amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 13 juin 2025 par

Ambre LINOSSIER-BENKEMOUN

Exploration des mécanismes centraux du couplage respiratoire-cardiovasculaire : Rôle des neurones GABAergiques du Complexe de pré-Bötzinger et modulation par les corps carotidiens et l'ocytocine

Discipline
Biologie santé

Spécialité
Neurosciences

École doctorale
Sciences du vivant (ED 658)

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED, INSERM, U1249)

Composition du jury

Muriel THOBY-BRISSON Rapporteuse
Directrice de recherche, INCIA - Bordeaux

Baptiste BALANÇA Rapporteur
Maître de conférences et praticien hospitalier, HCL, Université Claude Bernard Lyon 1 – Lyon

Pascale QUILICHINI Examinatrice
Chargée de recherche, INS - Marseille

Nathalie BUONVISO Examinatrice
Directrice de recherche, CRNL - Lyon

Gilles Fortin Président du jury
Directeur de recherche, IBENS - Paris

Christian GESTREAU Directeur de thèse
Professeur des Universités, INMED, Aix Marseille Univ – Marseille

Clément MENUET Co-directeur de thèse
Chargé de recherche, INMED - Marseille

Inserm

Inmed
Institut de neurobiologie de la méditerranée

Per aspera, ad astra

Affidavit

Je soussigné, Ambre Linossier, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Christian Gestreau et de Clément Menuet, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 11 avril 2025



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevet [1] réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. J. Buron, **A. Linossier**, C. Gestreau, F. Schaller, R. Tyzio, MS. Felix, V. Matarazzo, M. Thoby-Brisson, F. Muscatelli, C. Menuet. *A hypothalamus-Brainstem-Heart Neuronal pathway for the oxytocinergic modulation of respiratory heart rate variability in rodents*. **Article accepté dans Nature Neuroscience**, 2025

2. C. Menuet, A. Ben-Tal, **A. Linossier**, et al. *Redefining respiratory sinus arrhythmia as respiratory heart rate variability: an international expert recommendation for terminology clarity*. **Revue acceptée dans Nature Reviews Cardiology**, 2025

3. **A. Linossier**, C. Gestreau, C. Menuet. *Acute intermittent carotid bodies stimulations induce long term facilitation of respiratory-cardiovascular coupling in rats*, **Article en préparation, soumission prochaine**

4. **A. Linossier**, C. Gestreau, C. Menuet. *GABAergic neurons of the pre-Bötzinger complex regulate respiratory heart rate variability, Traube-Hering waves and blood pressure via the autonomic nervous system*. **Article en préparation**

5. **A. Linossier**, J. Buron, A.M. Allen, C. Menuet. *A student's guide to optotgenetics*. **Revue en préparation**

[1] Cette liste comprend les articles publiés, les articles soumis à publication et les articles en préparation ainsi que les livres, chapitres de livre et/ou toutes formes de valorisation des résultats des travaux propres à la discipline du projet de thèse. La référence aux publications doit suivre les règles standards de bibliographie et doit être conforme à la charte des publications d'AMU.

2) Participation aux conférences[2] et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. **Congrès biannuel de la Société International des Neurosciences du système nerveux Autonome (ISAN)**, Oxford/Birmingham, Angleterre, 2024, Présentation orale

2. **Symposium annuel de l'Institut MarMara**, Marseille, France, 2024, Présentation orale

3. **Colloque annuel de l'Ecole Doctorale des Sciences du vivant (ED 658)**, Marseille, France, 2023, Présentation poster

4. **Congrès biannuel de la société des Neurosciences française (NeuroFrance)**, Lyon, France, 2023, Présentation poster

5. **Colloque annuel du programme doctoral Neuroschool (Neurodays)**, Marseille, France, 2023, Présentation poster ; 2022, Organisatrice

[2] Le terme « conférence » est générique. Il désigne à la fois « conférence », « congrès », « workshop », « colloques », « rencontres nationales et/ou internationales » … etc.
Indiquer si vous avez fait une présentation orale ou sous forme de poster.

Résumé

La survie des organismes dépend du maintien à l'équilibre de constantes physiologiques essentielles, dont la concentration des gaz sanguins, régulée par les systèmes respiratoire et cardiovasculaire. L'efficience physiologique de ces systèmes est optimisée par le couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV). Le CRCV repose principalement sur l'interaction entre les neurones respiratoires et autonomes cardiovasculaires du tronc cérébral qui génère des oscillations de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle en phase avec la respiration. Toutefois, les mécanismes centraux à l'origine de ces oscillations sont encore mal caractérisés. Ma thèse a exploré ces interactions et les mécanismes à l'origine du CRCV, en combinant des approches anatomo-fonctionnelles incluant le traçage viral et l'optogénétique. Ces travaux révèlent que les neurones GABAergiques du complexe de pré-Bötzinger, le groupe de neurones générant le rythme inspiratoire, participent à générer le CRCV en condition basale. D'autre part, le CRCV peut être modulé dans diverses conditions physiopathologiques. Notamment, il est amplifié dans des contextes sociaux positifs, et une étude menée au début de ma thèse a contribué à montrer que l'ocytocine potentialise l'aspect cardiaque du CRCV en agissant sur les neurones glycinergiques du complexe de pré-Bötzinger. A l'inverse, le CRCV est altéré dans certaines pathologies comme l'hypertension ou les apnées du sommeil. Par un protocole de stimulations répétées des corps carotidiens, j'ai démontré que ces organes participent à la mise en place de l'exacerbation du CRCV. En résumé, mes travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes centraux du CRCV, en démontrant le rôle des neurones GABAergiques du complexe de pré-Bötzinger, et en identifiant deux mécanismes de modulation : un central physiologique, via l'ocytocine, et un périphérique, via les corps carotidiens, aux conséquences pathologiques.

Mots-clés : Couplage respiratoire-cardiovasculaire, Régulation autonome cardiovasculaire, Contrôle central respiratoire, Tronc cérébral, Corps carotidiens, Ocytocine

Abstract

The survival of organisms relies on maintaining the balance of essential physiological constants, including blood gas concentration. This regulation is ensured by the respiratory and cardiovascular systems, whose physiological efficiency is maximized by the respiratory-cardiovascular coupling (RCC). RCC has a primarily central origin, through interactions between respiratory neurons and autonomic cardiovascular neurons located in the brainstem which generate oscillations in heart rate and blood pressure in phase with respiration. However, the central mechanisms underlying these oscillations remain poorly characterized. The aim of my thesis was to study the neuronal interactions and the mechanisms underlying RCC by combining anatomo-functional approaches, including viral tracing and optogenetics. This work first demonstrated that GABAergic neurons of the pre-Bötzinger complex, the neuronal group generating the inspiratory rhythm, contact key regions for RCC and play a role in its establishment under basal conditions. Moreover, RCC can be modulated under various physiopathological conditions. Notably, it is enhanced in positive social contexts and a study conducted at the beginning of my thesis helped show that oxytocin potentiates the cardiac aspect of RCC by modulating glycinergic neurons of the pre-Bötzinger complex. Conversely, RCC is altered in certain pathologies such as hypertension or sleep apnea. Using a protocol of repeated stimulations of the carotid bodies, I demonstrated that these peripheral organs contribute to the establishment of RCC exacerbation. In summary, my work contributes to a better understanding of the central mechanisms of RCC by highlighting the crucial role of GABAergic neurons in the pre-Bötzinger complex and by identifying two mechanisms of RCC modulation: a central physiological one, *via* oxytocin, and a peripheral one *via* the carotid bodies, with potential pathological consequences.

Key words: Respiratory-cardiovascular coupling, Autonomic cardiovascular regulation, Central respiratory command, Brainstem, Carotid bodies, Oxytocin

Remerciements

A l'heure où j'écris ces quelques mots, je peine à croire que j'en sois déjà arrivée à cette étape de mon doctorat. Ce moment de la thèse me paraissait tellement loin et est arrivé tellement vite ! Je me revois y penser quand j'ai démarré ma thèse en Octobre 2021, et ça y est, on y est, alors que j'ai l'impression d'avoir tout juste eu le temps de cligner des yeux. En tout cas, aussi « brève » fût-elle, cette thèse aura été une expérience très enrichissante tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel, et je souhaite remercier les personnes qui m'auront accompagnée dans cette aventure.

Petit disclaimer : En tant que personne peu douée pour exprimer ses émotions, surtout publiquement, ces quelques mots de remerciement ne rendront pas justice à la profondeur de ma gratitude.

Avant tout, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'examiner mon travail. Vos gentils mots d'encouragements ne sont pas tombés dans l'oreille d'une sourde. Merci au **Dr. Muriel Thoby-Brisson** et au **Dr. Baptiste Balança** d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Merci également au **Dr. Nathalie Buonviso** et au **Dr. Pascale Quilichini** d'avoir accepté d'être examinatrices. Enfin, merci au **Dr. Gilles Fortin** d'avoir accepté d'être président en plus d'être examinateur. Comme le dit l'adage, « jamais deux sans trois » et après deux comités de suivi de thèse, cette soutenance de thèse marque la troisième fois qu'on vous fait faire le déplacement à Marseille. Promis, après ça, plus de rapports à rédiger. Merci à tous, j'espère que la lecture de ce manuscrit vous demandera moins de nuits blanches que son écriture ne m'en a coûté.

Commençons par le commencement, le grand maître (comme le disait un certain stagiaire) : MERCI **Clément** ! Merci d'avoir cru en moi dès le master. Merci de m'avoir donnée la chance de faire une thèse avec toi et Christian. Merci d'avoir toujours tout mis en place pour que tout se passe pour le mieux. Si j'en suis là où j'en suis aujourd'hui, c'est grâce à toi. J'ai une profonde estime pour la personne que tu es, autant d'un point de vue professionnel qu'humain, même si tu manges des pains au raisin.

Deuxième sur la liste, et pas des moindres, Merci **Christian** ! Votre pédagogie et votre large connaissance scientifique ont été d'une aide aussi précieuse qu'inspirante tout au long de cette thèse. Merci d'avoir toujours su vous rendre disponible malgré votre emploi du temps surchargé. Il serait bon que vous songiez à vous reposer parfois. Peut-être que d'ici là j'arriverai à vous tutoyer....

Merci à tous les deux. Merci de votre patience. Merci de votre supervision. J'espère avoir su vous le rendre. J'ai eu énormément de chance de tomber sur vous et vous faites partie intégrante de ma réussite. En route pour de nouvelles aventures pendant ce court post-doc à venir !

J'ai énormément apprécié travailler à l'INMED et c'est en partie grâce aux gens que j'ai pu côtoyer pendant ces années.

Merci **Francesca** pour les 150000 génotypages que j'envoyais à intervalles réguliers et que tu as toujours réalisés (presque 😉) sans râler. Merci **François** pour ton aide précieuse avec les microscopes. Merci **Emmanuelle** !! Qu'est-ce-que mes petits ratons seraient devenus sans toi ? Je sais qu'on ne te le dit pas souvent mais heureusement que tu es là. Tu es et tu resteras ma dealeuse préférée héhé. Merci **Lucas** pour ton aide précieuse sur la fin de ma rédaction (promis je te ferai des cookies). J'ai hâte qu'on puisse retourner jouer au badminton même si je sais que je vais prendre une sacrée raclée après ces 2 mois et demi passés assise sur une chaine.

Merci également à **tous les autres membres du labo** que je ne nommerai pas un par un sinon ce manuscrit déjà assez long le deviendra encore plus (pauvres arbres). Je sais que je suis une personne très discrète qui passe la quasi-totalité de mon temps la tête dans les manips, mais j'ai apprécié chaque moment passé avec chacun de vous.

Je tiens également à remercier les membres de mon équipe. Tout d'abord, merci **Françoise**. Vous représentez un peu mon « effet papillon ». Vous m'avez accueillie au sein de votre équipe pour mon stage de M1 et c'est ce qui m'a permis d'entrer en contact avec Clément pour mon stage de Master 2. La suite on la connaît. Pour cela, je vous en suis reconnaissante. Merci **Fabienne** pour ta gentillesse et pour ta volonté à toute épreuve. J'espère que tu arriveras à trouver la paix que tu mérites. Un grand merci à toi **Yasmine**. Tu as toujours eu confiance en moi et tu as toujours eu un mot d'encouragement. J'espère sincèrement que tu arriveras à t'épanouir et à avoir ce que tu désires. Tu mérites de ne plus avoir à te battre pour arriver à tes fins. Et surtout, repose-toi !!!
Julie, je te mets dans cette partie aussi parce que pour moi tu fais toujours partie de l'équipe. Je vais commencer par dire que je ne sais pas ce que je serais devenue sans toi pendant mon stage de Master et pendant le début de ma thèse. Heureusement que tu étais là pour pouvoir m'aider quand je n'osais pas aller déranger Clément. Les moments que l'on a pu passer ensemble au labo ou en dehors ont toujours été de très bons moments et ton absence se fait grandement ressentir. J'ai toujours une pensée pour toi quand je bois du thé, surtout à la bergamote !
Merci également à tous les autres membres que j'ai toujours eu le plaisir de côtoyer : **Roman, Jean-Luc, Igor, Valery, Christophe, Diabé, Ugo, Mira, Mélanie, Félix et Marie-Sophie** (ou plutôt ευχαριστώ 😉) Votre gentillesse a contribué à rendre ces années (et même les lab-meetings du lundi matin 9h !) agréables.

Enfin, je tenais à remercier les personnes qui me sont le plus proches, qui m'accompagnent dans ma vie de tous les jours et qui ont une place particulière dans mon petit cœur barricadé.
Cloé, ma bichette, que dire… J'ai pas les mots. Merci d'avoir toujours été là que ça aille ou pas. J'ai toujours pu compter sur toi et ça vaut tout l'or du monde à mes yeux. Merci de ta gentillesse et de ta bonne humeur constante. Merci de m'écouter répéter 100 fois les mêmes choses qui me tracassent depuis des années sans jamais me juger ou m'en tenir rigueur. C'est ça le vrai amour ! Tu es un modèle de résilience et tu mérites au moins autant de bonheur que ce tu as souffert. Je ne pense pas avoir

besoin d'en écrire plus, tu sais déjà tout ce que je pense.
Toi aussi **Valou**, merci de ton soutien. Merci de venir me déposer à minuit des empanadas que tu as spécialement fait venir de Barcelone pour me faire plaisir. Merci d'être mon garde du corps personnel et de faire fuir les ploucs sous MD qui s'approchent un peu trop en soirée techno. T'es vraiment une copine en or même si tu vas vraiment finir par me payer ma rhinoplastie.
Marina, toi aussi tu as toujours répondu présente même quand je disparaissais pendant un moment. Merci de remettre les pendules à l'heure à mon cerveau quand mes deux neurones rationnels se battent avec leurs homologues anxieux. Comme quand par exemple tu me rassures sur le fait que ce que j'ai est juste un scotome scintillant et pas le signe que je fais un AVC hihi. Je te l'ai déjà dit et je vais me répéter mais je suis très heureuse de te voir plus apaisée. Bombardiro crocodilo ou chimpanzini bananini ?

Kewin (alias Kauê téhéhéhé) merci (ou pas d'ailleurs, je suis pas encore sûre) pour les 459290059 réels instas que tu m'envoyais chaque jour (Jeanne, au secours !). Merci pour les papouilles qui sont, je crois, le seul moyen de mettre mon cerveau sur arrêt. J'avouerai que tu manques un peu depuis que tu es à Paris, reviens de temps en temps (avec des loukoums sinon tu peux rester là-bas). Keur

Σε ευχαριστώ που πάντα πίστευες σε μένα, ακόμη και όταν δεν πίστευα στον εαυτό μου. Αν τα κατάφερα, είναι επίσης χάρη σε σένα.

Merci d'avoir toujours accepté l'OVNI que je suis et de m'aimer pour cela. Vous faites partie de moi et heureusement que vous êtes là.

Papa, Maman, Tata, merci.

Je finirai en remerciant ArkoRelax, sans qui je serais un excellent modèle d'hypertension et d'anxiété avec atténuation de la RespVRC, exacerbation des ondes TH et tout le tintouin.

Je pense que la Ambre de 5 ans qui rêvait de devenir paléontologue serait très satisfaite de savoir que la Ambre de 27 ans est en train d'achever son doctorat en neurosciences. Alors non, désolée moi-même, je n'étudie pas les dinosaures et je ne serai pas la prochaine Nigel Marven, mais la pomme n'est pas tombée très loin de l'arbre.

En tout cas, une page se tourne avec la fin de ce doctorat pour en révéler une nouvelle que j'attendais et que j'ai hâte de découvrir. Romains 8:18 ; Suits, saison 1, épisode 10, 40:50.

