

2111.3378.4

Université de Montréal

Neurogenèse de la respiration chez la lamproie

par

Bruno Martel

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Sciences neurologiques

Décembre, 2005

©, Bruno Martel, 2005



W

4

U58

2006

V. 066

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Neurogenèse de la respiration chez la lamproie

présenté par :

Bruno Martel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Vincent Castellucci
président-rapporteur

Dr. Réjean Dubuc
directeur de recherche

Dr. Arlette Kolta
codirecteur

Dr. Trevor Drew
membre du jury

RÉSUMÉ

Le réseau neuronal générant le rythme respiratoire chez la lamproie demeure inconnu. Cette étude a pour but de trouver une région potentiellement génératrice de rythme respiratoire tout en caractérisant le patron respiratoire. Le rythme respiratoire de la lamproie est composé de décharges de courte durée ($40,9 \pm 15,6$ ms) avec une fréquence de $1,0 \pm 0,3$ Hz. On retrouve également des décharges de longue durée ($506,3 \pm 174,6$ ms) qui reviennent avec une période moyenne de $37,4 \pm 24,9$ s. Des injections d'agonistes (AMPA) et d'antagonistes (CNQX ou AP5) des récepteurs glutamatergiques ont été effectuées sur différentes régions du rhombencéphale. Les injections de CNQX ou d'AP5 au niveau du pôle rostral du noyau moteur du trijumeau (V), région décrite dans la littérature comme potentiellement génératrice de rythme, ont permis de diminuer ou d'arrêter le rythme rapide de la respiration. Les injections d'AMPA dans la même région ont augmenté la fréquence du rythme rapide de la respiration et ont diminué la récurrence du rythme lent. L'activité enregistrée de façon extracellulaire dans cette région était synchronisée avec celle émanant des noyaux moteurs X. Suite à une lésion transverse effectuée caudalement au noyau moteur V, le rythme rapide n'a été enregistré qu'au niveau de la région rostrale alors que le rythme lent n'a été enregistré qu'au niveau des noyaux moteurs X. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la respiration normale dépend de neurones situés dans la région rostrale du rhombencéphale, alors que la partie caudale du rhombencéphale générerait les décharges de longue durée.

Mots clés: Respiration, générateur de rythme respiratoire, pons, bulbe rachidien

ABSTRACT

The brainstem network generating the respiratory rhythm in lampreys is unknown. This study was aimed at characterizing the patterns of respiratory activities in lampreys and to identify the location of the neural networks. The respiratory motor output consisted of short bursts (40.9 ± 15.6 ms) of discharges occurring at a frequency of 1.0 ± 0.3 Hz. The latter were interrupted by long bursts (506.3 ± 174.6 ms) of discharges recurring with an average period of 37.4 ± 24.9 s. Local injections of a glutamate agonist (AMPA) and antagonists (CNQX or AP5) were made over different regions in the brainstem to influence the respiratory motor output. A unilateral injection of AP5 or CNQX over a rostral rhombencephalic region, lateral to the rostral pole of the trigeminal motor nucleus, decreased the frequency of the fast respiratory rhythm or stopped it altogether. An injection of AMPA increased the fast respiratory rhythm and decreased the occurrence of long bursts. The activity recorded extracellularly in this area was synchronous with the motor activity recorded over the X motoneurons. Interestingly, a complete transverse section of the brainstem caudal to the trigeminal nucleus abolished the fast rhythm recorded in the X motoneurons, but not in the rostral area. Conversely, the slow activity persisted in the X motoneurons, but not in the rostral area after the transection. Our results support the hypothesis that normal breathing depends on the activity of neurons located in the rostral rhombencephalon in lampreys, whereas the caudal rhombencephalon generates the long bursts of discharges.

Key words: Respiration, respiratory rhythm generator, pons, medulla

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
<u>INTRODUCTION</u>	1
1. <u>La respiration chez les mammifères</u>	2
1.1 Les générateurs centraux de patron.....	2
1.2 Les neurones respiratoires.....	4
1.3 Les différents rythmes respiratoires.....	7
1.4 Structures de genèse et de contrôle du rythme respiratoire.....	11
1.4.1 Les structures du bulbe rachidien.....	11
1.4.2 Les structures pontiques.....	21
1.4.3 La moelle épinière.....	22
1.5 Rythmogenèse respiratoire.....	25
2. <u>La respiration chez la lamproie</u>	27
2.1 La respiration de la lamproie adulte.....	28
2.2 La respiration de la larve.....	30

2.3 Effet de la locomotion sur la respiration.....	32
3. <u>Le contrôle neuronal de la respiration chez la lamproie</u>.....	33
3.1 Les motoneurones respiratoires.....	33
3.2 Les GCPs respiratoires.....	35
3.3 Les expériences de lésion.....	37
3.3.1 Lésion médiane.....	38
3.3.2 Lésion transverse	39
3.3.3 Genèse du rythme rapide au niveau du pons.....	40
3.3.4 Genèse du rythme rapide au niveau du bulbe rachidien.....	41
3.3.5 Genèse du rythme rapide au niveau du pons et du bulbe rachidien.....	42
3.4 Effets de diverses drogues sur la respiration.....	45
3.5 Les hypothèses sur l'organisation du réseau neuronal de la respiration	46
3.5.1 L'hypothèse d'un générateur en colonne.....	46
3.5.2 L'hypothèse du double générateur.....	47
4. <u>Énoncé du problème</u>.....	50
 <u>ARTICLE</u>	52
Accord des coauteurs.....	53
Page titre.....	54
List of abbreviations.....	55
Abstract.....	56
Introduction.....	58

Experimental procedures.....	61
Results.....	65
Discussion.....	70
Acknowledgements.....	77
References.....	78
Figures legends.....	84
Figures.....	88
<u>DISCUSSION</u>	98
5. <u>Les deux rythmes respiratoires</u>	99
5.1 Le rythme rapide et le rythme lent de la respiration.....	99
5.2 Changements induits par l'isolation du cerveau de lamproie.....	102
6. <u>Interactions entre les deux rythmes</u>	102
7. <u>Localisation des deux générateurs de rythme</u>	104
7.1 Rythmogenèse par des réseaux au niveau du pons et du bulbe rachidien.....	104
7.2 Coordination entre les générateurs pontiques et bulbaires.....	105
7.3 Coordination entre les générateurs pontiques bilatéraux.....	106
7.4 Rythmogenèse bulbaire et pontique chez les autres animaux.....	108
8. <u>Mécanismes impliqués dans la rythmogenèse respiratoire</u>	109
8.1 Chez la lamproie.....	109
8.2 Chez les mammifères.....	110

9. Conclusion..... 111

 9.1 Représentation schématique..... 111

 9.2 Perspectives futures..... 114

BIBLIOGRAPHIE..... 116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau du mémoire de maîtrise

Tableau I: **Structures de genèse et de contrôle du rythme respiratoire.....** 23

LISTE DES FIGURES

Figures du mémoire de maîtrise

Figure 1: Les neurones respiratoires.....	6
Figure 2: Patrons respiratoires observés après diverses lésions du tronc cérébral.....	8
Figure 3: Représentation schématique des différentes régions impliquées dans le contrôle de la respiration.....	13
Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes de la respiration courante.....	29
Figure 5: Représentation schématique des différentes étapes de la respiration chez la larve.....	31
Figure 6 Représentation de l'innervation des branchies chez la lamproie.....	34
Figure 7: Effet d'une hémisection caudale au noyau moteur du trijumeau (V)	44
Figure 8: Représentation schématique du modèle du double générateur.....	49
Figure 9: Représentation schématique de l'organisation neuronale du système respiratoire de la lamproie.....	112

Figures de l'article

Figure 1: The two respiratory activities recorded in a semi-intact preparation with the respiratory apparatus attached.....	87
Figure 2: Quantification of the two respiratory rhythms.....	88

Figure 3: The relationship between the two rhythms examined in the semi-intact preparation before and after cutting the cranial nerves, to isolate the brainstem.....	89
Figure 4: Injections of AP5 in the rostro-lateral site.....	90
Figure 5: Quantification of the effects of AP5 and CNQX injections on the fast respiratory rhythm.....	91
Figure 6: Injections of AMPA in the rostro-lateral site.....	92
Figure 7: Quantification of the effects of AMPA injections on the fast and slow respiratory rhythms.....	93
Figure 8: The effects of brainstem lesions on the two respiratory activities....	94
Figure 9: Intracellular recording from a motoneuron in the X motor nucleus in the isolated brainstem.....	95
Figure 10: Effects of bath application of D-glutamate (500 μM) and AP5 (200 μM) on the slow respiratory rhythm recorded in the caudal half of the rhombencephalon after making a complete transverse section at the caudal end of the V motor nucleus.....	96

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPA :	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AP5 :	Acide D,L-amino-5-phosphonopentanoïque
CNQX :	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
GCP :	Générateur central de patron
IX :	Glossopharyngien
V :	Trijumeau
VII :	Facial
X :	Vague

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont tout d'abord adressés au Dr. Réjean Dubuc pour m'avoir accepté en tant qu'étudiant dans son laboratoire. Malgré le fait que le Dr. Réjean Dubuc est souvent très occupé je tiens à le remercier d'avoir su m'accorder du temps de qualité afin de discuter de mes travaux de recherche. Je tiens également à le remercier d'avoir bien voulu m'aider à écrire mon premier article scientifique et de m'avoir fait partager sa grande expertise en ce domaine. Finalement, je me considère très chanceux d'avoir pu compléter ma maîtrise dans son laboratoire. Merci sincèrement pour tout.

Je remercie également le Dr. Arlette Kolta d'avoir bien voulu devenir ma codirectrice et, avec qui, j'ai eu la chance d'entretenir une très bonne relation professionnelle. Je la remercie également pour son aide, fort appréciée, lors de la rédaction de mon mémoire de maîtrise ainsi que pour ses commentaires concernant mon article scientifique.

Je me dois également de mentionner la contribution et l'aide que m'a fournies Jean-Charles Guimond. J'ai eu beaucoup de plaisir à le côtoyer l'instant d'un été et je suis certain qu'il en a été de même pour lui. Je suis très heureux d'avoir pu débiter mes recherches en tant que coéquipier de Jean-Charles, qui est devenu par la suite un très bon ami.

Je tiens également à remercier tous les étudiants et les membres du laboratoire du Dr. Réjean Dubuc que j'ai côtoyés durant mes études. Merci grandement pour cette magnifique ambiance plaisante et conviviale qui règne au laboratoire. Merci également pour l'aide et le support que vous avez pu me fournir durant ces deux années. Je retiens une pensée spéciale à Danielle Veilleux qui m'a fourni une aide technique appréciable et qui m'a aidé lors de la rédaction de mon mémoire. Je suis également reconnaissant envers Johannie Gravel, Karine Fénelon, Myriam Antri et François Auclair qui m'ont aidé dans mes recherches et qui m'ont fait part de leurs commentaires pertinents. J'ai également eu du plaisir à travailler avec Jean-François Gariépy qui possède une motivation contagieuse pour la recherche. Je remercie également Frédéric Bernard pour son aide précieuse et fort appréciée lors de la création de certaines images de mon article scientifique. Merci à Christian Valiquette pour son support technique avec les ordinateurs et pour la création d'excellents programmes d'analyse.

Je désire également exprimer ma gratitude envers Joanne Payette pour l'aide apportée au niveau administratif. Elle a su bien m'encadrer et me renseigner face à toutes les procédures qu'un étudiant de maîtrise doit suivre pour déposer son mémoire.

Introduction

1. La respiration chez les mammifères

Chez les mammifères, les contractions rythmiques du diaphragme et des muscles intercostaux permettent de garder un taux sanguin élevé d'oxygène et d'excréter du dioxyde de carbone (Taylor et al., 1999). Les motoneurones innervant les muscles respiratoires sont situés à différents niveaux de la moelle épinière. Les motoneurones phréniques innervant le diaphragme sont situés entre les segments C₃ et C₆ (Berger, 1979; Cameron et al., 1983; Gordon et Richmond, 1990), les motoneurones innervant les muscles intercostaux sont situés entre les segments T₁ et T₁₂ (Lipski et Martin-body, 1987), alors que les motoneurones innervant les muscles abdominaux sont situés entre les segments T₄ et L₃ (Miller et Wilson, 1983).

1.1 Les générateurs centraux de patron

La respiration chez les mammifères repose sur un réseau neuronal localisé dans le tronc cérébral (Pitts et al., 1939; Hoff et Breckenridge, 1949; Wang et al., 1957; Aoki et al., 1980; St-John et al., 1981; Rekling et Feldman, 1998; Butera et al., 1999; Gray et al., 1999; Koshiya et Smith, 1999; Naohiro et Smith, 1999; St-Jacques et St-John, 1999; Diethelm et Spyer, 2001; Mutolo et al., 2002). Le rythme respiratoire est déterminé de façon intrinsèque bien que les afférences sensorielles peuvent moduler le rythme respiratoire et ainsi adapter la respiration à diverses situations. Des structures externes au tronc cérébral affectent donc la respiration. Cependant, elles ne sont pas essentielles au réseau de la respiration puisque leur retrait n'élimine pas le rythme respiratoire (Bianchi et al., 1995).

Plusieurs parties du système nerveux produisent des patrons rythmiques sans que les influx sensoriels ne soient impliqués. Ces circuits neuraux qui produisent eux-mêmes les patrons rythmiques par leur propriété intrinsèque et leur interaction synaptique correspondent aux générateurs centraux de patron, couramment appelé les GCPs (Delcomyn, 1980). La locomotion, la déglutition et la mastication se caractérisent par une séquence temporelle complexe d'activation des muscles qui est produite par un réseau de cellules nerveuses, les GCPs, situé dans le cerveau ou la moelle épinière selon le comportement moteur. La lamproie a été le premier vertébré où les détails des connexions neuronales d'un GCP ont été caractérisés (Buchanan et Grillner, 1987). L'activation alternée des neurones moteurs situés de chaque côté des différents segments de la moelle épinière correspond au mouvement ondulatoire de la nage chez la lamproie (Grillner et al., 1987). Chaque segment possède un réseau capable de générer l'activité rythmique résultant de l'activité neuronale des deux côtés (Grillner et al. 1995). Cependant, ces fonctions rythmiques sont discontinues alors que le rythme respiratoire se doit d'être continu.

Le GCP respiratoire élabore un patron de décharge périodique durant toute la durée de vie. Certains neurones du GCP respiratoire possèdent des propriétés d'oscillations intrinsèques en l'absence de stimulation provenant de l'extérieur (Smith et al., 1991). Ces neurones endogènes, dits pacemakers, dictent la fréquence de base du rythme généré. Cependant, l'emplacement exact d'un GCP respiratoire chez les mammifères reste incertain (Smith et al., 1991; Gray et al., 1999).

La respiration volontaire requiert le cerveau antérieur alors que la respiration involontaire, autonome, requiert le tronc cérébral. Le système nerveux central reçoit de l'information par les voies afférentes chimiosensibles, pulmonaires et proprioceptives afin de moduler le rythme respiratoire essentiel à l'homéostasie (Aminoff et Sears, 1971). La respiration peut donc être modulée par différents stimuli.

1.2 Les neurones respiratoires

Les réseaux neuronaux permettent le rythme respiratoire à l'aide de décharges correspondant à l'inspiration ou à l'expiration. La phase expiratoire peut être divisée en deux phases : la phase post-inspiratoire et la phase expiratoire (Richter, 1982; Richter et al., 1992). La phase post-inspiratoire est également référée comme étant la phase de transition entre l'inspiration et l'expiration (phase de transition I-E) (Hilaire et Pásaro, 2003). On retrouve plusieurs sous-catégories de neurones, associées aux phases inspiratoires, post-inspiratoires et expiratoires, qui se distinguent par leur patron de décharge et par la période de temps où la fréquence de décharge est maximale (Fig. 1) (Cohen, 1979).

On retrouve des neurones (Pre-I) qui déchargent uniquement au début de la phase inspiratoire et à la fin de la phase expiratoire. Il y a des neurones qui déchargent de façon maximale (Early-I) au début de la phase inspiratoire. Il y a également des neurones inspiratoires à fréquence de décharge croissante (I Aug ou I) qui s'activent de façon maximale durant la fin de la phase inspiratoire. On retrouve également des neurones (Late-I) qui subissent une repolarisation au début d'une décharge phrénique pour se dépolariser et

se décharger à la fin de la phase inspiratoire. Ces neurones auraient un rôle à jouer dans l'arrêt de la phase inspiratoire (Cohen et al., 1993). Des neurones avec une décharge maximale (Post-I ou Early-E) au début de la phase de transition ont également été remarqués. Il y a aussi des neurones (E aug ou E) qui déchargent de façon croissante seulement durant la deuxième phase de l'expiration (Bianchi et al., 1995).

Ces six sous-groupes de neurones se retrouvent dans le bulbe rachidien (Vibert et al., 1976; Hilaire et Pásaro, 2003). Il est suggéré que les neurones pré-inspiratoires (Pre-I) fassent partie du GCP respiratoire et qu'ils auraient comme rôle de terminer la phase expiratoire et de débiter la phase inspiratoire (Richter et al., 1992). D'autres neurones avec des fréquences de décharges maximales durant la transition inspiration-expiration (Post-I ou Early-E) sont retrouvés principalement dans le pons mais également au niveau du mésencéphale, du thalamus et de l'hypothalamus (Bertrand et al., 1973; Kastella et al., 1974; Vibert et al., 1979; Orem et Netick, 1982).

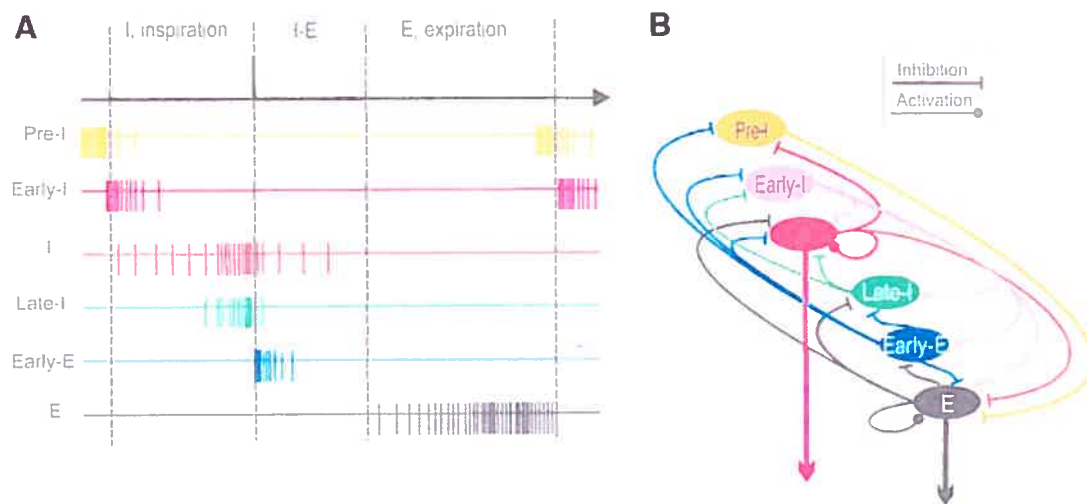


Figure 1 : Les neurones respiratoires. **A** : Représentation des patrons de décharges des six types de neurones durant la phase inspiratoire (**I**), la phase post-inspiratoire ou phase de transition entre l'inspiration et l'expiration (**I-E**) et la phase expiratoire (**E**). **B** : Représentation schématique d'un modèle de l'interaction entre les six types de neurones. Ce réseau fonctionne principalement à l'aide de synapses inhibitrices. (Adapté d'Hilaire et Pásaro, 2003)

1.3 Les différents rythmes respiratoires

Le terme d'eupnée réfère à la respiration normale permettant les échanges gazeux (Lumsden, 1923) et est caractérisée par la période de remplissage et d'évacuation de l'air des poumons (St-John, 1998; St-John et Paton, 2004). L'eupnée représente l'activité respiratoire principale générée par les neurones du pons et du bulbe rachidien (St-John, 1998). Lorsque des portions du tronc cérébral sont enlevées par des lésions rostro-caudales progressives, on remarque des changements dans l'activité respiratoire enregistrée (Fig. 2) (Lumsden, 1923). Une lésion effectuée au niveau rostral du mésencéphale, permet encore d'enregistrer de l'eupnée. L'apneusis est obtenue suite à une lésion dans la partie rostrale du pons (Lumsden, 1923) chez le chien et le lapin mais pas chez le rat et le cochon d'inde (Wang et al., 1993; St-John et Paton, 2004). Une lésion à la jonction bulbo-pontique permet finalement d'obtenir l'halètement (Lumsden, 1923). L'apneusis a un rythme plus lent que l'eupnée et est caractérisée par une décharge composée d'un plateau (Haji et al., 2000). L'halètement est défini comme un effort inspiratoire habituellement maximal et spasmodique. L'halètement peut être rythmique ou irrégulier (Haji et al., 2000).

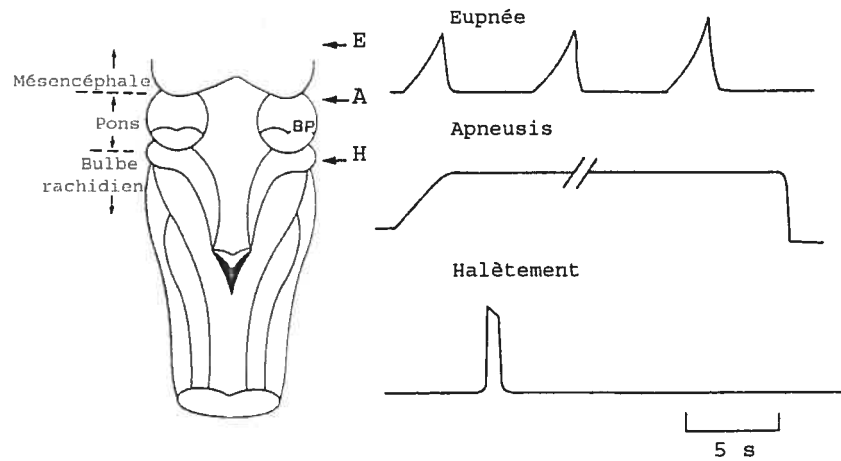


Figure 2 : Patrons respiratoires observés après diverses lésions du tronc cérébral. L'eupnée est encore enregistrée suite à une lésion effectuée au niveau rostral du mésencéphale (Niveau E). L'apneusis est enregistrée après une lésion effectuée au niveau rostral du pons (Niveau A). L'halètement est enregistré après une lésion effectuée à la jonction bulbo-pontique (Niveau H). BP : Brachium Pontique. (Adapté de St-John, 1996)

Les expériences de lésion du tronc cérébral suggèrent que des structures pontiques, désignées sous l'appellation de centre pneumotaxique, soient impliquées afin de maintenir un patron de décharges respiratoires normales, c'est-à-dire l'eupnée. Le centre pneumotaxique a premièrement été situé au niveau de la partie rostrale du pons (Lumsden, 1923). Plus récemment, des études de lésions et de stimulations ont permis de localiser de façon plus précise le centre pneumotaxique dans la région parabrachiale au niveau dorsolatéral et rostral du pons (Tang, 1953; Ngai et Wang, 1957; von Euler et al., 1976). Le centre apneustique et le centre d'halètement correspondent aux régions isolées permettant l'enregistrement respectif de l'apneusis et de l'halètement (Gromysz, 1984). Certains auteurs pensent que les décharges inspiratoires qui émanent du centre apneustique sont périodiquement inhibées par des signaux provenant du centre pneumotaxique (Gromysz, 1984), ce qui ferait de l'eupnée le patron principal de décharge enregistré. La conception d'un centre pneumotaxique responsable de la genèse de l'eupnée fait partie de l'hypothèse du « Multicentre » qui stipule que différentes régions ou différents mécanismes neuronaux sont responsables de la neurogenèse de l'eupnée, de l'apneusis et de l'halètement (Lumsden, 1923). À l'opposé de cette hypothèse, certains chercheurs pensent que l'eupnée, l'apneusis et l'halètement sont en fait différentes variantes d'un simple rythme respiratoire. C'est l'hypothèse du « Noyau » (Rekling et Feldman, 1998; St-John, 1998).

Fait intéressant, il est possible d'observer la transition des rythmes respiratoires de l'eupnée à l'apneusis à l'halètement sous des conditions d'anoxie et d'asphyxie chez des chiens et des singes néonataux *in vivo* (Guntheroth et Kawabori, 1975). La présence de

l'halètement est accompagnée d'une activité musculaire permettant l'inspiration (St-John, 1996). Cette activité respiratoire est perçue comme un mécanisme important de survie en cas d'anoxie ou d'asphyxie jusqu'au retour de l'oxygène. L'eupnée redevient présente lorsque l'air est à nouveau accessible (St-John, 1996).

La toux est un réflexe induit par la stimulation des récepteurs des voies respiratoires centrales et fournit la force d'expiration nécessaire afin d'enlever du mucus ou des particules au niveau du larynx, de la trachée et des bronches (Shannon et al., 1996; Pantaleo et al., 2002). Il est suggéré que le complexe Bötzinger et le groupe respiratoire ventral caudal aient un rôle dans la configuration du patron moteur de la toux pour les muscles inspiratoires et expiratoires (Oku et al., 1994; Pantaleo et al., 2002). Les différents rôles du complexe Bötzinger dans la respiration seront discutés dans la prochaine section.

1.4 Structures de genèse et de contrôle du rythme respiratoire

1.4.1 Les structures du bulbe rachidien

Au niveau du bulbe rachidien, les neurones respiratoires seraient plus densément concentrés dans deux régions anatomiquement distinctes: le groupe respiratoire ventral (VRG) et le groupe respiratoire dorsal (DRG) (Fig. 3) (Speck et Feldman, 1982).

Le groupe respiratoire dorsal

Les neurones du groupe respiratoire dorsal (DRG) constituent en fait la division ventrolatérale du noyau du tractus solitaire (NTS) (Bianchi, 1971). La majorité des neurones du DRG possèdent des patrons de décharge correspondant à la phase inspiratoire (von Euler, 1983; Berger et al., 1984; Otake et al., 1989). Certains auteurs affirment qu'il y aurait des neurones expiratoires dans le DRG (Feldman et Cohen, 1978). Au niveau intracellulaire, personne n'a pu démontrer la présence de neurones expiratoires dans le DRG. Les auteurs ont alors conclu que les activités expiratoires enregistrées de façon extracellulaire dans le DRG proviendraient d'axones (Berger et al., 1984; Grélot et al., 1989). Des études morphologiques ont par la suite confirmé cette hypothèse, à l'effet que des axones des motoneurones vagues passaient dans cette région (Grélot et al., 1988; Grélot et al., 1989; Barillot et al., 1990). Une activité semblant être reliée à la respiration a également été décrite dans la partie médiane du noyau du tractus solitaire (NTS) à l'extérieur du groupe respiratoire dorsal (DRG) (Pantaleo et Corda, 1986; Otake et al.,

1989). Les chercheurs suggèrent que des études intracellulaires devront être faites afin de savoir si cette activité provient d'un corps cellulaire ou bien d'un axone. Le DRG n'est cependant pas considéré comme essentiel à la genèse du rythme respiratoire (Speck et Feldman, 1982; Speck et Beck, 1989; Richter et Spyer, 2001). En effet, la respiration persiste après la destruction des neurones du DRG (Speck et Feldman, 1982).

Le groupe respiratoire ventral

Le groupe respiratoire ventral (VRG) correspond à une colonne bilatérale de neurones s'étendant de la moelle épinière cervicale (C₁) jusqu'au noyau facial dans l'aire tegmentaire (Bianchi, 1971; von Euler, 1983). Le VRG est considéré comme essentiel à la genèse du rythme respiratoire (Richter et Spyer, 2001). Une lésion transverse du tronc cérébral suggère que chaque colonne de neurones est capable de générer un rythme respiratoire, puisque chaque région isolée par la lésion est capable de rythmogenèse (Gromysz et Karczewski, 1984). Le VRG peut être subdivisé en trois parties: la partie caudale (cVRG), la partie intermédiaire (iVRG) et la partie rostrale (rVRG) (Kalia, 1981).

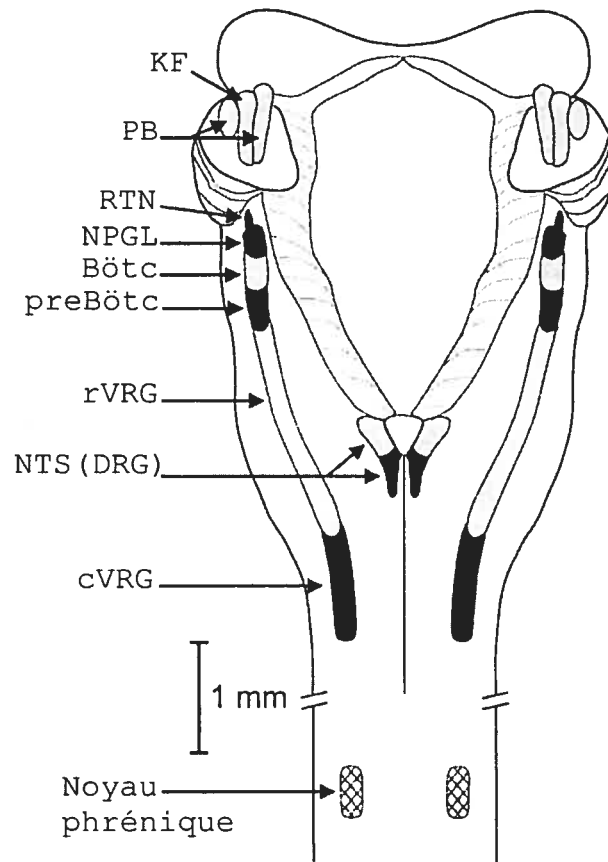


Figure 3 : Représentation schématique des différentes régions impliquées dans le contrôle de la respiration. **BötC** : Complexe Bötzing; **cVRG** : Groupe respiratoire ventral caudal; **DRG** : Groupe respiratoire dorsal; **KF** : Noyau Kölliker-Fuse; **NTS** : Noyau du tractus solitaire; **PB** : Noyau parabrachial; **NPGL** : Noyau réticulaire paragigantocellulaire; **preBötC** : Complexe préBötzing; **RTN** : Noyau rétrotrapézoïde; **rVRG** : Groupe respiratoire ventral rostral. (Adapté de Dobbins et Feldman, 1994)

Le groupe respiratoire ventral caudal

Le cVRG, qui correspond exactement au groupe respiratoire ventral caudal de Feldman (Feldman et Cohen, 1978), s'étend de la frontière séparant la moelle épinière et le bulbe rachidien jusqu'au niveau de l'obex. Le cVRG est également appelé par certains auteurs le noyau rétroambigu (NRA) (Merrill, 1970). Cette région contient une forte concentration de neurones expiratoires qui se retrouvent densément dans la partie latérale du bulbe rachidien. Quelques neurones inspiratoires seraient également entremêlés dans la majorité de neurones expiratoires (Arita et al., 1987). La destruction de cette région n'abolit cependant pas le rythme respiratoire, suggérant que cette région ne soit pas le principal site de rythmogenèse respiratoire (Rekling et Feldman, 1998).

Le groupe respiratoire ventral intermédiaire

L'iVRG, qui correspond de façon identique au groupe respiratoire ventral rostral de Feldman (Feldman et Cohen, 1978), est localisé dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien au même niveau rostro-caudal que le DRG. L'iVRG est situé de façon caudale par rapport au complexe préBötzinger et de façon rostrale par rapport au cVRG. L'iVRG inclut des régions du noyau ambigu (NA) ainsi que du noyau para-ambigu. Dans la région du noyau ambigu, on retrouve des motoneurones innervant les muscles laryngés et pharyngés (Nunez-abades et al., 1992). Ces motoneurones possèdent des décharges reliées tant à l'inspiration qu'à l'expiration mais ne font pas partie du GCP respiratoire (Grélot et al., 1988; Grélot et al., 1989; Barillot et al., 1990). Le noyau para-ambigu contient des

prémotoneurones innervant les muscles respiratoires thoraciques. On retrouve également des neurones respiratoires propriobulbaires en faible quantité dans l'iVRG (Dobbins et Feldman, 1994).

Le rVRG et le complexe Bötzing

Le rVRG inclut la portion rostrale du NA et est situé proche du noyau rétrofacial (NRF) (von Euler, 1983). On y retrouve également des interneurones respiratoires qui projettent vers le bulbe rachidien caudal et la moelle épinière (Bianchi et Barillot, 1982; Bystrzycka, 1980). Certains de ces interneurones ont une fréquence de décharge qui augmente seulement durant la deuxième phase de l'expiration (E aug ou E). Ces neurones sont référés collectivement comme étant le complexe Bötzing, selon la nomenclature de Feldman (Feldman et Cohen, 1978)

D'autres chercheurs n'adoptent pas cette terminologie car ils considèrent le complexe Bötzing comme faisant partie du VRG pour diverses raisons. Premièrement, le complexe Bötzing est une entité fonctionnelle plutôt qu'anatomique et deuxièmement on y retrouve d'autres types d'interneurones, tels des interneurones inspiratoires et des interneurones de type Early-E, ainsi que des motoneurones pharyngés (Bianchi et Barillot, 1982). Le complexe Bötzing ne semble pas être le site de genèse du rythme respiratoire mais semble plutôt être important afin de recevoir des influx des chimiorécepteurs (Mutolo et al., 2002). Il est également mentionné que le complexe Bötzing puisse faire partie d'un réseau générateur de la toux (Shannon et al., 1996; Pantaleo et al., 2002). Le complexe

Bötzinger contient également le plus grand nombre de neurones inspiratoires bulbosпинаux et propriobulbaires qui fournissent la décharge inspiratoire primaire aux motoneurones respiratoires spinaux (Ellenberger et Feldman, 1989; Smith et al., 1991).

Globalement, le rVRG contient des motoneurones pharyngés (Grélot et al., 1988; Grélot et al., 1989) ainsi que des connections réciproques avec d'autres structures respiratoires telles le noyau Kölliker-Fuse, le noyau parabrachial latéral, le noyau paragigantocellulaire et le noyau du tractus solitaire. Ces connections sont importantes pour la genèse du rythme respiratoire ainsi que pour la coordination du système respiratoire avec le système cardiovasculaire (Ellenberger et Feldman, 1989). En effet, plusieurs structures (noyau du tractus solitaire, noyau Kölliker-Fuse, noyau parabrachial) communicantes avec le rVRG sont également impliquées dans le contrôle central du système cardiovasculaire.

Le complexe préBötzinger

Le complexe préBötzinger est situé dans la partie rostroventrale du bulbe rachidien. Il est rostral au rVRG, selon la nomenclature de Feldman, et caudal au complexe Bötzinger (Fig. 3) (Johnson et al., 1994). Cette région a été identifiée et nommée par des physiologistes qui ont remarqué que les décharges rythmiques de cette région précédaient dans le temps les décharges enregistrées dans d'autres sites (Smith et al., 1991). Le complexe préBötzinger contient beaucoup de neurones inspiratoires et expiratoires ainsi que des cellules pacemakers connectées par des synapses glutamatergiques (Smith et al., 1991; Johnson et al., 1994; St-John, 1996; St-John, 1998; Koshiya et Smith, 1999; Thoby-

Brisson et Ramirez, 2001). Ce complexe contient peu de neurones bulbospinaux mais beaucoup de neurones propriobulbaires (Rekling et Feldman, 1998). Plusieurs études considèrent cette région comme étant le site de genèse du rythme respiratoire (Smith et al., 1991; Rekling et Feldman, 1998; Gray et al., 1999; Lieske et al., 2000; Rekling et al., 2000).

Des applications locales de substance P, un agoniste des récepteurs NK1, au niveau du complexe préBötzinger ont permis d'augmenter la fréquence des signaux respiratoires endogènes (Gray et al., 1999). L'injection de cette drogue aurait pu affecter la fréquence respiratoire en agissant directement sur des neurones rythmiques du complexe préBötzinger ou en agissant indirectement sur d'autres neurones du complexe préBötzinger, qui eux fournissent des signaux modulateurs au générateur de rythme (Gray et al., 1999). Puisque les neurones NK1R du complexe préBötzinger expriment les récepteurs au glutamate VGLUT2 (Guyenet et al., 2002) et sont immuno-réactifs pour le glutamate (Liu et al., 2001), il est suggéré que ces neurones soient excitateurs (Gray et al., 1999). Il a été démontré que la destruction des neurones NK1R du complexe préBötzinger entraîne un patron respiratoire ataxique. Ce patron respiratoire est caractérisé par une séquence irrégulière de décharges inspiratoires d'amplitude normale entremêlée de périodes prolongées de décharges inspiratoires de faible amplitude (Gray et al., 2001). Il est suggéré que les neurones NK1R soient nécessaires à la genèse respiratoire normale (Feldman et al., 2003).

Des études *in vivo* chez des chats anesthésiés ont permis de suggérer l'importance du complexe préBötzinger dans la genèse du rythme respiratoire. En effet, des injections pharmacologiques locales au niveau du complexe préBötzinger ont permis d'abolir l'eupnée (Abrahams et al., 1991; Koshiya et Guyenet, 1996). L'ablation de neurones du complexe préBötzinger a également permis d'éliminer l'eupnée enregistrée *in vitro* chez le rat (Funk et al., 1993). À l'opposé, divers auteurs dénotent plusieurs incohérences dans les résultats obtenus lors de l'ablation du complexe préBötzinger. Par exemple, des injections d'une substance neurotoxique au niveau du complexe préBötzinger n'ont pas éliminé l'eupnée chez les rats néonataux (Huang et al., 1997). Dans certains cas, l'apnée produite par l'ablation du complexe préBötzinger chez le rat est réversible et l'on peut observer un retour de l'eupnée (St-Jacques et St-John, 1999). Il est mentionné que si l'activité neuronale du complexe préBötzinger était la source exclusive de l'eupnée, la destruction de ce site devrait produire une apnée permanente (St-Jacques et St-John, 1999).

Une coupe en tranche du bulbe rachidien incluant le complexe préBötzinger est capable de générer un rythme que les chercheurs croient apparenté à l'eupnée (Smith et al., 1991; Connelly et al., 1992; Johnson et al., 1994). Les études utilisant des tranches permettent d'étudier un circuit en l'absence d'influence extrinsèque. Conséquemment, il est difficile de prédire si le rythme observé sur une tranche est représentatif de celui retrouvé sur un animal intact (Ramirez et al., 2002). Certaines chercheurs pensent que l'activité rythmique enregistrée sur une tranche du bulbe rachidien contenant le complexe préBötzinger diffère de l'eupnée *in vivo* et qu'elle s'apparente plutôt à de l'halètement (St-John, 1996; St-John, 1998). Ils considèrent que le complexe préBötzinger serait plutôt

important afin de générer l'halètement et que les décharges rythmiques durant l'eupnée seraient le résultat d'un circuit neuronal médullo-pontique (St-John, 1996; St-John et Paton, 2004). Le centre pneumotaxique et le complexe préBötzinger pourraient faire partie de ce circuit (St-John, 1996). Cependant, ceux qui stipulent que le complexe préBötzinger est le site de neurogenèse pour l'eupnée, argumentent que des lésions électrolytiques de l'aire tegmental latéral au niveau dorsomédial du noyau ambigu permettent d'abolir l'halètement sans affecter l'eupnée (Fung et al., 1994; St-John, 1996), et que St-John et ses collègues (Fung et al., 1994; St-John, 1996) ne font justement pas de distinction entre l'aire tegmental latéral au niveau dorsomédial du noyau ambigu et le complexe préBötzinger, qui est ventral et ventromédial par rapport au noyau ambigu.

Plusieurs hypothèses sont donc formulées quant au rôle du complexe préBötzinger dans la rythmogenèse respiratoire. Les différentes hypothèses semblent être bien appuyées par des résultats plausibles. Il est difficile, face à toutes ces contradictions, d'appuyer une hypothèse au détriment d'une autre. Il est donc important d'étudier la rythmogenèse respiratoire à partir de modèles expérimentaux plus simples dont le tronc cérébral entier peut être maintenu en condition intacte *in vitro* tout en générant le rythme respiratoire.

Autres structures du bulbe rachidien

Des études anatomiques utilisant le transport rétrograde suggèrent que la partie caudale du noyau réticulaire paragigantocellulaire latéral (NPGL) fasse partie d'un GCP respiratoire (von Euler, 1983). Les neurones du NPGL sont situés dans la partie

ventrolatérale du bulbe rachidien. Cependant, les neurones du NPGL ne semblent pas être compris dans le complexe préBötzinger. Le noyau rétrotrapézoïde (RTN), qui est situé au niveau de la surface ventrale du bulbe rachidien rostral et qui projette vers le DRG et le VRG, semble tout comme le NPGL fournir les substrats neuronaux qui affectent des neurones contrôlant la respiration (Smith et al., 1989).

1.4.2 Les structures pontiques

Diverses études d'électrophysiologie ont démontré la présence de plusieurs neurones avec une activité respiratoire dans la région rostrale du pons. Ces neurones se retrouvent principalement dans le noyau Kölliker-Fuse (KF) ainsi que dans le noyau parabrachial médian (PBM) (Cohen et Wang, 1959; Bertrand et Hugelin, 1971; Bianchi et St-John, 1982). Ces deux régions sont également désignées sous l'appellation de groupe respiratoire pontique (PRG) ou de centre pneumotaxique (von Euler, 1983; Hilaire et Pásaro, 2003). Le noyau Kölliker-Fuse et le noyau parabrachial médian seraient nécessaires afin de maintenir l'eupnée comme patron de décharges respiratoires normales (Bertrand et Hugelin, 1971; St-John, 1996). Certains chercheurs pensent que le centre pneumotaxique est essentiel à l'expression de l'eupnée (St-John et Paton, 2004). En effet, le pons est capable de générer une activité rythmique en l'absence de connections avec le bulbe rachidien (St-John, 1998; St-John et Paton, 2004). Cependant, le rôle de ces neurones pontiques rythmiques dans la respiration reste à déterminer (Alheid et al., 2004). Une étude démontre qu'en l'absence d'innervation périphérique les neurones du centre pneumotaxique permettent la fin de la phase inspiratoire qui coïncide avec l'augmentation de leur fréquence de décharge (Feldman et al., 1976). La terminaison de la phase inspiratoire est justement une étape importante dans la genèse du rythme respiratoire (Haji et al., 2000).

Une autre hypothèse suggère que les neurones pontiques serviraient plutôt d'intermédiaires afin de transmettre le signal des décharges respiratoires émanant du bulbe

rachidien vers des structures telles que le mésencéphale, le diencéphale et l'amygdale. Les neurones pontiques pourraient également permettre d'ajuster le rythme respiratoire face à des informations périphériques tel un changement de température (Kastella et al., 1974; Vibert et al., 1979).

1.4.3 La moelle épinière

Des neurones respiratoires de type inspiratoire ont été enregistrés dans la moelle épinière cervicale, au niveau des segments C₁ à C₃ (Aoki et al., 1980). Cette région est également considérée comme la continuation caudale du VRG (Aoki et al., 1980). Cette région pourrait servir de relai des récepteurs périphériques et du tronc cérébral vers les motoneurones respiratoires (Bianchi et al., 1995).

Tableau I - Structures de genèse et de contrôle du rythme respiratoire

<u>Structures</u>	<u>Fonctions</u>
1) Structures pontiques	
Noyau Köllifer-Fuse (KF) et noyau parabrachial médian (PBM)	<ul style="list-style-type: none"> • ces deux régions sont désignées sous l'appellation de centre pneumotaxique • certains chercheurs pensent que ces structures sont essentielles à l'expression de l'eupnée
2) Structures du bulbe rachidien	
Noyau réticulaire paragigantocellulaire latéral (NPGL) et noyau rétrotrapézoïde (RTN)	<ul style="list-style-type: none"> • fournir les substrats neuronaux qui affectent des neurones contrôlant la respiration
Complexe Bötzinger	<ul style="list-style-type: none"> • important pour recevoir les influx des chimiorécepteurs • pourrait faire partie d'un réseau générateur de la toux chez les mammifères • non essentiel à la genèse du rythme respiratoire
Complexe préBötzinger	<ul style="list-style-type: none"> • controversé quant au rôle joué par le complexe préBötzinger • certaines études suggèrent l'importance du complexe préBötzinger dans la genèse du rythme respiratoire • certains chercheurs considèrent que le complexe préBötzinger serait plutôt important afin de générer l'halètement

Groupe respiratoire ventral intermédiaire (iVRG)	<ul style="list-style-type: none"> • contient des motoneurones possédant des décharges reliées tant à l'inspiration qu'à l'expiration
Groupe respiratoire ventral caudal (cVRG)	<ul style="list-style-type: none"> • contient une forte concentration de neurones expiratoires ainsi que quelques neurones inspiratoires • non essentiel à la genèse du rythme respiratoire
DRG	<ul style="list-style-type: none"> • patron de décharge correspondant à la phase inspiratoire • non essentiel à la genèse du rythme respiratoire
3) Moelle épinière	
Segments C ₁ à C ₃	<ul style="list-style-type: none"> • enregistrement de neurones de type inspiratoire • pourrait servir de relai des récepteurs périphériques et du tronc cérébral vers les motoneurones respiratoires

1.5 Rythmogenèse respiratoire

L'hypothèse « pacemaker » stipule qu'un noyau de neurones avec des propriétés de décharge intrinsèque est essentiel afin de générer l'activité rythmique, qui est par la suite retransmise à d'autres neurones respiratoires (Feldman et Smith, 1989; Smith et al, 1991; Rekling et Feldman, 1998; Butera et al., 1999; Koshiya et Smith, 1999). Deux mécanismes sont proposés afin d'expliquer les propriétés rythmiques des neurones pacemakers retrouvés au niveau du complexe préBötzinger. Il a été mentionné que les courants sodiques persistants (I_{NaP}) sont exprimés de façon ubiquitaire par les neurones inspiratoires du complexe préBötzinger et permettent l'activité dite « pacemaker » avec un niveau approprié de conductance, telles les conductances sodiques persistants (g_{NaP}) et les conductances de fuite (g_{Leak}) (Ballanyi et al., 1999; Butera et al., 1999; Del Negro et al., 2002). L'autre mécanisme semble dépendre des courants calciques (I_{Ca}) et des courants cationiques non spécifiques activés par le calcium (I_{CAN}) (Thoby-Brisson et Ramirez, 2001; Pena et al., 2004). Cependant, des études ont démontré que le blocage pharmacologique des courants I_{NaP} et I_{CAN} peut arrêter le rythme respiratoire mais qu'il est possible de le raviver en augmentant l'excitabilité neuronale avec de la substance P (Del Negro et al., 2005). Face à ces résultats, il est suggéré que le rythme respiratoire enregistré à partir de tranches ou sur un animal intact ne serait pas d'origine pacemaker mais émergerait plutôt lorsque les neurones seraient suffisamment excités (Del Negro et al., 2005). Certains croient que l'hypothèse du « groupe pacemaker » (Rekling et al., 1996; Rekling et Feldman, 1998; Rekling et al., 2000) serait plus appropriée que l'hypothèse « pacemaker » afin d'expliquer ces résultats. Dans le modèle du « groupe pacemaker », les neurones pacemakers sont

incorporés dans le processus de genèse respiratoire plutôt que d'être considérés comme essentiels. (Del Negro et al., 2005).

Puisque la localisation du générateur de rythme ainsi que les mécanismes de rythmogenèse ne sont pas parfaitement connus et sont encore sources de plusieurs contradictions chez les mammifères, l'utilisation de modèles animaux plus simples permettant l'expérimentation sur des cerveaux entiers *in vitro* pourrait s'avérer utile.

2. La respiration chez la lamproie

L'eau contient moins d'oxygène que l'air car la diffusion de l'oxygène y est beaucoup plus restreinte. Par conséquent, les poissons ont de larges surfaces de branchies pour faciliter les échanges gazeux et possèdent un bon système de ventilation pour y expulser l'eau (Rovainen, 1977). Il est également possible de remarquer des similarités entre le système respiratoire des poissons avec celui des mammifères, puisque le rythme respiratoire des poissons est généré par le système nerveux central et est modifié par des mécanorécepteurs périphériques ainsi que par des chimiorécepteurs.

La lamproie est un vertébré aquatique de la famille des agnathes. Il est justement possible de relever plusieurs ressemblances entre la lamproie et les autres espèces de poisson quant à la physiologie de fonctionnement des motoneurones, l'organisation du générateur central de patron et le feedback sensoriel (Hardisty et Potter, 1972). La lamproie possède plusieurs avantages pour l'étude neurophysiologique de la respiration chez les vertébrés. En effet, le contrôle neuronal de la respiration chez la lamproie est comparativement plus simple (Russell, 1986) et les volumes respiratoires chez la larve sont facilement mesurables (Rovainen, 1977). Un cerveau isolé de lamproie continue à produire des décharges de type respiratoire enregistrées à partir des noyaux moteurs VII, IX et X ou des nerfs périphériques correspondants (Guimond et al., 2003). Les motoneurones respiratoires sont facilement accessibles pour y effectuer des enregistrements intracellulaires (Rovainen, 1974; Guimond et al., 2003), tout comme différents types de

neurones au niveau de la moelle épinière (Grillner et al., 1987) et du tronc cérébral (Brocard et Dubuc, 2003; Le Ray et al., 2003; Le Ray et al., 2004).

2.1 La respiration de la lamproie adulte

Les lamproies adultes respirent par sept pores branchiaux situés de chaque côté du corps. À chaque pore branchial correspond un panier branchial (panier cartilagineux enrobant les cavités branchiales) associé aux muscles branchiaux. Les muscles branchiaux se contractent avec un délai rostro-caudal causant un affaissement des paniers branchiaux, créant ainsi une expulsion d'eau au travers des branchies (Fig. 4) (Guimond et al., 2003). L'expiration de l'eau est donc active. La fermeture du vélum prévient une évacuation d'eau par la cavité orale durant la contraction des muscles branchiaux (Hardisty et Potter, 1972). Le vélum est constitué d'une paire de muscles en forme de poche et correspond à l'épiglotte chez les mammifères. L'inspiration se fait de façon passive, où l'entrée d'eau est provoquée par une extension des paniers branchiaux causée par une relaxation des muscles rattachés (Fig. 4) (Rovainen, 1977; Thompson, 1990). Cette respiration causée par le courant bilatéral de l'eau au travers des pores branchiaux est appelée la respiration courante. Lorsque le disque oral de la lamproie est attaché à une proie ou à un quelconque objet, l'eau ne peut entrer par la cavité buccale. La lamproie adopte alors la respiration courante. La lamproie adulte utilise également la respiration courante lorsque la ventouse n'est pas scellée sur une proie ou un objet. La lamproie adulte peut également respirer de façon unidirectionnelle durant la nage. L'eau rentre donc par la bouche et est évacuée au niveau des pores branchiaux (Hardisty et Potter, 1972).

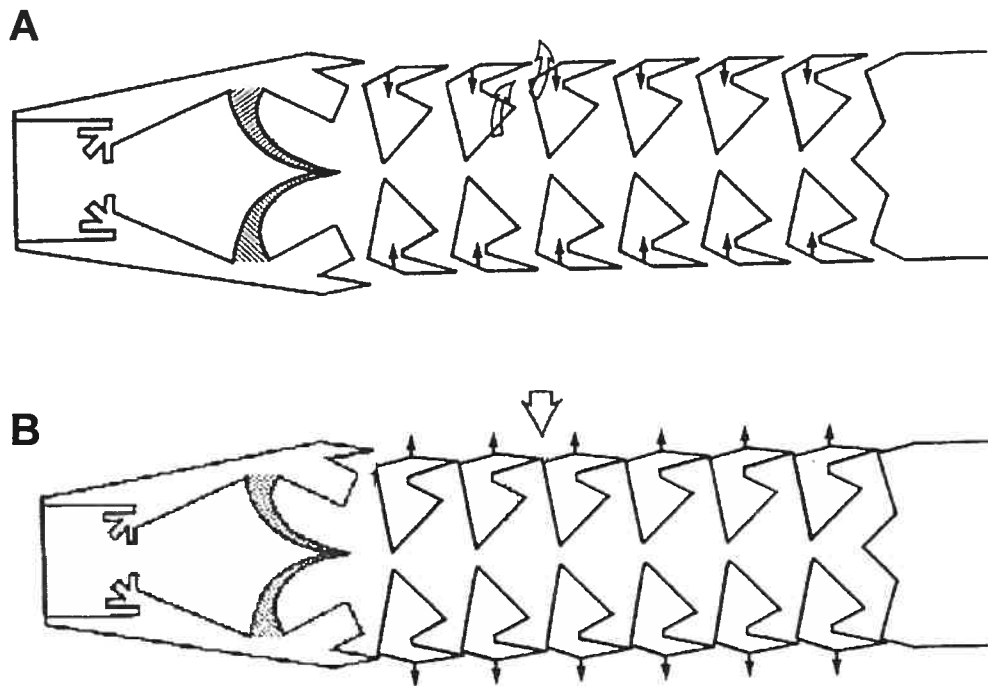


Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la respiration courante. À noter que les flèches blanches représentent le mouvement de l'eau. **A** : L'expiration est causée par une contraction des paniers branchiaux (flèches noires) créant ainsi une expulsion d'eau au travers des branchies. **B** : L'inspiration est provoquée par une extension des paniers branchiaux causée par une relaxation des muscles rattachés (flèches noires). (Adapté d'Hardisty et Potter, 1972)

2.2 La respiration de la larve

Les larves respirent de façon unidirectionnelle. En effet, une expérience a permis de mesurer le courant unidirectionnel de l'eau utilisée par la larve pour respirer (Rovainen, 1977). La respiration chez la larve est initiée par le vélum qui va se sceller et se contracter, ce qui va causer un déplacement d'eau en direction des pores branchiaux. L'efficacité de cette poussée dépend de la capacité du vélum à se sceller de façon hermétique afin d'éviter tout reflux rostral d'eau. Vers la fin de cette poussée, les muscles branchiaux peuvent se contracter afin d'aider la sortie d'eau par les branchies lors de respirations de moyenne et forte amplitude (Rovainen et Schieber, 1975). Il s'agit de l'expiration (Fig. 5). Par la suite, le vélum va se relâcher ce qui va permettre l'entrée d'eau par la bouche au travers de la gorge pour se diriger vers les paniers branchiaux qui prennent de l'expansion par relâchement musculaire (Hardisty et Potter, 1972; Rovainen, 1977). Il s'agit de l'inspiration, qui se fait de façon passive (Fig. 5). Aucune activité électrique n'a été enregistrée en provenance des muscles branchiaux durant la phase d'expansion des paniers branchiaux (Rovainen, 1974; Homma, 1975). La fermeture des valves branchiales empêche l'eau de pénétrer par les pores branchiaux durant l'inspiration et fait en sorte que la majorité de l'eau pénétrant les paniers branchiaux provienne de la bouche (Rovainen et Schieber, 1975). À l'opposé des lamproies adultes, les valves des pores branchiaux se ferment durant l'expansion des paniers branchiaux afin d'y retenir l'eau.