Table des matières

AFFIDAVIT **3**

LISTE DE PUBLICATIONS ET/OU BREVETS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES **4**

RESUME **5**

ABSTRACT **7**

REMERCIEMENTS **8**

TABLE DES MATIERES **11**

TABLE DES FIGURES **15**

ABREVIATIONS **18**

INTRODUCTION **20**

AVANT-PROPOS **21**

CHAPITRE 1 : PHYSIOLOGIE INTEGREE DES SYSTEMES RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE **24**

1.1. LE SYSTEME RESPIRATOIRE 24

1.1.1. Histoire et fonctions *24*

1.1.2. Anatomie et physiologie *24*

1.1.3. Techniques pour l'étude du système respiratoire *27*

1.2. LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE 28

1.2.1. Histoire et évolution *28*

1.2.2. Anatomie et fonction *28*

1.2.3. Techniques pour l'étude du système cardiovasculaire *30*

1.2.4. Variabilités du rythme cardiaque et de la pression artérielle *31*

1.2.4.1. Variabilités du rythme cardiaque (VRC) 31

1.2.4.2. Variabilités de la pression artérielle (VPA) 33

1.3. PHYSIOLOGIE DE LA VARIABILITE RESPIRATOIRE DU RYTHME CARDIAQUE (RESPVRC) 36

1.3.1. Historique *36*

1.3.2. Fonctions supposées *36*

1.3.3. Mécanismes centraux et périphériques *38*

1.4. PHYSIOLOGIE DES ONDES DE TRAUBE-HERING (ONDES TH) 40

1.4.1. Historique *40*

1.4.2. Fonctions supposées *41*

1.4.3. Mécanismes périphériques et centraux *41*

CHAPITRE 2 : BASES NEUROBIOLOGIQUES DES SYSTEMES RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE CHEZ LE MAMMIFERE **44**

2.1. LA COMMANDE NERVEUSE RESPIRATOIRE 44

2.1.1. Le réseau respiratoire central 45
2.1.1.1. L'inspiration 48
2.1.1.1.1 Le complexe de préBötzinger (préBötC) 48
2.1.1.2. La post-inspiration 52
2.1.1.3. L'expiration tardive 53
2.1.2. Modulation périphérique : le chémoréflexe périphérique 54
2.1.2.1. Anatomie des corps carotidiens 54
2.1.2.2. Mécanismes cellulaires potentiels de la sensibilité à l'oxygène et transduction du signal hypoxique 55
2.1.2.3. Réseau du chémoréflexe périphérique et réponses à l'hypoxie 56
2.2. LA REGULATION AUTONOME CARDIOVASCULAIRE 59
2.2.1. La régulation cardiovasculaire sympathique 60
2.2.1.1. Modulation respiratoire de l'activité sympathique 63
2.2.2. La régulation cardiaque parasympathique 66
2.2.2.1. Modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque 67
2.2.3. Noyaux autonomes cardiovasculaires 69
2.2.3.1. Les noyaux centraux présympathiques cardiovasculaires 69
2.2.3.1.1. Le bulbe rostral ventro-latéral (RVLM) 69
2.2.3.1.2. L'hypothalamus 74
2.2.3.2. Les noyaux centraux parasympathiques cardiovasculaires 74
2.2.3.2.2. Le noyau Ambigu (nA) 75
3.2.2.2.1. Le noyau moteur dorsal du vague 78
2.2.4. Modulation périphérique : le baroréflexe 79
2.3. COUPLAGE CENTRAL RESPIRATOIRE-CARDIOVASCULAIRE 83
2.3.1. Modulation respiratoire des neurones cardiaques du nA 83
2.3.2. Modulation respiratoire des neurones présympathiques de la RVLM 86

CHAPITRE 3 : LES MODULATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DU COUPLAGE RESPIRATOIRE-CARDIOVASCULAIRE 90

3.1. ALTERATIONS PATHOLOGIQUES DU CRCV 90
3.1.1. Hypertension, couplage respiratoire-sympathique vasomoteur exacerbé et dysfonctionnement des corps carotidiens..... 91
3.1.1.1. L'hypertension neurogénique 91
3.2.2.2.1. Implication des corps carotidiens dans l'hypertension neurogénique 94
3.1.1.2. Hypertension et altérations du CRCV : les apnées obstructives du sommeil 97
3.2.2.2.1. Hypertension et altérations du CRCV : l'hypoxie intermittente chronique 99
3.1.2. Insuffisance cardiaque chronique et altérations du CRCV 101
3.2. MODULATIONS PHYSIOLOGIQUES DU CRCV, UNE LUEUR D'ESPOIR ? 102
3.2.1. Facteurs physiologiques modulant la RespVRC 103
3.2.2. Rôle de l'ocytocine dans la modulation de la RespVRC 104
3.2.2.1. Régulation cardiovasculaire périphérique par l'ocytocine 104
3.2.2.2. Régulation cardiovasculaire centrale par l'ocytocine 105
3.2.2.2.1. Modulation centrale des réseaux de la RespVRC par l'ocytocine 107

OBJECTIFS DE LA THESE 109

MATERIELS ET METHODES 114

RESULTATS 132

PARTIE 1 : LES NEURONES GABAERGIQUES DU COMPLEXE DE PRE-BÖTZINGER REGULENT LA VARIABILITE RESPIRATOIRE DU RYTHME CARDIAQUE, LES ONDES DE TRAUBE-HERING ET LA PRESSION ARTERIELLE MOYENNE *VIA* LE SYSTEME NERVEUX AUTONOME 133

RESUME 133
INTRODUCTION 134
MATERIELS ET METHODES 138
RESULTATS 152
DISCUSSION 180

PARTIE 2 : ACUTE INTERMITTENT CAROTID BODIES STIMULATIONS INDUCE LONG TERM FACILITATION OF RESPIRATORY-CARDIOVASCULAR COUPLING IN RATS 188

RÉSUMÉ 188
INTRODUCTION 189
MATERIEL ET METHODES 192
RÉSULTATS 196
DISCUSSION 202
BIBLIOGRAPHIE 211

PARTIE 3 : L'OCYTOCINE AMPLIFIE LA VARIABILITE RESPIRATOIRE DU RYTHME CARDIAQUE *VIA* LES NEURONES GLYCINERGIQUES DU COMPLEXE DE PRE-BÖTZINGER 225

RESUME 225
INTRODUCTION 226
MATERIELS ET METHODES 228
RESULTATS 233
DISCUSSION 239

DISCUSSION 244

1. CE QUE NOS RESULTATS APPORTENT A LA COMPREHENSION DES MECANISMES FONDAMENTAUX DU CRCV 247

1.1. LA RESPVRC 247
1.2. LES ONDES TH 249
1.2.1. Rôle physiologique potentiel de la modulation inhibitrice inspiratoire des neurones C1 251
1.3. REGULATION DE LA PRESSION ARTERIELLE MOYENNE PAR DES NEURONES RESPIRATOIRES 252
1.4. DIFFERENTS PHENOTYPES NEUROCHIMIQUES, DIFFERENTS ROLES ? 253

2. CE QUE NOS RESULTATS APPORTENT A LA COMPREHENSION DE LA FONCTION PHYSIOLOGIQUE DU CRCV 256

3. REFLEXIONS PLUS LARGES 259

3.1. LE COMPLEXE DE PRE-BÖTZINGER, PLUS QU'UN GENERATEUR DE RYTHME INSPIRATOIRE 259
3.2. LE CRCV, LA POULE OU L'ŒUF ? 260
3.3. L'OCYTOCINE, UNE PERSPECTIVE DE TRAITEMENT ? 261

4. CONCLUSION 261

BIBLIOGRAPHIE 263

ANNEXE 287

PARTIE 1 : REDEFINING RESPIRATORY SINUS ARRHYTHMIA AS RESPIRATORY HEART RATE VARIABILITY: AN INTERNATIONAL EXPERT RECOMMENDATION FOR TERMINOLOGICAL CLARITY 288

PARTIE 2 : THE OXYTOCIN-MODULATED BRAIN CIRCUIT THAT SYNCHRONIZES HEART RATE WITH BREATHING 296

Table des figures

FIGURE 1. ANATOMIE DU SYSTEME RESPIRATOIRE 26

FIGURE 2. PHYSIOLOGIE ANATOMO-FONCTIONNELLE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE 29

FIGURE 3. ENREGISTREMENTS DE LA RESPVRC 33

FIGURE 4. ENREGISTREMENTS DES ONDES TH 35

FIGURE 5. MODELISATION DES ECHANGES GAZEUX ET DU TRAVAIL CARDIAQUE EN FONCTION DE L'AMPLITUDE DE LA RESPVRC ET DU TYPE DE RESPIRATION 37

FIGURE 6. LA RESPVRC A UNE ORIGINE MAJORITAIREMENT CENTRALE 40

FIGURE 7. LES ONDES TH RESULTENT DE MECANISMES PERIPHERIQUES ET CENTRAUX 43

FIGURE 8. SCHEMAS DES VOIES NERVEUSES RESPIRATOIRES ET PROFILS DE DECHARGES DES SORTIES MOTRICES AU COURS DU CYCLE RESPIRATOIRE 45

FIGURE 9. ORGANISATION DU RESEAU RESPIRATOIRE CENTRAL ET PATRONS D'ACTIVITES NERVEUSES 47

FIGURE 10. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DU PREBÖTC 50

FIGURE 11. ANATOMIE DES CORPS CAROTIDIENS 55

FIGURE 12. REGIONS MEDULLAIRES ESSENTIELLES AUX REPONSES RESPIRATOIRES ET CARDIOVASCULAIRES INDUITES PAR L'ACTIVATION DU CHEMOREFLEXE PERIPHERIQUE 58

FIGURE 13. CONTROLE NERVEUX AUTONOME DE L'ACTIVITE CARDIOVASCULAIRE 60

FIGURE 14. LOCALISATION ET EFFETS DE L'INNERVATION AUTONOME DU CŒUR ET DES VAISSEAUX 62

FIGURE 15. LA MODULATION RESPIRATOIRE DE L'ACTIVITE SYMPATHIQUE DANS LA GENESE DES ONDES TH 64

FIGURE 16. MODULATION RESPIRATOIRE DE L'ACTIVITE PARASYMPATHIQUE CARDIAQUE CHEZ LE RAT 67

FIGURE 17. CARACTERISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES NEURONES PRESYMPATHIQUES DE LA RVLM 71

FIGURE 18. CARACTERISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES NEURONES PREGANGLIONNAIRES PARASYMPATHIQUES CARDIAQUES DU NA CHEZ LE RONGEUR 77

FIGURE 19. CARACTERISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES NEURONES PREGANGLIONNAIRES CARDIAQUES DU NOYAU MOTEUR DORSAL DU VAGUE 79

FIGURE 20. SCHEMATISATION DU RESEAU MEDULLAIRE ESSENTIEL AUX REPONSES CARDIOVASCULAIRES INDUITES PAR L'ACTIVATION DU BAROREFLEXE 82

FIGURE 21. LES NEURONES PREGANGLIONNAIRES PARASYMPATHIQUES CARDIAQUES DU NA SONT HYPERPOLARISES PENDANT L'INSPIRATION PAR DES COURANTS INHIBITEURS GLYCINERGIQUES ET GABAERGIQUES 84

FIGURE 22. LES NEURONES PRESYMPATHIQUES DE LA RVLM QUI CONTRIBUENT A GENERER LES ONDES TH REÇOIVENT PLUSIEURS MODULATIONS RESPIRATOIRES DE LEUR ACTIVITE 86
FIGURE 23. L'HYPERTENSION NEUROGENIQUE EST LIEE A UNE MODULATION RESPIRATOIRE DE L'ACTIVITE SYMPATHIQUE EXCESSIVE 93
FIGURE 24. L'HYPERTENSION NEUROGENIQUE EST ASSOCIEE A UNE HYPERSENSIBILITE DES CORPS CAROTIDIENS IMPLIQUEE DANS LE MAINTIEN DE L'HYPERACTIVITE SYMPATHIQUE 95
FIGURE 25. L'HIC CAUSE UNE HYPERTENSION MEDIEE PAR LES CORPS CAROTIDIENS..... 100
FIGURE 26. PROJECTIONS DES NEURONES OCYTOCINERGIQUES 105
FIGURE 27. L'INJECTION INTRANASALE D'OCYTOCINE AMPLIFIE LA RESPVRC 107
FIGURE 28. LA PREPARATION *IN SITU* CŒUR-TRONC CEREBRAL ISOLES PERFUSES..... 117
FIGURE 29. CARTOGRAPHIE FONCTIONNELLE DU PREBÖTC. 120
FIGURE 30. PRINCIPE DE L'HYBRIDATION *IN SITU* PAR RNASCOPE. 121
FIGURE 31. MOYENNAGES DECLENCHES PAR LA RESPIRATION ET PARAMETRES D'ANALYSE DES SIGNAUX NERVEUX ET CARDIOVASCULAIRES. 124
FIGURE 32. CARTOGRAPHIE ELECTROPHYSIOLOGIQUE DU NOYAU MOTEUR DU NERF FACIAL 141
FIGURE 33. CARACTERISATION DU PHENOTYPE NEUROCHIMIQUE DES NEURONES INHIBITEURS DU PREBÖTC PAR HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE CHEZ LE RAT JUVENILE. 153
FIGURE 34. CARACTERISATION DES PROJECTIONS DES NEURONES PREBÖTC^{GABA} DANS LES REGIONS DU COUPLAGE RESPIRATOIRE-CARDIOVASCULAIRE CHEZ LE RAT JUVENILE PAR TRAÇAGE VIRAL ANTEROGRADE. 156
FIGURE 35. CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DE BIPOLES DANS LES NEURONES PREBÖTC^{GABA}. 161
FIGURE 36. LES PHOTOMODULATIONS PROLONGEES DES NEURONES PREBÖTC^{GABA} IMPACTENT LES FONCTIONS RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE CHEZ LE RAT *IN VIVO*. 164
FIGURE 37. LES PHOTOMODULATIONS PROLONGEES DES NEURONES PREBÖTC^{GABA} IMPACTENT LES FONCTIONS RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE CHEZ LA PREPARATION *IN SITU* CŒUR-TRONC CEREBRAL ISOLES PERFUSES DE RAT..... 167
FIGURE 38. LES NEURONES PREBÖTC^{GABA} MODULENT LES ONDES TH ET LA PRESSION ARTERIELLE PAR UN EFFET SUR L'ACTIVITE NERVEUSE SYMPATHIQUE VASOMOTRICE. 170
FIGURE 39. L'ATROPINE SUPPRIME LES EFFETS DES PHOTOMODULATIONS DES NEURONES PREBÖTC^{GABA} SUR L'ACTIVITE NERVEUSE PARASYMPATHIQUE CARDIAQUE MAIS PAS SUR L'ACTIVITE NERVEUSE SYMPATHIQUE. 172
FIGURE 40. LES NEURONES GABAERGIQUES DU PREBÖTC SONT SYMPATHOINHIBITEURS. 175
FIGURE 41. LES NEURONES PREBÖTC^{GABA} MODULENT L'ACTIVITE NERVEUSE SYMPATHIQUE PAR UNE CONNECTIVITE INHIBITRICE AVEC LES NEURONES PRESYMPATHIQUES DE LA RVLM. 179
FIGURE 42. FOUR CONSECUTIVE NACN PERFUSATE INJECTIONS IN RAT WHBPS INDUCE SPECIFIC CB-MEDIATED CHEMOREFLEXES..... 218
FIGURE 43. ACUTE INTERMITTENT CB STIMULATIONS INDUCE NO EFFECT ON RESPIRATORY FREQUENCY AND HEART RATE, BUT INDUCE A SYMPATHETIC LTF AND A PROLONGED INCREASE IN PERFUSION PRESSURE. 219
FIGURE 44. ACUTE INTERMITTENT CB STIMULATIONS DO NOT CHANGE TONIC SYMPATHETIC ACTIVITY BUT INDUCE A RESPSNA LTF, AS WELL AS A PROLONGED INCREASE IN THE AMPLITUDES OF TH WAVES AND OF THE RESPIRATORY MODULATION OF HEART RATE 220

FIGURE 45. ACUTE INTERMITTENT CB STIMULATIONS INDUCE UPPER AIRWAY AND ABDOMINAL NERVE ACTIVITIES' LTF 221
FIGURE 46. ACUTE INTERMITTENT CB STIMULATIONS INDUCE AN INCREASED OCCURRENCE OF LATE-EXPIRATORY / PRE-INSPIRATORY BURSTS ON RESPIRATORY NERVES TARGETING THE UPPER AIRWAY AND ABDOMINAL MUSCLES, INCREASING RESPSNA AND TH WAVES COMPARED TO CYCLES WITHOUT LATE-EXPIRATORY / PRE-INSPIRATORY BURSTS. 223
FIGURE 47. ACUTE INTERMITTENT CB STIMULATIONS INCREASE RESPSNA AND TH WAVES IN RESPIRATORY CYCLES BOTH WITH AND WITHOUT LATE-EXPIRATORY / PRE-INSPIRATORY ACTIVITY. 224
FIGURE 48. CARACTERISATION HISTOLOGIQUE *A POSTERIORI* DES SITES D'INJECTIONS DANS LA REGION DU PREBÖTC/NA. 234
FIGURE 49. L'INJECTION DE TGOT DANS LE PREBÖTC AMPLIFIE LA RESPVRC *IN VIVO* CHEZ LE RAT JUVENILE ANESTHESIE 236
FIGURE 50. CARACTERISATION DU PHENOTYPE NEUROCHIMIQUE DES NEURONES EXPRIMANT LE RECEPTEUR A L'OCYTOCINE DANS LE PREBÖTC PAR HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE CHEZ LA SOURIS ADULTE. 238
FIGURE 51. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE PROPOSE DE LA MODULATION DES NEURONES CARDIAQUES DU NA PAR LES NEURONES PREBÖTC^{GABA} ET PREBÖTC$^{OT\text{-}R;GLYCINE}$ POUR LA GENESE DE LA RESPVRC EN CONDITION BASALE. 248
FIGURE 52. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE PROPOSE DE LA MODULATION DES NEURONES PRESYMPATHIQUES C1 DE LA RVLM PAR LES NEURONES PREBÖTC^{GABA} QUI CONTRIBUE A GENERER LES ONDES TH EN CONDITION BASALE. 250
FIGURE 53. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE PROPOSE DE LA MODULATION DES NEURONES PRESYMPATHIQUES DE LA RVLM PAR LES NEURONES PREBÖTC^{GABA} QUI CONTRIBUE A REGULER LA PRESSION ARTERIELLE MOYENNE. 253
FIGURE 54. PROFIL DEVELOPPEMENTAL DU PHENOTYPE DES NEURONES INHIBITEURS DU PREBÖTC ET CO-TRANSMISSION GABA-GLYCINE 255

Abréviations

A

AMPc = Adénosine monophosphate cyclique

aCSF = liquide céphalo-rachidien artificiel

ARNm = acide ribonucléique messager

ATP = adénosine triphosphate

B

BötC = complexe de Bötzinger

C

CO_2 = Dioxyde de carbone

cVRG = groupe respiratoire ventral caudal

CVLM = bulbe caudal ventro-latéral

$CVLM^{GABA}$ = neurones GABAergiques du bulbe caudal ventro-latéral

CRCV = couplage respiratoire cardiovasculaire

CC, CBs = corps carotidiens

CTB = sous unité B de la toxine cholérique

CSD = dénervation des corps carotidiens

E

ECG = électrocardiogramme

EMG = électromyogramme

G

GABA = acide gamma aminobutyrique

GAD1,2 = glutamate décarboxylase 1 ou 2, gène codant pour la glutamate décarboxylase

***Gt*ACR2** = channelrhodopsine anionique issue de guillardia theta 2

H

HRP = peroxydase de raifort

HIC = hypoxie intermittente chronique

I

I/E = transition de l'inspiration à l'expiration

L

LTF = facilitation à long terme

N

nA = noyau Ambigu

NTS = Noyau du tractus solitaire

NaCN = cyanure de sodium

NK1R = récepteur à la substance P

O

O_2 = Dioxygène

Ondes TH = Ondes de Traube Hering

OT-R = récepteur de l'ocytocine

P

préBötC = complexe de pré-Bötzinger

préBötC^{GABA} = neurones GABAergiques du complexe de pré-Bötzinger

préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ = neurones glycinergiques du complexe de pré-Bötzinger qui expriment le récepteur de l'ocytocine

post-I = post-inspiration

PBS = tampon phosphate salin

pFRG = groupe respiratoire parafacial

PiCO = Complexe Post-Inspiratoire

Px = x jours de vie post-natals

R

RespVRC, RespHRV = variabilité respiratoire du rythme cardiaque

RespSNA = modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique

RVLM = bulbe rostral ventro-latéral

RNAscope = hybridation *in situ* fluorescente

S

sem = erreur standard à la moyenne

Slc6a5 = solute carrier family 6 member 5, gène du transporteur vésiculaire 2 de la glycine

Slc17a6 = solute carrier family 17 member 6, gène du transporteur vésiculaire du glutamate

SNA = activité nerveuse sympathique

T

TGOT = Thr^4,Gly^7-ocytocine (agoniste des récepteurs à l'ocytocine)

TH waves = Ondes de Traube Hering

Préparation *in situ* = préparation cœur-tronc cérébral isolés perfusés

V

VRC = variabilités du rythme cardiaque

VPA = variabilités de la pression artérielle

Vglut2 = transporteur vésiculaire glutamatergique 2

W

WHBP = whole heart brainstem preparation, préparation cœur-tronc cérébral isolés perfusés, préparation *in situ*

Introduction

Avant-propos

Une des conditions *sine qua non* à la vie de tous les organismes est l'apport continu d'énergie. La première loi de la thermodynamique décrit que l'énergie peut être convertie d'une forme à une autre, mais ne peut être ni créée, ni détruite. Les organismes vivants n'y dérogent pas et puisent différents éléments dans leur environnement pour alimenter les processus cellulaires principalement basés sur l'oxydoréduction ou le transfert d'électrons, qui convertiront l'énergie chimique contenue dans ces sources en une autre forme d'énergie biochimique, réutilisée pour d'autres processus cellulaires (Alberts, 2002 ; Costa, 2014).