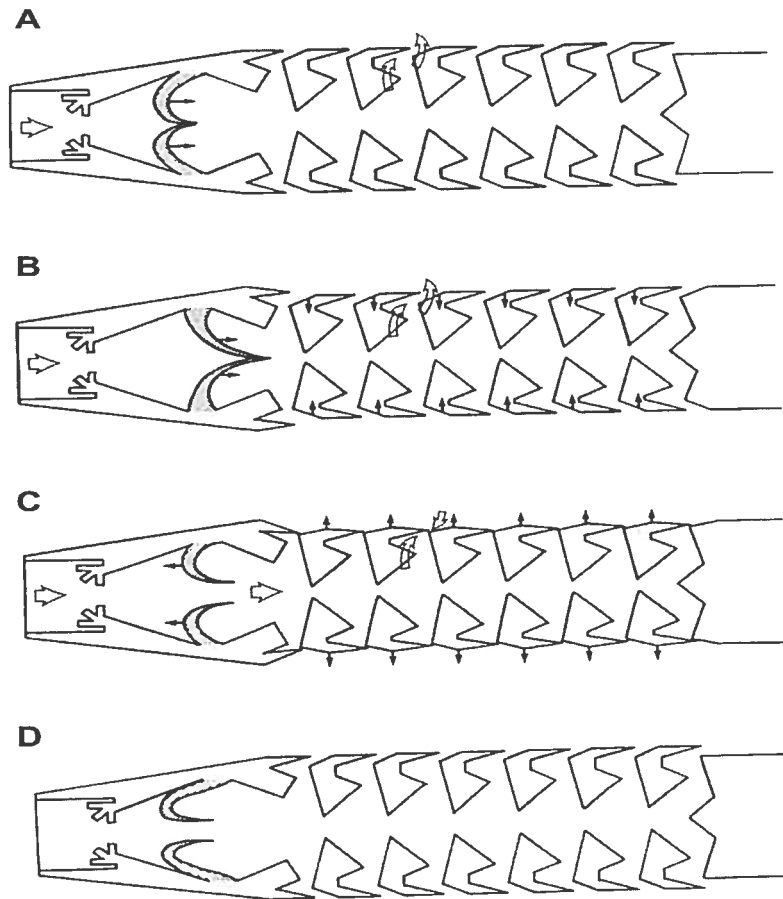


Figure 5 : Représentation schématique des différentes étapes de la respiration chez la larve. À noter que les flèches blanches représentent le mouvement de l'eau. **A :** La respiration est initiée par le vélum (zone hachurée) qui va se sceller et se contracter (flèches noires), ce qui va causer un déplacement d'eau en direction des pores branchiaux. **B :** Les muscles branchiaux peuvent se contracter (flèches noires) afin d'aider la sortie d'eau par les branchies. **C :** Le vélum va se relâcher ce qui va permettre l'entrée d'eau par la bouche vers les paniers branchiaux qui prennent de l'expansion par relaxation musculaire (flèches noires). Une quantité initiale d'eau va pénétrer ou sortir par les pores branchiaux jusqu'à la fermeture des valves branchiales. **D :** Position de repos avant l'initiation d'un autre cycle respiratoire. (Adapté d'Hardisty et Potter, 1972)

2.3 Effet de la locomotion sur la respiration

Chez les mammifères, la locomotion cause une augmentation de l'activité respiratoire (Boggs, 2002). Cependant, les mécanismes neuronaux responsables de ce phénomène ne sont pas parfaitement compris chez les mammifères. Chez la lamproie, la locomotion induite par une stimulation mécanique de la peau du museau et de la queue entraîne une hausse de l'activité respiratoire. Cette augmentation de l'activité respiratoire est anticipatoire au déclenchement de la locomotion. De plus, l'augmentation de l'activité respiratoire par les stimulations mécaniques cutanées persiste en l'absence du mésencéphale et de la moelle épinière, suggérant l'implication de mécanismes rhombencéphaliques (Gravel et al., 2005).

3. Le contrôle neuronal de la respiration chez la lamproie

3.1 Les motoneurones respiratoires

Des stimulations intracellulaires ont permis de démontrer que les motoneurones respiratoires chez l'espèce de lamproie *Petromyzon marinus* étaient localisés dans les noyaux moteurs glossopharyngiens (IX) et vagues (X) (Rovainen, 1974). La plupart de ces motoneurones innervent les muscles branchiaux, alors que certains innervent les muscles diagonaux dorsaux et ventraux, les poches branchiales ainsi que les valves externes et internes responsables de l'ouverture des branchies (Rovainen, 1974). Des stimulations du noyau moteur facial (VII) ne semblaient causer aucune activation des muscles branchiaux. À l'opposé, des études anatomiques (Lindström, 1949) et des expérimentations de traçage rétrograde sur des lamproies adultes ont permis de démontrer clairement l'innervation des muscles branchiaux par les motoneurones VII, IX et X (Guimond et al., 2003). De plus, des lésions ont démontré que les muscles branchiaux du 1^{er} pore branchial étaient innervés par les nerfs VII et IX alors que les muscles branchiaux du 2^e pore étaient innervés par le nerf IX et par la première branche branchiale du nerf X. Les cinq autres pores branchiaux sont innervés par des branches du nerf X (Fig. 6) (Guimond et al., 2003). On retrouve également une organisation rostro-caudale des motoneurones branchiaux quant à l'innervation des pores branchiaux (Guimond et al., 2003).

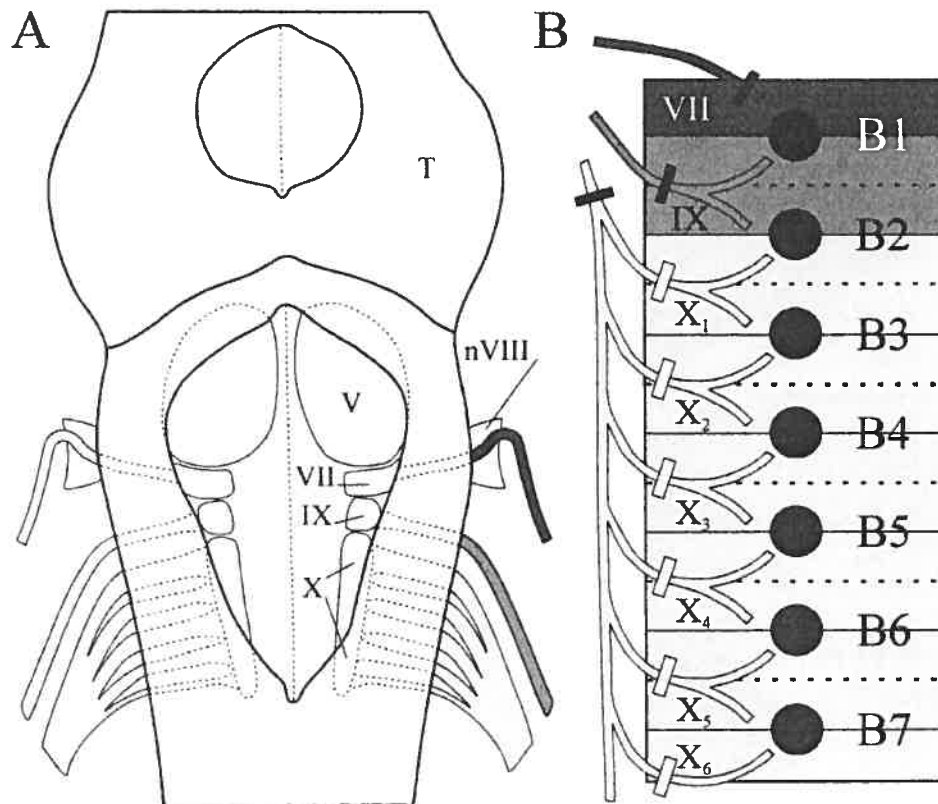


Figure 6 : Représentation de l'innervation des branchies chez la lamproie. **A** : Schéma démontrant le positionnement des noyaux moteurs VII, IX et X responsables de l'innervation des branchies. **B** : Représentation de l'innervation des branchies par leur nerf respectif. Les lignes noires et blanches représentent les sites d'injections respectifs pour le traçage « nerfs entiers » ainsi que pour le traçage spécifique des branches du X. **V** : Noyau moteur du trijumeau; **T** : Tectum; **nVIII** : Nerf vestibulaire. (Adapté de Guimond et al., 2003)

Au stade larvaire, ce sont les motoneurones respiratoires, situés dans le noyau moteur du trijumeau (V), qui permettent le mouvement de pompage de l'eau par le vélum. En effet, la lésion du nerf du trijumeau induit l'arrêt du mouvement du vélum. Les motoneurones responsables de la contraction du vélum ont été localisés physiologiquement dans la région caudale et latérale du noyau moteur du trijumeau (Homma, 1975) ainsi que par traçage à l'aide d'injections de peroxydase de Raifort dans le vélum (Homma, 1979). Lors de la métamorphose de la lamproie au stade adulte, le vélum devient plus petit, et le mouvement de l'eau induit par le vélum n'est plus l'élément principal de la respiration.

3.2 Les GCPs respiratoires

Deux rythmes peuvent être enregistrés à partir des motoneurones respiratoires de la lamproie (Thompson, 1985; Rovainen, 1996). Il y a le rythme rapide qui correspond à la respiration dite « normale » ainsi qu'un rythme lent caractérisé par de longues bouffées de décharge correspondant à de fortes contractions bilatérales des branchies. Les décharges du rythme rapide semblent varier entre 0,3 et 2,5 Hz selon les animaux (Thompson, 1990). Le rythme lent a été décrit comme une « activité de toux » qui est irrégulière et de longue durée, généralement de 0,5 à 1 seconde (Thompson, 1985). Cette « toux » aurait pour fonction de libérer des particules prises dans les ouvertures branchiales (Rovainen, 1974). La « toux » survient également en réponse à une stimulation de l'ouverture branchiale. Chez la lamproie adulte, il est possible d'induire un réflexe de « toux » suite à une pression exercée sur les flancs de la lamproie (Thompson, 1990). De la « toux » a également été observée sur des préparations de barbotte (Burleson et Smith, 2001). La « toux » chez les

barbottes est caractérisée par une rapide et forte contraction de l'opercule. Suite à la paralysie des muscles avec de la gallamine, les barbottes continuent à démontrer le même patron d'activité caractéristique de la « toux », suggérant que la « toux » soit générée centralement (Burlison et Smith, 2001).

Les motoneurones respiratoires de la lamproie ne font pas partie intégrante du générateur de rythme respiratoire mais sont plutôt innervés par des interneurones générateurs non identifiés (Rovainen, 1977; Kawasaki, 1979; Rovainen, 1983; Kawasaki, 1984; Thompson, 1985; Russel, 1986). Ces interneurones ont été désignés sous l'appellation de générateur central de patron (GCP) respiratoire de la lamproie (Rovainen, 1977).

Chez les mammifères, les mécanismes de genèse et de localisation du rythme respiratoire restent incertains (Cohen, 1979; Smith et al., 1991; St-John, 1996; St-John, 1998; St-John et Paton, 2004). La lamproie possède plusieurs avantages pour l'étude de la localisation des générateurs centraux de patron respiratoire. Les GCPs ont été le mieux caractérisés jusqu'à présent sur des invertébrés. À l'opposé, chez les vertébrés, la complexité du système nerveux rend la tâche plus difficile. Cependant, l'étude des vertébrés primitifs, comme la lamproie, semble un compromis intéressant entre la simplicité de son système nerveux et la possibilité que les résultats obtenus puissent être représentatifs des vertébrés supérieurs (Grillner, 2003). De plus, des préparations *in vitro* semi-intactes (Brocard et Dubuc, 2003; Guimond et al., 2003; Le Ray et al., 2003) ou de cerveau isolé (Le Ray et al., 2004; Brocard et al., 2005; Viana di Prisco et al., 2005)

permettent d'enregistrer diverses activités neuronales durant plusieurs heures. La lamproie a également été le premier vertébré où il a été possible de caractériser les détails des connections neuronales d'un GCP (Buchanan et Grillner, 1987). Il reste à espérer qu'il en sera de même pour la respiration.

3.3 Les expériences de lésion

Les lésions du tronc cérébral de la lamproie ont été amplement utilisées dans le but de restreindre et d'isoler les différents rythmes respiratoires de la lamproie (Rovainen, 1974; Kawasaki, 1979; Rovainen, 1983; Kawasaki, 1984; Thompson, 1985; Rovainen 1985; Thompson, 1990). Pour étudier un générateur, il faut premièrement délimiter le générateur lui-même. Cependant, un des problèmes pour déterminer la localisation d'un générateur rythmique est l'ambiguïté provoquée par des résultats négatifs lors des lésions. Par exemple, l'abolition de l'activité respiratoire pourrait résulter d'une lésion sur le générateur rythmique, d'une lésion sur un système excitateur du GCP ou encore de dommages aux tissus environnants (Thompson, 1985; Russel, 1986).

L'ablation des nerfs crâniens derrière les capsules otiques produit une cessation ipsilatérale de la respiration et a contribué physiologiquement à renforcer le rôle des noyaux moteurs X, IX et VII dans la respiration (Guimond et al., 2003). Le sectionnement de la moelle épinière ainsi que des racines dorsales et ventrales n'interfèrent pas avec la contraction périodique des muscles branchiaux. Même une lésion au niveau de l'obex, caudalement à l'entrée des nerfs vagues, permet d'enregistrer le rythme respiratoire à partir

des noyaux moteurs, bien que la fréquence de ce dernier soit réduite (Kawasaki, 1979). Le tronc cérébral est essentiel à l'activité respiratoire (Rovainen, 1974; Kawasaki, 1979; Rovainen, 1983; Kawasaki, 1984; Rovainen 1985; Thompson, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1990; Guimond et al., 2003).

3.3.1 Lésion médiane

Une lésion médiane du tronc cérébral semble interrompre les connections nécessaires à la synchronisation bilatérale entraînant du même coup une désynchronisation bilatérale (Kawasaki, 1979; Rovainen, 1974; Kawasaki, 1984). D'un côté du cerveau, la fréquence respiratoire est la même qu'avant la lésion alors que de l'autre côté on observe une diminution de la fréquence respiratoire (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Il est suggéré que le côté possédant la fréquence respiratoire la plus élevée entraîne l'autre côté à suivre le rythme imposé (Rovainen, 1974; Kawasaki, 1979). Le côté imposé pourrait également à son tour dicter le rythme respiratoire lors d'une diminution de la fréquence respiratoire émanant du côté dominant. Chaque côté du cerveau possède donc son propre générateur central de patron respiratoire. Chez les mammifères, la respiration semble être également produite par des générateurs respiratoires bilatéraux (Wyman, 1977; Cohen, 1979; Gromysz et Karczewski, 1982).

Il a été démontré, à l'aide de diverses lésions médianes, que la partie rostrale du bulbe rachidien peut être suffisante à la synchronisation bilatérale du rythme rapide de la respiration (Rovainen, 1985), alors que la partie caudale du bulbe rachidien permet la

synchronisation du rythme rapide de la respiration et du rythme lent (Kawasaki, 1984; Rovainen, 1985; Thompson, 1985). Ces résultats suggèrent que les projections commissurales ne sont pas localisées mais distribuées en plusieurs endroits du tronc cérébral. La présence de nombreuses fibres commissurales a été mise en évidence par diverses études anatomiques sur le tronc cérébral de la lamproie (González et al., 1997; Pflieger et Dubuc, 2000).

3.3.2 Lésion transverse

Les lésions transverses du tronc cérébral sont celles qui sont source de plusieurs contradictions entre les différents chercheurs. En effet, suite à ces lésions, certains chercheurs suggèrent l'importance de la partie rostrale du rhombencéphale dans la genèse du rythme rapide de la respiration alors que d'autres vont plutôt suggérer l'importance de la partie caudale du rhombencéphale. Un des objectifs de la présente étude est justement de clarifier ces différentes contradictions. La lésion transverse effectuée caudalement au noyau moteur du trijumeau (V) a été très utilisée dans les différentes études (Rovainen, 1985; Thompson, 1985; Russel, 1986). Des études anatomiques supportent l'hypothèse que la partie rostrale du rhombencéphale serait l'équivalent du pons des mammifères alors que la partie caudale serait homologue au bulbe rachidien (Butler et Hodos, 1996; Brocard et Dubuc, 2003). Les prochaines sections aborderont justement les différents rythmes respiratoires enregistrés dans la partie rostrale et caudale du rhombencéphale de la lamproie.

3.3.3 Genèse du rythme rapide au niveau du pons

Il est possible d'enregistrer des décharges respiratoires dans une région rostro-latérale au noyau moteur du trijumeau sous la plaque alaire (Thompson, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1990). Une étude a permis d'enregistrer trois types différents de décharges respiratoires dans cette région (Russel, 1986). Il y a les décharges qui surviennent avant (précoces), en même temps et après les décharges respiratoires retrouvées au niveau des noyaux moteurs respiratoires. Il est suggéré que les décharges précoces pourraient être impliquées dans la genèse du rythme rapide de la respiration considérant le temps où se produisent ces décharges (Thompson, 1985; Russel, 1986).

Suite à la lésion transverse caudale au noyau moteur du trijumeau, le rythme rapide de la respiration a pu être de nouveau enregistré au niveau de la région rostro-latérale du noyau moteur du trijumeau (Thompson, 1985). Suite à une hémisection transverse caudale au noyau moteur V, seul le rythme lent est enregistré du côté ipsilatéral alors qu'au niveau controlatéral il est possible d'enregistrer le rythme rapide et le rythme lent à partir des noyaux moteurs IX et X (Fig. 7A) (Thompson, 1985). Ces résultats suggèrent que la région rostrale à la lésion transverse, effectuée caudalement au noyau moteur du trijumeau, peut contenir des éléments essentiels à la genèse du rythme respiratoire.

Une autre étude suggère que le générateur du rythme rapide serait plutôt situé dans la partie caudale du noyau moteur du trijumeau. En effet, cette étude démontre qu'il est encore possible d'enregistrer des décharges respiratoires à partir des noyaux moteurs IX et

X suite à des lésions effectuées dans la partie rostrale du noyau moteur V (Russel, 1986). À l'opposé, des lésions transverses effectuées dans la partie caudale du noyau moteur V ne permettent plus d'enregistrer le rythme rapide à partir des noyaux moteurs IX et X (Russel, 1986).

Des décharges périodiques ont aussi été enregistrées sur la ligne médiane rostrale au niveau des noyaux moteurs du trijumeau (Rovainen, 1985). Ces décharges précédaient dans le temps celles des nerfs crâniens IX et X et continuaient après une lésion transverse caudale au noyau moteur du trijumeau, bien qu'une diminution de la fréquence respiratoire ait été observée (Rovainen, 1985). Ces décharges périodiques pourraient provenir d'axones qui auraient comme rôle de permettre la synchronisation bilatérale entre les deux générateurs du rythme rapide.

3.3.4 Genèse du rythme rapide au niveau du bulbe rachidien

D'autres expériences de lésions transverses effectuées caudalement à différents niveaux du rhombencéphale suggèrent que la région pontique et la partie rostrale du bulbe rachidien ne sont pas essentielles à la genèse du rythme rapide de la respiration (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Selon ces études, la région caudale du bulbe rachidien pourrait être essentielle à la genèse du rythme rapide de la respiration. Le rythme respiratoire enregistré à partir de cette section du bulbe rachidien possède une fréquence de décharge inférieure à la fréquence respiratoire de base. Cela n'exclut donc pas le rôle de la région pontique afin de permettre de générer le rythme respiratoire de fréquence supérieure (Kawasaki, 1979).

3.3.5 Genèse du rythme rapide au niveau du pons et du bulbe rachidien

L'enregistrement intracellulaire d'un cycle respiratoire de décharge cellulaire émanant du noyau moteur X permet de décomposer la décharge en trois phases. Une phase excitatrice initiale de faible amplitude, une seconde phase excitatrice de large amplitude et une troisième phase d'inhibition. Des expériences de lésion suggèrent que le rythme rapide de la respiration serait le résultat d'inputs en provenance de diverses régions (Thompson, 1985).

Suite à une lésion transverse caudale au noyau moteur du trijumeau, la phase excitatrice initiale a pu être enregistrée proche de la région du bulbe rachidien contenant les motoneurones respiratoires (VII, IX et X), donc indépendamment de la région pontique (Thompson, 1985). Cependant, ces résultats sont eux-mêmes considérés comme non robustes par leur auteur à cause du faible taux de réussite (4/25) (Thompson, 1985). La phase excitatrice de large amplitude et la phase inhibitrice pouvaient être quant à elles isolées dans la partie latérale du noyau moteur du trijumeau proche du sulcus limitant (Thompson, 1985). Des lésions médianes ont permis de démontrer l'importance de la région controlatérale du trijumeau dans la genèse de la phase inhibitrice (Thompson, 1985). Une hémisection caudale au noyau moteur du trijumeau, permet d'enregistrer, de façon intracellulaire, la phase excitatrice initiale au niveau du noyau moteur X du côté ipsilatéral à la lésion (Fig. 7B).

Ces résultats suggèrent que le bulbe rachidien possède une capacité rythmique respiratoire qui fonctionnerait en synergie avec une autre paire de GCPs située dans la région pontique (Thompson, 1985). Lors de la respiration normale, la région caudale ne fournirait qu'une faible excitation synaptique et serait subordonnée au GCP de la région pontique (Thompson, 1985; Thompson, 1990). La région caudale fournirait plutôt l'excitation prédominante pour les autres formes d'activités respiratoires.

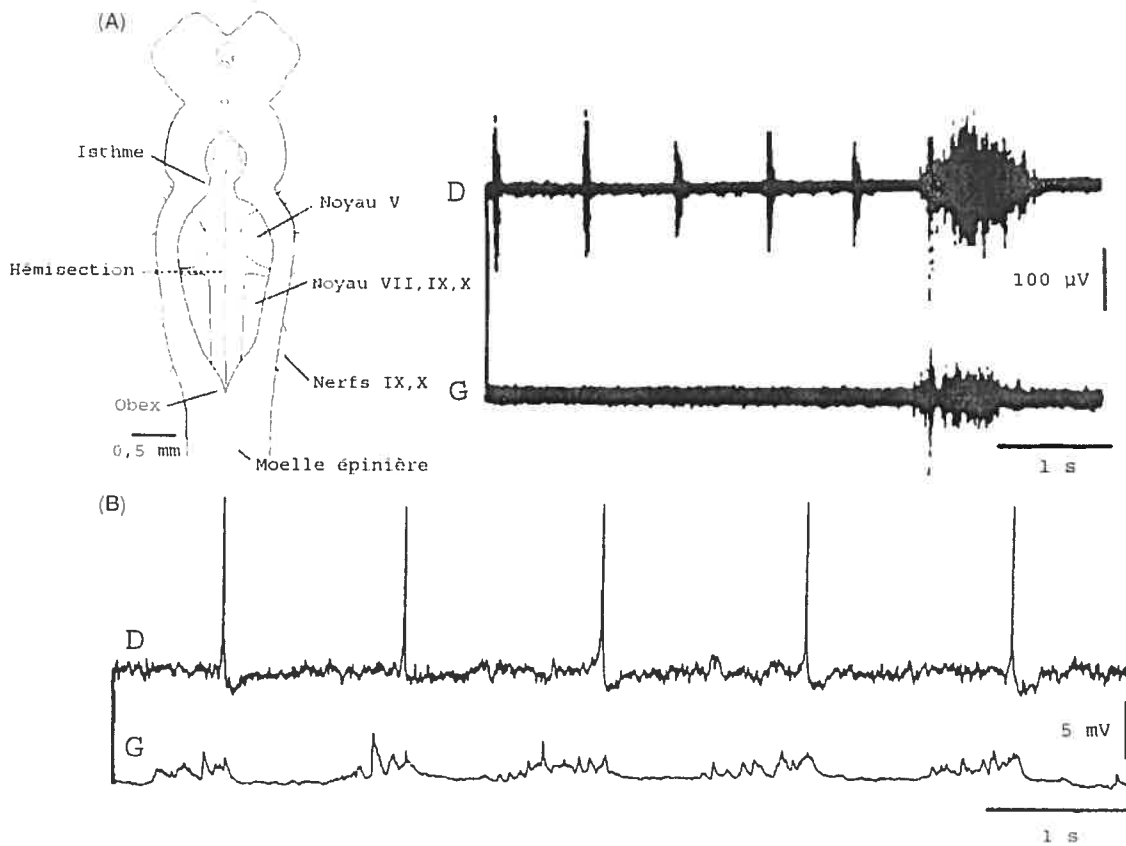


Figure 7 : Effet d'une hémisection caudale au noyau moteur du trijumeau (V). **A :** Suite à la lésion caudale au noyau moteur du trijumeau, le rythme rapide de la respiration n'est enregistré que du côté controlatéral à la lésion alors que le rythme lent est encore enregistré des deux côtés à partir des noyaux moteurs X. **B :** L'activité intracellulaire enregistrée au niveau du noyau moteur X démontre encore la présence de la phase excitatrice initiale du côté ipsilatéral à la lésion. (Adapté de Thompson, 1985)

3.4 Effets de diverses drogues sur la respiration

Des expériences utilisant des agonistes et des antagonistes glutamatergiques dissous dans une solution de Ringer suggèrent que les récepteurs de type ionotrope (AMPA/Kaïnate) et de type métabotrope (mGluR) puissent être impliqués dans la neurotransmission du système respiratoire de la lamproie (Bongianni et al., 1999; Bongianni et al., 2002). Il est suggéré que les récepteurs NMDA jouent un rôle moins important que les récepteurs AMPA/Kaïnate. Cependant, les auteurs proposent que les récepteurs NMDA pourraient jouer un rôle plus important lors du retrait du blocage voltage-dépendant des récepteurs par le Mg^{2+} (Brodin et Grillner, 1986). Chez le rat néonatal, il a également été démontré que les récepteurs AMPA/Kaïnate et les récepteurs NMDA jouent différents rôles dans la genèse du rythme respiratoire (Greer et al., 1991). Chez la lamproie, les mGluRs de type I sont principalement impliqués dans le contrôle de la fréquence respiratoire alors que les mGluRs de type II semblent contribuer à moduler tant la fréquence que l'intensité des décharges respiratoires (Bongianni et al., 2002). Le rôle suggéré de ces récepteurs au niveau de la respiration est consistant avec leur rôle décrit au niveau du réseau locomoteur de la lamproie (Krieger et al., 1998).

Cependant, il reste à déterminer si les agonistes et les antagonistes utilisés agissent directement sur le GCP respiratoire. En effet, ces drogues sont utilisées en application diffuse dans la solution de Ringer et auraient pu interagir avec divers composants du réseau neuronal de la respiration et potentiellement conduire à des interactions pouvant être

difficiles à interpréter (Bongianni et al., 2002). D'où l'importance de mieux connaître l'emplacement du GCP respiratoire, afin d'y effectuer des injections locales.

3.5 Les hypothèses sur l'organisation du réseau neuronal de la respiration

Peu de chercheurs se sont aventurés à émettre une hypothèse quant à la possible organisation du réseau neuronal respiratoire de la lamproie. Cela pourrait s'expliquer en partie par le fait que beaucoup de résultats effectués sur le système respiratoire de la lamproie se contredisent, d'où la difficulté d'émettre une hypothèse englobant tous ces résultats.

3.5.1 L'hypothèse d'un générateur en colonne

Une hypothèse se basant sur les résultats démontrant la présence d'un GCP respiratoire au niveau du pons (Rovainen, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1985) et d'un autre GCP respiratoire auxiliaire situé dans le bulbe rachidien a été émise (Thompson, 1985). Cette hypothèse stipule qu'il n'y aurait qu'un seul GCP respiratoire de chaque côté du tronc cérébral, qui serait en fait une colonne située tant au niveau pontique qu'au niveau du bulbe rachidien. Il est suggéré que la lésion transverse caudale au noyau moteur du trijumeau diviserait l'oscillateur en deux parties. La présence d'un GCP respiratoire caudal serait donc un artéfact, signal résiduel, résultant de la séparation de la partie caudale du GCP en colonne (Thompson, 1985).

Cependant, cette hypothèse semble improbable pour plusieurs raisons. Les décharges excitatrices initiales du rythme respiratoire au niveau caudal ne sont pas uniquement présentes suite à la lésion transverse mais le sont également avant cette lésion (Thompson, 1985). De plus, la partie pontique ne semble pas trop affectée par la lésion transverse. En effet, avec la subdivision d'un GCP on pourrait s'attendre à des changements plus drastiques. Ces résultats suggèrent plutôt la présence de composants neuronaux pontiques et bulbaires distincts.

3.5.2 L'hypothèse du double générateur

Selon l'hypothèse du double générateur, un motoneurone serait excité par des afférences ipsilatérales provenant d'un GCP respiratoire pontique et d'un GCP respiratoire du bulbe rachidien. Le GCP respiratoire pontique controlatéral effectuerait un effet excitateur via une voie croisant la ligne médiane au niveau rostral et un effet inhibiteur via une voie croisant la ligne médiane au niveau caudal (Fig. 8) (Thompson, 1985). Cependant, ce modèle ne tient pas compte des résultats positionnant uniquement le GCP respiratoire dans le bulbe rachidien (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Il est mentionné que ces résultats différents pourraient s'expliquer par les différentes espèces de lamproies utilisées ainsi que des conditions expérimentales différentes (Thompson, 1985). De nos jours, l'hypothèse de l'utilisation de différentes espèces de lamproie pour expliquer les différents résultats semble peu probable. En effet, beaucoup d'études récentes ont été produites sur la locomotion de la lamproie, faisant du réseau locomoteur de ce vertébré l'un des mieux

compris. Ce réseau locomoteur ne semble pas varier d'une espèce de lamproie à une autre (Grillner, 2003).

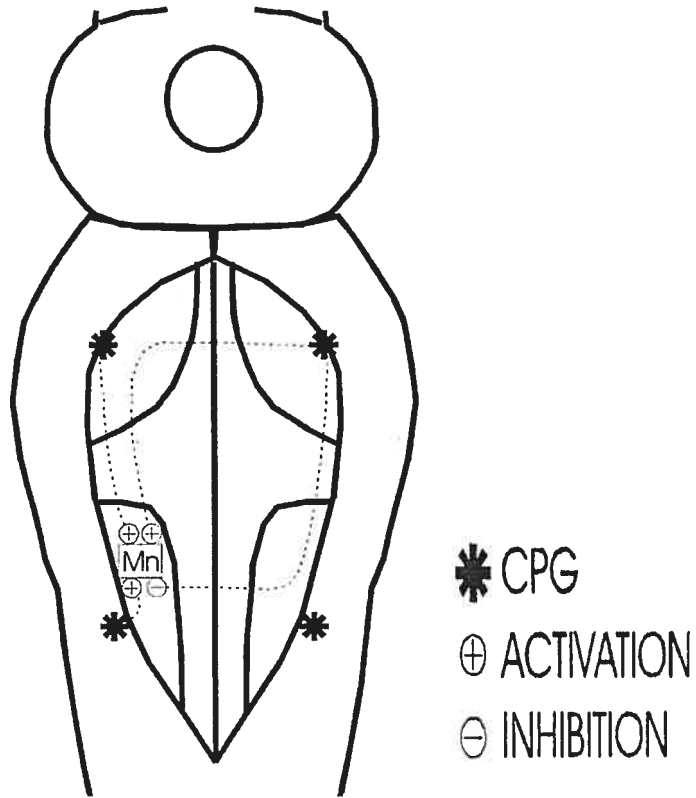


Figure 8 : Représentation schématique du modèle du double générateur. Les motoneurones respiratoires seraient excités par des afférences ipsilatérales en provenance d'un GCP respiratoire pontique et bulbaire. Le GCP respiratoire pontique controlatéral effectuerait un effet excitateur via une voie croisant la ligne médiane au niveau rostral et un effet inhibiteur via une voie croisant la ligne médiane au niveau caudal. MN : Motoneurone.
(Adapté de Thompson, 1985)

4. Énoncé du problème

Le système nerveux de la lamproie est un modèle idéal afin d'examiner la neurogenèse de la respiration au niveau du système nerveux d'un vertébré. En effet, le système nerveux peut être isolé *in vitro* avec ou sans le système respiratoire rattaché. Les signaux respiratoires peuvent être enregistrés plusieurs heures sous ces conditions (Guimond et al., 2003). Des études électrophysiologiques ont été entreprises il y a plusieurs années afin d'identifier le ou les site(s) de génération du rythme respiratoire chez la lamproie. Il est suggéré que le rythme rapide soit généré dans une région rostro-latérale au noyau moteur du trijumeau sous la plaque alaire, au niveau rostral du rhombencéphale (Rovainen, 1985; Thompson, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1990; Rovainen, 1996). Cette région serait homologue au pons des mammifères (Butler et Hodos, 1996). D'autres études suggèrent que cette région pontique n'est pas essentielle pour la respiration de la lamproie et que le générateur du rythme rapide serait plutôt situé au niveau caudal du rhombencéphale (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Des expériences de lésion du cerveau de lamproie suggèrent également la possibilité de deux paires de générateurs rythmiques. Une de ces paires serait située au niveau pontique alors que l'autre serait située au niveau du bulbe rachidien (Thompson, 1985). Face à ces contradictions décrites précédemment, nous avons entrepris de réexaminer la genèse du rythme respiratoire chez la lamproie.

Il a été proposé que les systèmes neuronaux responsables des comportements moteurs aient été bien conservés lors de l'évolution des vertébrés (Grillner, 2003). Les résultats obtenus chez les lamproies pourraient être représentatifs des vertébrés supérieurs

tels les mammifères, où il subsiste également plusieurs interrogations quant à la localisation et les mécanismes de neurogenèse des différents rythmes respiratoires.

Les résultats de ce mémoire ainsi que la méthodologie utilisée sont présentés dans la prochaine section intitulée « Article », et sont décrits sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement à des fins de publication.

Article

Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du programme

Bruno Martel
Maîtrise en sciences neurologiques
Département de physiologie, Faculté de médecine

2. Description de l'article

Martel, B.*, Guimond, J.C.*, Gariépy, J.F., Gravel, J., Auclair, F., Kolta, A., Lund, J.P. et Dubuc, R. *Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon.*

* L'article sera soumis avec deux co-premiers auteurs.

L'article sera soumis à Neuroscience.

3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Bruno Martel inclue cet article dans son mémoire de maîtrise, qui a pour titre Neurogenèse de la respiration chez la lamproie.


Jean-Charles Guimond


9 nov 2005
Date


Jean-François Gariépy

11 décembre 2005
Date


Jean-François Gravel

08/12/05
Date


François Auclair

20/12/05
Date


Dr. Arlette Kolta

20/12/2005
Date


Dr. James P. Lund

17/12/2005
Date


Dr. Réjean Dubuc

19/12/2005
Date

Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

Martel B.^{a,*}, Guimond J.C.^{a,b,*}, Gariépy J.F.^a, Gravel J.^a, Auclair F.^a,
Kolta A.^{a,c}, Lund J.P.^{a,d} and Dubuc R.^{a,b}

^aCentre de Recherche en Sciences Neurologiques, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada.

^bDépartement de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec), Canada.

^cDépartement de stomatologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada.

^dFaculty of Dentistry, McGill University, Montréal (Québec), Canada.

*Bruno Martel and Jean-Charles Guimond contributed equally to this paper and wrote it as co-first authors.

Corresponding author:

Dr Réjean Dubuc

Département de kinanthropologie

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888 Succ. Centre-ville

Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8

Tél: (514) 343-5729

Fax: (514) 343-6611

Email: [REDACTED]

List of abbreviations

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

AP5: D,L-Amino-5-phosphonopentanoic acid

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

IX: Glossopharyngeal

V: Trigeminal

VII: Facial

X: Vagal

Abstract

The brainstem network generating the respiratory rhythm in lampreys is unknown. This study was aimed at characterizing the patterns of respiratory activities in lampreys and to identify the location of the underlying neural networks. In a semi-intact preparation that included the brain and the gills, rhythmic discharges were recorded bilaterally with surface electrodes placed over the X motor nucleus. The respiratory motor output consisted of short bursts (40.9 ± 15.6 ms) of discharges occurring at a frequency of 1.0 ± 0.3 Hz. The latter were interrupted by long bursts (506.3 ± 174.6 ms) of discharges recurring with an average period of 37.4 ± 24.9 s. After isolating the brainstem by cutting all cranial nerves in a semi-intact preparation, the long bursts occurred less frequently, whereas the frequency of the short respiratory bursts did not change significantly. Local injections of a glutamate agonist (AMPA) and antagonists (CNQX or AP5) were made over different regions in the brainstem to influence the respiratory motor output. The results were similar in semi-intact preparations and the isolated brainstem. A unilateral injection of AP5 or CNQX over a rostral rhombencephalic region, lateral to the rostral pole of the V motor nucleus, decreased the frequency of the fast respiratory rhythm or stopped it altogether. An injection of AMPA increased the fast respiratory rhythm and decreased the occurrence of long bursts. The activity recorded extracellularly in this area was synchronous with the motor activity recorded over the X motoneurons. Interestingly, a complete transverse section of the brainstem caudal to the trigeminal nucleus abolished the fast rhythm recorded in the X motoneurons, but not in the rostral area. Conversely, the slow activity persisted in the X motoneurons, but not in the rostral area after the transverse section. Our results support the hypothesis that normal breathing depends on the activity of neurons located in the rostral

rhombencephalon in lampreys, whereas the caudal rhombencephalon generates the long bursts of discharges occurring at a slow frequency.

Key words: Respiration, respiratory rhythm generator, pons, medulla.

Introduction

The peripheral respiratory apparatus of adult lampreys comprises seven gill pores on each side that are surrounded by cartilaginous gill baskets and associated branchial muscles that are innervated by branches of the facial (VII), glossopharyngeal (IX) and vagal (X) nerves (Rovainen 1974, Kawasaki 1984, Guimond et al., 2003). The muscles contract during expiration to expel water through the gill pores, whereas inspiration is caused by passive recoil of the gill baskets (Rovainen, 1977; Kawasaki, 1981).

The lamprey nervous system provides a useful model to examine neurogenesis of respiration in a vertebrate nervous system. The entire nervous system can be isolated *in vitro* with or without the respiratory apparatus attached. The respiratory output can be recorded for hours to days under *in vitro* conditions (Thompson, 1985; Rovainen, 1996; Guimond et al., 2003). Electrophysiological studies were carried out several years ago to identify the site or sites of generation of the respiratory rhythm in lampreys. Some authors suggested that the normal respiratory rhythm was generated in the rostral rhombencephalon close to the trigeminal (V) motor nucleus (Rovainen, 1985; Thompson, 1985; Russell, 1986; Thompson, 1990; Rovainen, 1996). The rostral rhombencephalon of lampreys is homologous to the pons of mammals. Other studies suggested that this pontine area was not essential for normal breathing of lampreys and that the rhythm generator was located in the caudal half of the rhombencephalon (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984), in a region homologous to the medulla of mammals. Moreover, lesion experiments suggested the possibility of two pairs of rhythm generators, one located in the pontine area and the other one, less important for normal respiration, located in the medullar area was also proposed (Thompson, 1985).

Because of the remaining controversy relative to the location of the respiratory rhythm generating area in the brainstem of lampreys, we undertook to reexamine this. Considering that the neural generator of respiration of vertebrates is not without evolutionary foundation, we hope to gain significant information relative to the neurogenesis of respiration that could be transposed to the mammalian nervous system. In mammals, successive lesions of the brainstem of vagotomized preparations were made to identify the brainstem regions responsible for respiration (Lumsden, 1923). Removal of the rostral pons transformed the eupneic pattern into apneusis, characterized by sustained inspiratory motor activity, and the presence of a “pneumotaxic center” in the rostral pons was proposed. Further studies localized the “pneumotaxic center” more precisely in the parabrachial region of the rostral dorsolateral pons (Tang, 1953; Ngai and Wang, 1957; von Euler et al., 1976). *In vitro* slices preparations allowed the researchers to identify more precisely the location of respiratory centers. A small group of neurons located in the preBötzinger complex in the ventral medulla were proposed to generate a rhythm similar to eupnea independent of other inputs (Smith et al., 1991; Connelly et al., 1992; Johnson et al., 1994). The preBötzinger complex was then considered as the location of the primary respiratory rhythm generator (Smith et al., 1991). Others, suggested that rhythmic activity recorded from slices of medulla containing the preBötzinger complex was gasping instead of eupnea (St-John, 1996; St-John, 1998). It was suggested that the preBötzinger complex would be important for the genesis of gasping. Eupnea would come from a ponto-medullary circuit (St-John, 1996; St-John and Paton, 2004). Another hypothesis was that respiratory patterns such eupnea, gasping and sigh would all be generated by intrinsic mechanisms of the preBötzinger complex (Lieske et al., 2000). It appears therefore that controversies remain as to the neurogenesis of respiration in mammals.

This study examines respiratory rhythm *in vitro* in lampreys. Local injections of glutamate receptors agonists and antagonists and lesion studies suggest that a region in the lateral tegmentum close to the trigeminal (V) motor nucleus in the rostral rhombencephalon is important for the fast respiratory activity, whereas a slow bursting pattern seems to originate from the caudal rhombencephalon.

Experimental procedures

Post-transformation and reproductive adult sea lampreys (*Petromyzon marinus*, male and female), ranging from 12 to 42 cm in total body length, were collected from streams entering Lake Champlain (VT, USA) and from Lake Huron (ON, CAN). They were maintained in aerated fresh water at 7°C. All procedures conformed to the guidelines from the Canadian Institutes of Health Research and were approved by the University Committee for Animal Care and Use. The guidelines from the Canadian Institutes of Health Research are in conformity with those of the NIH in the United States and those of the European Community.

The animals were anaesthetized by immersion in cold fresh water containing 100 mg/L of ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonic acid salt (Sigma, St-Louis, MO, USA) for approximately 5 min prior to dissection. All subsequent manipulations were done in cold oxygen-saturated Ringer's solution of the following composition (in mM): 130 NaCl, 2.1 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.8 MgCl₂, 4 HEPES (Sigma), 4 D-glucose, and 1 NaHCO₃. The solution was oxygenated with 100% O₂ and the pH was adjusted to 7.4 with NaOH prior to use.

Semi-intact brain-gill preparations (n=75) were dissected as follows: following anesthesia, the animals were transected behind the last gill pore, eviscerate, and the sucker was removed. The seven gills were maintained intact and special care was taken not to damage the cranial nerves innervating the gills. The brain was exposed dorsally and the choroids plexi over the mesencephalic and the fourth ventricles were removed. Complete transverse sections at the mesencephalo-diencephalic and bulbo-spinal junctions were made. In eight cases, all cranial nerves were cut to isolate the brainstem from the

respiratory apparatus. The two types of preparation were pinned to the bottom of a recording chamber equipped with a continuous flow of fresh oxygenated Ringer's solution (6-9°C). For the semi-intact preparations the animal were pinned in a way that allowed normal contraction of the gill. Semi-intact preparations were used for drugs injections. The isolated brainstem preparation was used in some of the experiments where lesions were made and when absence of movement was needed to make intracellular recordings (see below).

Recordings

The respiratory motor output was recorded with glass suction electrodes (inside tip diameter: ca. 65 μm) positioned over the X motor nucleus or in the rostral rhombencephalon. Similar electrodes were used to record in the rostral rhombencephalon in a site lateral to the V motor nucleus. The signals were processed through a high impedance probe and a differential AC amplifier (Model 1800, A-M Systems Inc; 0.03 to 1 KHz bandwidths). Intracellular recordings were also made from motoneurons in the X motor nucleus with glass electrodes filled with 4M KAc (75 to 150 M Ω). The signals were amplified and low-pass filtered at 3 KHz with an Axoclamp 2A amplifier (Axon instruments inc., Foster City, CA, U.S.A.). All signals were digitalized using Axotape 2.0 software (Axon instruments Inc.; sampling rate = 8.33 KHz).

Drugs

Local injections of 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; Sigma), D,L-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D,L-AP5; Sigma), and α -Amino-3-hydroxy-5-

methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA; Sigma), were made with a micropipette (inside tip diameter: ca. 5 μm). All drugs were diluted in Ringer's and Fast Green (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) was added to the solution to assess visually the spread of injection (Brocard and Dubuc, 2003; Le Ray et al., 2004; Brocard et al., 2005). Injections (0.4 to 10.6 nL) were made by applying pulses of pressure (20-100 ms pulse duration) with a picospritzer (General Valve Corporation, Fairfield, NJ, USA) connected to the injection pipette that was placed just above the targeted region. Control injections of Ringer's with Fast Green were also made and were found to have no effect on the respiratory frequency.

D-Glutamic acid (500 μM ; D-Glu; Sigma) and D,L-AP5 (200 μM) were also diluted in the Ringer's solution for bath applications.

Analysis

The cycle duration was measured as the time interval between the beginnings of two consecutive respiratory bursts. A specific homemade software was used to detect the onset of each burst when the root mean square value exceeded for more than 10 ms a threshold set just above the background level. Manual corrections of the automated detections were performed when needed. The frequency of the respiratory discharges was calculated from cycle to cycle (instantaneous frequency = $1/\text{cycle duration}$).

Paired Student's *t* tests were performed to compare the frequency of the respiratory burst before and after drug injections with Origin version 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). For the fast respiratory rhythm analyses, the averaged frequency value of ten consecutive cycles immediately before each experimental procedure was compared to the averaged frequency value of ten consecutive cycles at maximum drug

effect. A complete stop for more than 60 s was considered as a frequency of zero. For the slow rhythm analyses, the values were expressed as cycle periods rather than frequencies.

Results

Respiratory rhythms

Extracellular recordings over the X motor nucleus displayed synchronous respiratory activity on both sides (Fig. 1). The respiratory activity consisted of short bursts of discharges of 20 to 89 ms duration (average 40.9 ± 15.6 ms) with a frequency varying from 0.7 to 1.6 Hz (average = 1.0 ± 0.3 Hz; Fig. 2A₁). The variability from one preparation to another was similar to that of the respiratory frequency recorded for individual preparations. The variation coefficient of the mean frequencies in 10 preparations was 34 %, a value that was not significantly different than the mean variation coefficient of the respiratory frequency recorded for 10 min in 10 preparations (22.2 ± 8.7 %; $p > 0.05$; Fig. 2A₁). The respiratory activity was interrupted by recurring long bursts of discharges with a duration varying between 243 and 1394 ms (mean 506.3 ± 174.6 ms; Fig. 1). These long bursts were previously referred to as cough activity by Thompson (1985). The period between two consecutive bursts varied between 13.4 to 71.9 s (mean 37.4 ± 24.9 s; Fig. 2B₁; $n=10$). The long bursts of discharge appeared either as single events or as multiple successive bursts (Fig. 1B; Fig. 2B₃). When the events occurred as multiple bursts (Fig. 2B₂), the period between consecutive bursts was significantly superior to that of the short respiratory bursts (mean = 1.5 ± 0.5 s; $p < 0.01$).

Relation between the slow and fast rhythmic activities

The relationship between the two rhythms was investigated in 5 semi-intact preparations before and after cutting all the cranial nerves to isolate the brainstem from the respiratory apparatus. The instantaneous frequency of the fast respiratory rhythm was

examined after the occurrence of a long burst of discharges (Fig. 3). In the semi-intact preparation, 58.0 ± 10.2 % of the long bursts of discharge were followed by an increase of the fast rhythm (average increase: 16.3 ± 27.5 %; $n=5$), whereas the remaining bursts (42.0 ± 10.2 %) were followed by a decrease of the fast rhythm (average decrease: 9.0 ± 7.9 %; $n=5$). The increases in instantaneous frequency were statistically larger than the decreases ($p<0.05$). The brainstem of the same five semi-intact preparations was then isolated from the respiratory apparatus by cutting all cranial nerves and the changes in instantaneous frequency of the fast respiratory rhythm following a long burst of discharge were examined. The most noticeable change after isolating the brainstem was a significant decrease in the occurrence of the long bursts of discharges. The period of the long bursts of discharges significantly increased from a mean of 29.9 ± 37.8 to 102.3 ± 114.5 s ($p<0.01$ paired t-test). Despite the large increase of the period, the variability in the rhythm as expressed by the coefficients of variations did not change (77.4 ± 65.9 % vs. 82.5 ± 26.9 %; $p>0.05$). There was also an increase in the proportion of long bursts occurring as single events from 47.4 to 69.4 % after isolation of the brainstem. Finally, the relationship between the two rhythms changed dramatically. Indeed, there was a significant increase in the proportion of long bursts followed by an increase in the fast respiratory frequency (58.0 ± 10.2 % in the semi-intact preparation to 94.0 ± 6.3 % in the isolated brainstem; $p<0.01$ paired t-test).

Effects of local injections of CNQX and AP5 on the respiratory rhythms

As an initial step to identify the location of the neural networks responsible for respiratory rhythms, local injections of glutamate receptor agonists and antagonists were made in the brainstem. Injections in the medial rhombencephalic reticular formation or directly in the V motor nucleus had no effect on the respiratory rhythm. On the other hand,

injections in an area lateral to the trigeminal motor nucleus, in the rostral part of the rhombencephalon produced powerful changes in the respiratory activity. This area had been proposed previously as a possible generator region for the fast respiratory rhythm (Rovainen, 1985; Thompson, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1990; Rovainen, 1996). It is henceforth referred to as the rostro-lateral site. A unilateral injection of the AMPA/Kainate glutamate receptor antagonist, CNQX (1 μ M), either stopped the respiratory rhythm (Fig. 5B₁; n=7) or slowed it down significantly (reduced by 42.8 ± 28.8 %; $p < 0.01$ paired t-test; Fig 5B₂; n=3), while other injections had no effect (Fig. 5B₃; n=4). The NMDA receptor antagonist, AP5 (500 μ M), produced the same effects. In four preparations, a unilateral injection in the rostro-lateral site abolished the fast respiratory rhythm bilaterally (Fig. 4A; Fig. 5A₁). In three of those four preparations, a sustained tonic activity was induced before the respiratory rhythm was totally abolished. In six cases, the frequency was significantly reduced by 32.8 ± 16.4 % ($p < 0.05$ paired t-test; Fig. 5A₂), whereas there was no significant change in the respiratory frequency in the seven remaining cases (Fig. 5A₃). The decrease in respiratory frequency or the abolition of the respiratory rhythm lasted between 64 to 280 s, in the 10 preparations where effects were observed after injections of AP5. There was a significant difference in the duration of the effects in the preparations where the rhythm was abolished as compared to those where it was only slowed down (205.8 ± 84.1 s vs. 115.7 ± 68.6 s respectively; $p < 0.01$). Possible changes in the occurrence of long bursts of discharge were also examined and no significant change was observed in the occurrence of the slow rhythm following CNQX or AP5 injections ($p > 0.05$ paired t-test).

Effect of AMPA injections on the respiratory rhythms

The glutamate receptor agonist, AMPA (500 μ M - 1 mM), was also injected in the rostro-lateral site in 16 experiments. The control respiratory frequencies varied from 0.4 to 1.7 Hz (average = 0.8 ± 0.1 Hz). In 15 cases, a unilateral injection significantly increased the respiratory frequency on both sides (150.4 ± 114.9 %; $p < 0.001$ paired t-test; Fig. 7A), whereas it had no effect in one case. The effects of AMPA lasted from 100 to 300 s. Immediately following the injection, the respiratory activity became tonic with no apparent rhythmic bursts of discharge (Fig. 6B₂). This was followed by a recurrence of respiratory bursts, but at a higher frequency. In 8 cases, the duration of the effects of an injection of AMPA was sufficiently long to examine the changes that could occur in the occurrence of long bursts of discharge. It was found that the number of long bursts significantly decreased when the frequency of the fast respiratory activity was increased by AMPA (arrows in Fig. 6A). In 5 of the 8 preparations examined here, there was a significant reduction in the occurrence of the long bursts ($p < 0.05$ paired t-test; Fig. 7B).

Lesions experiments

Given that the previous experiments suggested the presence of neurons in the rostro-lateral site that could play a role in the generation of the respiratory rhythm, the next step was to record neural activity in that region simultaneously with that of motoneurons in the X motor nucleus. Interestingly, in all preparations where it was possible to record from the rostro-lateral site ($n=8$), rhythmic discharges phase-locked with the respiratory discharges recorded in the X motor nucleus were observed (Fig. 8B₁). The frequencies recorded in those experiments varied from 0.4 to 1.1 Hz (average = 0.7 ± 0.3 Hz). As described previously, the fast respiratory rhythm was interrupted by long bursts of discharges, the

latter occurring simultaneously in the rostro-lateral site and in the X motor nucleus with an average period of 53.0 ± 66.5 s. After a complete transverse section ($n=8$) was made at the caudal end of the V motor nucleus, the extracellular electrode was reinserted in the rostro-lateral site and the respiratory activity could be recorded again from 6 of the 8 preparations. The long bursts of discharge were abolished in the rostro-lateral site (Fig. 8B₂), whereas the fast respiratory rhythm was preserved but the bursts of discharge occurred at a frequency that was slower than before the transverse section (0.3 ± 0.1 Hz vs. 0.7 ± 0.3 Hz; $p<0.01$ paired t-test).

On the other hand, only long bursts of discharges could still be recorded over the X motor nucleus after the complete transverse section (Fig. 8B₂; $n=7$). The fast respiratory discharges had disappeared. Moreover, the period of the long bursts did not change after the transverse section (47.8 ± 24.0 s vs. 55.4 ± 71.5 s; $p>0.05$ paired t-test). Intracellular recordings were made from motoneurons of the X motor nucleus after the transverse section. The recorded motoneurons ($n=8$) showed membrane potential fluctuations related to the long bursts of discharges, but there was no sub-threshold oscillations related to the fast respiratory rhythm (Fig. 9). Finally, a mid-sagittal lesion was made in the rostral rhombencephalon to separate it in two sides. In two out of three trials, the fast respiratory rhythm was preserved (Fig. 8B₃).

Bath applications of D-glutamate or AP5 were also made in preparations with a transverse section caudal to the V motor nucleus to examine the effects on the long bursts of discharges. D-glutamate ($500 \mu\text{M}$) significantly reduced ($n=4$) the period of the long bursts of discharges by 48.1 ± 14.8 % (70.9 ± 23.5 s vs. 38.0 ± 21.7 s; $p<0.05$ paired t-test; Fig. 10A), whereas bath applications of AP5 ($200 \mu\text{M}$) significantly increased ($n=4$) the period by 139.0 ± 59.7 % (55.9 ± 8.6 s vs. 162.4 ± 64.0 s; $p<0.01$ paired t-test; Fig. 10B).

Discussion

The present study confirms that the respiratory rhythm in lampreys is composed of short bursts of discharge occurring nearly every second interspersed with long bursts of discharge occurring at about 40 s intervals. We now demonstrate interactions between the fast and slow respiratory rhythm in the isolated brainstem preparation of lamprey. A complete transverse section made caudal to the trigeminal (V) motor nucleus demonstrated the importance of the rostral rhombencephalon in generating the fast respiratory rhythm and the importance of the caudal rhombencephalon for the slow respiratory rhythm. This was supported by local injections of glutamate receptor agonists and antagonists in the lateral tegmentum close to the trigeminal (V) motor nucleus.

Two rhythmic respiratory activities generated in the brainstem of lampreys

Our results show the presence of two distinct respiratory rhythmic activities which differ in duration and in frequency. The fast respiratory rhythm, which is regular in frequency, corresponds to the regular breathing movements of the gills allowing expiration of water by a rostro-caudal delayed contraction of the gills (Guimond et al., 2003). The inspiration of water is made by passive recoil of the gill baskets (Rovainen, 1977; Kawasaki, 1981). The fast respiratory rhythm is known to vary among preparations between 0.3 to 2.5 Hz (Thompson, 1985) and the present results concur with this. The slow respiratory rhythm which corresponds to strong bilateral contractions of the gills has been referred to in some studies as “cough” (Thompson, 1985) and may have as one function to dislodge particles in the gill openings (Rovainen, 1974). In mammals, cough is a reflex induced by stimulation of peripheral receptors in the central airway that trigger a strong

expiration to remove mucus and particles from the larynx, trachea and bronchus (Shannon et al., 1996; Pantaleo et al., 2002). As opposed to cough in mammal, the slow respiratory rhythm was present after removing all sensory inputs in the isolated brainstem preparation. Hence the term “cough” may not be the most appropriate to describe the slow respiratory rhythm found in lamprey.