Les sources d'énergie utilisées varient en fonction des organismes et des processus biologiques. Cela peut provenir du soleil, pour la photosynthèse, ou du glucose, pour la fermentation. Pour les organismes aérobies (humains, animaux, ainsi que de nombreuses plantes et bactéries), l'oxygène est indispensable aux processus métaboliques convertissant l'énergie chimique des nutriments en énergie biochimique récupérée sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire à la plupart des processus cellulaires, et ainsi à la survie des organismes (Alberts, 2002). Ces processus cellulaires génèrent du dioxyde de carbone qui doit être éliminé sous peine de s'accumuler et de devenir toxique (Costa, 2014).

Ainsi, des systèmes spécialisés se sont développés pour finement réguler ces échanges gazeux et ont progressivement évolué pour s'adapter à la croissance et à la complexification des organismes. Parmi eux, le système respiratoire qui apporte le dioxygène contenu dans l'air jusqu'aux cellules et qui rejette dans l'atmosphère le dioxyde de carbone produit par ces dernières, et le système cardiovasculaire qui, entre autres, distribue le dioxygène aux tissus tout en en récupérant leurs déchets métaboliques. Or les organismes ont tendance à évoluer dans une logique de minimisation de leur dépense énergétique, compatible avec l'optimisation de leur survie. C'est pourquoi les systèmes respiratoire et cardiovasculaire, qui servent une fonction commune essentielle au maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine, sont fonctionnellement couplés pour diminuer le travail cardiaque et optimiser la perfusion tissulaire. Ce couplage se traduit par une modulation

respiratoire des activités cardiaque et vasculaire, appelé couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV).

Bien que les premières observations du CRCV remontent à plus de deux cents ans, les mécanismes qui en sont à l'origine restent encore mal caractérisés. Cette méconnaissance s'explique notamment par la complexité des mécanismes impliqués, d'origines à la fois périphérique et centrale. Néanmoins, nous savons que le CRCV repose principalement sur l'interaction entre plusieurs populations de neurones respiratoires et de neurones autonomes cardiovasculaires du tronc cérébral.

Des altérations de ce couplage sont retrouvées dans plusieurs grandes pathologies cardiovasculaires qui sont la première cause de mortalité dans le monde. Par ailleurs, des travaux récents qui modulent le CRCV, en restaurant la composante parasympathique cardiaque perdue, améliorent la condition et la survie de modèles animaux et de patients atteints de pathologies cardiovasculaires. Cela illustre d'une part l'importance physiologique de l'intégrité de ce couplage ainsi que la nécessité de mieux en comprendre les mécanismes pathophysiologiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, articulé autour de trois études portant sur : 1) l'implication d'une sous-population inhibitrice de neurones respiratoires dans la genèse du CRCV en condition basale, 2) un mécanisme périphérique à l'origine d'une potentialisation du CRCV qui est associée au développement de certaines formes d'hypertension artérielle, et 3) un mécanisme central d'amplification de la composante parasympathique cardiaque du CRCV, qui est associée à une bonne santé cardiovasculaire et qui ouvre la porte à des perspectives de traitement pour les pathologies de ce système.

Le premier chapitre de l'introduction aura pour objectif de reprendre l'historique et la physiologie des systèmes respiratoire et cardiovasculaire ainsi que du CRCV. Le second chapitre développera les bases neurobiologiques de ces grands systèmes et du CRCV, ainsi que de leurs régulations périphériques. Enfin, le troisième chapitre portera sur les modulations pathophysiologiques du CRCV. Les conclusions ainsi que des précisions quant à certains propos seront retrouvées dans des encarts. Un chapitre matériels et méthodes contenant les techniques principales et communes à mes différents projets sera suivi de la présentation des résultats de chacun de mes trois projets de thèse. La remise en perspective de ces résultats dans un contexte général sera présentée en

discussion. Enfin, les articles scientifiques et revues auxquels j'ai participé pendant ma thèse seront trouvés en Annexe.

Je tiens à mentionner que, bien que je n'en parle pas dans ce manuscrit par souci de simplicité et d'homogénéité générale du travail présenté, une petite partie de mon travail de thèse a été consacrée à l'obtention et l'analyse de données concernant un couplage entre la déglutition et l'activité autonome cardiovasculaire. Je tiens également à préciser que j'ai réalisé de bout en bout l'intégralité des travaux présentés dans les résultats dans cette thèse, à l'exception du génotypage des rats qui a été fait par la plateforme de biologie moléculaire du laboratoire.

Chapitre 1 : Physiologie intégrée des systèmes respiratoire et cardiovasculaire

1.1. Le système respiratoire

1.1.1. Histoire et fonctions

Les premières formes de vie sur Terre étaient aquatiques, et la plupart des vertébrés utilisaient un système respiratoire composé de branchies pour les échanges gazeux. Ces organes composés de lamelles très richement vascularisées et situées sur des arcs branchiaux permettent d'extraire le dioxygène (O2) de l'eau et de rejeter le dioxyde de carbone (CO2) par contact avec un flux d'eau permanent et se déplaçant dans un sens unique (Carvalho, 2011). Mais il y a environ 400 millions d'années, des changements environnementaux incluant l'appauvrissement des niveaux d'oxygène de certaines étendues aquatiques et leur assèchement, ont motivé les organismes aquatiques à explorer la terre (Costa, 2014). Cette transition de l'eau à la terre a nécessité l'évolution anatomique et fonctionnelle des processus respiratoires puisque le système branchial, séchant à l'air, devient inefficace en dehors de l'eau. Certains poissons du groupe des *sarcoptérygiens* avaient développé auparavant des poumons primitifs en plus de leurs branchies. Ces poumons auraient eu pour fonction initiale de réguler la flottaison du poisson, puis de réserve d'air pour supplémenter le système branchial. Cette deuxième fonction de respiration bimodale aquatique et aérienne est devenue un avantage évolutif majeur dans des conditions aquatiques appauvries en oxygène (Perry, 2001 ; Costa, 2014). Aussi, la respiration aérienne pulmonaire a été conservée à travers les âges, les poumons devenant l'organe principal de la respiration pour la vie terrestre chez les tétrapodes, les amphibiens, et le restant beaucoup plus tard, chez les mammifères (Perry, 2001 ; Carvalho, 2011 ; Costa, 2014).

1.1.2. Anatomie et physiologie

Le système respiratoire des mammifères est composé de voies aériennes permettant d'acheminer et de réguler le flux d'air, et des poumons. Les voies aériennes se divisent en voies

aériennes supérieures qui vont du nez au larynx, et les voies aériennes inférieures qui vont de la trachée aux alvéoles (Fig. 1). Contrairement aux amphibiens qui ventilent leurs poumons par une pompe buccale aspirant l'air dans la cavité buccale avant de le pousser vers les poumons, le système respiratoire des mammifères est composé d'un ensemble de muscles qui, en se contractant, créent une forte dépression intra-pulmonaire y aspirant de l'air (Carvalho, 2011) (Fig. 1).

Le cycle respiratoire est composé de 3 phases : l'inspiration, la post-inspiration et l'expiration tardive. Pour l'inspiration, les muscles inspiratoires, composés du diaphragme et des muscles intercostaux externes, se contractent, la cage thoracique s'étend, et l'air entre par la cavité buccale ou nasale. L'ouverture de la lumière pharyngée lors du passage de l'air est assurée par les muscles dilatateurs du pharynx, dont le génioglosse, qui avance et abaisse la langue, ainsi que les muscles élévateurs et tenseurs du palais mou, qui maintiennent l'ouverture de l'oropharynx (Fig. 1b). L'air traverse ensuite le larynx, où l'ouverture de la glotte (l'espace entre les cordes vocales) est assurée par les muscles abducteurs du larynx, notamment le cricoaryténoïdien postérieur (Bianchi, 1995). Enfin, l'air chemine par la trachée et les bronches pour atteindre les alvéoles pulmonaires, où s'effectuent les échanges gazeux (Fig. 1a).

La post-inspiration a pour but de prolonger les échanges gazeux, et est caractérisée par la contraction des muscles constricteurs des voies aériennes supérieures, et particulièrement du larynx. Parmi eux, les muscles cricoaryténoïdiens latéraux, interaryténoïdien et thyroaryténoïdien qui rétrécissent la glotte par une adduction partielle des cordes vocales (Fig. 1b). Les muscles constricteurs supérieurs, moyens et inférieurs du pharynx y contribuent également en réduisant le calibre du pharynx (Bianchi, 1995). La constriction des lumières laryngée et pharyngée augmente la résistance au flux d'air sortant, et le ralentit. De plus, il est intéressant de noter que de nombreux comportements moteurs non-respiratoires, comme la vocalisation ou le réflexe de déglutition, se produisent pendant la post-inspiration (Gestreau, 2000 ; Dutschmann, 2014).

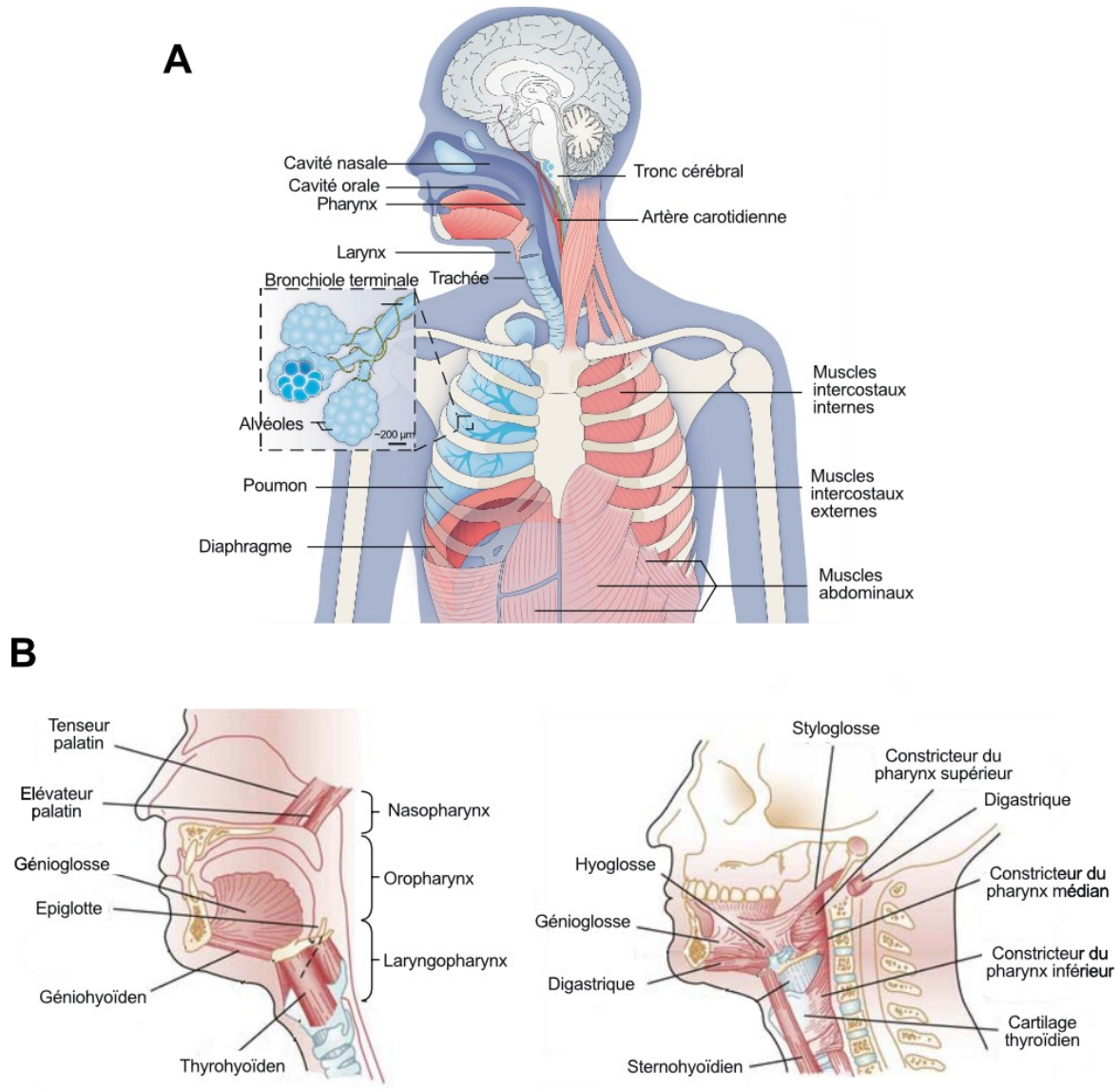


Figure 1. Anatomie du système respiratoire (adapté de Del Negro, 2018). La respiration dépend de muscles jouant le rôle de pompe ou de résistance au flux d'air et de stabilisation des mouvements respiratoires. Le diaphragme et les muscles intercostaux externes sont la pompe inspiratoire, les muscles abdominaux et intercostaux internes sont la pompe expiratoire (A). Les muscles des voies aériennes supérieures, dont ceux pharynx et du larynx, modulent la résistance au flux d'air (B). Enfin, certains autres muscles comme le stérnocléidomastoidien permettent la stabilisation de la cage thoracique. L'activité des muscles respiratoires est hautement coordonnée, selon une séquence de contraction en trois phases (l'inspiration, l'expiration précoce ou post inspiration, et l'expiration tardive).

Enfin, l'expiration tardive est passive au repos chez le mammifère et résulte du relâchement progressif des muscles inspiratoires et post-inspiratoires. L'expiration tardive peut cependant devenir active en cas de demande métabolique accrue, comme lors d'une activité physique. Sont

alors recrutés les muscles abdominaux et intercostaux internes pour expulser plus d'air, plus rapidement (Richter, 1982 ; Bianchi, 1995) (Fig. 1a).

La respiration physiologique repose donc sur la coordination fine de muscles respiratoires permettant leur activation selon une séquence précise, adaptée aux conditions métaboliques. La contraction des muscles respiratoire résulte d'une commande nerveuse qui est générée centralement, dans le tronc cérébral, et qui est modulée par des systèmes de contrôles périphériques. Parmi eux, le chémoréflexe, qui contrôle les niveaux sanguins gazeux et en informe les centres pour qu'ils adaptent leur commande (Smith, 2007 ; Prabhakar, 2004) (des mécanismes qui seront détaillés dans le chapitre 2 de cette introduction). La fonction de la respiration est de maintenir l'homéostasie du corps en régulant les niveaux des différents gaz du sang et donc les niveaux du pH sanguin dans des valeurs compatibles avec le bon fonctionnement des processus cellulaires, et de ce fait, avec la vie. Le système respiratoire n'est pas le seul impliqué dans le maintien de l'homéostasie gazeuse. En effet, le système cardiovasculaire intervient également puisque sans vascularisation des poumons, l'oxygène ne pourrait pas être assimilé par hématose, et sans circulation sanguine, il ne pourrait pas être acheminé aux cellules de l'organisme.

1.1.3. Techniques pour l'étude du système respiratoire

Il existe plusieurs méthodes invasives ou non pour étudier la physiologie respiratoire, que ce soit d'un point de vue du patron respiratoire ou du contenu de l'air expiré. La méthode la plus répandue chez l'humain reste la spirométrie, qui enregistre les volumes et débits respiratoires par un spiromètre. Plus précise, la pléthysmographie corporelle mesure les variations du volume corporel liées aux mouvements respiratoires thoraciques dans une enceinte hermétique. Cette technique est utilisée chez l'humain mais est également très répandue pour l'analyse de la fonction respiratoire chez le rongeur de laboratoire (Grimaud & Murthy, 2018 ; Kim, 2024). Les avancées de la technologie ont amené au développement de capteurs portables moins contraignants, permettant une analyse continue des paramètres respiratoires et gazeux utile aux athlètes et aux patients atteints de pathologies respiratoires (Kim, 2024).

L'analyse de la respiration peut également se faire de manière invasive. L'enregistrement électromyographique des différents muscles respiratoires est une des méthodes les plus directes

et précises pour quantifier les paramètres des différentes phases du cycle respiratoire (Grimaud & Murthy, 2018). C'est la méthode que nous avons utilisée pour mesurer les paramètres respiratoires chez le rongeur *in vivo*.