In the frog, two types of discharges are also present *in vitro* (McLean et al., 1995). These correspond to buccal and lung respiratory activity (Gdovin et al., 1998; Torgerson et al., 1998; Wilson et al., 2002). Buccal rhythm is characterized by small amplitude bursts and allows gas exchange between the environment and the oropharynx in the postmetamorphic animal (Burggren and West, 1982; Boutilier et al., 1986). In adults, the main oxygen uptake is achieved during lung ventilation, characterized by larger amplitude bursts. There are some similarities between the lung and buccal bursts with the two respiratory rhythms presently described in lampreys. For instance, the buccal rhythm varies between 0.5 and 1 Hz (Wilson et al., 2002), frequencies that are similar to that of the fast respiratory rhythm found in lampreys. As suggested by the figure 1 in Wilson et al., 2002, the lung bursts seem to occur each 60 s. This is similar to the period of the slow rhythm in lampreys. Moreover, as for the slow respiratory rhythm, the lung events tend to occur individually or as multiple events (Wilson et al., 2002). One distinction would be the same duration time for the buccal and lung bursts, as opposed in lamprey where the fast and slow respiratory activities are composed of bursts with different duration time.

After sectioning the cranial nerves in semi-intact preparations to remove peripheral input influences, no change were observed in the fast respiratory rhythm frequencies as opposed to the slow respiratory rhythm which decreased in occurrence. This could indicate that the fast respiratory frequency rhythm is purely centrally evoked and that maybe tonic

feedback does not contribute to modulate the frequency of the fast respiratory rhythm. Conversely, the reduction in the occurrence of the slow respiratory rhythm following isolation of the brainstem could be caused by the removal of the sensory fibers indicating that the sensory fibers may contribute to the activation of the long bursts. Indeed, it was previously shown that mechanical stimulations of the skin can induce long bursts of discharges (Thompson, 1990). However, the slow rhythm is at least partly centrally evoked because long bursts of discharges are still present after the isolation of the brainstem of lampreys.

Interactions between the two rhythmic activities

This study is the first to provide evidence of interactions between the two respiratory rhythms found in the lamprey. The interactions, as expressed by changes in the frequency of the fast respiratory rhythm following a long burst activity, is not very clear in the semi-intact preparations. Striking changes occur in the isolated brainstem, where almost all (94.0 %) of the slow rhythm activities are followed by an increase of the fast respiratory frequency. This drastic change observed in the interactions between the two rhythmic activities could be explained by the loss of sensory inputs in the isolated brainstem preparation. Sensory inputs in the semi-intact preparation could stabilize the fast respiratory activity. For instance in the cat, hip joints afferents entrain the fictive locomotor rhythm (Andersson and Grillner, 1981; Andersson and Grillner, 1983). Similar sensory modulation of the central locomotor rhythm was observed in the dogfish (Grillner and al., 1976; Grillner and Wallén, 1982) and in lampreys (Viana di Prisco et al., 1990; Vinay et al., 1996). Mechanoreceptors from the contracting gills could feedback onto the fast respiratory rhythm generator. Once sensory inputs are removed in the isolated brainstem, the

stabilizing feedback would be removed and the long respiratory bursts seen in the present study could perhaps influence more efficiently the fast respiratory rhythm.

Localization of the two rhythms generator in the brainstem

The main purpose of this study was to localize the sites of genesis of the two respiratory activities. Two approaches were used; lesions studies and pharmacological injections of glutamate receptor agonists and antagonists to modulate the respiratory rhythm.

Injections of glutamate receptor agonists or antagonists into the rostro-lateral site strongly modulated the fast respiratory rhythm. Furthermore, after a complete transverse section caudal to the V motor nucleus, the fast respiratory rhythm was recorded only in the region rostral to the cut, as opposed to the slow respiratory rhythm that was only present in the region caudal to the cut. Several anatomical findings support the hypothesis that the rostral part of the rhombencephalon is the equivalent of the pons of mammals, whereas the caudal part is homologous to the medulla (Butler and Hodos, 1996; Brocard and Dubuc, 2003).

The present results support the idea that the fast rhythm activity is generated in the rostral part of the rhombencephalon, as proposed in other studies (Thompson, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1990), and more precisely in the rostro-lateral site. This is in opposition to a more caudal localization previously proposed for the fast respiratory rhythm generator (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Our results also show that the region caudal to the transverse section would be necessary for the genesis of the slow respiratory rhythm. Moreover, bath applications of drugs were able to modulate the slow respiratory rhythm recorded from the X motor nucleus after the transverse section, suggesting that glutamate

transmission could be implicated in the neural control of this rhythm. Whether the glutamate receptor agonists and antagonists act directly on a slow respiratory rhythm generator or through indirect pathway remains to be established as the exact location of the slow respiratory rhythm generator.

In mammal, the preBötzinger complex was considered by some as the location of the primary respiratory rhythm generator (Smith et al., 1991) but others, suggested that rhythmic activity recorded from slices of medulla containing the preBötzinger complex would be gasping instead of eupnea (St-John, 1996; St-John, 1998), and that eupnea would come from a ponto-medullary circuit (St-John, 1996; St-John and Paton, 2004). In the frog both the buccal and the lung areas are located in the medulla but both areas are spatially separated (Wilson et al., 2002).

Interactions between the pontine and medulla area in the lamprey

The two rhythmic activities are present in the intact brainstem at the level of the rostro-lateral site. The reduction of the fast respiratory frequency observed after the transverse section could result from the removal of tonic inputs coming from the caudal brainstem modulating the fast respiratory rhythm. Indeed, the slow respiratory input could modulate the fast respiratory rhythm.

Interestingly, unilateral injections of glutamate receptor agonists or antagonists produced bilateral effects. This suggests a bilateral coordination of the respiratory activity. Reciprocal bilateral excitatory inputs could be involved. In fact, midline section in the brainstem of lamprey have been made (Kawasaki, 1979; Rovainen, 1974), showing that each midsection of the brainstem is capable of rhythmogenesis. In lamprey, anatomical studies on the brainstem have revealed the presence of many commissural fibers (González

et al., 1997; Pflieger and Dubuc, 2000). Furthermore, unilateral injections of retrograde tracers in rostral vagal motor nucleus have revealed the presence of cell bodies in the rostro-lateral site on both sides. Most of those neurons were located in the periventricular cell layer close to the sulcus limitans of His, while others were found deeper in the trigeminal descending tract nucleus (ndV; Auclair and Dubuc, unpublished data). In the frog, after complete mid-sagittal lesion, each half of the isolated brainstem will generate its own rhythmic fictive breathing (McLean et al., 1995). Similar observation is made in the mammals (Wyman, 1977; Cohen, 1979).

Mechanisms for rhythmogenesis in the rostro-lateral site

Previous studies using glutamate receptor agonists and antagonists into bath application have suggested the importance of ionotropic and metabotropic glutamatergic receptors in the neurogenesis of the fast respiratory rhythm (Bongianni et al., 1999; Bongianni et al., 2002). This concept has been confirmed by our local injections of glutamate receptor agonists and antagonists into the rostro-lateral site.

It was suggested that pacemaker neurons are present in the preBötzinger complex to generate the respiratory rhythm (Feldman and Smith, 1989; Onimaru et al. 1989). Two mechanisms for bursting have now been described to explain pacemaker activities in these neurons. One of them is based on voltage-dependant persistent Na^+ current (I_{NaP}) (Smith et al., 1991; Del Negro et al., 2001) and the other one depends on Ca^{2+} currents (I_{Ca}) and a Ca^{2+} -activated nonspecific cationic current (I_{CAN}) (Thoby-Brisson and Ramirez, 2001). On the other hand, when I_{NaP} and I_{CAN} are pharmacologically removed, the respiratory rhythm is stopped, but it can be restarted by boosting neuronal excitability. It was concluded that respiratory rhythm in slices is not pacemaker driven but rather emerges when neurons are

sufficiently excitable and there is recurrent excitation in the network (Del Negro and al., 2005). Our results suggest the importance of glutamate receptor into the rostro-lateral site. Whether glutamate antagonists stop the fast respiratory rhythm by acting directly on pacemaker neurons or by blocking excitatory inputs of the rostro-lateral site remains an open question.

In conclusion, results from this study provide evidences that the fast respiratory rhythm originate from the pons as opposed to the slow respiratory rhythm which arises from the medulla. Experiments are underway to establish the mechanisms by which the two respiratory activities are generated.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Bruno Martel received a studentship from NSERC and Dr. Georges Phénix Foundation. The authors wish to express their gratitude to D. Veilleux for her excellent technical assistance with the experiments, to C. Valiquette for his skilful programming of data analysis software and to F. Bernard for his help with figure making. We thank W.D. Swink, M.K. Jones and R. Bergstedt from the Lake Huron Biological Station as well as R. McDonald of the Sea Lamprey Control Center in Sault Ste-Marie, Ontario for their kind supply of lampreys.

References

- Andersson O, Grillner S (1981) Peripheral control of the cat's step cycle. I. Phase dependent effects of ramp-movements of the hip during "fictive locomotion". Acta Physiol Scand 113(1):89-101.
- Andersson O, Grillner S (1983) Peripheral control of the cat's step cycle. II. Entrainment of the central pattern generators for locomotion by sinusoidal hip movements during "fictive locomotion". Acta Physiol Scand 118(3):229-239.
- Bongianni F, Deliagina TG, Grillner S (1999) Role of glutamate receptor subtypes in the lamprey respiratory network. Brain Res 826:298-302.
- Bongianni F, Mutolo D, Carfi M, Pantaleo T (2002) Group I and II metabotropic glutamate receptors modulate respiratory activity in the lamprey. Eur J Neurosci 16:454-460.
- Boutilier RG, Glass ML, Heisler N (1986) The relative distribution of pulmocutaneous blood flow in *Rana catesbeiana*: effects of pulmonary or cutaneous hypoxia. J Exp Biol 26:33-39.
- Brocard F, Bardy C, Dubuc R (2005) Modulatory effect of substance P to the brain stem locomotor command in lampreys. J Neurophysiol 93(4):2127-2141.
- Brocard F, Dubuc R (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. J Neurophysiol 90(3):1714-1727.

- Burggren WW, West NH (1982) Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Respir Physiol* 47:151-164.
- Butler AB, Hodos W (1996) *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. Wiley-Liss, New York, NY. 744 pages.
- Cohen MI (1979) Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev* 59:1105-1173.
- Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL (1992) Pre-Bötzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res* 590:337-340.
- Del Negro CA, Johnson SM, Butera RJ, Smith JC (2001) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. III. Experimental tests of model predictions. *J Neurophysiol* 86:59-74.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman, JL (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci* 25(2):446-453.
- Feldman JL, Smith JC. (1989) Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Ann NY Acad Sci* 563:114-130.
- Gdovin MJ, Torgerson CS, Remmers JE (1998) Neurorespiratory pattern of gill and lung ventilation in the decerebrate spontaneously breathing tadpole. *Respir Physiol* 113(2): 135-146.
- González MJ, Manson MJ, Anadón R (1997) Octavolateral neurons projecting to the middle and posterior rhombencephalic reticular nuclei or larval lamprey : a retrograde horseradish peroxidase labeling study. *J Comp Neurol* 384:396-408.

- Grillner S, Perret C, Zangger P (1976) Central generation of locomotion in the spinal dogfish. *Brain Res* 109(2):255-269.
- Grillner S, Wallen P (1982) On peripheral control mechanisms acting on the central pattern generators for swimming in the dogfish. *J Exp Biol* 98:1-22.
- Guimond JC, Auclair F, Lund JP, Dubuc R (2003) Anatomical and physiological study of respiratory motor innervation in lampreys. *Neuroscience* 122:259-266.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behaviour of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72:2598-2608.
- Kawasaki R (1979) Breathing rhythm-generation in the adult lamprey, *Entosphenus japonicus*. *Jpn J Physiol* 29:327-338.
- Kawasaki R (1981) Artificial Pacemaking of breathing movements by medullary stimulation in adult lampreys. *Jpn J Physiol* 31:571-583.
- Kawasaki R (1984) Breathing rhythm-generation mechanism in the adult lamprey (*Lampetra japonica*). *Jpn J Physiol* 34:319-335.
- Le Ray D, Brocard F, Dubuc R (2004) Muscarinic modulation of the trigemino-reticular pathway in lampreys. *J Neurophysiol* 92(2):926-938.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 3(6):600-607.
- Lumsden T (1923) Observations on the respiratory centres in the cat. *J Physiol Lond* 57:153-160.

- McLean HA, Kimura N, Kogo N, Perry SF, Remmers JE (1995) Fictive respiratory rhythm in the isolated brainstem of frogs. *J Comp Physiol A* 176:703-713.
- Ngai SH, Wang SC (1957) Organization of central respiratory mechanisms in the brain stem of the cat: localization by stimulation and destruction. *Am J Physiol* 190:343-349.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1989) Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro. *Exp Brain Res* 76:530-536.
- Pantaleo T, Bongianini F, Mutolo D (2002) Central nervous mechanisms of cough. *Pulm Pharmacol Ther* 15(3):227-233.
- Pflieger JF, Dubuc R (2000) Relationship between vestibular primary afferents and vestibulospinal neurons in lampreys. *J Comp Neurol* 427(2):255-273.
- Rovainen CM (1974) Respiratory motoneurons in lampreys. *J Comp Physiol* 94:57-68.
- Rovainen CM (1977) Neural control of ventilation in the lamprey. *Fed Proc* 36:2386-2389.
- Rovainen CM (1985) Respiratory burst at the midline of the rostral medulla of the lamprey. *J Comp Physiol A* 157:303-309.
- Rovainen CM (1996) Feeding and breathing in lamprey. *Brain Behav Evol* 48:297-305.
- Russel DF (1986) Respiratory pattern generation in adult lampreys (*Lampetra fluviatilis*): interneurons and burst resetting. *J Comp Physiol A* 158:91-102.
- Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Lindsey BG (1996) Brainstem respiratory networks and cough. *Pulm Pharmacol* 9:343-347.

- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Feldman DW (1991) Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.
- St-John WM (1996) Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals? *J Appl Physiol* 81:1865-1877.
- St-John WM (1998) Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Prog Neurobiol* 56:97-117.
- St-John WM, Paton JFR (2004) Role on pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. *Respir Physiol Neurobiol* 143:321-332.
- Tang PC (1953) Localization of the pneumotaxic center in the cat. *Am J Physiol* 172:645-652.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J Neurophysiol* 86:104-112.
- Thompson KJ (1985) Organization of inputs to motoneurons during fictive respiration in the isolated lamprey brain. *J Comp Physiol A* 157:291-302.
- Thompson KJ (1990) Control of respiratory motor pattern by sensory neurons in spinal cord of lamprey. *J Comp Physiol A* 166:675-684.
- Torgerson CS, Gdovin MJ, Remmers JE (1998) Fictive gill and lung ventilation in the pre- and postmetamorphic tadpole brain stem. *J Neurophysiol* 80:2015-2022.

- Viana di Prisco G, Wallén P, Grillner S (1990) Synaptic effects of intraspinal stretch receptor neurons mediating movement-related feedback during locomotion. *Brain Res* 530(1):161-166.
- Vinay L, Barthe JY, Grillner S (1996) Central modulation of stretch receptor neurons during fictive locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* (76)2:1224-1235.
- 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 Physiol. Scand* 96:324-337.
- Wilson RJA, Vasilakos K, Harris MB, Straus C, Remmers JE (2002) Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. *J Physiol* 540:557-570.
- Wyman RJ (1977) Neural generation of the breathing rhythm. *Annu Rev Physiol* 29:417-448.

Figures Legends

Figure 1: The two respiratory activities recorded in a semi-intact preparation with the respiratory apparatus attached. A: Left: Sketch diagram illustrating the semi-intact preparation with the recording electrodes placed over the X motor nuclei. Right: Raw records illustrating the respiratory activities. The arrows at the bottom of the graph illustrate the occurrence of long bursts of discharges that comprise the slow respiratory rhythm. B: Same as raw records in A but on longer scale duration.

Figure 2: Quantification of the two respiratory rhythms. A: Graph illustrating the average frequencies of the fast respiratory rhythm in 10 different lampreys. B₁: Graph illustrating the average periods of the slow respiratory rhythm in the same animals. B₂: Graph illustrating the average periods of consecutive bursts in slow respiratory events, when the latter showed multiple bursts. Note that, in animal no 1, the slow respiratory events occurred only as single bursts, thus the absence of value. B₃: Distribution of the number of long bursts per slow respiratory events.

Figure 3: The relationship between the two rhythms examined in the semi-intact preparation before and after cutting the cranial nerves, to isolate the brainstem. A: Left: Sketch diagram illustrating the semi-intact preparation with the recording electrode placed over the X motor nucleus. Right: Graph illustrating the instantaneous frequency of the fast respiratory rhythm. The arrows at the bottom of the graph illustrate the occurrence of long bursts of discharge that comprise the slow respiratory rhythm.

Bottom: Raw records illustrating the respiratory activities. B: Same as in A but after cutting the cranial nerves to isolate the brainstem. Note that after cutting the cranial nerves, 94.0% of long bursts were followed by a clear increase of the fast rhythm and period between long bursts increased.

Figure 4: Injections of AP5 in the rostro-lateral site. A: Graph illustrating the effects of AP5 on the instantaneous frequency of the fast respiratory rhythm. B: Examples of raw records before (B₁), during (B₂) and after (B₃) the effects caused by the injection of AP5.

Figure 5: A: Quantification of the effects of AP5 injections on the fast respiratory rhythm. Graphs illustrating the fast respiratory rhythm frequency before (control) and after the injection of the drug (post-injection). The injections stopped the fast respiratory rhythm in four cases (A₁), decreased it in six cases (A₂) and seven injections had no effect (A₃). B: Same as in A, but after an injection of CNQX. The injections stopped the fast respiratory rhythm in seven cases (B₁), decreases it in three cases (B₂) and four injections had no effect (B₃).

Figure 6: Injections of AMPA in the rostro-lateral site. A: Graph illustrating the effects of AMPA on the instantaneous frequency of the fast respiratory rhythm. B: Examples of raw records before (B₁), during (B₂) and after (B₃) the effects caused by the injection of AMPA.

Figure 7: Quantification of the effects of AMPA injections on the fast and slow respiratory rhythms. A: Changes in the fast respiratory rhythm frequency observed in fifteen preparations. B: Effects of AMPA injections on the long bursts of discharges in eight preparations into which the effect of AMPA lasted long enough to be quantified.

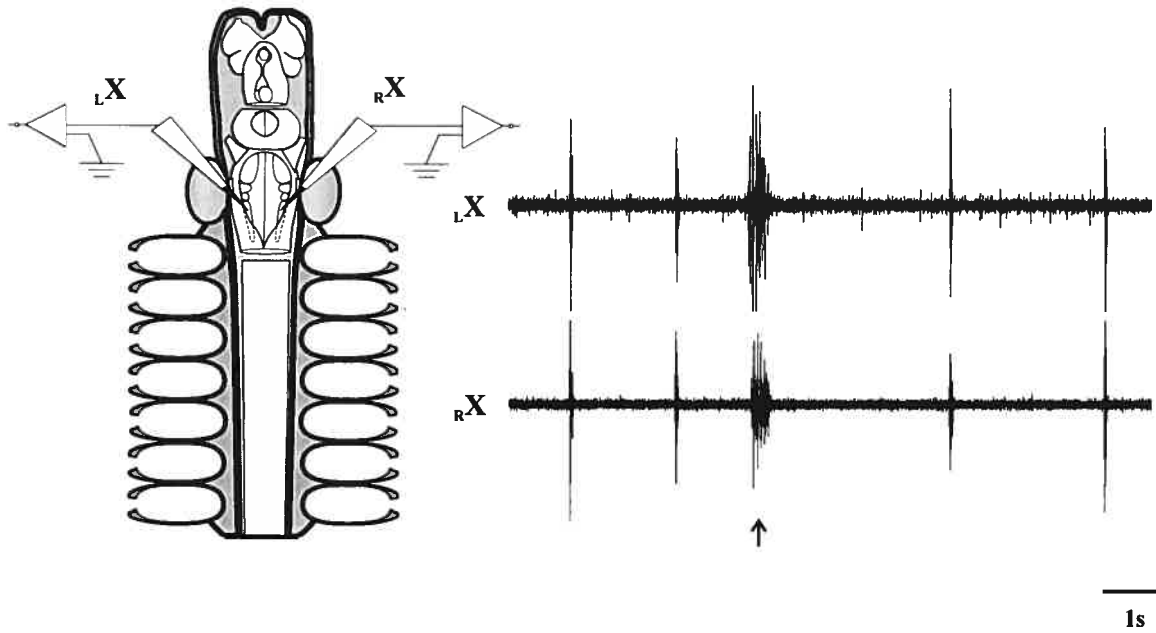
Figure 8: The effects of brainstem lesions on the two respiratory activities. A: Schematic representation of the brainstem illustrating the location of the lesions and the recording electrodes. B: Examples of raw recordings (top trace: the rostro-lateral site; bottom trace: X motor nucleus) before (B₁), after a transverse section at the caudal end of the V motor nucleus (B₂), and after a mid-sagittal lesion of the rostral part of the rhombencephalon (B₃). Note that after the mid-sagittal lesion, recordings were only made from the rostro-lateral site.

Figure 9: A: Intracellular recording from a motoneuron in the X motor nucleus under control conditions in the isolated brainstem. Left: The isolated brainstem preparation with the location of the recording electrodes. Right: Top trace: intracellular recording of a motoneuron (Intra_LX); Bottom trace: Surface recording from the X motor nucleus (Extra_RX). B: Same as in A, but after making a complete transverse section at the caudal end of the V motor nucleus. Note that the intracellular recording matches perfectly the extracellular one; there are no sub-threshold oscillations related to the fast respiratory rhythm.

Figure 10: A: Effects of bath application of D-glutamate (500 μM) on the slow respiratory rhythm recorded in the caudal half of the rhombencephalon after making a complete transverse section at the caudal end of the V motor nucleus. Top: Bar graph illustrating the effects of the drug on the period between slow respiratory events before, during, and after a bath application of D-Glutamate. Bottom: Raw records before (top trace), during (middle trace), and after (bottom trace) bath application of D-Glutamate B: Same as in A, but after a bath application of AP5 (200 μM).

Figure 1
Martel et al.
Respiratory rhythms in the lamprey rhombencephalon

A



B

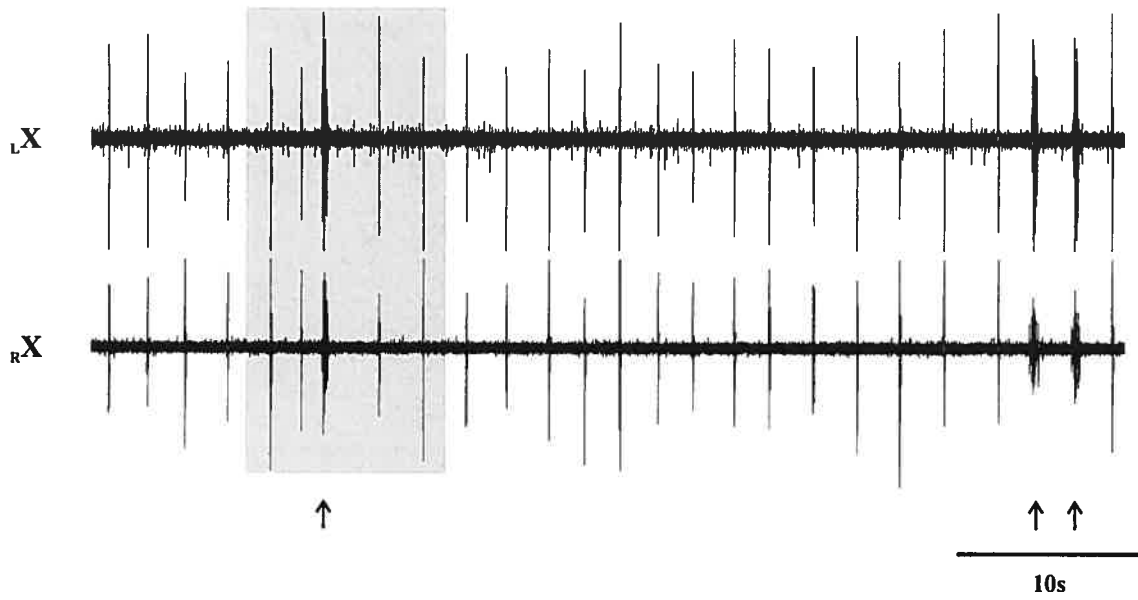
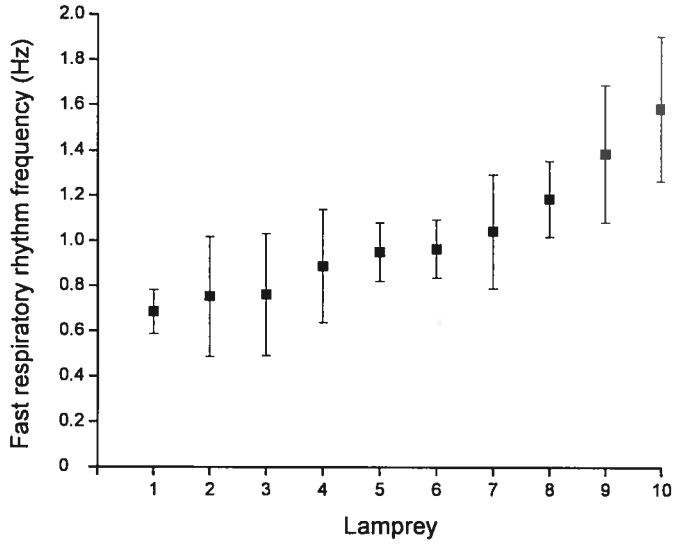
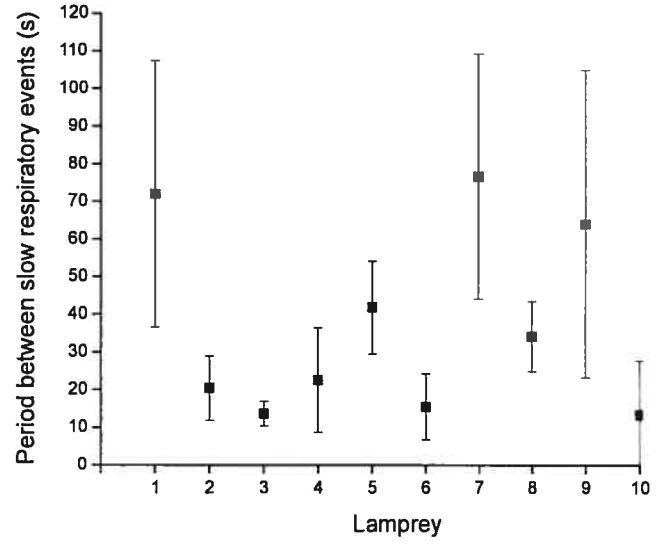