1.2. Le système cardiovasculaire

1.2.1. Histoire et évolution

Bien qu'il en ait d'autres, la fonction principale du système cardiovasculaire est le transport de divers éléments, dont l'oxygène et le dioxyde de carbone. Chez les organismes unicellulaires ou multicellulaires simples, ces échanges reposent sur un mécanisme de diffusion (Costa, 2014 ; Monahan-Earley, 2013). Cependant, avec l'évolution, les organismes ont grandi et ce mécanisme est devenu insuffisant, rendant nécessaire la mise en place d'un système de transport interne permettant l'approvisionnement de toutes les cellules. Un premier système circulatoire interne, est le système cœlomique. Une cavité, le cœlome, entre la paroi externe du corps et du tube digestif, est remplie d'un liquide cœlomique qui transporte les nutriments et gaz respiratoires. Il n'y a pas de pompe dans ce système et ce fluide est notamment déplacé grâce aux cils présents à la surface des cellules mésothéliales ou par les contractions des muscles de la paroi corporelle. Ce système, assez simple, est notamment trouvé chez les annélides (Monahan-earley, 2013). Mais pour les organismes plus grands et plus complexes, un système vasculaire sanguin s'est développé. Il peut être ouvert, comme chez les arthropodes, ou fermé, comme chez tous les vertébrés. Ce système est composé de vaisseaux dans lesquels circule l'hémolymphe ou le sang, et d'une pompe, plus ou moins simple en fonction des organismes (Monahan-Earley, 2013 ; Costa, 2014).

1.2.2. Anatomie et fonction

Chez les mammifères, le cœur est la pompe du système cardiovasculaire. C'est un muscle qui dispose d'un système de conduction nerveuse, incluant des cellules autorythmiques localisées dans le nœud sinusal et dans le nœud auriculo-ventriculaire, qui génèrent et transmettent des impulsions électriques nécessaires à la contraction séquentielle des cardiomyocytes composant les oreillettes et ventricules, permettant de pomper le sang efficacement dans les cavités

cardiaques et dans la circulation. Cependant, bien que le cœur possède un système intrinsèque capable de générer son propre rythme, il est également innervé par le système nerveux autonome (un aspect plus abordé dans le deuxième chapitre de cette introduction) qui est modulateur de certains paramètres cardiaques tels quel la fréquence cardiaque ou la force de contraction (Jones, 2014 ; Gordan, 2015 ; Giannino, 2024).

Le cycle cardiaque est composé de 2 phases : la diastole, pendant laquelle le cœur est relâché et se remplit de sang, et la systole, période de contraction du cœur qui éjecte le sang dans la circulation (Fig. 2a). Ce cycle se reflète sur la pression artérielle qui augmente lors de la systole et qui diminue lors de la diastole.

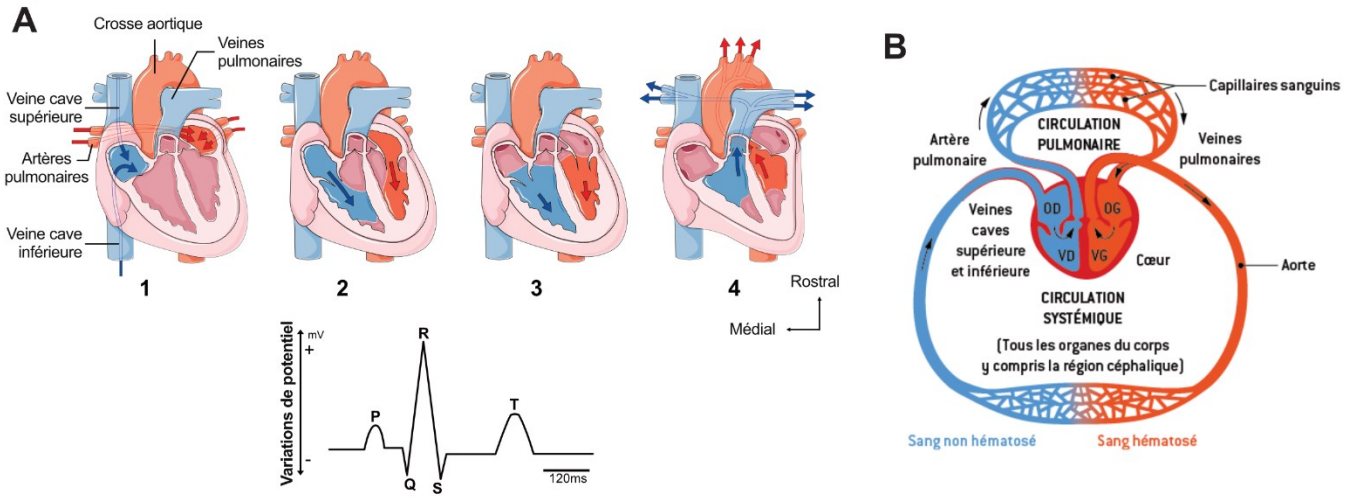


Figure 2. Physiologie anatomo-fonctionnelle du système cardiovasculaire. (**A**) Schéma du trajet du sang dans les cavités cardiaques au cours du cycle cardiaque (en haut) et des variations de potentiel enregistrées par ECG pendant un cycle cardiaque (en bas). L'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes et leur contraction (2 et 3 en haut). Le complexe QRS correspond à la dépolarisation des ventricules et leur contraction (4 en haut). L'onde T correspond à la repolarisation des ventricules (en 1). (**B**) Représentation schématique du système vasculaire. Le sang oxygéné (hématosé) est en rouge et le sang désoxygéné (non hématosé) est en bleu. Les flèches indiquent le sens de circulation du sang. OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche.

Le système circulatoire est composé de deux voies circulatoires : la circulation systémique, qui contribue aux échanges gazeux entre le sang et les tissus, et la circulation pulmonaire, qui contribue aux échanges gazeux entre l'air et le sang. Le système circulatoire est également composé de plusieurs types de vaisseaux sanguins qui assurent diverses fonctions. On trouve les artères, qui

transportent le sang du cœur vers les tissus en se ramifiant progressivement en artérioles de plus en plus fines jusqu'à former des capillaires. Les artères systémiques sont responsables de l'acheminement du sang oxygéné vers l'ensemble du corps et les artères pulmonaires transportent le sang désoxygéné vers les poumons pour qu'il soit réoxygéné. Les veines constituent un autre type de vaisseaux sanguins. Les veines systémiques ramènent le sang chargé des déchets métaboliques et du CO2 rejeté par les tissus vers le cœur, alors que les veines pulmonaires ramènent le sang riche en O2 des poumons vers le cœur (Fig. 2b). Une différence notable entre ces vaisseaux est que certaines artères, contrairement aux veines, possèdent une tunique supplémentaire de muscles lisses pouvant se contracter, régulant ainsi la pression artérielle qui est le produit de la résistance vasculaire et du débit cardiaque (Jones, 2014). Tout comme le système respiratoire, le système cardiovasculaire est doté de systèmes de contrôle et de régulation périphériques. Parmi eux, le baroréflexe, qui surveille les niveaux de pression artérielle et qui en informe les centres régulateurs cardiovasculaires pour qu'ils adaptent leur commande (Gordan, 2015 ; Guyenet, 2006).

1.2.3. Techniques pour l'étude du système cardiovasculaire

L'étude du système cardiovasculaire peut se faire de diverses manières en fonction de l'information recherchée (anatomique ou fonctionnelle), du contexte dans lequel elle est réalisée, et surtout de l'espèce chez qui la mesure est obtenue (Pickering, 2005 ; Jones, 2014). Les premières mesures d'activité nerveuse cardiaque remontent au 19è siècle, où Carlo Matteucci, un physicien, est le premier à montrer chez la grenouille que chaque battement cardiaque est associé à du courant électrique (AlGhatrif, 2012). C'est 45 ans plus tard, en 1887, qu'est mesurée l'activité cardiaque chez l'humain pour la première fois. Pour cela, Augustus Waller a utilisé un électromètre capillaire dont le principe repose sur le changement de forme d'une interface liquide dans un capillaire en réponse à des variations de potentiel électrique. Ces avancées ont amené au développement de l'électrocardiogramme (ECG) en 1901 grâce à Willem Einthoven, ce qui lui vaudra un prix Nobel en 1924 (AlGhatrif, 2012). Les techniques ont grandement évolué depuis, avec par exemple des méthodes permettant l'enregistrement de l'activité cardiaque sans contact direct avec le sujet par utilisation de signaux radiofréquence ou radar (Zhang, 2024 ; Will, 2018). Mais l'ECG reste la méthode la plus couramment utilisée car non invasive, rapide et facile à utiliser tout en restant précise. L'ECG mesure les variations de potentiels générées par les dépolarisations et

repolarisations séquentielles des oreillettes et des ventricules du cœur (Jones, 2014) (Fig. 2a). C'est la méthode que j'ai utilisée pendant mon travail pour étudier l'activité cardiaque chez le rongeur.

Il existe également différentes méthodes pour mesurer la pression artérielle mais la plus répandue, non invasive, utilise un sphygmomanomètre (ou tensiomètre), composé d'un brassard relié à un manomètre qu'on gonfle jusqu'à occlure l'artère brachiale, avec un stéthoscope permettant d'écouter les sons émis par le retour de la circulation lorsque le brassard est dégonflé (Pickering, 2005). Cette technique se base sur la mesure de la tension appliquée sur les parois des vaisseaux par le sang qui circule. Mais cette méthode reste indirecte et manque de précision (Bui, 2023) par rapport à la pose d'un cathéter artériel. Les variations de la pression artérielle sont perçues par le cathéter comme des déformations mécaniques qui sont ensuite converties en un signal électrique par un transducteur. C'est par la pose de cathéters artériels que nous avons mesuré et analysé la pression artérielle des rongeurs *in vivo*.

1.2.4. Variabilités du rythme cardiaque et de la pression artérielle

Les enregistrements de l'activité cardiovasculaire ont permis de gagner en finesse dans la connaissance de ces systèmes. Il a ainsi été mis en évidence qu'ils ne fonctionnent pas de manière linéaire, mais qu'ils présentent des variations, connues sous le nom de variabilité du rythme cardiaque (VRC) et de variabilité de la pression artérielle (VPA). Ces variabilités s'expriment à différentes échelles temporelles allant de la seconde à la journée et résultent de la régulation dynamique du système cardiovasculaire par plusieurs mécanismes nerveux, cardiovasculaires, réflexes et endocrines. Les analyses dans le domaine fréquentiel de densité spectrale, notamment basées sur la transformée de Fourier, sont souvent utilisées pour étudier les différentes composantes de la VRC et de la VPA qui s'expriment dans plusieurs domaines de fréquence.

1.2.4.1. Variabilités du rythme cardiaque (VRC)

Parmi les différents types de VRC, on trouve la VRC à long terme qui sont des fluctuations ayant une période allant de plusieurs minutes à plusieurs heures, et qui sont retrouvées dans la gamme définie dans la nomenclature usuelle comme celle des très basses fréquences. Les

mécanismes responsables de cette VRC dans les très basses fréquences incluent les rythmes circadiens, le cycle nycthéméral ainsi que des mécanismes hormonaux, thermorégulateurs et métaboliques (Schaffer, 2014).

On observe également la VRC à court terme qui concerne principalement des fluctuations ayant une période allant de quelques secondes à quelques minutes chez l'humain et pouvant descendre sous la seconde chez le rongeur, et qui sont observables dans les gammes définies comme allant des basses aux hautes fréquences. Parmi les facteurs responsables de la VRC à court terme, on trouve le système nerveux autonome qui module le rythme cardiaque à l'échelle du battement par la balance entre l'influence de ses deux branches cardioaccélératrice et cardioinhibitrice qui constituent les fluctuations les plus rapides du rythme cardiaque (Gordan, 2015). Par ailleurs, le baroréflexe, le chémoréflexe, et le tonus vasculaire, eux-mêmes influencés par l'activité cardiaque, sont impliqués dans la VRC à court terme. Ils sont généralement représentés dans le domaine des basses fréquences (entre 0.04 et 0.15Hz chez l'humain adulte) (Schaffer, 2014) (Fig. 3b). Une autre source importante de variabilité à court terme est la respiration, avec qui oscille le rythme cardiaque. En effet, le rythme cardiaque augmente à chaque inspiration et diminue à chaque expiration, un phénomène historiquement appelé arythmie sinusale respiratoire qui nous intéresse particulièrement (Dick, 2014a ; Davies & Neilson,1966 ; Dornhorst, 1952) (Fig. 3a).

L'appellation « arythmie sinusale respiratoire », bien qu'ayant persistée chez les experts jusqu'à aujourd'hui, renvoie une dimension pathologique à cause de la nomenclature bien que cette variabilité du rythme cardiaque soit bel et bien physiologique. Dans une logique de simplification, une revue d'opinion à laquelle j'ai participé a été rédigée en consensus avec des experts du domaine afin de renommer l'arythmie sinusale respiratoire en « variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC) ». Cela permet de remettre l'emphase sur la composante respiratoire à l'origine de ce phénomène, et c'est la terminologie que j'emploierai à partir de maintenant (cf. partie 1 de l'annexe).

La RespVRC est généralement présente dans la gamme des hautes fréquences. Cependant, la RespVRC découle de la respiration et la gamme de fréquence précise dans laquelle est observée la RespVRC varie avec la fréquence respiratoire des sujets. Chez l'humain au repos, elle est comprise entre 0.15 Hz et 0.4 Hz. Mais lorsque la fréquence respiratoire diminue, la RespVRC est déplacée dans un domaine de fréquences plus basses, comprenant d'autres composantes de la variabilité du rythme cardiaque, ce qui complexifie son analyse fréquentielle.

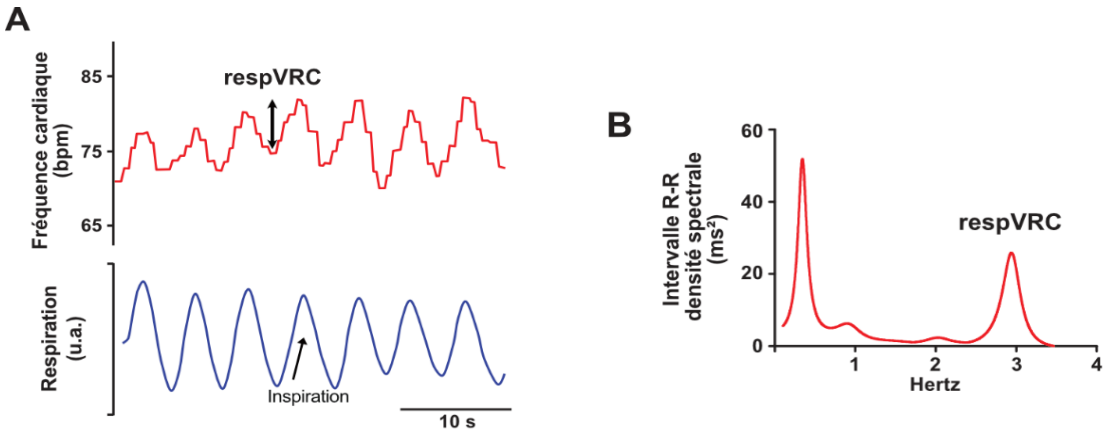


Figure 3. Enregistrements de la RespVRC (adapté de Giardino 2003, Fazan 2005 et Dick 2014a). (A) Enregistrements dans le domaine temporel de la fréquence cardiaque instantanée et de la respiration chez l'humain. La fréquence cardiaque augmente avec l'inspiration et diminue avec l'expiration, un phénomène appelé variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC). L'analyse de la RespVRC dans le domaine temporel passe par la mesure de son amplitude, qui est calculée comme la différence entre la valeur minimale et maximale de la fréquence cardiaque au cours de chaque cycle respiratoire. (**B**) Enregistrements dans le domaine fréquentiel de l'intervalle entre les ondes R (intervalle R-R, à gauche) chez la souris éveillée. La RespVRC est représentée par le pic dans le domaine des hautes fréquences, à celle de la respiration (3 Hz). Notez le pic dans les basses fréquences qui représente d'autres mécanismes à l'origine de la variabilité du rythme cardiaque, notamment le baroréflexe. RespVRC : variabilité respiratoire du rythme cardiaque.

1.2.4.2. Variabilités de la pression artérielle (VPA)

La pression artérielle est également modulée par plusieurs mécanismes qui participent à la VPA. Mais la classification et les échelles de temps utilisées pour décrire les VPA sont légèrement différentes de la VRC. On retrouve la VPA à très court terme qui est de l'ordre de quelques secondes en termes de période, celle à court terme dont la période s'étend sur une journée, celle à moyen terme dont la période s'étend sur plusieurs jours, et enfin celle à long terme dont la période s'étend sur plusieurs semaines, mois ou années. Les facteurs qui contribuent à la VPA à moyen et long terme incluent des facteurs comportementaux tels que le stress, la qualité du sommeil, la cigarette et l'alcool ainsi que facteurs environnementaux comme les changements de température saisonnières et de pression atmosphériques liées à l'altitude (Parati, 2013 ; Narita, 2023). La VPA à court terme traduit des variations métaboliques incluant des facteurs hormonaux et thermorégulateurs, ainsi que les rythmes circadiens et nycthéméraux qui sont représentés dans le domaine des très basses fréquences (<0.04 Hz) comme pour la VRC (Parati, 2013 ; Narita, 2023).

Enfin, la pression artérielle inclue trois types de variabilités à très court terme. Tout d'abord à l'échelle du battement cardiaque, puisque le cycle cardiaque influence la pression artérielle qui augmente lors de la systole et diminue lors de la diastole (le pouls). Ensuite, une modulation à l'échelle d'une période de plusieurs dizaines de secondes par ce qui semble être des mécanismes spinaux à l'origine d'oscillations lentes appelées ondes de Mayer qui sont représentées dans la gamme des basses fréquences (environ 0.1 Hz). Et enfin, une variabilité liée à la respiration, qui est celle qui m'a particulièrement intéressée dans mon travail de thèse. En effet, la pression artérielle oscille avec chaque cycle respiratoire, comme le rythme cardiaque (Fig. 3a). La pression artérielle commence à augmenter lors de l'inspiration, atteint un pic pendant la post-inspiration et diminue pendant l'expiration tardive. Ces oscillations sont appelées ondes de Traube-Hering (ondes TH) et sont généralement présentes dans la gamme des hautes fréquences (0.15 Hz et 0.4 Hz) chez l'adulte au repos (Fig. 4b). Cependant, comme la RespVRC, les ondes TH sont entrainées par la respiration et leur représentation dans le domaine fréquentiel peut varier en fonction de la fréquence respiratoire (Parati, 2013 ; Barnett, 2020).

Dans la même logique que lorsque nous avons renommé l'arythmie sinusale respiratoire en variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC), nous avons réfléchi à renommer les ondes de Traube Hering en « variabilité respiratoire de la pression artérielle », ou RespVPA. Cependant, la nomenclature « Traube Hering » rend hommage aux scientifiques ayant décrit ce phénomène. De ce fait, je conserverai cette terminologie pour mon manuscrit de thèse.