Figure 2
Martel et al.
Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

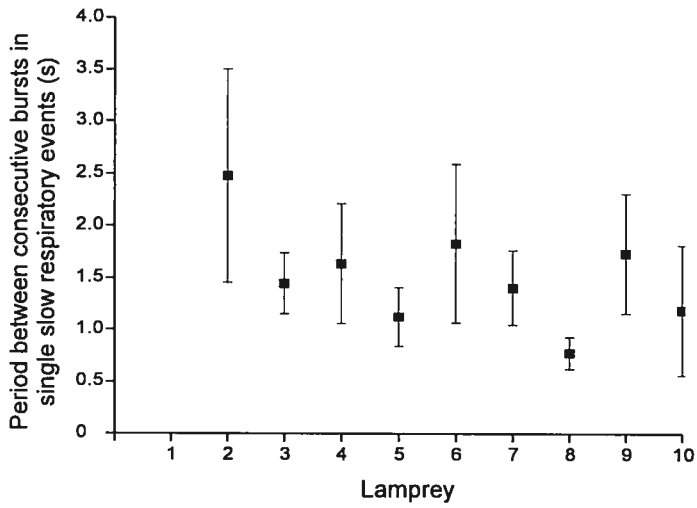
A₁



B₁



B₂



B₃

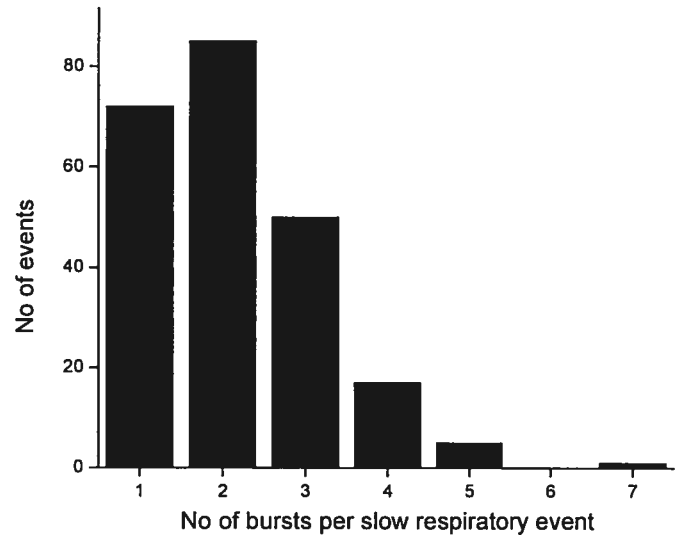
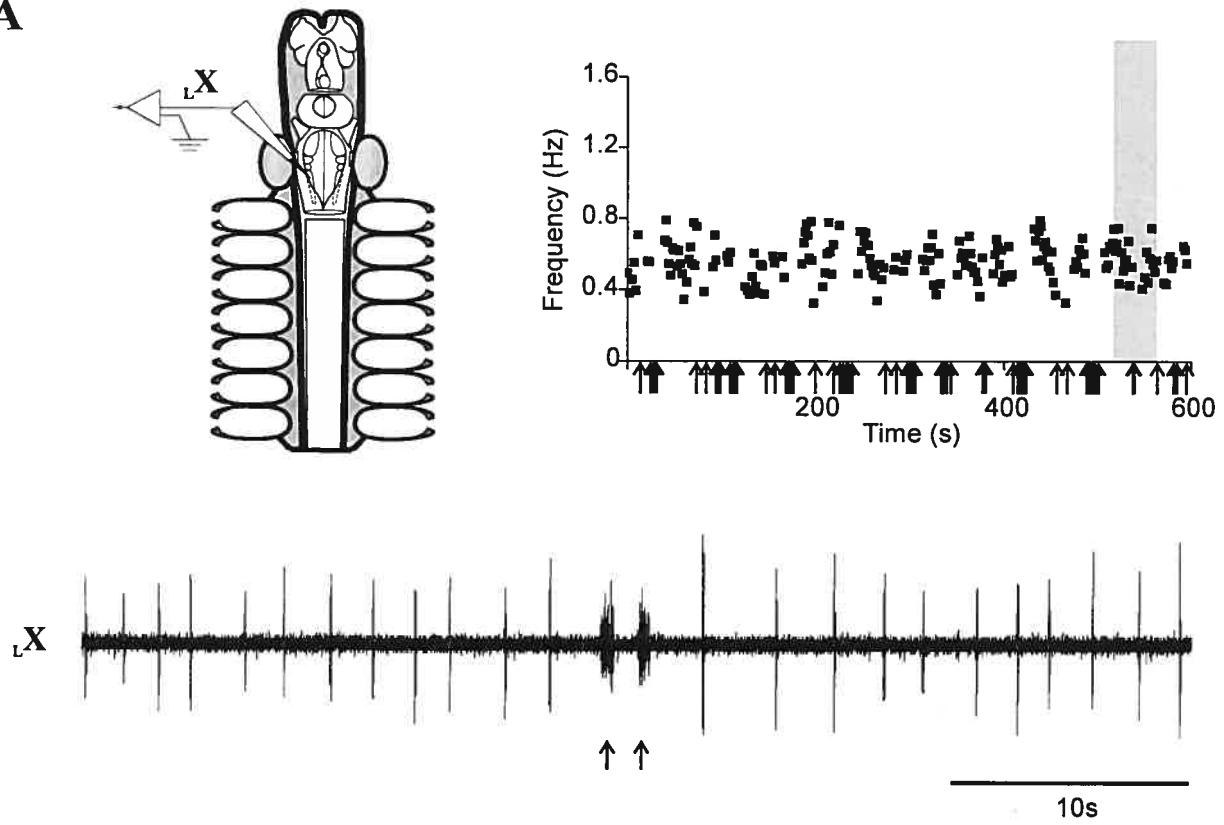


Figure 3
Martel et al.

Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

A



B

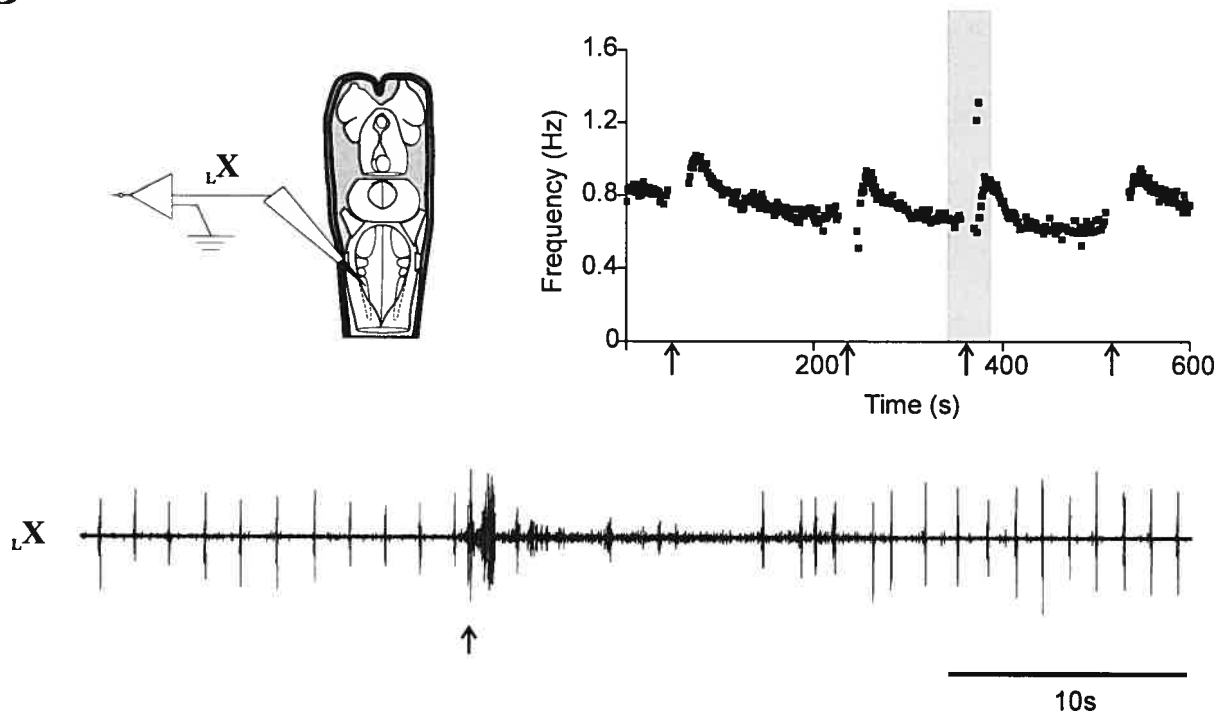
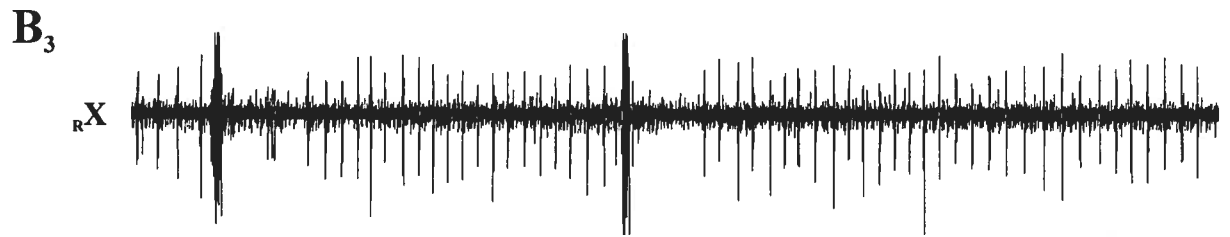
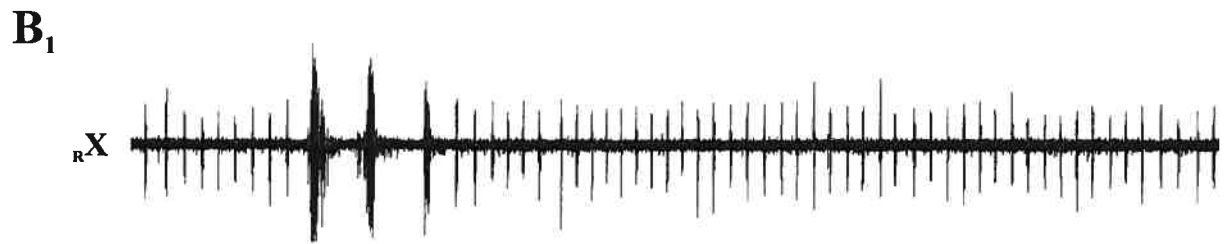
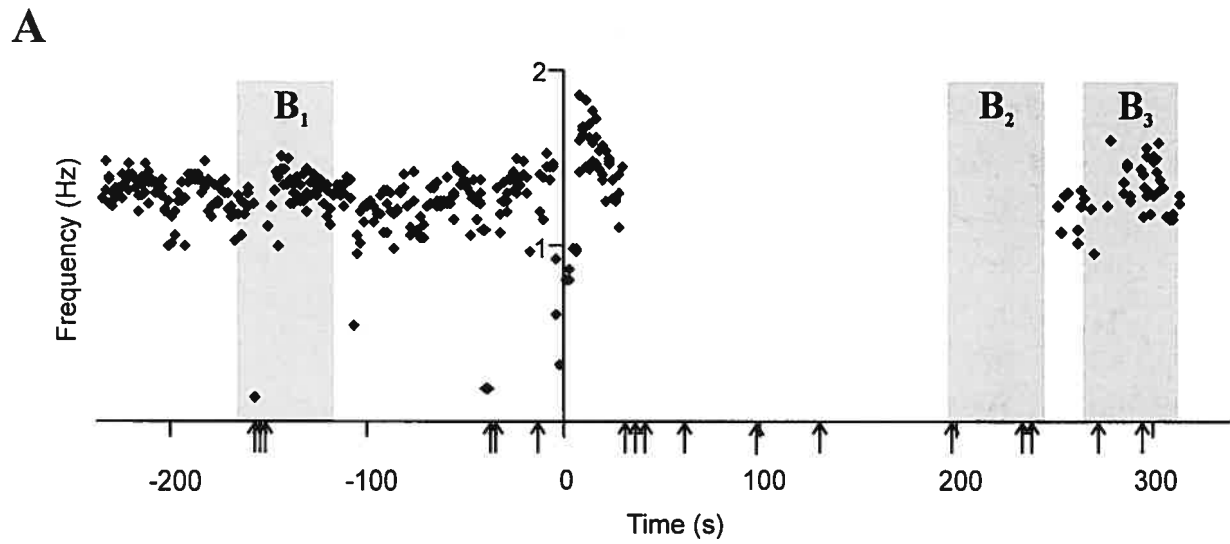


Figure 4
Martel et al.
Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon



5s

Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

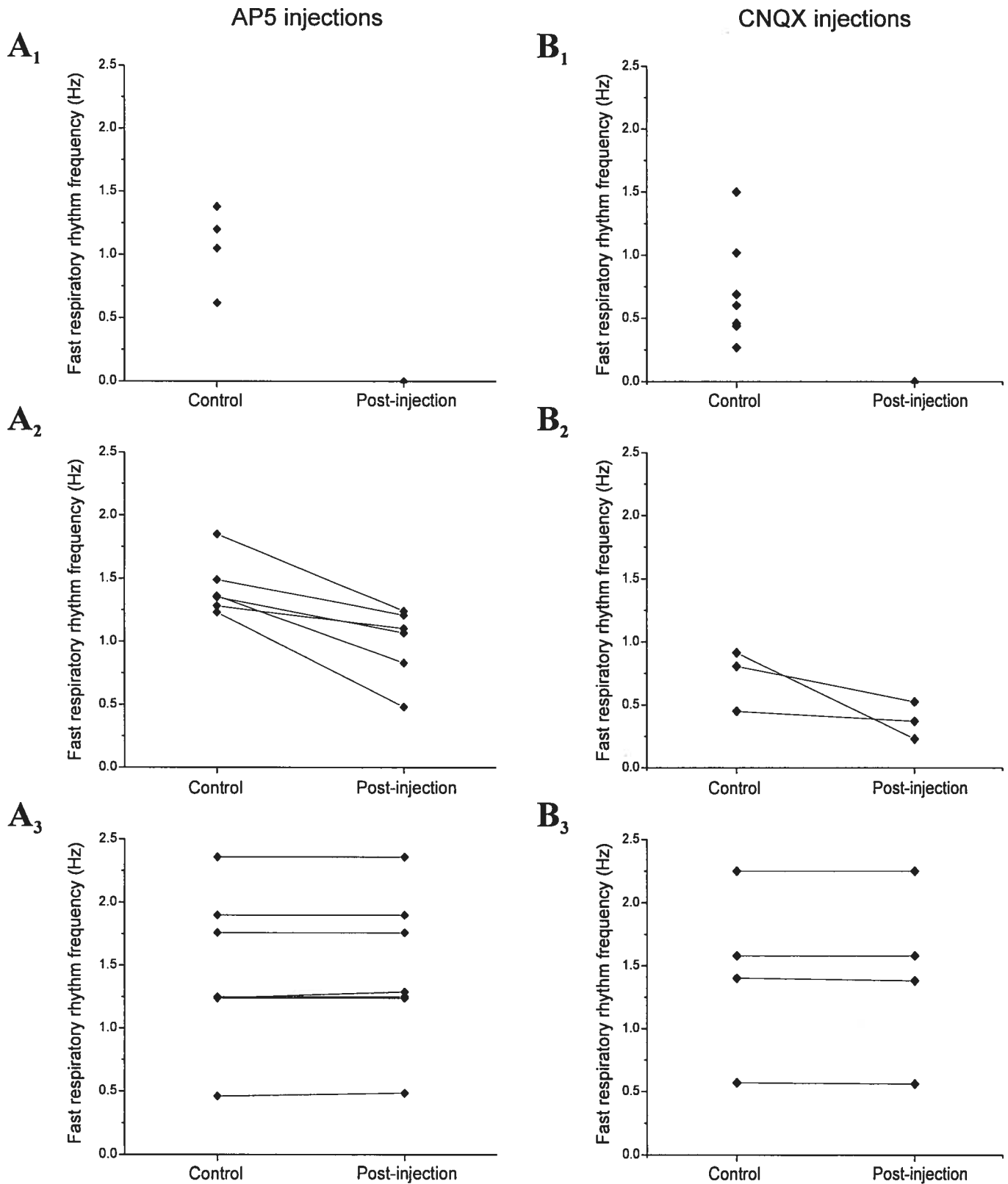
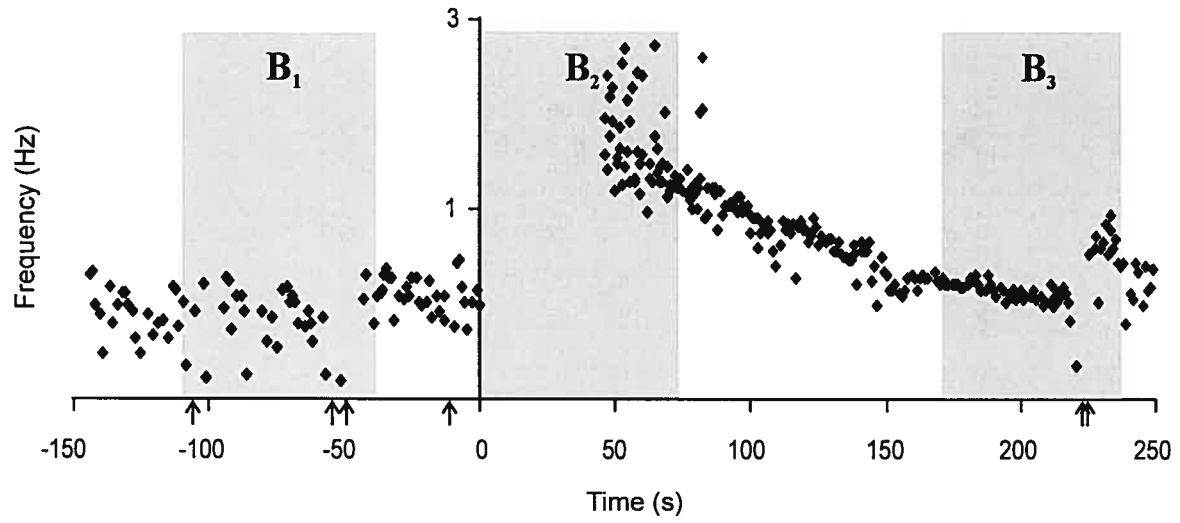


Figure 6
Martel et al.

Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

A



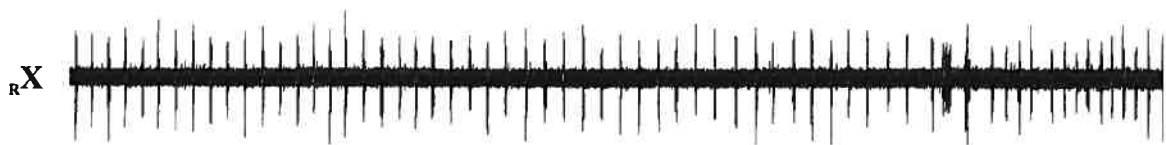
B₁



B₂



B₃

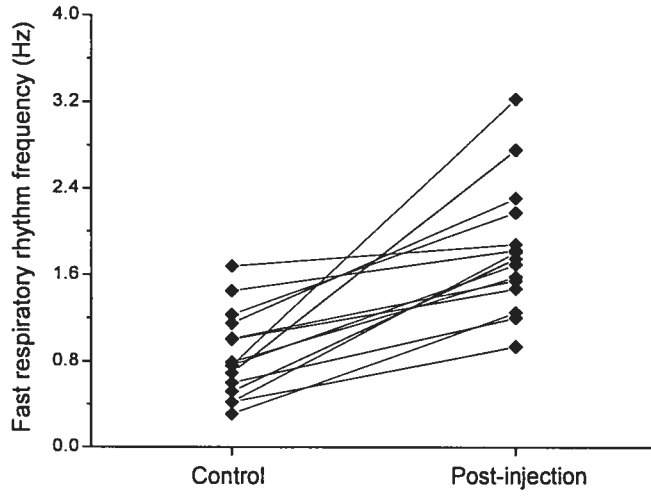


10s

Figure 7
Martel et al.
Respiratory rhythms in the lamprey rhombencephalon

AMPA injections

A



B

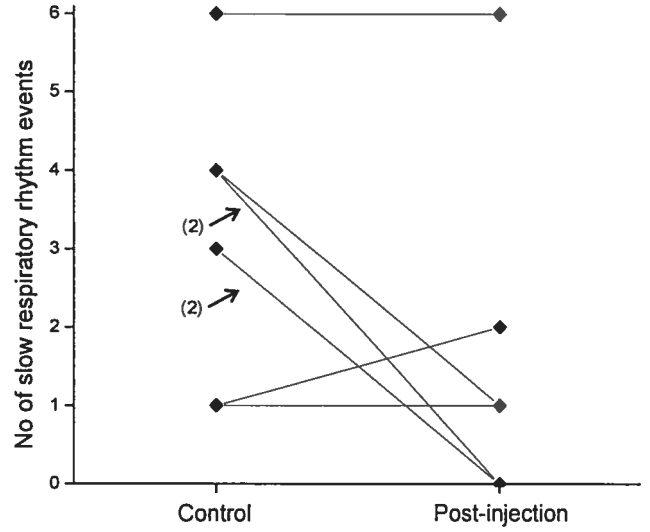


Figure 8
Martel et al.
Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

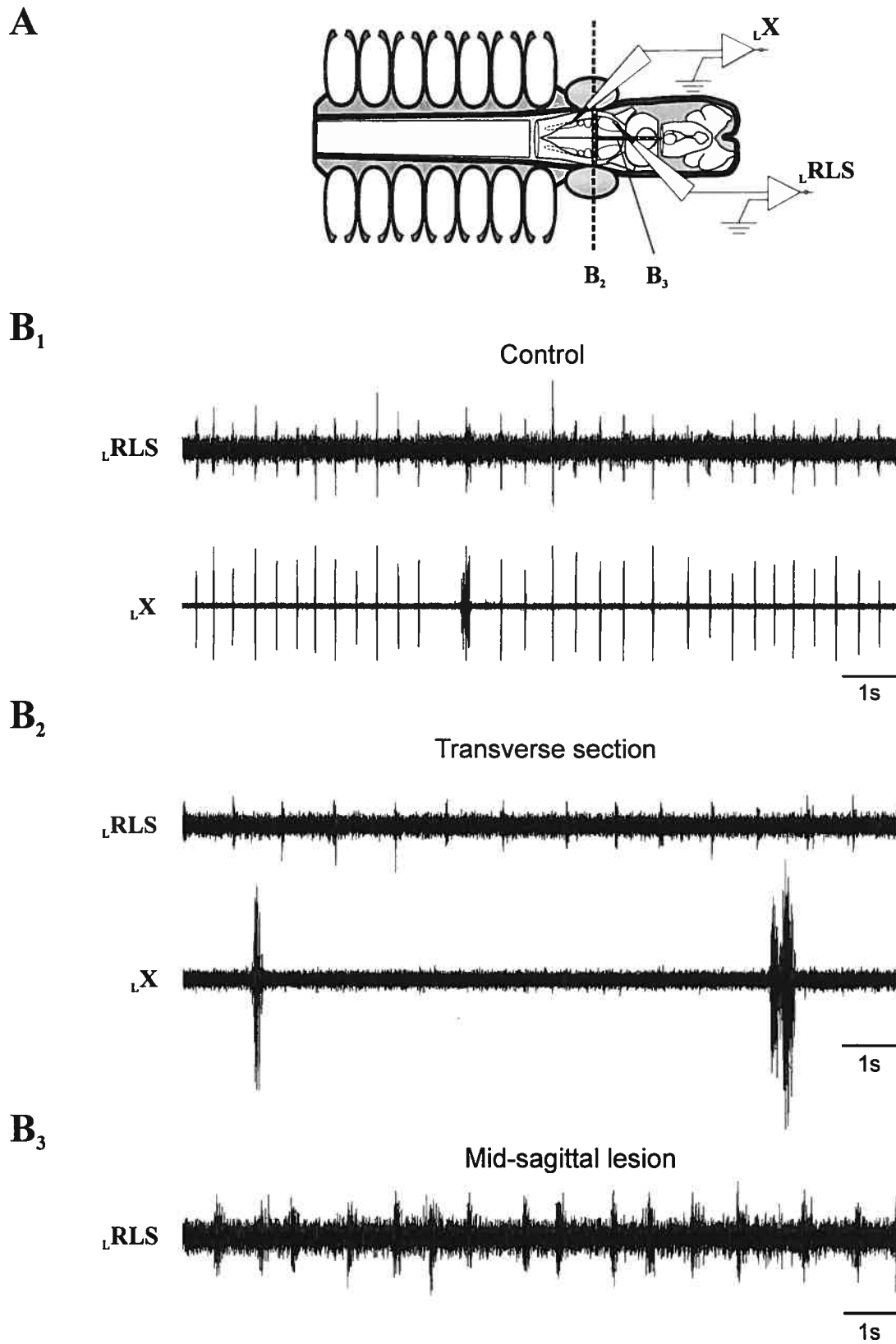


Figure 9
Martel et al.
Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon

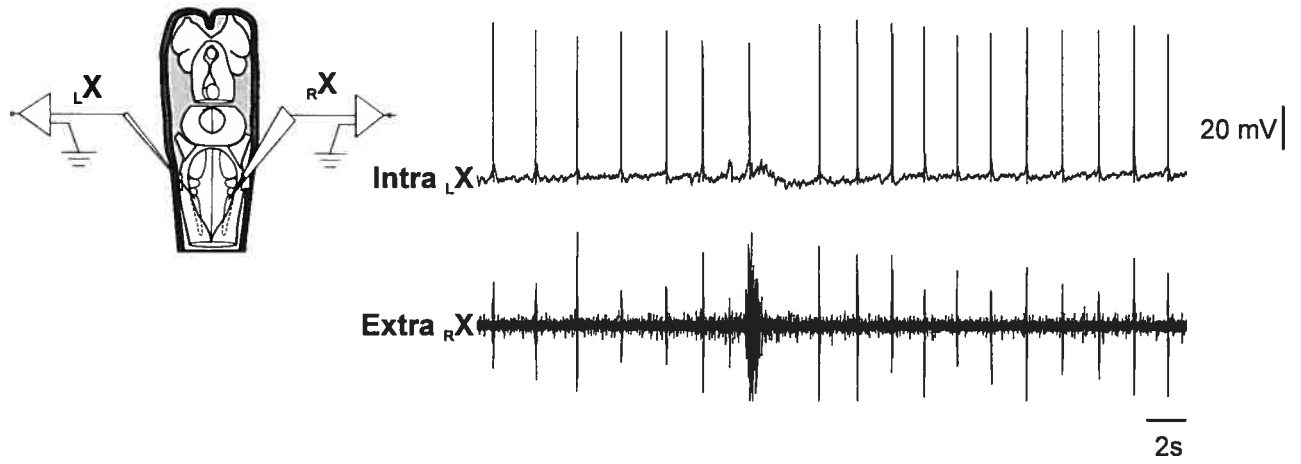
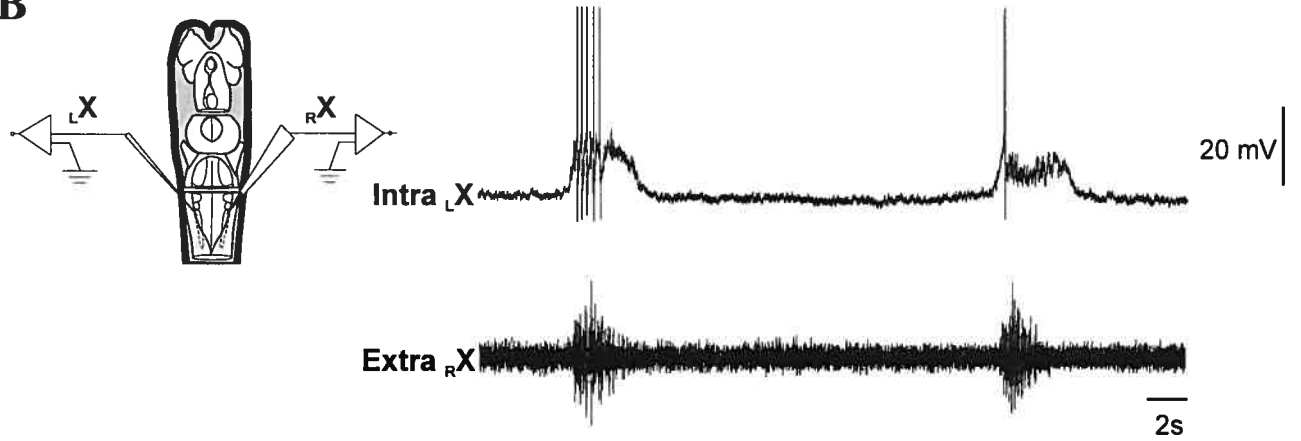
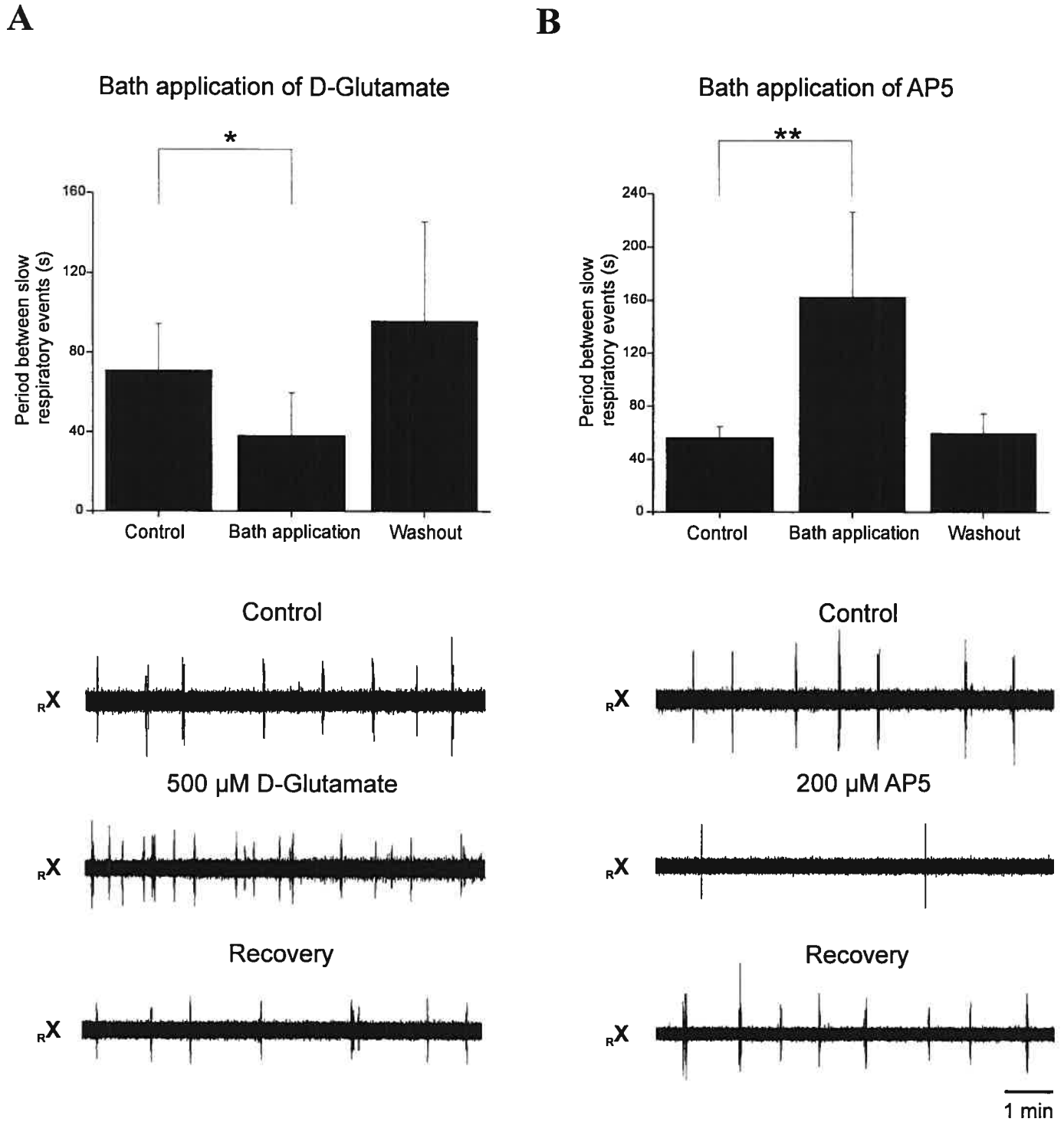
A**B**

Figure 10
Martel et al.
Respiratory rhythms generated in the lamprey rhombencephalon



Discussion

La présente étude démontre que le rythme respiratoire de la lamproie est composé de décharges de courte durée, présentes environ à chaque seconde, entremêlées avec des décharges de longue durée qui reviennent avec une récurrence moyenne de 40 secondes. Il a été démontré que sur une préparation de type isolée la majorité des décharges du rythme lent sont suivies d'une augmentation de la fréquence du rythme rapide de la respiration. De plus, des expériences de lésions ont permis de démontrer que le rythme rapide de la respiration serait généré au niveau de la partie rostrale du rhombencéphale alors que le rythme lent serait généré au niveau de la partie caudale du rhombencéphale. Des injections d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques dans une région rostro-latérale au noyau moteur du trijumeau (V) ont également permis de confirmer cette hypothèse.

5. Les deux rythmes respiratoires

5.1 Le rythme rapide et le rythme lent de la respiration

Les résultats démontrent la présence de deux activités respiratoires qui diffèrent en fréquence et en durée. Le rythme rapide de la respiration possède une fréquence de décharges régulières qui coïncide avec la contraction rythmique des branchies permettant l'expiration de l'eau. L'inspiration de l'eau est causée par l'extension passive des paniers branchiaux (Rovainen, 1977; Thompson, 1985). Le rythme rapide de la respiration correspond à la respiration « normale » (Thompson, 1985) permettant l'apport d'oxygène

via le mouvement de va-et-vient de l'eau au travers des branchies (Rovainen, 1974). La fréquence du rythme rapide de la respiration se situe généralement entre 0,3 et 2,5 Hz dans la littérature (Thompson, 1985), ce qui est du même ordre de grandeur que les résultats de la présente étude. Le rythme lent de la respiration, qui est irrégulier, coïncide avec de fortes contractions bilatérales des branchies. Ce rythme a déjà été interprété comme une activité de « toux » (Thompson, 1985) en raison de sa fonction de déloger des particules prises dans les ouvertures branchiales (Rovainen, 1974). Il est difficile de comparer la période entre les différents épisodes de rythme lent de la présente étude (environ 40 sec.) avec celle recensée dans la littérature, puisque les chercheurs y accordent généralement peu d'intérêt. En effet, les chercheurs considèrent ce rythme irrégulier plutôt comme un événement sporadique pouvant être causé par une stimulation mécanique des branchies (Thompson, 1990).

Chez les mammifères, la toux est un réflexe induit par la stimulation des récepteurs des voies respiratoires centrales et fournit la force d'expiration nécessaire afin d'enlever du mucus ou des particules au niveau du larynx, de la trachée et des bronches (Shannon et al., 1996; Pantaleo et al., 2002). L'usage de la terminologie « toux » pour décrire le rythme lent de la lamproie semble inapproprié d'un point de vue comparatif avec le comportement respiratoire retrouvé chez les mammifères. En effet, le rythme lent de la lamproie n'est pas seulement induit par une stimulation des branchies mais est également généré de façon intrinsèque au niveau du tronc cérébral. Chez les mammifères, l'eupnée est considérée comme le patron « respiratoire normal » (Lumsden, 1923) permettant la ventilation stable et à long terme des gaz sur des préparations intactes (St-John, 1998; St-John et Paton,

2000). À ce niveau, la comparaison du rythme rapide de la lamproie avec l'eupnée des mammifères semblerait plus appropriée.

Chez la grenouille adulte, deux types de décharges (buccales et pulmonaires) sont également présents *in vitro* (McLean et al., 1995). Le rythme buccal est caractérisé par des décharges de faible amplitude et permet les échanges gazeux entre l'environnement et l'oropharynx. L'oropharynx est une région suggérée comme étant peu importante au niveau des échanges gazeux chez un animal post-métamorphosé. Chez la grenouille adulte, l'apport d'oxygène se produit principalement par les poumons via le rythme pulmonaire qui est caractérisé par des décharges de plus grande amplitude (Burggren et West, 1982; Boutilier et al., 1986). Au niveau comportemental, il est possible de remarquer des similarités entre les deux rythmes respiratoires de la lamproie avec le rythme buccal et pulmonaire de la grenouille. En effet, le rythme buccal possède une fréquence de décharge, généralement entre 0,5 et 1 Hz (Wilson et al., 2002), du même ordre de grandeur que le rythme rapide de la lamproie. Le rythme pulmonaire possède une récurrence, calculée à partir de la figure 1 de l'article Wilson et al., 2002, d'environ 60 secondes, ce qui est similaire aux résultats de la présente étude en ce qui concerne le rythme lent de la lamproie. Tout comme pour le rythme lent de la respiration chez la lamproie, les décharges pulmonaires peuvent venir en épisodes de plusieurs bouffées ou apparaître de façon individuelle. Le rythme buccal et le rythme pulmonaire possèdent la même durée de décharge (Wilson et al., 2002) contrairement aux deux rythmes respiratoires de la lamproie qui possèdent des durées de décharge différentes.

5.2 Changements induits par l'isolation du cerveau de lamproie

Aucun changement n'a été observé au niveau de la fréquence du rythme rapide de la respiration suite à l'isolation du cerveau de lamproie. Cela suggère que le rythme rapide de la respiration semble être d'origine centrale et qu'en condition normale les inputs périphériques ne semblent pas affecter sa fréquence de base. À l'opposé, on observe une diminution de la récurrence des décharges du rythme lent lors du passage d'une préparation semi-intacte à isolée. Il est connu que des stimulations mécaniques de la peau de lamproie peuvent induire des décharges du rythme lent coordonnées à de fortes contractions bilatérales des branchies (Thompson, 1990). Cette diminution pourrait donc être causée par le retrait de fibres sensorielles démontrant ainsi la contribution de ces fibres dans l'activation du rythme lent. Cependant, le rythme lent doit quand même posséder une origine centrale puisqu'il est encore possible d'enregistrer ce rythme suite à l'isolation du cerveau de lamproie.

6. Interaction entre les deux rythmes

Cette étude est la première à démontrer une interaction entre les deux rythmes respiratoires de la lamproie. L'interaction décrite par une augmentation de la fréquence du rythme rapide de la respiration suite à un épisode de rythme lent, n'est pas tout à fait claire sur une préparation semi-intacte. Des changements drastiques surviennent sur une préparation isolée où la presque totalité des épisodes de rythme lent (94,0 %) sont suivis d'une augmentation de la fréquence du rythme rapide de la respiration.

Ce changement de comportement au niveau de l'interaction des deux activités rythmiques de la respiration pourrait s'expliquer par la perte d'influx sensoriels au niveau de la préparation isolée. Les influx sensoriels, sur une préparation semi-intacte de lamproie, pourraient stabiliser le rythme rapide de la respiration afin d'éviter les fluctuations de ce dernier. Les mécanorécepteurs des branchies pourraient exercer une rétroaction sur le générateur du rythme rapide de la respiration. L'isolation du tronc cérébral de la lamproie empêcherait justement les influx afférents de moduler le patron respiratoire, ce qui serait à l'origine des différences observées au niveau des deux préparations.

Il est également connu que les influx sensoriels peuvent avoir un impact sur la rythmogenèse de d'autres activités rythmiques. Par exemple, la locomotion fictive chez le chat peut être modulée par les inputs en provenance de l'articulation de la hanche (Andersson et Grillner, 1981; Andersson et Grillner, 1983). Chez les roussettes, la locomotion fictive peut subir un effet d'entraînement causé par l'activation de récepteurs sensibles à l'étirement (Grillner et Wallén, 1982). On observe le même phénomène chez la lamproie, où les « edge cells » sont également connues pour modifier le rythme fictif de la locomotion (Viana di Prisco et al., 1990; Vinay et al., 1996)

7. Localisation des deux générateurs de rythme

L'un des objectifs majeurs de la présente étude était de localiser les générateurs du rythme rapide et du rythme lent de la lamproie. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées : des lésions du cerveau de la lamproie ainsi que des injections pharmacologiques locales d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques.

7.1 Rythmogénèse par des réseaux au niveau du pons et du bulbe rachidien

Des injections d'agonistes et d'antagonistes glutamatergiques effectuées dans une région rostro-latérale au noyau moteur V sous la plaque alaire (site rostro-latéral), région potentiellement génératrice du rythme respiratoire de la lamproie (Rovainen, 1985; Russel, 1986; Thompson, 1990), ont permis d'influencer grandement le rythme rapide de la respiration. De plus, des enregistrements extracellulaires effectués au niveau du site rostro-latéral ont permis d'enregistrer la présence des deux activités rythmiques synchrones avec celles émanant des noyaux moteurs X. Cependant, suite à la lésion transverse effectuée caudalement au noyau moteur V, seul le rythme rapide est de nouveau enregistré au niveau du site rostro-latéral. Le rythme lent n'a été enregistré que dans la région caudale à la lésion. Ces résultats semblent donc démontrer l'importance de la partie rostrale du rhombencéphale dans la genèse du rythme rapide de la respiration. Des études anatomiques supportent l'hypothèse que la partie rostrale du rhombencéphale serait l'équivalent du pons des mammifères alors que la partie caudale serait homologue au bulbe rachidien (Butler et Hodos, 1996; Brocard et Dubuc, 2003).

Nos résultats viennent confirmer des études effectuées sur la lamproie qui avaient suggéré l'importance de la partie rostrale du rhombencéphale dans la genèse du rythme rapide de la respiration (Thompson, 1985; Russel, 1986) et contredire celles qui suggéraient plutôt la région du bulbe rachidien (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Au contraire, nos résultats ont démontré que le bulbe rachidien serait plutôt nécessaire à la neurogenèse du rythme lent. Dans le même ordre d'idée, l'application de drogues dissoutes dans la solution de Ringer, suite à la lésion transverse, a permis de moduler le rythme lent. Il reste donc à trouver un site au niveau du bulbe rachidien où des injections locales d'agonistes et d'antagonistes glutamatergiques pourraient affecter le rythme lent.

Malgré la proximité du site rostro-latéral avec le noyau moteur du trijumeau, les décharges rythmiques du rythme rapide ne proviennent pas de cet endroit car l'activité des motoneurones du trijumeau est indépendante du rythme respiratoire chez les lamproies adultes (Petropoulos et al., 1999). L'anatomie du système trigéminal de la lamproie est également bien documentée et les motoneurones du trijumeau sont connus pour innervier les muscles qui contrôlent la ventouse, l'apicalis, le pharynx et le vélum (Hardisty et Potter, 1972) du côté ipsilatéral (Koyama et al., 1987).

7.2 Coordination entre les générateurs pontiques et bulbaires

Lorsqu'on effectue la lésion séparant le pons du bulbe rachidien de la lamproie on observe une diminution significative du rythme rapide de la respiration alors qu'aucun changement n'est observé au niveau du rythme lent. Cela suggère que les structures

pontiques n'influencent pas le rythme lent de la respiration. À l'opposé, des inputs toniques en provenance du bulbe rachidien pourraient maintenir le rythme rapide de la respiration à une fréquence supérieure de son rythme de base. Le générateur du rythme lent pourrait même être responsable de cet effet. Puisque le rythme lent peut être enregistré dans la région pontique avant la lésion transverse, cela laisse supposer l'existence de voies ascendantes du générateur du rythme lent vers le site rostro-latéral. Ces mêmes voies pourraient moduler le rythme rapide de la respiration. De plus, puisque le rythme rapide de la respiration n'est plus enregistré à partir des noyaux moteurs X, suite à la lésion transverse, cela confirme l'existence de voies descendantes de la région pontique vers le bulbe rachidien. Ces voies descendantes, également démontrées par d'autres études (Thompson, 1985; Thompson, 1990), permettent de transmettre un signal vers les noyaux moteurs du VII, IX et X qui serait intégré avec les signaux du rythme lent du bulbe rachidien afin d'en faire un signal respiratoire.

7.3 Coordination entre les générateurs pontiques bilatéraux

Il semble également y avoir une coordination bilatérale en ce qui concerne les deux générateurs de rythme pontique. En effet, les injections unilatérales d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques ont produit un effet sur le côté ipsilatéral et controlatéral des noyaux moteurs respiratoires. Nos injections unilatérales de drogues dans le site rostro-latéral auraient pu affecter par des voies descendantes bilatérales les noyaux moteurs VII, IX et X, tel que démontré par d'autres recherches (Thompson, 1985; Thompson, 1990). Des injections unilatérales de traceurs rétrogrades dans le noyau moteur

X démontrent justement la présence de corps cellulaires au niveau du site rostro-latéral des deux côtés. La majorité de ces neurones étaient localisés au niveau de la couche cellulaire périventriculaire proche du sulcus limitant du His alors que d'autres neurones étaient retrouvés plus profondément au niveau des fibres descendantes du noyau moteur du trijumeau (Auclair et Dubuc, résultats non publiés).

De plus, suite à une seconde lésion effectuée au niveau médian du pons, nous avons démontré qu'il est possible d'enregistrer sur un des côtés le rythme rapide de la respiration. D'autres expériences de lésion médiane du tronc cérébral chez la lamproie démontrent que chaque moitié du cerveau possède également son propre générateur de patron rythmique (Rovainen, 1974; Kawasaki, 1979). Il a été proposé que le côté qui possède la fréquence respiratoire la plus rapide entraîne l'autre côté par l'intermédiaire de connections bilatérales (Kawasaki, 1979; Rovainen, 1985). Les deux côtés du pons de la lamproie pourraient donc entretenir des excitations réciproques au niveau rostro-pontique, via des fibres commissurales, afin de maintenir un seul rythme rapide synchronisé. La présence de nombreuses fibres commissurales a justement été mise en évidence par diverses études anatomiques sur le tronc cérébral de la lamproie (González et al., 1997; Pflieger et Dubuc, 2000). Une expérience de lésion sagittale médiane du tronc cérébral effectuée jusqu'au niveau du site rostro-latéral démontre que la région rostrale du pons est capable de permettre la coordination bilatérale du rythme rapide de la respiration (Thompson, 1985). Les injections d'AP5 et d'AMPA dans l'un de ces deux générateurs auraient donc pu interférer au niveau global de l'excitation réciproque des deux générateurs du rythme rapide. Ceci entraînerait un effet suffisant pour moduler bilatéralement l'activité des deux

générateurs du rythme rapide et ainsi produire un effet au niveau des noyaux moteurs des deux côtés. Chez la grenouille et les mammifères, des lésions sagittales médianes ont également démontré que le rythme respiratoire est produit bilatéralement (Wyman, 1977; Cohen, 1979; Fortin et al., 1995; McLean et al., 1995).

7.4 Rythmogenèse bulbaire et pontique chez les autres animaux

Des études *in vivo* chez le chat et des études *in vitro* chez le rat suggèrent l'importance du complexe préBötzinger dans la genèse du rythme respiratoire (Abrahams et al., 1991; Koshiya et Guyenet, 1996; Funk et al., 1993). À l'opposé, l'apnée résultant de la lésion du complexe préBötzinger du rat peut être renversée par une stimulation des chimiorécepteurs respiratoires périphériques (St-Jacques et St-John, 1999). Ces résultats suggèrent donc que d'autres régions pourraient être impliquées dans la rythmogenèse respiratoire des mammifères. De plus, certains chercheurs pensent que l'eupnée enregistrée à partir de tranches contenant le complexe préBötzinger (Smith et al., 1991; Connelly et al., 1992; Johnson et al., 1994) s'apparente plutôt à de l'halètement (St-John, 1996; St-John, 1998) et suggèrent que les décharges d'eupnée proviendraient plutôt d'un circuit médullo-pontique. Ce circuit pourrait contenir des structures tels le centre pneumotaxique et le complexe préBötzinger (St-John, 1996; St-John et Paton, 2004). Il est même suggéré que le pons soit capable de rythmogenèse (St-John, 1996). Beaucoup d'incertitudes et de controverses subsistent donc chez les mammifères quant à la localisation d'un générateur de rythme.

Chez la grenouille, les réseaux neuronaux responsables des rythmes buccal et pulmonaire sont tous deux situés au niveau du bulbe rachidien mais séparés spatialement (Wilson et al., 2002). Aucune structure pontique de la grenouille adulte n'est essentielle à la genèse du rythme respiratoire. La région pontique du trijumeau n'est pas que spécifique à la lamproie dans la rythmogénèse respiratoire mais semble être également une structure dominante chez les poissons osseux et cartilagineux. Ces espèces ont en commun l'utilisation d'une pompe buccale (Milsom et al., 2004).

8. Mécanismes impliqués dans la rythmogénèse respiratoire

8.1 Chez la lamproie

Des expériences utilisant des agonistes et des antagonistes glutamatergiques dissous dans une solution de Ringer suggèrent que les récepteurs de type ionotrope (AMPA/Kaïnate) et de type métabotrope (mGluR) puissent être impliqués dans la neurotransmission du système respiratoire de la lamproie (Bongianni et al., 1999; Bongianni et al., 2002). Bien que ces drogues aient eu un effet significatif sur le rythme rapide de la respiration, l'utilisation diffuse de ces drogues dans une solution de Ringer en diminue la portée significative. En effet, les drogues n'ont pas nécessairement produit leurs effets grâce à l'activation de récepteurs spécifiques aux générateurs du rythme rapide de la respiration. L'effet aurait pu être causé par l'interaction simultanée avec plusieurs éléments du circuit neuronal de la lamproie, donnant ainsi lieu à des interactions complexes et difficiles à interpréter. Nos injections locales de CNQX, d'AP5 et d'AMPA permettent de

surmonter cette problématique et suggèrent justement la présence de récepteurs AMPA/Kaïnate et NMDA modulant la fréquence du rythme rapide au niveau du site rostro-latéral.

8.2 Chez les mammifères

Deux modèles sont proposés chez les mammifères, afin d'expliquer la rythmogenèse respiratoire. Il y a le modèle « pacemaker » où des neurones pacemakers génèrent de façon intrinsèque les décharges rythmiques. Il y a également le modèle « pacemaker en groupe » où la stimulation de plusieurs neurones pacemakers groupés permettrait d'atteindre une dépolarisation assez élevée afin d'entraîner les décharges rythmiques (Rekling et Feldman, 1998). Au niveau cellulaire, deux mécanismes ont été décrits afin d'expliquer les décharges rythmiques. Le premier mécanisme est basé sur les courants Na^+ persistants (I_{NaP}) (Smith et al., 1991; Del Negro et al., 2001) alors que le deuxième est basé sur les courants Ca^{2+} (I_{Ca}) et les courants cationiques non spécifiques activés par le Ca^{2+} (I_{CAN}) (Thoby-Brisson et Ramirez, 2001). Il a été récemment démontré que le blocage pharmacologique des courants de type I_{NaP} et I_{CAN} entraîne l'arrêt du rythme respiratoire qui peut cependant être ravivé en augmentant l'excitabilité neuronale avec de la substance P. Face à ces nouveaux résultats, il a été suggéré que le rythme respiratoire enregistré au niveau de tranches ne serait pas d'origine « pacemaker » mais émergerait plutôt lorsque les neurones sont suffisamment excités (Del Negro et al., 2005). Chez la lamproie, des études de tranches du site rostro-latéral seront effectuées prochainement afin de comprendre les différents mécanismes cellulaires permettant la rythmogenèse du rythme

rapide de la respiration. Ces résultats pourraient nous aider à comprendre les mécanismes par lesquels les injections d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques arrêtent le rythme rapide de la respiration chez la lamproie. En effet, la drogue injectée aurait pu agir directement sur les récepteurs de neurones pacemakers ou bien agir indirectement en bloquant les inputs excitateurs glutamatergiques du site rostro-latéral.

9. Conclusion

9.1 Représentation schématique

En conclusion, nous proposons un modèle de l'organisation du réseau neuronal générant les rythmes respiratoires chez la lamproie (Fig. 9). Dans ce modèle, le rythme rapide de la respiration serait généré uniquement dans la région pontique, tel que proposé par d'autres études. D'autres études ont attribué la localisation de la neurogenèse du rythme rapide plutôt au niveau caudal du rhombencéphale (Kawasaki, 1979; Kawasaki, 1984). Nos résultats démontrent clairement qu'au contraire cette région serait plutôt nécessaire dans la neurogenèse du rythme lent de la respiration. De plus, cette étude a également été la première à démontrer l'importance du rythme lent de la respiration comme partie intégrante du signal respiratoire de la lamproie. La localisation du générateur du rythme lent au niveau du bulbe rachidien reste néanmoins inconnue.

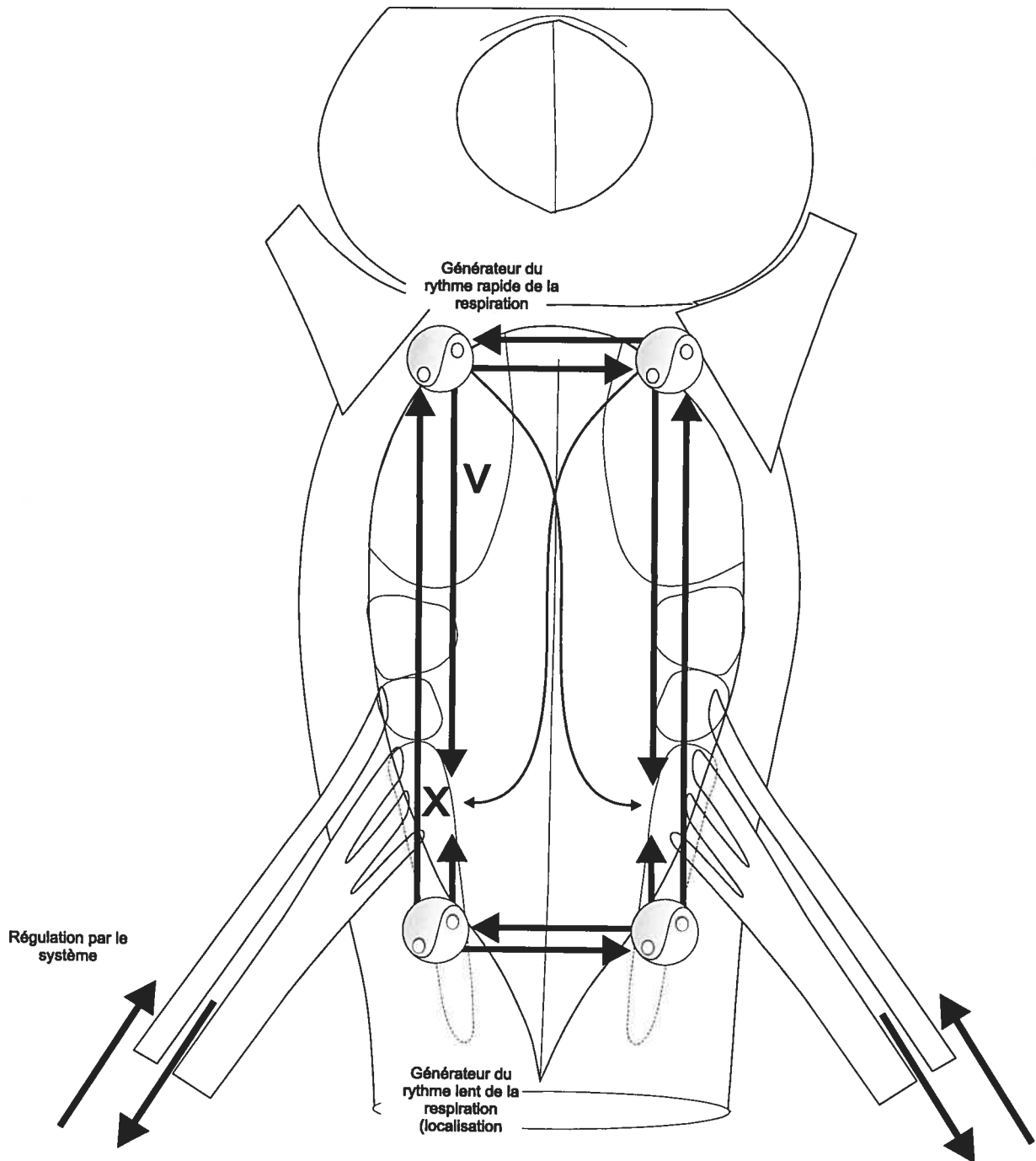


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation neuronale du système respiratoire de la lamproie. **V** : Noyau moteur du trijumeau; **X** : Noyau moteur vague.