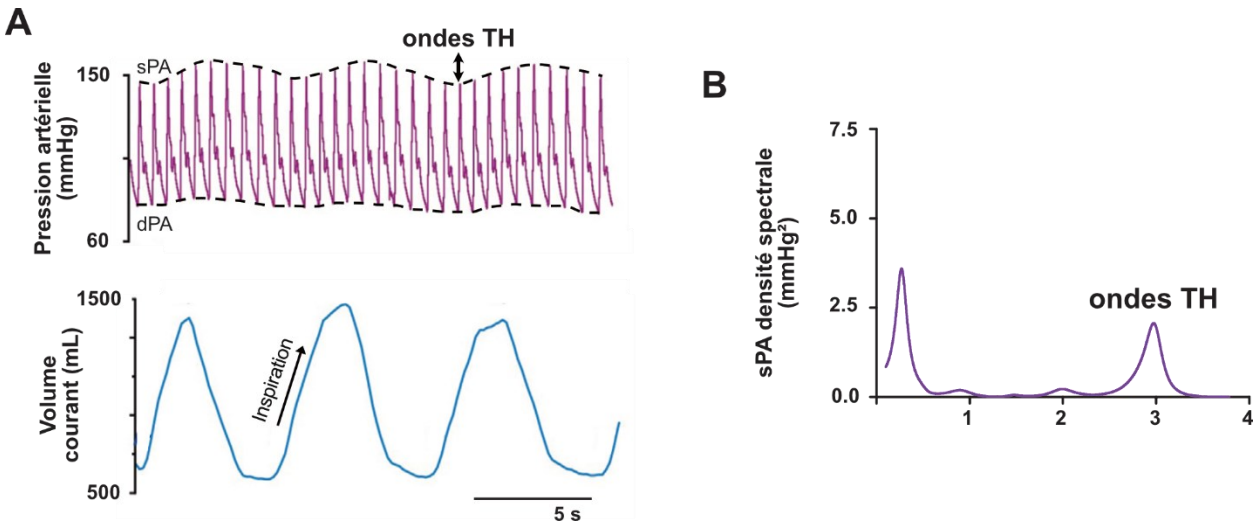


Figure 4. Enregistrements des ondes TH (adapté de Giardino 2003, Fazan 2005 et Dick 2014a).
(A) Enregistrements dans le domaine temporel de la pression artérielle (en haut) et de la respiration (en bas) chez l'humain. Les oscillations de la pression artérielle en phase avec la respiration sont appelées ondes de Traube-Hering (ondes TH). L'analyse des ondes TH dans le domaine temporel passe par la mesure de leur amplitude qui est calculée comme la différence entre la valeur minimale et maximale de la pression artérielle systolique au cours de chaque cycle respiratoire. (**B**) Enregistrements dans le domaine fréquentiel de la pression artérielle systolique chez la souris éveillée. Les ondes TH sont représentées par un pic dans la gamme des hautes fréquences, à la fréquence de la respiration (3 Hz). Le pic dans les basses fréquences représente une variabilité de la pression artérielle résultant d'autres mécanismes comme le baroréflexe. sPA : pression artérielle systolique ; dPA : pression artérielle diastolique ; ondes TH : ondes de Traube-Hering.

La pression artérielle et le rythme cardiaque ne sont donc pas constants mais variables. Les différents mécanismes qui sous-tendent la VRC et la VPA sont intriqués et s'influencent les uns les autres ce qui rend parfois compliquée l'analyse de ces phénomènes qui évoluent en fonction de l'état physiopathologique des sujets. Notre intérêt porte essentiellement sur les ondes TH et la RespVRC qui découlent de l'interaction entre les systèmes respiratoire et cardiovasculaire, un phénomène appelé couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV) et dont l'étude est le cœur de mon travail de thèse.

1.3. Physiologie de la variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC)

1.3.1. Historique

La première observation selon laquelle l'intervalle entre chaque battement cardiaque varie au cours du cycle respiratoire remonte au 18è siècle grâce aux travaux de Stephen Hales chez le cheval. Puis en 1847, Carl Ludwig fit la première description de ce phénomène qui fut appelé arythmie sinusale respiratoire par la suite. En enregistrant les variations de pression artérielle et de pression intrathoracique chez le chien à l'aide d'un kymographe, il démontra que le pouls augmente pendant l'inspiration et diminue pendant l'expiration (Billman, 2011 ; Ludwig, 1847). Le développement de l'ECG marqua un tournant critique pour le développement de nouvelles méthodes amenant à une meilleure compréhension de ce phénomène et de ses fonctions.

1.3.2. Fonctions supposées

La RespVRC joue probablement un rôle physiologique important puisqu'elle est très conservée d'un point de vue évolutif. On la retrouve chez beaucoup d'espèces du royaume animal, allant des reptiles aux mammifères en passant par les oiseaux et en remontant jusqu'aux poissons primitifs pulmonés (Elstad, 2018 ; Dick 2014a). Cependant, bien que ce phénomène ait été décrit il y a près de deux siècles, il n'y a pas de réel consensus quant à sa fonction. En effet, la RespVRC étant un couplage entre les systèmes respiratoire et cardiovasculaire qui contribuent chacun à maintenir l'homéostasie du corps, il est compliqué de découpler et/ou moduler ces systèmes sans effet aspécifique compensatoire.

Une première hypothèse a été que la RespVRC optimise l'efficacité des échanges gazeux en adaptant la perfusion sanguine pulmonaire à la ventilation alvéolaire. Cette hypothèse était basée sur des études menées chez le chien et l'humain qui montraient qu'une augmentation d'amplitude de RespVRC était associée à de meilleurs échanges gazeux (Hayano, 1996 ; Giardino, 2003). Mais cette hypothèse a été remise en question par plusieurs travaux montrant que c'était plutôt la technique de respiration utilisée, lente et profonde, qui optimisait les échanges gazeux tout en augmentant l'amplitude de la RespVRC (Ben Tal, 2012 ; Sin, 2010 ; Dick 2014a) (Fig.5).

La fonction cardiaque est limitante pour la survie. Cela a notamment été montré par des travaux qui révèlent que 1) le nombre total de battements cardiaques au cours d'une vie serait relativement constant, peu importe sa durée (Levine, 1997), et 2) qu'il existe une relation inverse entre la fréquence cardiaque et la durée de vie (Levine, 1997 ; Gaye, 2024). Ainsi, optimiser le travail fourni par le cœur serait associé à moins d'énergie dépensée et à une meilleure survie. Aussi, des travaux de modélisation mathématiques ont suggéré une seconde hypothèse à la fonction de la RespVRC, qui, pour un même nombre de battements cardiaques, optimiserait le travail du cœur tout en maintenant les niveaux de CO_2 dans des limites physiologiques (Ben Tal, 2012) (Fig. 5).

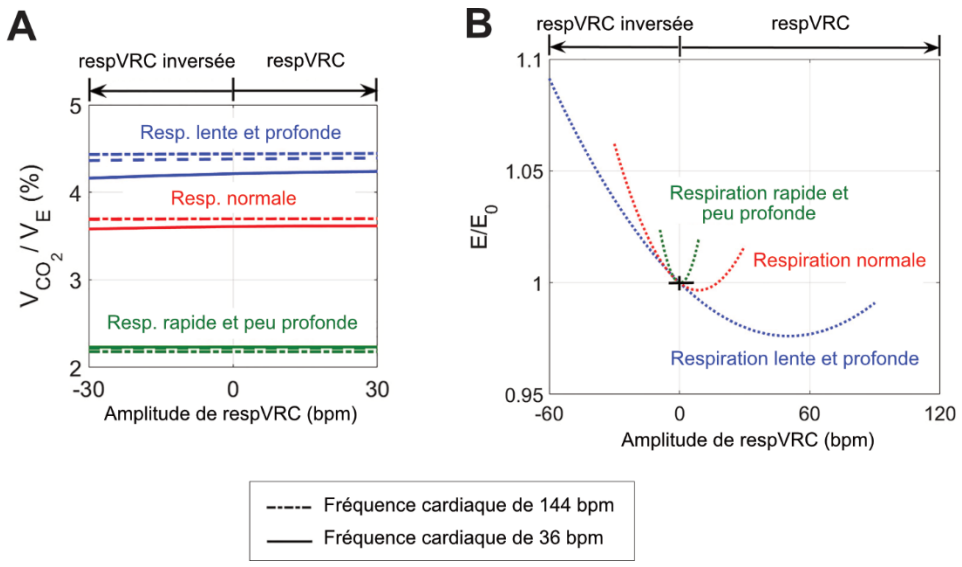


Figure 5. Modélisation des échanges gazeux et du travail cardiaque en fonction de l'amplitude de la RespVRC et du type de respiration (adapté de Elstad 2018). L'amplitude de la RespVRC a peu d'influence sur les échanges gazeux (**A**) mais minimise le travail cardiaque en conservant des niveaux physiologiques en CO_2 (**B**). (**A**) et (**B**) ont été générés à partir du modèle mathématique par Ben-Tal, 2012. VCO_2/VE modélise l'efficacité des échanges gazeux, en normalisant le volume de CO_2 extrait du sang en une minute par la ventilation. E/E0 modélise le travail cardiaque en normalisant l'effort cardiaque lorsque l'amplitude de la RespVRC est nulle. bpm = battements par minute ; Resp = respiration.

Un exemple appuyant cette théorie sont les ours en hibernation, qui réduisent au maximum leurs dépenses énergétiques et dont le cœur ne bat presqu'exclusivement que pendant l'inspiration, leur conférant une amplitude de RespVRC très conséquente (Lasker, 2010). Un autre exemple concerne le lien entre RespVRC et pathologies cardiovasculaires. Les patients souffrant d'insuffisance

cardiaque chronique ont une perte de la RespVRC, ce qui est un facteur de mauvais pronostique de survie (La Rovere, 1998). A l'inverse, l'utilisation d'un pacemaker à biofeedback basé sur la respiration, chez le rongeur et le mouton insuffisants cardiaques, rétablit la RespVRC ce qui améliore leur fonction cardiaque par augmentation de la contractilité cardiaque et de l'oxygénation du myocarde (Shanks, 2021 ; O'Callaghan, 2020). L'ensemble de ces données suggère que la RespVRC optimise la fonction cardiovasculaire et le travail cardiaque en réduisant la dépense énergétique nécessaire au maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine.

1.3.3. Mécanismes centraux et périphériques

La RespVRC est la résultante de l'interaction entre des mécanismes d'origines centrale et périphérique. Les mécanismes centraux impliquent la modulation de l'activité de neurones générant la commande nerveuse autonome cardiaque par des neurones respiratoires. Ces mécanismes centraux seront décrits plus en détails dans le chapitre 2.2. Les mécanismes périphériques, eux, modulent le rythme cardiaque soit directement *via* les propriétés intrinsèques du tissu cardiaque et mécaniques hémodynamiques, soit indirectement en modulant la commande centrale *via* des afférences sensorielles (Elstad, 2018).

Les mécanismes d'origine périphérique impliqués dans la RespVRC sont principalement mis en jeu par les changements de pression intrathoracique et de conformation de certains organes induits par les mouvements respiratoires. Lors de l'inspiration, la cage thoracique s'étend ce qui distend les poumons. Les mécanorécepteurs sensibles à l'étirement présents dans les parois pulmonaires sont alors stimulés et ces afférences vont moduler la commande centrale cardiovasculaire (Giardino, 2003 ; Taha, 1995). La contraction du diaphragme pendant l'inspiration entraine une diminution de la pression intra-thoracique grâce à l'expansion du thorax ainsi qu'une augmentation de la pression intra-abdominale liée à la contraction de ce muscle. La diminution de la pression intra-thoracique diminue la pression sur les parois cardiaques ce qui réduit la pression dans l'oreillette droite et facilite le retour veineux. Le retour veineux est également facilité par l'augmentation de la pression intra-abdominale qui comprime la veine cave inférieure (ramenant au cœur le sang de la partie inférieure du corps) et presse le sang vers le cœur. L'augmentation du retour veineux a plusieurs conséquences. D'une part, cela étire les oreillettes qui sont pourvues de récepteurs sensibles à l'étirement. La stimulation par l'étirement de ces récepteurs véno-auriculaires va augmenter la

décharge des afférences qui les innervent et qui vont moduler l'activité de la commande centrale cardiovasculaire pour induire une tachycardie (Crystal & Salem, 2012). De plus l'étirement des oreillettes par l'augmentation du retour veineux stimule l'activité des cellules autorythmiques du nœud sinusal du fait de leurs propriétés intrinsèques mécano-électriques (Blinks, 1956 ; Quinn & Kohl, 2021). Cela induit une augmentation de la fréquence cardiaque qui se combine à celle médiée par la modulation de la commande des réseaux cardiovasculaires centraux grâce aux afférences des récepteurs véno-auriculaires (Quinn & Kohl, 2021 ; Crystal & Salem, 2012). Par ailleurs, une augmentation de retour veineux est directement liée à l'augmentation du volume d'éjection systolique, puisque le système cardiovasculaire est un circuit fermé soumis aux régulations hémodynamiques (Loi de Frank-Starling). Cela induit une augmentation de la pression artérielle systémique lors de l'inspiration (un des mécanismes à l'origine des ondes TH) qui distend les parois des vaisseaux dans lesquelles sont présents des récepteurs sensibles à l'étirement. Les barorécepteurs artériels sont stimulés et modulent la commande cardiovasculaire centrale grâce à leurs afférences, un mécanisme qui est impliqué dans la diminution de la fréquence cardiaque en post-inspiration (Gilbey, 1984 ; McAllen & Spyer, 1978b).

La contribution à la RespVRC de tous ces mécanismes périphériques, liés aux propriétés mécaniques des tissus et du sang ou aux afférences, a été mise en évidence par les données obtenues chez des patients transplantés ou chez des modèles animaux déafférentés. D'une part, la RespVRC est réduite chez les patients transplantés pulmonaires ou après la destruction ciblée des afférences pulmonaires chez le mouton et l'humain (Taha, 1995 ; Valipour, 2019 ; Montano, 2000), des résultats qui illustrent la contribution des afférences à la génération de la RespVRC. De plus, le cœur des patients transplantés a subi une dénervation totale (afférences et efférences). La régulation de leur rythme cardiaque ne dépend donc que des mécanismes purement périphériques, incluant les propriétés intrinsèques des cellules autorythmiques cardiaques et les adaptations hémodynamiques. Or, la RespVRC des patients transplantés cardiaque est très réduite ce qui montre que ces mécanismes purement périphériques ne sont que minoritaires pour la génération de la RespVRC puisqu'ils ne compensent pas la suppression de l'influence de la commande nerveuse centrale cardiovasculaire (Taha, 1995).

Les mécanismes périphériques contribuent à la genèse de la RespVRC, mais ce phénomène persiste sur des préparations déafférentées, paralysées, dont on a retiré les poumons et dont la cage thoracique est ouverte démontrant une contribution importante des mécanismes centraux (Fig. 6b).

De plus, la RespVRC disparait après la mort cérébrale (Conci, 2001) (Fig. 6a) ce qui confirme le rôle des mécanismes centraux dans sa genèse, lesquels reposent sur le couplage entre les neurones générant la commande nerveuse respiratoire et ceux générant la commande nerveuse autonome cardiovasculaire (Elstad, 2018).

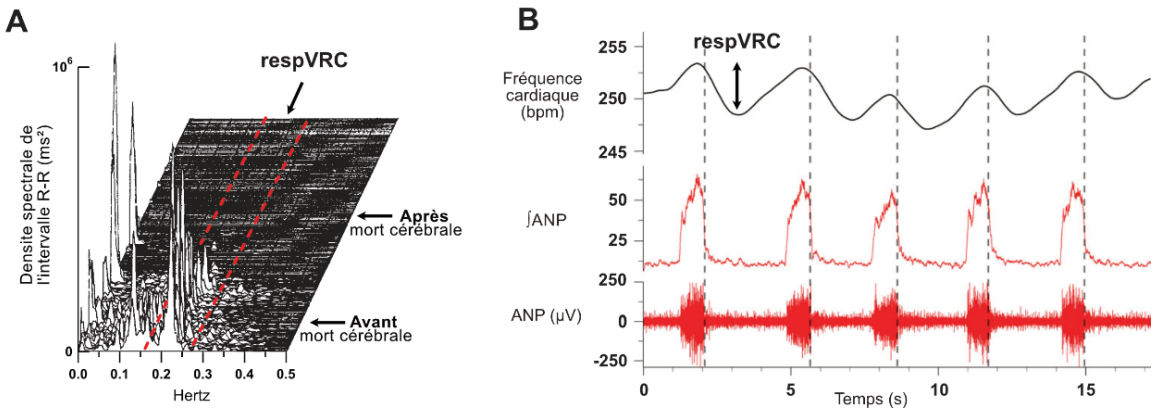


Figure 6. La RespVRC a une origine majoritairement centrale (adapté de Conci, 2001 et Farmer, 2016). (**A**) Mesure de la densité spectrale de la RespVRC chez l'humain avant et après mort cérébrale. La bande pointillée indique la gamme de fréquences dans laquelle se trouve la RespVRC et qui disparaît après la mort du tronc cérébral, alors même que le patient est sous ventilation artificielle. (**B**) Enregistrements de l'activité cardiaque et de l'activité phrénique inspiratoire sur une préparation réduite de rat *in situ cœur*-tronc cérébral isolés perfusés. Cette préparation est décérébrée, paralysée, vagotomisée avec les poumons enlevés et la cage thoracique ouverte. La RespVRC est toujours présente même en l'absence des mécanismes périphériques contribuant à sa genèse, ce qui souligne l'importance des mécanismes centraux du couplage respiratoire-cardiovasculaire dans la genèse de ce phénomène. ANP : activité nerveuse phrénique.

1.4. Physiologie des ondes de Traube-Hering (ondes TH)

1.4.1. Historique

En 1865, Ludwig Traube fut le premier à décrire des oscillations de la pression artérielle en phase avec la respiration chez le chien curarisé, en concluant qu'elles auraient une origine nerveuse centrale puisqu'elles disparaissent après une section de la moelle épinière cervicale. Puis, en 1969, Karl E. Hering approfondit cette observation en montrant que ces ondes résultent d'interactions complexes entre la respiration, la régulation cardiaque et le tonus vasomoteur (Plumier, 1900 ; Billman, 2011).