Les générateurs du rythme rapide des deux côtés du pons entretiendraient des excitations réciproques au niveau rostro-pontique afin de maintenir un seul rythme rapide synchronisé. Cette étude a été la première à mettre en évidence l'interaction entre le rythme rapide et le rythme lent de la respiration. En effet, sur une préparation isolée du tronc cérébral de lamproie les épisodes de rythme lent sont suivis majoritairement d'une augmentation de la fréquence du rythme rapide de la respiration. Cela laisse supposer une certaine modulation exercée par les générateurs du rythme lent vers les générateurs du rythme rapide. Cependant, cet effet est moindre sur une préparation semi-intacte et serait sûrement le résultat d'une régulation par le système sensoriel.

Chez les mammifères, la localisation du générateur de rythme respiratoire reste incertain (Cohen, 1979; Smith et al., 1991; St-John, 1996; St-John, 1998; St-John et Paton, 2004). Les différentes hypothèses semblent être bien appuyées par des résultats plausibles. Face à toutes ces contradictions, il est difficile d'appuyer une hypothèse au détriment d'une autre. D'où l'importance d'utiliser des modèles animaux dont les résultats pourront être représentatifs des vertébrés supérieurs. La lamproie possède justement plusieurs avantages pour l'étude de la localisation des générateurs centraux de patron respiratoire. Les GCPs ont été le mieux caractérisés jusqu'à présent sur des invertébrés. À l'opposé, chez les vertébrés, la complexité du système nerveux rend la tâche plus difficile. Cependant, l'étude des vertébrés primitifs, comme la lamproie, semble un compromis intéressant entre la simplicité de son système nerveux et la possibilité que les résultats obtenus puissent être représentatifs des vertébrés supérieurs (Grillner, 2003). En effet, il est proposé que les

systèmes neuronaux responsables des comportements moteurs aient été bien conservés lors de l'évolution des vertébrés (Grillner, 2003). Par conséquent, les études effectuées sur la lamproie dans cette recherche pourraient également servir de modèle simplifié du système respiratoire afin d'aider à résoudre les contradictions et interrogations sur la localisation et les mécanismes de neurogenèse des différents rythmes respiratoires chez les mammifères. Il reste à démontrer que l'eupnée enregistrée chez la lamproie est l'équivalent du rythme respiratoire enregistré à partir du pons des mammifères. Bien qu'on ne puisse affirmer avec exactitude que les mécanismes de rythmogenèse soient identiques chez les mammifères et la lamproie, il n'en demeure pas moins que notre étude soulève des questions importantes quant au rôle possible des régions pontiques dans la genèse respiratoire. Par exemple, le site rostro-latéral pourrait être une région équivalente aux noyaux Kölliker-Fuse et parabrachial médian, auxquels on a associé le rôle de centre pneumotaxique. Des chercheurs chez les mammifères suggèrent que le centre pneumotaxique serait important dans la genèse d'eupnée. Des études supplémentaires devront être effectuées chez les mammifères pour élucider le rôle de cette région dans la rythmogenèse respiratoire.

9.2 Perspectives futures

Dernièrement, nous avons démontré que la substance P pouvait moduler le rythme rapide de la respiration (observations personnelles). Il serait intéressant de poursuivre ces recherches en isolant le site rostro-latéral dans une préparation en tranche afin d'y enregistrer l'activité cellulaire de cette région. Des marqueurs aux récepteurs de la substance P pourraient être combinés à la substance P injectée afin d'identifier précisément

les cellules exprimant les récepteurs NK1, responsables de l'augmentation de la fréquence respiratoire. Cela nous permettrait de vérifier la présence de récepteurs NK1 au niveau du site rostro-latéral. Il est connu, que chez les mammifères, des injections de substance P au niveau du complexe préBötzinger peuvent modifier le rythme respiratoire (Gray et al., 1999). De plus, le complexe préBötzinger a été défini en fonction de la portion des neurones NK1R propriobulbaires réagissant à la substance P (Feldman et al., 2003). Il importe d'identifier les cellules des générateurs respiratoires et d'identifier les mécanismes cellulaires utilisés dans la rythmogenèse.

Bibliographie

Abrahams, T.P., Hornby, P.J., Walton, D.P., DaSilva, A.M.T., Gillis, R.A. (1991) An excitatory amino acid(s) in the ventrolateral medulla is (are) required for breathing to occur in the anesthetized cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259:1388-1395.

Alheid, G.F., Milsom, W.K., McCrimmon, D.R. (2004) Pontine influences on breathing: an overview. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 143:105-114.

Aminoff, M.J., Sears, T.A. (1971) Spinal integration of segmental, cortical and breathing inputs to thoracic respiratory motoneurons. *J. Physiol.* 215:557-575.

Andersson, O., Grillner, S. (1981) Peripheral control of the cat's step cycle. I. Phase dependent effects of ramp-movements of the hip during "fictive locomotion". *Acta Physiol. Scand.* 113:89-101.

Andersson, O., Grillner, S. (1983) Peripheral control of the cat's step cycle. II. Entrainment of the central pattern generators for locomotion by sinusoidal hip movements during "fictive locomotion". *Acta Physiol. Scand.* 118:229-239.

Aoki, M., Mori, S., Kawahara, H., Watanabe, H., Ebata, N. (1980) Generation of spontaneous respiratory rhythm in high spinal cats. *Brain Res.* 202:51-63.

Arita, H., Kogo, N., Koshiya, N. (1987) Morphological and physiological properties of caudal medullary expiratory neurons of the cat. *Brain Res.* 401:258-266.

Ballanyi, K., Onimura, H., Homma, I. (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Prog. Neurobiol.* 59:583-684.

Barillot, J.C., Grélot, L., Reddad, S., Bianchi, A.L. (1990) Discharge patterns of laryngeal motoneurons in the cat: an intracellular study. *Brain Res.* 509:99-106.

Berger, A.J. (1979) Phrenic motoneurons in the cat: subpopulations and nature of respiratory drive potentials. *J. Neurophysiol.* 42:76-90.

Berger, A.J., Averill, D.B., Cameron, W.E. (1984) Morphology of inspiratory neurons located in the ventrolateral nucleus of the tractus solitarius of the cat. *J. Comp. Neurol.* 224:60-70.

Bertrand, F., Hugelin, A. (1971) Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. *J. Neurophysiol.* 34:189-207.

Bertrand, F., Hugelin, F.A., Vibert, J.F. (1973) Quantitative study of anatomical distribution of respiration-related neurons in the pons. *Exp. Brain Res.* 16:383-399.

Bianchi, A.L. (1971) Localisation et étude des neurones respiratoires bulbaires. Mise en jeu antidromique par stimulation spinale ou vagale. *J. Physiol. (Paris)* 63:5-40.

Bianchi, A.L., Barillot, J.C. (1982) Respiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus : pontile, medullary, spinal and vagal projections. *Neurosci. Lett.* 31:277-282.

Bianchi, A.L., Denavit-Saubié, M., Champagnat, J. (1995) Central control of breathing in mammal : neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* 75:1-45.

Bianchi, A.L., St-John, W.M. (1982) Medullary axonal projections of respiratory neurons of pontile pneumotaxic center. *Respir. Physiol.* 48:357-373.

Boggs, D.F. (2002) Interactions between locomotion and ventilation in tetrapods. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133:269-288.

Bongianni, F., Deliagina, T.G., Grillner, S. (1999) Role of glutamate receptor subtypes in the lamprey respiratory network. *Brain Res.* 826:298-302.

Bongianni, F., Mutolo, D., Carfi, M., Pantaleo, T. (2002) Group I and II metabotropic glutamate receptors modulate respiratory activity in the lamprey. *Eur. J. Neurosci.* 16:454-460.

Boutilier, R.G., Glass, M.L., Heisler, N. (1986) The relative distribution of pulmocutaneous blood flow in *Rana catesbeiana*: effects of pulmonary or cutaneous hypoxia. *J. Exp. Biol.* 26:33-39.

Brocard, F., Bardy, C., Dubuc, R. (2005) Modulatory effect of substance P to the brain stem locomotor command in lampreys. *J. Neurophysiol.* 93(4): 2127- 2141.

Brocard, F., Dubuc, R. (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J. Neurophysiol.* 90(3): 1714-1727.

Brodin, L., Grillner, S. (1986) Effects of magnesium on fictive locomotion induced by activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the lamprey spinal cord in vitro. *Brain Res.* 380:244-252.

Buchanan, J.T., Grillner, S. (1987) Newly identified glutamate interneurons and their role in locomotion in the lamprey spinal cord. *Science* 236:312-316.

Burggren, W.W., West, N.H. (1982) Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Respir. Physiol.* 47:151-164.

Burlerson, M.L., Smith, R.L. (2001) Central nervous control of gill filaments muscles in channel catfish. *Respir. Physiol.* 126:103-112.

Butera, R., Rinzel, J., Smith, J.C. (1999) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger Complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* 82:398-415.

Butler, A.B., Hodos, W. (1996) *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. Wiley-Liss, New York, NY. 744 pages.

Bystrzycka, E.K. (1980) Afferent projections to the dorsal and ventral respiratory nuclei in the medulla oblongata of the cat studied by horseradish peroxidase technique. *Brain Res.* 185:59-66.

Cameron, W.E., Averill, D.B., Berger, J. (1983) Morphology of cat phrenic motoneurons as revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 219:70-80.

Cohen, M.I. (1979) Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol. Rev.* 59:1105-1173.

Cohen, M.I., Huang, W.-X., Barnhardt, R., See, W.R. (1993) Timing of medullary late-inspiratory neuron discharges: vagal afferent effects indicate possible off-switch. *J. Neurophysiol.* 69:1784-1787.

Cohen, M.I., Wang, S.C. (1959) Respiratory neuronal activity in the pons of cat. *J. Neurophysiol.* 22:33-50.

Connelly, C.A., Dobbins, E.G., Feldman, J.L. (1992) Pre-Bötzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res.* 590:337-340.

Delcomyn, F. (1980) Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science* 210:492-498.

Del Negro, C.A., Johnson, S.M., Butera, R.J., Smith, J.C. (2001) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. III. Experimental tests of model predictions. *J. Neurophysiol.* 86:59-74.

Del Negro, C.A., Koshiya, N., Butera, R.J., Smith, J.C. (2002) Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-Bötzinger complex inspiratory neurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 88:2242-2250.

Del Negro, C.A., Morgado-Valle, C., Hayes, J.A., Mackay, D.D., Pace, R.W., Crowder, E.A., Feldman, J.L. (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J. Neurosci.* 25(2):446-453.

Diethelm, W.R., Spyer, K.M. (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of *in vivo* and *in vitro* models. *Trends Neurosci.* 24:464-472.

Dobbins, E.G., Feldman, J.L. (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J. Comp. Neurol.* 347:64-86.

Ellenberger, H.H., Feldman, J.L. (1989) Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res.* 513:35-42.

Feldman, J.L., Cohen, M.I. (1978) Relation between expiratory duration and rostral medullary expiratory neuronal discharge. *Brain Res.* 141:172-178.

Feldman, J.L., Cohen, M.I., Wolotsky, P. (1976) Powerful inhibition of pontine respiratory neurons by pulmonary afferent activity. *Brain Res.* 104:341-346.

Feldman, J.L., Mitchell, G.S., Nattie, E.E. (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Ann. Rev. Neurosci.* 26:239-266.

Feldman, J.L., Smith, J.C. (1989) Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Ann. NY Acad. Sci.* 563:114-130.

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

Fung, M.L., Wang, W., St-John, W.M. (1994) Medullary loci critical for expression of gasping in adults rats. *J. Physiol.* 480:597-611.

Funk, G., Smith, J., Feldman, J. (1993) Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices: role of excitatory amino acids. *J. Neurophysiol.* 70(4):1497-1515.

González, M.J., Manson, M.J., Anadón, R. (1997) Octavolateral neurons projecting to the middle and posterior rhombencephalic reticular nuclei of larval lamprey: a retrograde horseradish peroxidase labeling study. *J. Comp. Neurol.* 384:396-408.

Gordon, D.C., Richmond, F.J.R. (1990) Topography in the phrenic motoneuron nucleus demonstrated by retrograde multiple-labelling techniques. *J. Comp. Neurol.* 292:424-434.

Gravel, J., Lund, J.P., Dubuc, R. (2005) Interactions between locomotion and respiration in lampreys. *Soc. Neurosci. Abst. Program No.* 866.3.

Gray, P.A., Janczewski, W.A., Mellen, N., McCrimmon, D.R., Feldman, J.L. (2001) Normal breathing requires preBotzinger Complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat. Neurosci.* 4:927-930.

Gray, P.A., Rekling, J.C., Bocchiaro, C.M., Feldman, J.L. (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science* 286:1566-1568.

Greer, J.J., Smith, J.C., Feldman, J.L. (1991) Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J. Physiol.* 437:727-749.

Grélot, L., Barillot, J.C., Bianchi, A.L. (1989) Central distributions of the efferent and afferent components of the pharyngeal branch to the vagus and glossopharyngeal nerves: an HRP study in the cat. *Exp. Brain Res.* 78:327-335.

Grélot, L., Bianchi, A.L., Iscoe, S., Remmers, J.E. (1988) Expiratory neurones of the rostral medulla: anatomical and functional correlates. *Neurosci. Lett.* 50:23-40.

Grillner, S. (2003) The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:573-586.

Grillner, S., Wallén, P. (1982) On peripheral control mechanisms acting on the central pattern generators for swimming in the dogfish. *J. Exp. Biol.* 98:1-22.

Grillner, S., Wallén, P., Dale, N., Brodin, L., Buchanan, J., Hill, R. (1987) Transmitters, membrane properties and network circuitry in the control of locomotion in the lamprey. *Trends Neurosci.* 10:34-41.

Gromysz, H. (1984) The effects of pontine or bulbar transection on the respiratory pattern in the rabbit. *Acta Neurobiol.* 44:239-247.

Gromysz, H., Karczewski, W.A. (1982) Phrenic motoneurone activity in split-brainstem cats and monkeys. *Respir. Physiol.* 50:51-61.

Gromysz, H., Karczewski, W.A. (1984) The split-respiratory centre in the cat : responses to hypercapria. *Respir. Physiol.* 57:225-233.

Guimond, J.C., Auclair, F., Lund, J.P., Dubuc, R. (2003) Anatomical and physiological study of respiratory motor innervation in lampreys. *Neuroscience* 122:259-266.

Guntheroth, W.G., Kawabori, I. (1975) Hypoxic apnea and gasping. *J. Clin. Invest.* 56(6):1371-1378.

Guyenet, P.G., Sevigny, C.P., Weston, M.C., Stornetta, R.L. (2002) Neurokinin-1 receptor expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J. Neurosci.* 22:3806-3816.

Haji, A., Takeda, R., Okazaki, M. (2000) Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol. Ther.* 86(3):277-304

Hardisty, M.W., Potter, I.C. (1972) *The biology of lampreys.* Academic Press, New York. 288 pages.

Hilaire, G., Pásaro, R. (2003) Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammal. *Am. Physiol. Soc.* 18:23-28.

Hoff, H.E., Breckenridge, C.G. (1949) The medullary origin of respiratory periodicity in the dog. *Am. J. Physiol.* 158:157-172.

Homma, S. (1975) Velar motoneurons of lamprey larvae. *J. Comp. Physiol.* 104:175-183.

Homma, S. (1979) Conductance changes during bath applications of β -alanine and taurine in giant interneurons of the isolated lamprey spinal cord. *Brain Res.* 173:287-293.

Huang, Q., Zhou, D., St-John, W.M. (1997) Lesions of regions for *in vitro* ventilatory genesis eliminates gasping but not eupnoea. *Respir. Physiol.* 107:111-123.

Johnson, S.M., Smith, J.C., Funk, G.D., Feldman, J.L. (1994) Pacemaker behaviour of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J. Neurophysiol.* 72:2598-2608.

Kalia, M. (1981) Anatomical organization of central respiratory neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 43:105-120.

Kastella, K.G., Spurgeon, H.A., Weiss, G.K. (1974) Respiratory-related neurons in anterior hypothalamus of the cat. *Am. J. Physiol.* 227:710-713.

Kawasaki, R. (1979) Breathing Rhythm-generation in the adult lamprey, *Entosphenus japonicus*, *Jpn. J. Physiol.* 29:327-338.

Kawasaki, R. (1984) Breathing rhythm-generation mechanism in the adult lamprey (*Lampetra japonica*). *Jpn. J. Physiol.* 34:319-335.

Koshiya, N., Guyenet, P. (1996) Tonic sympathetic chemoreflex after blockage of respiratory rhythmogenesis in the rat. *J. Physiol.* 491:859-869.

Koshiya, N., Smith, J.C. (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized *in vitro*. *Nature* 400:360-363.

Koyama, H., Kishida, R., Goris, R.C., Kusunoki, T. (1987) Organization of sensory and motor nuclei of the trigeminal nerve in lampreys. *J. Comp. Neurol.* 264:437-448.

Krieger, P., Grillner, S., El Manira, A. (1998) Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors contributes to burst frequency regulation in the lamprey locomotor network. *Eur. J. Neurosci.* 10:3333-3342.

Le Ray, D., Brocard, F., Bourcier-Lucas, C., Auclair, F., Lafaille, P., Dubuc, R. (2003) Nicotinic activation of reticulospinal cells involved in the control of swimming in lampreys. *Eur. J. Neurosci.* 17(1):137-148.

Le Ray, D., Brocard, F., Dubuc, R. (2004) Muscarinic modulation of the trigemino-reticular pathway in lampreys. *J. Neurophysiol.* 92(2):926-938.

Lieske, S.P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., Ramirez, J.M. (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat. Neurosci.* 3(6):600-607.

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

Lipski, J., Martin-body, R.L. (1987) Morphological properties of respiratory intercostals motoneurons in cats as revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.* 260:434-434.

Liu, Y.Y., Ju, G., Wong-Riley, M.T. (2001) Distribution and colocalization of neurotransmitters and receptors in the pre-Botzinger complex of rats. *J. Appl. Physiol.* 91:1387-1395.

Lumsden, T. (1923) Observation on the respiratory centres in the cat. *J. Physiol.* 57:153-160.

McLean, H.A., Kimura, N., Kogo, N., Perry, S.F., Remmers, J.E. (1995) Fictive respiratory rhythm in the isolated brainstem of frogs. *J. Comp. Physiol. A* 176:703-713.

Merrill, E.G. (1970) The lateral respiratory neurons of the medulla: their association with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain Res.* 24:11-28.

Miller, A.D., Wilson, V.J. (1983) Vomiting center reanalyzed: an electrical stimulation study. *Brain Res.* 270:154-158.

Milsom, W.K., Chatburn, J., Zimmer, M.B. (2004) Pontine influences on respiratory control in ectothermic and heterothermic vertebrates. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 143:263-280.

Mutolo, D., Bongianini, F., Carfi, M., Pantaleo, T. (2002) Respiratory changes induced by kainic acid lesions in rostral ventral respiratory group of rabbits. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283:227-242.

Naohiro, K., Smith, J.C. (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized *in vitro*. *Nature* 400:360-363.

Ngai, S.H., Wang, S.C. (1957) Organization of central respiratory mechanisms in the brain stem of the cat: localization by stimulation and destruction. *Am. J. Physiol.* 190:343-349.

Nunez-abades, P.A., Pásaro, R., Bianchi, A.L. (1992) Study of the topographical distribution of different populations of motoneurons within rat's nucleus ambiguus, by

means of four different fluorochromes. *Neurosci. Lett.* 135:103-107.

Oku, Y., Tanaka, I., Ezure, K. (1994) Activity of bulbar respiratory neurons during fictive coughing and swallowing in the decerebrate cat. *J. Physiol.* 480:309-324.

Orem, J., Netick, A. (1982) Characteristics of midbrain respiratory neurons in sleep and wakefulness in the cat. *Brain Res.* 244:231-241.

Otake, H., Sasaki, H., Ezure, K., Manabe, M. (1989) Axonal trajectory and terminal distribution of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat's medulla. *J. Comp. Neurol.* 286:218-230.

Pantaleo, T., Bongianni, F., Mutolo, D. (2002) Central nervous mechanisms of cough. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 15(3):227-233.

Pantaleo, T., Corda, M. (1986) Respiratory-related neurons in the medial nuclear complex of the solitary tract of the cat. *Respir. Physiol.* 64:135-148.

Pena, F., Parkis, M.A., Tryba, A.K., Ramirez, J.M. (2004) Differential contribution of pacemakers properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43:105-117.

Petropoulos, D., Lund, J.P., Dubuc, R. (1999) A physiological study of brainstem and peripheral inputs to trigeminal motoneurons in lampreys. *Neuroscience* 91:379-389.

Pflieger, J.F., Dubuc, R. (2000) Relationship between vestibular primary afferents and vestibulospinal neurons in lampreys. *J. Comp. Neurol.* 427(2):255-273.

Pitts, R.F., Magoun, H.W., Ranson, S.W. (1939) The origin of respiratory rhythmicity. *Am. J. Physiol.* 127:654-670.

Ramirez, J.M., Zuperku, E.J., Alheid, G.F., Lieske, S.P., Ptak, K., McCrimmon, D.R. (2002) Respiratory rhythm generation: converging concepts from *in vitro* and *in vivo* approaches? *Respir. Physiol. Neurobiol.* 131:43-56.

Rekling, J.C., Champagnat, J., Denavit-Saubié, M. (1996) Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 75:795-810.

Rekling, J.C., Feldman, J.L. (1998) Pre-Bötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu. Rev. Physiol.* 60:385-405.

Rekling, J.C., Shao, X.M., Feldman, J.L. (2000) Electrical coupling and excitatory synaptic transmission between rhythmogenic respiratory neurons in the PreBötzinger complex. *J. Neurosci.* 20(23):113-117.

Richter, D.W. (1982) Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J. Exp. Biol.* 100:93-107.

Richter, D.W., Ballanyi, K., Schwarzacher, S. (1992) Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:788-793.

Richter, D.W., Spyer, K.M. (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of *in vivo* and *in vitro* models. *Trends in Neurosci.* 24:464-472.

Rovainen, C.M. (1974) Respiratory motoneurons in lampreys. *J. Comp. Physiol.* 94:57-68.

Rovainen, C.M. (1977) Neural control of ventilation in the lamprey. *Fed. Proc.* 36:2386-2389.

Rovainen, C.M. (1983) Generation of respiratory activity by the lamprey brain exposed to picrotoxin and strychnine, and weak synaptic inhibition in motoneurons. *Neuroscience* 10:875-882.

Rovainen, C.M. (1985) Respiratory bursts at the midline of the rostral medulla of the lamprey. *J. Comp. Physiol. A* 157:303-309.

Rovainen, C.M. (1996) Feeding and breathing in lamprey. *Brain Behav. Evol.* 48:297-305.

Rovainen, C.M., Schieber, M.H. (1975) Ventilation of larval lampreys. *J. Comp. Physiol.* 104:185-203.

Russel, D.F. (1986) Respiratory pattern generation in adult lampreys (*Lampetra fluviatilis*): interneurons and burst resetting. *J. Comp. Physiol. A.* 158:91-102.

Shannon, R., Baekey, D.M., Morris, K.F., Lindsey, B.G. (1996) Brainstem respiratory networks and cough. *Pulm. Pharmacol.* 9:343-347.

Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Feldman, D.W. (1991) Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.

Smith, J.C., Morrison, D.E., Ellenberger, H.H., Otto, M.R., Feldman, J.L. (1989) Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *J. Comp. Neurol.* 281:69-96.

Speck, D.F., Beck, E.R. (1989) Respiratory rhythmicity after extensive lesions of the dorsal and ventral respiratory groups in medulla of cat. *Brain Res.* 482:387-392.

Speck, D.F., Feldman, J.L. (1982) The effects of microstimulation and microlesions in the ventral and dorsal respiratory groups in medulla of cat. *J. Neurosci.* 2:744-757.

St-Jacques, R., St-John, W.M. (1999) Transient, reversible apnoea following ablation of the pre-Bötzinger complex in rats. *J. Physiol.* 520:303-314.

St-John, W.J., Bartlett, D., Knuth, Jr. K.V., Hwang, J.-C. (1981) Brain stem genesis of automatic ventilatory patterns independent of spinal mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 51:204-210.

St-John, W.M. (1996) Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals? *J. App. Physiol.* 81:1865-1877.

St-John, W.M. (1998) Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Progr. Neurobiol.* 56:97-117.

St-John, W.M., Paton, J.F.R. (2000) Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. *Respir. Physiol.* 123:201-213.

St-John, W.M., Paton, J.F.R. (2004) Role on pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 143:321-332.

Tang, P.C. (1953) Localization of the pneumotaxic center in the cat. *Am. J. Physiol.* 172:645-652.

Taylor, E.W., Jordan, D., Coote, J.H. (1999) Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol. Rev.* 79:855-916.

Thoby-Brisson, M., Ramirez, J.M. (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J. Neurophysiol.* 86:104-112.

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

Thompson, K.J. (1990) Control of respiratory motor pattern by sensory neurons in spinal cord of lamprey. *J. Comp. Physiol. A* 166:675-684.

Viana di Prisco, G., Boutin, T., Petropoulos, D., Brocard, F., Dubuc, R. (2005) The trigeminal sensory relay to reticulospinal neurones in lampreys. *Neuroscience* 131(2):535-546.

Viana di Prisco, G., Wallén, P., Grillner, S. (1990) Synaptic effects of intraspinal stretch receptor neurons mediating movement-related feedback during locomotion. *Brain Res.* 530(1):161-166.

Vibert, J.F., Bertrand, F., Denavit-Saubié, M., Hugelin, A. (1976) Discharge patterns of bulbo-pontine respiratory unit populations in cat. *Brain Res.* 114:211-225.

Vibert, J.-F., Caille, D., Gromysz, H., Bertrand, F., Hugelin, A. (1979) Ascending projection from the respiratory centers to mesencephalon and diencephalon. *Neurosci. Lett.* 11:29-33.

Vinay, L., Barthe, J.Y., Grillner, S. (1996) Central modulation of stretch receptor neurons during fictive locomotion in lampreys. *J. Neurophysiol.* 76(2):1224-1235.

von Euler, C. (1983) On the central pattern generator for the basic breathing rhythmicity. *J. Appl. Physiol.* 55:1647-1659.

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

Wang, S.C., Ngai, S.H., Frumin, M.J. (1957) Organization of central respiratory mechanisms in the brain stem of the cat: genesis of normal respiratory rhythmicity. *Am. J. Physiol.* 190:330-342.

Wang, W., Fung, M.L., St-John, W.M. (1993) Pontile regulation of ventilatory activity in the adult rat. *Am. Physiol. Soc.* 74:2801-2811.

Wilson, R.J.A., Vasilakos, K., Harris, M.B., Straus, C., Remmers, J.E. (2002) Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. *J. Physiol.* 540:557-570.

Wyman, R.J. (1977) Neural generation of the breathing rhythm. *Annu. Rev. Physiol.* 29:417-448.