Moins d'intérêt a été porté aux ondes de Traube Hering (ondes TH) par rapport à la RespVRC, et les connaissances actuelles à leur sujet sont plus limitées. Par exemple, aucune datation précise de l'apparition des ondes TH dans l'évolution n'a été faite. Toutefois, nous pouvons faire l'hypothèse que leur émergence remonte aux premiers vertébrés dotés d'un système respiratoire et d'un système cardiovasculaire organisé puisque 1) elles découlent d'une modulation nerveuse du système cardiovasculaire (Menuet, 2017, 2020 ; Simms, 2009), 2) elles résultent de l'interaction des systèmes respiratoire et cardiovasculaire (Barnett, 2020).

1.4.2. Fonctions supposées

La fonction physiologique des ondes TH reste floue. Une hypothèse avancée serait qu'elles jouent un rôle dans l'optimisation de la perfusion tissulaire, tout en l'adaptant aux variations des besoins métaboliques (Parati, 2020 ; Simms, 2010). Cependant, malgré le manque de connaissances à leur sujet, il est clairement établi que l'augmentation de l'amplitude de ces oscillations à long terme est dommageable pour le système cardiovasculaire et pour les organes cibles (Tatasciore, 2007 ; Parati 2020). Notamment, l'exacerbation des ondes TH est une cause de développement d'hypertension artérielle (Simms et al, 2009 ; Menuet, 2017 ; Briant, 2015).

1.4.3. Mécanismes périphériques et centraux

Les ondes TH sont des variations de pression artérielle en phase avec le cycle respiratoire. Comme pour la RespVRC, les ondes TH résultent de plusieurs mécanismes centraux et périphériques. Les mécanismes centraux impliquent la modulation de l'activité de neurones générant la commande nerveuse autonome vasculaire par des neurones respiratoires. Ces mécanismes centraux seront décrits plus en détails dans le chapitre 2.2. Les mécanismes périphériques incluent des afférences qui exercent une influence indirecte sur la pression artérielle en modulant la commande centrale cardiovasculaire, et des mécanismes hémodynamiques qui modulent directement les paramètres circulatoires.

Pour commencer, l'inspiration étire les poumons, ce qui stimule les afférences pulmonaires qui contribuent à générer les ondes TH en modulant l'activité des centres nerveux cardiovasculaires

(Simms, 2010). Comme cela a été mentionné dans le sous-chapitre précédent, les variations de pression intra-thoraciques et intra-abdominales pendant l'inspiration augmentent le retour veineux. Cette augmentation du retour veineux est un facteur important dans la genèse des ondes TH, et il en découle plusieurs conséquences. L'augmentation du retour veineux se traduit par un remplissage plus élevé des cavités du cœur qui augmente de fait le volume d'éjection systolique. Cela permet d'équilibrer le débit entre les cavités droites et les cavités gauches. La pression artérielle varie directement avec le volume d'éjection systolique et la fréquence cardiaque, deux paramètres augmentés lors de l'inspiration. Ainsi, l'inspiration, associée à une augmentation de la fréquence cardiaque et à une augmentation du volume d'éjection systolique du fait du retour veineux augmenté, donne lieu à une élévation transitoire de la pression artérielle systémique qui contribue à générer les ondes TH (Simms, 2010 ; Barnett, 2020). Par ailleurs, puisque la pression artérielle est directement influencée par la fréquence cardiaque, il a récemment été suggéré que la RespVRC participe à générer les ondes TH (Barnett, 2020). Cependant d'autres données suggèrent que la RespVRC jouerait au contraire le rôle de tampon en atténuant les ondes TH (Elstad, 2015). L'augmentation de pression artérielle systémique pendant l'inspiration stimule les barorécepteurs de la paroi de la crosse aortique. Les afférences barosensibles modulent en retour l'activité des réseaux cardiovasculaires centraux pour normaliser la pression artérielle, ce qui est impliqué dans la genèse des ondes TH (Di Rienzo, 1991).

Ces influences mécaniques périphériques contribuent plus largement à la genèse des ondes TH qu'à la genèse de la RespVRC, puisque les ondes TH persistent après la mort cérébrale de patients comateux ventilés artificiellement (Conci, 2001) (Fig. 7b).

Cependant, les ondes TH persistent sur des préparations présentant une absence de mouvements respiratoires (par paralysie et ouverture de la cage thoracique), et ayant subi une déafférentation pulmonaire et cardiaque (Fig. 7a), ce qui démontre une contribution importante des mécanismes centraux qui reposent grandement sur un couplage entre les neurones générant la commande nerveuse centrale respiratoire et ceux générant la commande nerveuse centrale cardiovasculaire (Simms, 2009 ; Menuet, 2020 ; Dempsey, 2002).

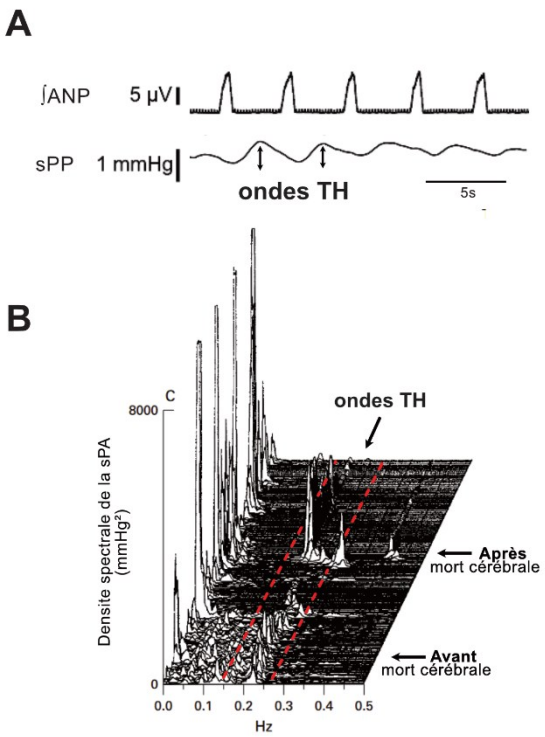


Figure 7. Les ondes TH résultent de mécanismes périphériques et centraux (adapté de Menuet 2020 et Conci, 2001). (**A**) Enregistrements de l'activité phrénique inspiratoire (ANP) et de la pression de perfusion systolique (sPP, équivalent de la pression artérielle systolique) sur une préparation de rat *in situ cœur*-tronc cérébral isolés perfusés (décérébrée, paralysée, avec les poumons enlevés et la cage thoracique ouverte). Les ondes TH persistent grâce à l'influence vasomotrice de la commande nerveuse cardiovasculaire organisée centralement. (**B**) Mesure de la densité spectrale de la pression artérielle systolique (sPA) chez le patient comateux sous ventilation artificielle avant et après mort cérébrale. La bande pointillée indique la gamme de fréquences dans laquelle se trouve les ondes TH. La mort cérébrale perturbe l'amplitude des ondes TH mais n'induit pas leur disparition.

Ce premier chapitre se sera attelé à montrer que le système respiratoire et le système cardiovasculaire, bien qu'anatomiquement distincts, servent une fonction commune qui est essentielle à la survie : le maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine. Leur couplage, assuré par des mécanismes complexes et intriqués, optimise cette fonction en réduisant notamment l'effort physiologique nécessaire.

Chapitre 2 : Bases neurobiologiques des systèmes respiratoire et cardiovasculaire chez le mammifère

2.1. La commande nerveuse respiratoire

La respiration est un comportement moteur rythmique et stéréotypé maintenu pendant toute la vie des organismes. La respiration repose sur l'activation séquentielle des muscles respiratoires régie par une commande respiratoire rythmique. Cette commande est transmise aux muscles respiratoires par des nerfs dont les corps cellulaires des motoneurones sont regroupés dans des noyaux spinaux et crâniens. La commande respiratoire est générée et organisée par un générateur central de patron moteur respiratoire constitué d'un réseau neuronal complexe distribué entre plusieurs noyaux du tronc cérébral. Ces circuits sont capables de produire une activité rythmique de manière endogène aboutissant à une sortie motrice coordonnée grâce à leurs propriétés intrinsèques et à leurs interconnexions synaptiques (Richter, 1982 ; Smith, 2007). La commande respiratoire est adaptée aux besoins métaboliques et aux contraintes environnementales grâce à des systèmes sensoriels périphériques (Fig. 8).

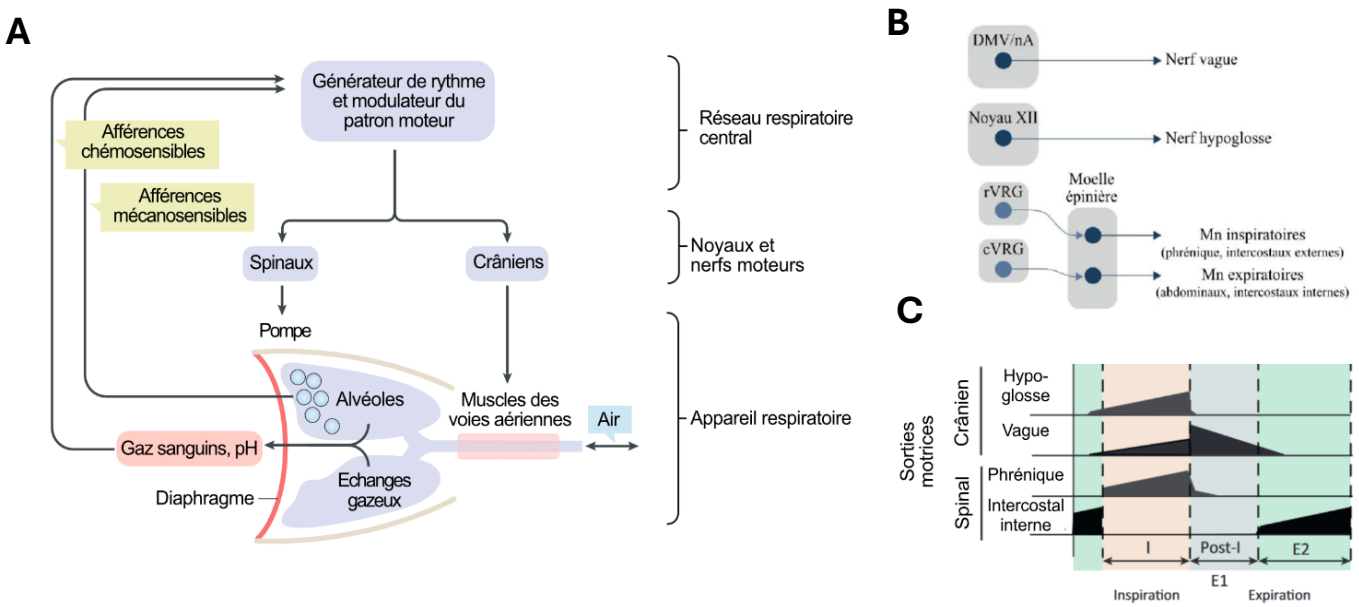


Figure 8. Schémas des voies nerveuses respiratoires et profils de décharges des sorties motrices au cours du cycle respiratoire (adapté de Del Negro, 2018 et Smith, 2013). (**A**) Schéma général du contrôle respiratoire. (**B**) Noyaux moteurs et voies de sorties respiratoires. Du noyau ambigu partent les motoneurones qui passent par le nerf vague pour innerver les muscles du pharynx *via* sa branche pharyngée, et les muscles intrinsèques du larynx *via* sa branche laryngée supérieure et récurrente. Du noyau moteur du XII partent les motoneurones du nerf hypoglosse qui innervent la langue. Les neurones prémoteurs du groupe respiratoire ventral rostral et caudal projettent vers les noyaux spinaux d'où partent les motoneurones phréniques, intercostaux internes et externes, et abdominaux. (**C**) Patrons d'activités des sorties motrices respiratoires physiologiques observés *in vivo*. *rVRG* ; groupe respiratoire ventral rostral ; cVRG : groupe respiratoire ventral caudal ; nA : noyau ambigu ; DMV : noyau moteur dorsal du vague ; Mn : motoneurone ; post-I : post-inspiration ; E1 et E2 : expiration précoce et tardive, I : inspiration.

2.1.1. Le réseau respiratoire central

La première preuve de l'origine centrale supra-spinale de la commande respiratoire remonte à l'Antiquité gréco-romaine. Claude Galien, médecin s'intéressant aux systèmes cardiovasculaire, respiratoire et nerveux, a fait l'observation chez des gladiateurs que la section de la moelle épinière sous le bulbe rachidien entraînait un arrêt respiratoire fatal (Long, 2021). Ce n'est qu'au 19è siècle qu'une description plus précise de la localisation des centres respiratoires a été proposée, grâce à des sections étagées du tronc cérébral. Ces travaux ont démontré que le réseau respiratoire ne réside pas en un simple « Nœud vital » comme le pensait Flourens, mais que c'est un réseau distribué entre le pont et le bulbe rachidien (Spyer, 2009) (Fig. 9a). Par la suite, cette méthode de

transsections ponto-bulbaires a permis de démontrer que la respiration physiologique (eupnée) et la coordination de ses 3 phases - l'inspiration, la post-inspiration et l'expiration - nécessitent l'intégrité fonctionnelle du réseau respiratoire dans son ensemble (Smith, 2007) (Fig. 9b).

Les neurones respiratoires présentent une grande diversité anatomo-fonctionnelle. D'un point de vue fonctionnel, ils sont décrits en fonction de leur patron de décharge qui peut être phasique (croissant ou décroissant), ou tonique (constant), et de la phase du cycle respiratoire où ils sont actifs. Cela est déterminé par enregistrement extracellulaire des neurones respiratoires et en comparant la temporalité de leur activité avec celle du nerf phrénique, pour l'inspiration, du nerf laryngé récurrent (branche du nerf vague), pour la post-inspiration, ou du nerf lombaire, pour l'expiration tardive (Richter, 1982 ; Bianchi, 1995 ; Paton, 1996). La caractérisation anatomique des neurones respiratoires a débuté par la description de leur localisation précise au sein du tronc cérébral et de leur anatomie grâce à l'injection de colorants après enregistrement de leur activité (Ezure, 2003 ; Ezure & Tanaka, 2006). La caractérisation de leur connectome a été réalisée par diverses approches anatomiques et fonctionnelles. D'une part grâce à l'injection de traceurs antérogrades (cheminant du corps cellulaire vers la terminaison axonale) ou rétrogrades (de la terminaison axonale vers le corps cellulaire). Puis par des méthodes électrophysiologiques basées sur les stimulations antidromiques et les tests de collision d'influx (Bianchi, 1995 ; Gestreau & Bianchi, 2009)

Ce type d'étude a permis d'identifier les sites de projections axonales des neurones respiratoires, ainsi que les régions qui les contactent (Yang, 2018, 2020 ; Oliveira, 2021, 2024 ; Biancardi, 2020). Plus récemment, grâce au développement des méthodes d'analyse transcriptomique et protéomique, la diversité des marqueurs moléculaires des différentes sous-populations neuronales respiratoires a été mise en lumière, ajoutant ainsi un niveau supplémentaire de précision et de complexité au réseau (Biancardi, 2020 ; Yackle, 2022 ; David, 2022).

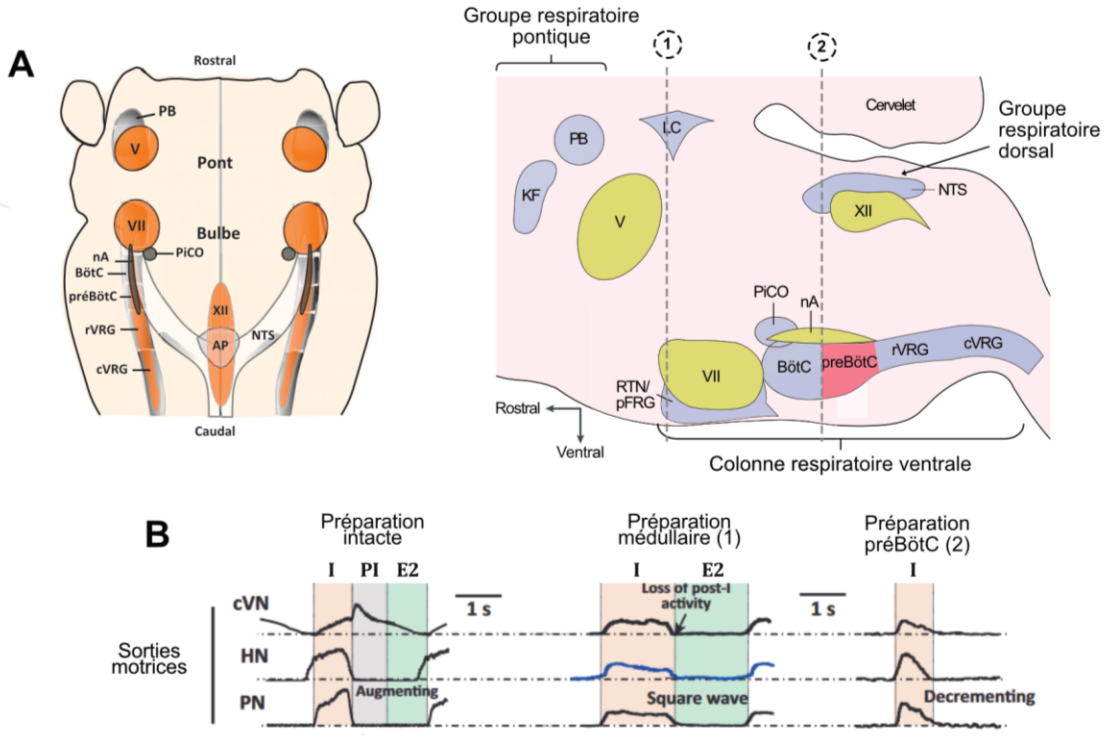


Figure 9. Organisation du réseau respiratoire central et patrons d'activités nerveuses (adapté de Del Negro 2018 et Smith 2013) (**A**) Vue dorsale (à gauche) et sagittale (à droite) des noyaux respiratoires dans le tronc cérébral. (**B**) Patrons de décharge des sorties motrices respiratoires sur une préparation de rat *in situ* intacte (à gauche) ou après transsections ponto-bulbaires à différents niveaux (au milieu et à droite) schématisées par les lignes pointillées 1 et 2 en (**A**). Le patron moteur respiratoire de la préparation médullaire résulte d'une section du pont réalisée au niveau de la ligne pointillée numéro 1. Le patron moteur respiratoire de la préparation « préBötC » est obtenu après section du bulbe au niveau de la ligne numéro 2. Le préBötC est suffisant pour générer une activité rythmique de type inspiratoire mais la genèse d'un patron moteur respiratoire physiologique nécessite l'intégrité du réseau respiratoire. V : noyau facial ; AP : area postrema; BötC : complexe de bötzinger; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral ; cVRG : groupe respiratoire ventral caudal; KF : noyau de Kolliker-Fuse; nA : noyau ambigu; NTS : noyau du tractus solitaire ; PB : complexe parabrachial; pFRG: groupe respiratoire parafacial ; RTN : Noyau rétrotrapézoïde ; preBötC : complexe de pré-bötzinger; PiCO : complexe post-inspiratoire ; I : inspiration ; post-I : post-inspiration ; E2 : expiration tardive.

Les neurones respiratoires sont distribués entre 3 régions principales du tronc cérébral : la colonne respiratoire ventrale, qui forme deux colonnes bilatérales proches de la surface ventrolatérale du bulbe rachidien et qui contient le cœur du générateur de patron moteur respiratoire ; le groupe respiratoire pontique, situé dans le pont dorsolatéral ; et le groupe respiratoire dorsal, dans le bulbe dorsomédian (Fig. 9a). Ces régions sont elles-mêmes divisées en sous-régions définies et délimitées sur des critères anatomo-fonctionnels (propriétés électrophysiologiques et signature

neurochimique et transcriptomique) (Alheid & McCrimmon, 2008 ; Smith, 2007). Cette classification en sous-régions délimitées est cependant constamment réétudiée. D'ailleurs, des travaux récents basés sur des enregistrements électrophysiologiques à large échelle dans la colonne respiratoire ventrale *in vivo laissen*t penser que les régions respiratoires forment plutôt un continuum interconnecté et dynamique plutôt que des noyaux aux limites claires (Bush & Ramirez, 2024).

Je détaillerai ci-dessous les sous-groupes respiratoires qui ont eu une implication importante pour mon travail de thèse.

2.1.1.1. L'inspiration

Le cycle respiratoire est constitué de 3 phases : l'inspiration, la post-inspiration et l'expiration tardive. Smith et collaborateurs ont été les premiers à identifier la localisation du groupe de neurones responsable de la genèse du rythme inspiratoire en enregistrant l'activité motrice inspiratoire via des motoneurones phréniques (qui innervent le diaphragme) à leur sortie par la 4è racine spinale cervicale, et en réalisant des transsections ponto-bulbaires de plus en plus caudales jusqu'à l'abolition de cette activité motrice rythmique inspiratoire (Smith, 1991). De nombreuses études furent ensuite menées et ont démontré que ce groupe, appelé complexe de pré-Bötzinger (préBötC), est nécessaire et suffisant pour générer le rythme inspiratoire. En effet, il continue à générer des oscillations inspiratoires sur des préparations réduites *in vitro* et *in situ* (Smith, 1991 ; Ruangkittisakul, 2018 ; Smith, 2007), et son inhibition *in vivo stoppe* le rythme inspiratoire (Tan, 2008 ; Menuet, 2020) (Fig.10).

2.1.1.1.1 Le complexe de préBötzinger (préBötC)

Le préBötC est situé entre l'extrémité caudale du Complexe de Bötzinger (BötC), l'extrémité rostrale du groupe respiratoire ventral rostral (rVRG), et la surface ventrale du noyau Ambigu (nA) (Fig. 9a). C'est un groupe très hétérogène composé d'environ 3000 neurones de chaque côté chez le rongeur, constitué de neurones excitateurs glutamatergiques et de neurones inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques (environ 25-50%) très interconnectés ipsi et contralatéralement (Wallén-Mackenzie, 2006 ; Winter, 2009 ; Ashhad, 2020) (Fig. 10). Les neurones du préBötC

contactent de nombreuses régions dont ils vont moduler l'activité, à commencer par les autres noyaux du réseau respiratoire, mais aussi vers les noyaux autonomes régulateurs de l'activité cardiovasculaire (Yang & Feldman, 2018 ; Dempsey, 2017 ; Tan, 2010). Ils reçoivent aussi une multitude de projections, en provenance d'autres neurones respiratoires mais également et surtout de régions du tronc cérébral ou du cerveau antérieur permettant de moduler le rythme respiratoire avec les besoins métaboliques et les contraintes environnementales et comportementales (Yang & Feldman, 2020 ; Shao, 2024).

Fonctionnellement, les neurones glutamatergiques du préBötC ont une activité de type phasique inspiratoire, pouvant avoir un patron de décharge pré-inspiratoire ou inspiratoire (Ashad, 2020 ; Gray, 2010 ; Caroll, 2013, Baertsch, 2018) (Fig. 10a, b). Bien que les mécanismes à l'origine de la rythmogenèse respiratoire soient vivement débattus, les propriétés rythmogènes du préBötC sont généralement attribuées à ces neurones glutamatergiques. En effet, leur délétion ou leur inhibition opto/chémogénétique abolit l'activité rythmique inspiratoire (Wang, 2014 ; Wallén-Mackenzie, 2006 ; Bouvier, 2010 ; Tan, 2008 ; Cui, 2016) alors que le blocage pharmacologique ou la modulation optogénétique des neurones inhibiteurs altère le patron moteur mais n'interrompt pas le rythme (Janczewski, 2013 ; Sherman, 2015 ; Chang, 2023). Certains neurones glutamatergiques du préBötC proviennent de progéniteurs exprimant le facteur de transcription Dbx1 (Bouvier, 2010 ; Gray, 2010). Parmi eux, les neurones glutamatergiques ayant des propriétés rythmogènes constituent un sous-groupe qui exprimerait le récepteur à la substance P (NK1R) mais pas la somatostatine, un peptide pourtant largement exprimé par les neurones glutamatergiques du préBötC (Vann, 2018 ; Stornetta, 2003 ; Yackle, 2022). Ces neurones sont également impliqués dans la synchronie des deux préBötC *via* leurs projections contralatérales, nécessaires à la robustesse et à la régularité du rythme inspiratoire (Bouvier, 2010).

Pour mentionner brièvement les mécanismes de la rythmogenèse respiratoire, les hypothèses canoniques reposant essentiellement sur les propriétés intrinsèques des neurones aux propriétés rythmogènes et sur des interconnexions inhibitrices réciproques ont été établies à partir de modèles réduits *in vitro* ou *in situ* (Smith, 1991 ; Smith, 2007 ; Shao & Feldman, 1997 ; St-John, 2009) et étaient difficilement transposables à des modèles plus intégrés, *in vivo* (Janczewski, 2013 ; Sherman, 2015 ; Phillips & Baertsch, 2024). Les hypothèses récentes s'appuient sur les propriétés des réseaux et sur le concept d'assemblées neuronales au sein du préBötC. Ces micro-réseaux s'activeraient à bas bruit grâce aux propriétés intrinsèques de leurs membranes, puis leur synchronisation progressive,

favorisée par leur connectivité synaptique et l'augmentation de la balance excitation/inhibition du réseau, aboutirait, lorsqu'elle devient suffisante, à une décharge inspiratoire populationnelle transmise aux neurones prémoteurs inspiratoires (Del Negro, 2018 ; Ausborn, 2018 ; Phillips & Baertsch, 2024 ; Ashad, 2020).

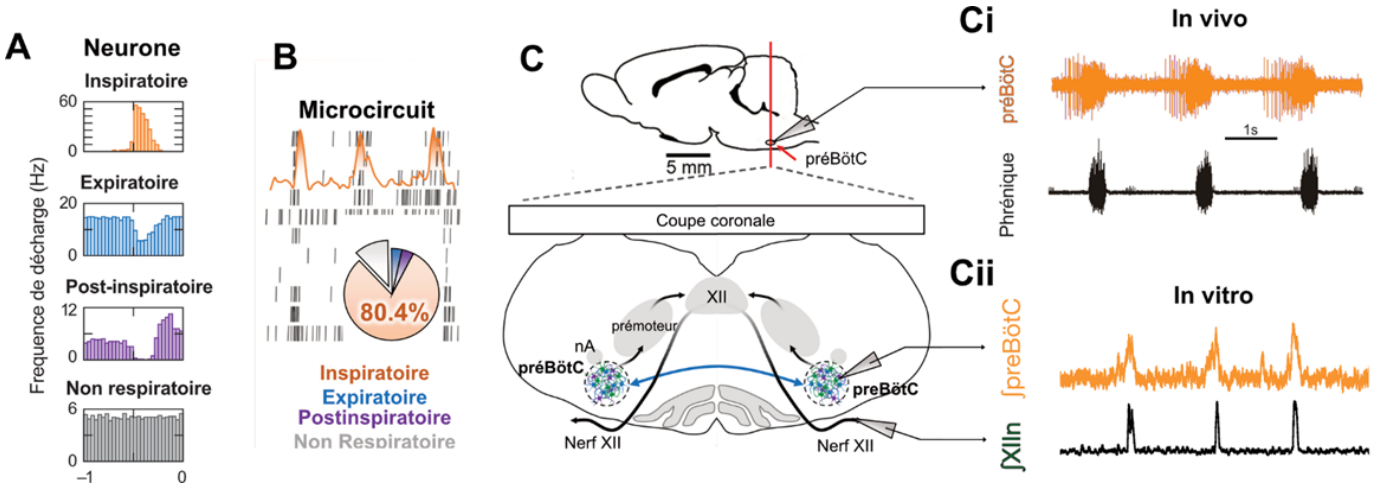


Figure 10. Caractérisation fonctionnelle du préBötC (Adapté de Baertsch, 2018 ; Ramirez, 2018 ; Ashhad & Feldman, 2020 ; Marchenko, 2016) (**A**) Profils et fréquence de décharge des neurones du préBötC obtenus à partir de la caractérisation de plus de 900 neurones *in vitro* chez la souris. Chaque profil est centré sur l'inspiration. (**B**) Enregistrements extracellulaires par multiélectrodes du préBötC chez la souris *in vitro*. Les raster plots montrent l'alignement temporel de la décharge de 11 neurones avec l'activité populationnelle inspiratoire intégrée du préBötC (en orange). (**C**) Enregistrements extracellulaires *in vivo (chez* le rat) (**Ci**) et *in vitro* (chez la souris) (**Cii**) de l'activité du préBötC et des sorties motrices phrénique (**Ci**) ou hypoglosse (XII, **Cii**). Le préBötC continue de générer un rythme inspiratoire lorsqu'il est isolé sur une tranche. La précession d'activité inspiratoire vue en **Ci** est liée à des neurones possédant une décharge pré-inspiratoire, caractéristiques du préBötC et qui auraient des propriétés rythmogènes. nA : Noyau Ambigu.

Les neurones inhibiteurs du préBötC sont plus diversifiés que les neurones excitateurs, tant sur le plan anatomique que fonctionnel. Au cours du développement, comme dans d'autres régions, la majorité des neurones inhibiteurs du préBötC co-expriment le GABA et la glycine. Puis ces neurones entament à partir de la naissance un processus de différenciation pour acquérir leur phénotype mature GABAergique ou glycinergique. Ce changement phénotypique est considéré comme terminé après 20-30 jours de vie chez le rongeur puisque le ratio entre les différentes cellules reste stable passé cet âge (Hirllinger, 2019). D'après ces travaux, dans le préBötC mature, environ 50% des neurones inhibiteurs sont glycinergiques, 40% sont GABAergiques et il resterait 10% de neurones co-exprimant le GABA et la glycine (Hirrlinger, 2019). D'un point de vue fonctionnel, les neurones

inhibiteurs ont une grande variété de profils de décharge. On en trouve des phasiques ainsi que des toniques, et bien que la majorité des neurones inhibiteurs soit inspiratoires, certains sont expiratoires (Kuwana, 2006 ; Winter, 2009, Carroll, 2013, Morgado-Valle, 2010) (Fig. 10a,b).

Le rôle des neurones inhibiteurs du preBötC fait toujours débat (qu'est ce qui ne le fait pas dans le monde de la respiration ?) et bien que certains neurones glycinergiques aient des propriétés autorythmiques *in vitro* (Kuwana, 2006, Morgado-Valle, 2010), les travaux récents de désinhibition des réseaux et de délétion conditionnelle de ces neurones montrent qu'ils ne sont pas essentiels à la rythmogenèse inspiratoire. Ils seraient plutôt modulateurs de la fréquence respiratoire, puisque la balance excitation/inhibition régule la synchronie du réseau, et du patron de la décharge inspiratoire, en ajustant la durée de décharge et son amplitude (Baertsch, 2018, Sherman, 2015 ; Janczewski, 2013 ; Marchenko, 2016). Ils permettraient également la stabilité du rythme inspiratoire puisque la délétion conditionnelle du transporteur vésiculaire de la glycine dans les neurones co-transmetteurs GABA/glycine du préBötC entraine des irrégularités respiratoires incluant une plus grande variabilité d'un cycle respiratoire à l'autre (Hirrlinger, 2019).

Le préBötC génère le rythme inspiratoire et participe à organiser la commande inspiratoire en collaboration avec le reste du réseau respiratoire. Cette commande est ensuite transmise vers les neurones moteurs du noyau hypoglosse (XII) et vers la principale région prémotrice inspiratoire, le groupe ventral respiratoire rostral (rVRG) (Yang, 2018) (Fig. 10c ;8b). Les neurones de l'hypoglosse innervent les muscles de la langue qui sont modulés par la respiration, et notamment par l'inspiration pour ouvrir les voies aériennes pharyngées grâce à un mouvement de protrusion (Bianchi, 1995). Les neurones prémoteurs de la rVRG projettent directement sur les motoneurones spinaux phréniques et intercostaux qui déclencheront la contraction du diaphragme ainsi que des muscles intercostaux externes et donc l'entrée d'air (Stornetta, 2003 ; Wu, 2017) (Fig. 8b,c).

Le préBötC n'est pas qu'un générateur de rythme inspiratoire, il permet également la synchronisation avec la respiration de certains comportements et rythmes en étant couplé aux réseaux qui les sous-tendent. Par exemple, il est impliqué dans la modulation de l'activité cardiovasculaire par un couplage avec des neurones régulateurs de ce système, un aspect qui sera abordé dans le chapitre 2.2.

2.1.1.2. La post-inspiration

La transition de l'inspiration à l'expiration (I/E) repose sur l'interaction entre plusieurs mécanismes périphériques et centraux incluant le retour sensoriel de l'étirement pulmonaire lors de l'inspiration et la connectivité réciproque entre les réseaux respiratoires bulbaires et pontiques.

Le groupe respiratoire pontique contient le noyau Kölliker-Fuse qui est essentiel à la post-inspiration (post-I) et à la transition I/E (Dutschmann & Herbert, 2006 ; Bautista, 2014) (Fig.8). En effet, la lésion ou l'inhibition pharmacologique de ce noyau entraîne la perte de la post-I et donc la mise en place d'un patron respiratoire pathologique appelé apneuse, caractérisé par une inspiration sévèrement prolongée (Dutschmann & Herbert, 2006 ; Smith, 2007 ; Toor, 2024 ; Baekey, 2008). Dans le Kölliker-Fuse, des neurones de transition I/E reçoivent une excitation graduelle au cours de l'inspiration grâce à des neurones inspiratoires croissants du préBötC, ainsi que grâce à des projections excitatrices venant du noyau du tractus solitaire (NTS) stimulées en réponse à l'étirement pulmonaire (Ezure & Tanaka, 2006). En effet, le NTS, centre intégrateur et composant du groupe respiratoire dorsal, reçoit les afférences vagales qui innervent les mécanorécepteurs contrôlant les niveaux d'étirement pulmonaire (Kubin, 2006). Ce réflexe est important pour la post-I puisque la suppression des afférences vagales (par vagotomie ou refroidissement) crée une apneuse (Dutschmann & Dick, 2012).

Les neurones I/E du noyau Kölliker-Fuse envoient des projections excitatrices dans le bulbe rachidien vers les neurones inspiratoires tardifs, qui reçoivent également des projections excitatrices du NTS. Les neurones inspiratoires tardifs vont alors initier la terminaison de l'inspiration en inhibant les neurones inspiratoires du préBötC directement, et indirectement en désinhibant les neurones post-I du complexe de Bötzinger (BötC) (Dutschmann & Dick, 2012 ; Richter & Smith, 2014 ; Ezure & Tanaka, 2006).

Récemment, Anderson et al. (2016) ont identifié le complexe post inspiratoire (PiCO), un groupe de neurones glutamatergiques et cholinergiques situé dans la formation réticulée ventrale, capable de générer une activité rythmique post-I *in vitro* (Anderson, 2016). Toutefois, son inhibition pharmacologique *in vivo a un i*mpact moindre sur le patron respiratoire par rapport à celle du Kölliker-Fuse ou du BötC, suggérant un rôle moins important dans la genèse de la post-inspiration (Anderson, 2016 ; Toor, 2019, 2024 ; Burke, 2010 ; Dutschmann & Herbert, 2006).

Les neurones post-I du BötC et du Kölliker-Fuse envoient des projections vers le noyau Ambigu (nA), qui contient les motoneurones innervant les muscles adducteurs du larynx, induisant leur contraction, caractéristique de la post-I. Cela augmente la résistance au flux d'air, ce qui maximise la durée des échanges gazeux et protège les poumons d'un affaissement dû à une expiration trop rapide (Richter & Smith, 2014 ; Burke, 2010 ; Toor, 2024).

2.1.1.3. L'expiration tardive

L'expiration tardive est passive au repos. Elle est caractérisée par le relâchement passif des muscles inspiratoires et repose essentiellement sur les neurones expiratoires croissants du BötC qui inhibent les neurones inspiratoires du préBötC et les motoneurones phréniques (Smith, 2007 ; Ezure, 2003 ; Tian, 1999).

Cependant, en cas de demande métabolique augmentée comme lors d'un effort physique ou en cas de challenge gazeux (diminution de l'oxygène ou augmentation du CO_2), l'expiration tardive devient active, et les muscles abdominaux sont recrutés pour expulser plus d'air et ainsi augmenter la ventilation pulmonaire (Flor, 2020 ; Abdala, 2009). Ce patron respiratoire résulte du recrutement d'un oscillateur expiratoire conditionnel trouvé dans le groupe respiratoire parafacial (pFRG). Ce groupe qui se chevauche avec les neurones chémosensibles du noyau rétrotrapézoïde (Abdala, 2009 ; Takakura, 2006) (Fig. 9a) a d'abord été décrit comme une région oscillatoire pré-inspiratoire chez l'embryon et le nouveau-né (Onimaru & Homma, 2003 ; Thoby-Brisson, 2009). Puis, ce même noyau a été décrit chez le juvénile et l'adulte en tant qu'oscillateur expiratoire conditionnel. Au repos, les neurones du pFRG sont maintenus silencieux par une forte inhibition provenant notamment des neurones du BötC et du préBötC, pour empêcher une co-activation des muscles expiratoires et inspiratoires (Flor, 2020). Mais lorsque la demande métabolique augmente, les neurones du pFRG reçoivent des entrées excitatrices (de sources chémosensibles), sont désinhibés, et génèrent une activité rythmique expiratoire tardive. Ces neurones, ainsi que les neurones expiratoires du BötC projettent sur les neurones prémoteurs expiratoires du groupe respiratoire caudal (cVRG) qui contactent les motoneurones lombaires innervant les muscles abdominaux, et ceux innervant les muscles intercostaux internes (Ezure, 2003 ; Zoccal, 2018 ; Abdala, 2009 ; Flor, 2020).

2.1.2. Modulation périphérique : le chémoréflexe périphérique

Pour adapter la ventilation à l'état métabolique, l'équilibre des gaz sanguins est surveillé en permanence. Ainsi, différents systèmes de retour sensoriels fonctionnent en parallèle pour adapter la commande respiratoire et maintenir l'homéostasie en cas de variations de l'environnement (Fig.7a). Parmi eux, les récepteurs à l'étirement pulmonaire que j'ai déjà mentionnés, et les chémorécepteurs, qui sont d'une grande importance pour le niveau de ventilation.

La chémosensibilité est la capacité de l'organisme à contrôler et réguler la composition chimique de son milieu. Elle est médiée par des cellules sensibles aux variations en O_2, CO_2 et pH. On trouve des chémorécepteurs en périphérie dans les artères, qui monitorent les pressions partielles gazeuses du sang, et des chémorécepteurs centraux, dans le cerveau, qui surveillent celles du liquide céphalo-rachidien. Les mécanismes de ces deux chémosensibilités diffèrent et je ne décrirai que ceux concernant la chémosensibilité périphérique, ayant trait à une partie de mon travail de thèse.

On distingue deux principaux sites de chémorécepteurs périphériques : dans la crosse aortique et au niveau de la bifurcation de l'artère carotide commune. Les chémorécepteurs carotidiens, regroupés dans les corps carotidiens, sont les principaux chémorécepteurs périphériques en termes de contribution à la réponse à une diminution en O_2 (hypoxie), en glucose (hypoglycémie), et à une augmentation du CO_2 et/ou une baisse du pH (hypercapnie) (Iturriaga, 2021 ; Prabhakar & Peng, 2004). Les chémorécepteurs de la crosse aortique sont plus accessoires, et sembleraient plutôt servir de mécanisme compensatoire en cas d'absence chronique des corps carotidiens (Bisgard, 1980 ; Prabhakar & Peng, 2004).

2.1.2.1. Anatomie des corps carotidiens

Les corps carotidiens (CC) sont deux petits organes bilatéraux situés à la bifurcation carotidienne (Fig. 11) et qui mesurent environ un millimètre chez le rat, et 2-3 millimètres chez l'humain. Malgré leur petite taille, ces organes sont les plus vascularisés de tout le corps (Iturriaga, 2021 ; Zera, 2019).

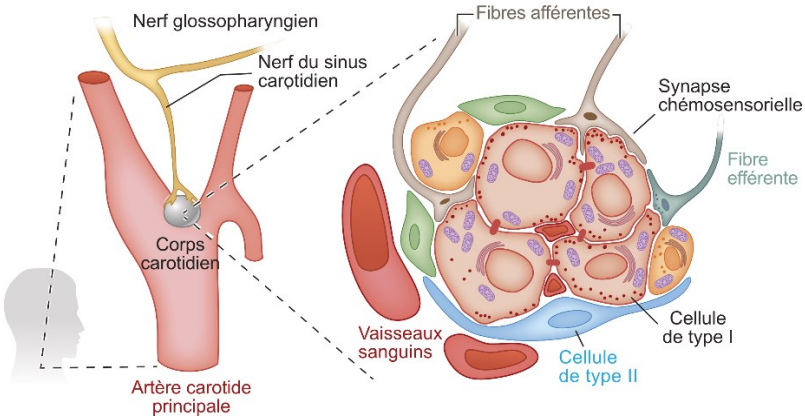


Figure 11. Anatomie des corps carotidiens (adapté de Iturriaga, 2021). Schématisation de la localisation des corps carotidiens et de leur organisation anatomique.

Les CC sont composés d'un conglomérat de deux types cellulaires (Fig. 11). Les cellules de type I (ou cellules glomiques) sont les cellules chémosensibles formant l'unité structurelle des CC. Elles sont organisées autour des capillaires qui vascularisent grandement cet organe et elles sont innervées par des fibres du nerf du sinus carotidien, branche des afférences glossopharyngiennes dont les corps cellulaires sont dans le ganglion pétreux et qui projettent vers le tronc cérébral. Les cellules glomiques sont encapsulée par des cellules sustentaculaires de type II, d'origine gliale, et qui joueraient un rôle dans la plasticité du CC induite par une hypoxie prolongée (Iturriaga, 2021 ; Pardal, 2007). Les cellules de type I sont les principales responsables de la perception de la pression partielle en O_2, en CO_2 et/ou pH ainsi que de la transduction de ce signal qui sera ensuite acheminé jusqu'au tronc cérébral par les afférences (Nurse, 2013).

2.1.2.2. Mécanismes cellulaires potentiels de la sensibilité à l'oxygène et transduction du signal hypoxique

Malgré des années de recherche, le mécanisme exact de la sensibilité des CC à l'O_2 reste méconnu. Deux hypothèses historiques ont été avancées : l'hypothèse métabolique, reliant cette sensibilité à la phosphorylation oxydative mitochondriale, et l'hypothèse membranaire, impliquant des canaux potassiques sensibles à l'O_2. D'une part, le fait que l'utilisation de poisons métaboliques comme le cyanure de sodium (NaCN), qui bloque la phosphorylation oxydative, reproduise les effets d'une hypoxie suggère ainsi un rôle central des processus métaboliques mitochondriaux dans la sensibilité aux variations en O_2 (Wyatt & Buckler, 2004 ; Iturriaga, 2021 ; Prabhakar & Peng, 2004).

D'autre part, des études électrophysiologiques suggèrent plutôt un rôle majeur à des canaux membranaires potassiques dont la conductance diminue avec l'hypoxie (López-Barneo, 1988 ; Iturriaga, 2021). Mais ces hypothèses prises séparément n'expliquent pas le mécanisme de la sensibilité à l'O_2 en totalité. Ainsi, les modèles récents intègrent ces mécanismes et suggèrent que l'hypoxie altère la fonction mitochondriale, modifiant les concentrations des molécules produites par cet organite (incluant l'ATP et les espèces réactives de l'oxygène). Cela induirait la fermeture de canaux potassiques (comme les canaux potassiques TASK) entrainant une dépolarisation de la membrane, une entrée de calcium et la libération de neurotransmetteurs (Iturriaga, 2021 ; Prabhakar & Peng, 2004).

Le cyanure de sodium (NaCN) est le composé que nous avons utilisé afin de stimuler les corps carotidiens dans une de nos études (cf. Partie 2 des résultats). Il agit en bloquant le complexe IV de la chaine respiratoire mitochondriale ce qui entrave le métabolisme oxydatif et donc la respiration cellulaire. Il mime ainsi une hypoxie aiguë dose-dépendante et réversible qui dépolarise les cellules chémosensibles et provoque un chémoréflexe périphérique (Wyatt & Buckler, 2004).

Il existe une grande diversité neurochimique aux différents niveaux du réseau du chémoréflexe permettant une régulation fine des voies activées et ainsi des réponses induites par la chémostimulation. Cela commence au niveau des cellules de type I qui sont hétérogènes dans leur morphologie et leur contenu neurochimique. Elles expriment différents récepteurs et libèrent différents neurotransmetteurs excitateurs, incluant l'ATP et l'acétylcholine, et inhibiteurs, comme la dopamine ou le GABA, qui contribuent à la transduction du signal (Nurse, 2013 ; Zera, 2019).

2.1.2.3. Réseau du chémoréflexe périphérique et réponses à l'hypoxie

Les afférences chémosensibles qui innervent les CC sont également neurochimiquement hétérogènes. Les fibres sont de type A ou C et la majorité d'entre elles sont catécholaminergiques puisqu'elles sont positives à la tyrosine hydroxylase et/ou à la dopamine-béta hydroxylase (Finley, 1992 ; Zera, 2021). Différentes études incluant l'utilisant des traceurs rétrogrades injectés dans le ganglion pétreux ainsi que des marqueurs d'activité neuronale suite à une hypoxie ou à la

stimulation des fibres chémosensibles montrent que les afférences des CC projettent majoritairement dans le NTS, et se distribuent préférentiellement dans les sous-divisions commissurale, médiale et ventrolatérale (Paton, 1999 ; Ferreira, 2015 ; Finley & Katz, 1992).

Les neurones de second ordre du NTS stimulés par les afférences chémosensibles envoient des projections excitatrices vers les noyaux respiratoires et cardiovasculaires qui produiront le panel des réponses qui caractérise le chémoréflexe périphérique : une augmentation de la fréquence respiratoire, une augmentation de pression artérielle et une diminution de la fréquence cardiaque (bradycardie) (Shao, 2024 ; Zera, 2019 ; Iturriaga, 2021) (Fig. 12).

Les effets ventilatoires du chémoréflexe périphérique sont sous-tendus par le réseau respiratoire central. Plusieurs groupes de la colonne respiratoire ventrale sont ciblés par les projections du NTS activées par l'hypoxie, y compris le préBötC, dont la stimulation pourrait contribuer à l'augmentation de la fréquence respiratoire liée à l'hypoxie. La région du noyau rétrotrapézoïde/pFRG est également stimulée lors du chémoréflexe périphérique, et met en place l'expiration tardive (Takakura, 2006 ; Zera, 2019 ; Moraes, 2012) (cf. chapitre 2.1.1.3). Les effets cardiaques reposent sur les neurones cardiaques du nA qui envoient des projections parasympathiques vers le cœur, responsables de la bradycardie (Kollai & Koizumi, 1979). Enfin, les effets sur la pression artérielle passent majoritairement par la stimulation des neurones présympathiques du bulbe rostro-ventro-latéral (RVLM). Ces neurones qui envoient des projections excitatrices sur les neurones sympathiques pré-ganglionnaires dans la moelle épinière, stimulent le tonus sympathique ce qui a notamment un effet vasoconstricteur (Koshiya & Guyenet, 1996) (Fig. 12). L'ensemble de ces réponses a pour but de compenser une baisse d'oxygène tissulaire et de rétablir l'homéostasie gazeuse sanguine.

Ces différentes réponses respiratoires et cardiovasculaires du chémoreflexe périphérique semblent dépendre de voies différentes modulées par des neurotransmetteurs spécifiques. Les effets respiratoires du chémoréflexe semblent liés à la transmission cholinergique puisque l'injection d'un antagoniste des récepteurs nicotiniques dans le NTS commissural altère spécifiquement l'augmentation ventilatoire à l'hypoxie (Furuya, 2014). A l'inverse, les effets cardiovasculaires reposeraient sur la transmission glutamatergique et purinergique. La composante parasympathique cardiaque serait plutôt liée à une voie glutamatergique puisque l'injection d'antagonistes des

récepteurs glutamatergiques dans le NTS commissural supprime la bradycardie mais n'altère ni la réponse ventilatoire ni la réponse sympathique à l'hypoxie (Braga, 2006). La réponse sympatho-vasomotrice dépend notamment de la voie purinergique et des récepteurs P2X qui sont abondamment exprimés à chaque niveau du réseau du chémoréflexe périphérique (sur les cellules de type I, les afférences glossopharyngiennes et les neurones de second ordre du NTS). En effet, l'injection d'un antagoniste des récepteurs P2X3 dans les CC, ou des récepteurs P2X et glutamatergiques du NTS commissural diminue la réponse sympathique à l'hypoxie (Braga, 2007).

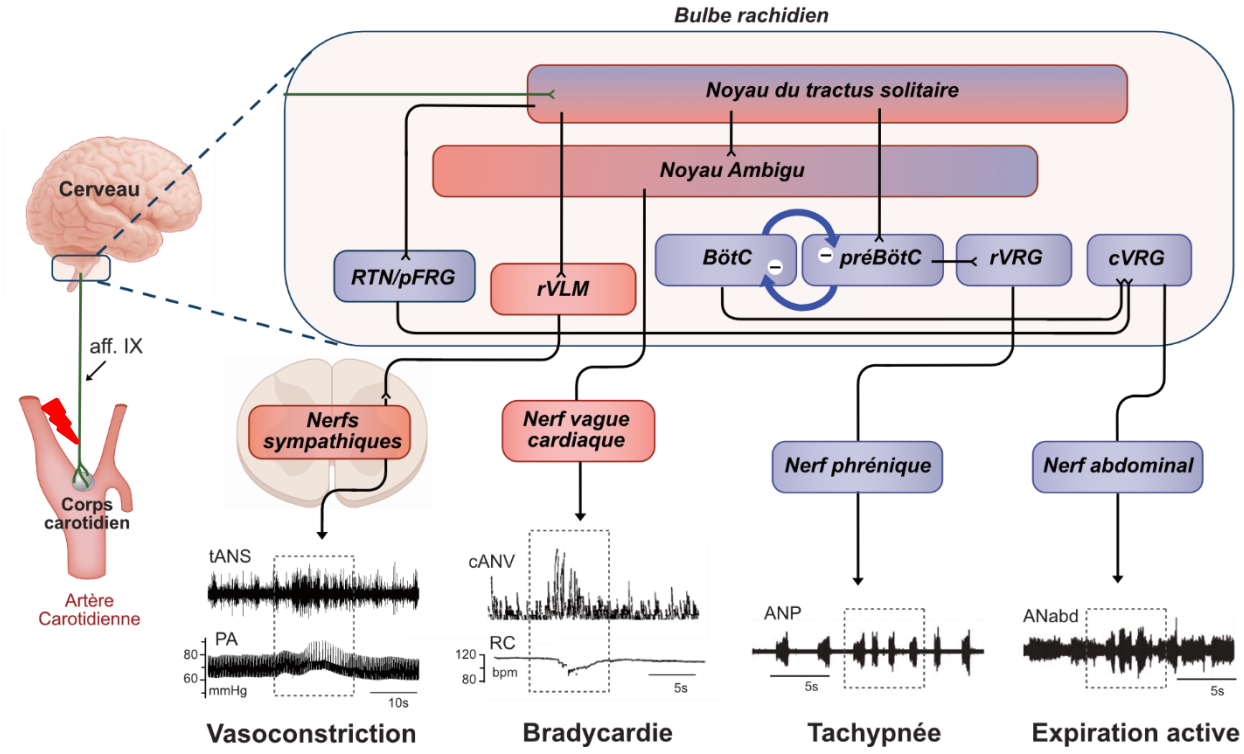


Figure 12. Régions médullaires essentielles aux réponses respiratoires et cardiovasculaires induites par l'activation du chémoréflexe périphérique (adapté de Zera, 2019 et Koizumi & Kollai, 1981). La stimulation des corps carotidiens par une hypoxie recrute plusieurs régions du tronc cérébral pour provoquer une augmentation de pression artérielle (par une augmentation d'activité sympathique), une bradycardie (par augmentation d'activité parasympathique cardiaque), une tachypnée (par stimulation du préBötC) et une expiration forcée (par recrutement de l'activité abdominale). Les noyaux impliqués dans la composante cardiovasculaire du chémoréflexe périphérique sont en rouge, et ceux impliqués dans la composante respiratoire sont en bleu. Tous les enregistrements ont été obtenus sur la préparation *in situ* de rat sauf l'enregistrement de la cANV et du RC qui ont été obtenus chez le chien anesthésié. RVLM : bulbe rostral ventro-latéral ; RTN/pFRG : noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial ; BötC : complexe de bötzinger, préBötC : complexe de préBötzinger ; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral ; cVRG : groupe respiratoire ventral caudal ; a. IX : afférences glossopharyngiennes ; tANS : activité nerveuse sympathique thoracique ; PA : pression artérielle ; cANV : activité nerveuse vagale cardiaque ; ANP : activité nerveuse phrénique ; ANabd : activité nerveuse abdominale ; RC : rythme cardiaque.

L'ensemble des réponses respiratoires et cardiovasculaires mises en jeu par le chémoréflexe périphérique illustre bien l'interdépendance des systèmes respiratoires et cardiovasculaires pour le maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine.

2.2. La régulation autonome cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est modulé par plusieurs facteurs locaux, neuroendocriniens et nerveux permettant de l'adapter aux besoins tissulaires qui varient à chaque instant. Son activité est notamment régulée par le système nerveux autonome, sur lequel nous nous focaliserons et qui est divisé en deux composantes : le système parasympathique et le système sympathique, qui exercent généralement des effets opposés.

L'activité cardiaque est dépendante de quatre propriétés électrophysiologiques : la chronotropie (fréquence cardiaque), l'inotropie (force de contractilité cardiaque), la dromotropie (la vitesse de conduction dans le tissu) et la bathmotropie (excitabilité des cellules myocardiques). Le système sympathique aura plutôt un effet stimulant sur ces paramètres, à l'inverse du parasympathique, et la régulation cardiaque autonome repose donc sur la balance entre les contributions respectives de ces deux systèmes. Contrairement au cœur, la plupart des veines et des artères reçoit principalement une innervation sympathique dont les variations de tonus modulent le diamètre. La vasoconstriction artérielle augmente la résistance à l'écoulement du sang et augmente de fait la pression artérielle. (Gordan, 2015 ; Wehrwein, 2016 ; Charkoudian & Wallin, 2014). Ces paramètres ne varient pas indépendamment l'un de l'autre, bien que leurs mécanismes de régulation puissent différer. Ils font partie d'un système interconnecté et s'influencent l'un l'autre.

Le dernier relai des efférences du système nerveux est organisé en une chaîne à deux neurones : un neurone préganglionnaire qui établit une synapse avec un neurone post-ganglionnaire dans un ganglion autonome. Bien que les systèmes sympathique et parasympathique partagent cette organisation commune, ils diffèrent dans leur morphologie et leurs propriétés neurochimiques (je ne me concentrerai que sur les aspects concernant le système cardiovasculaire) (Fig. 13).

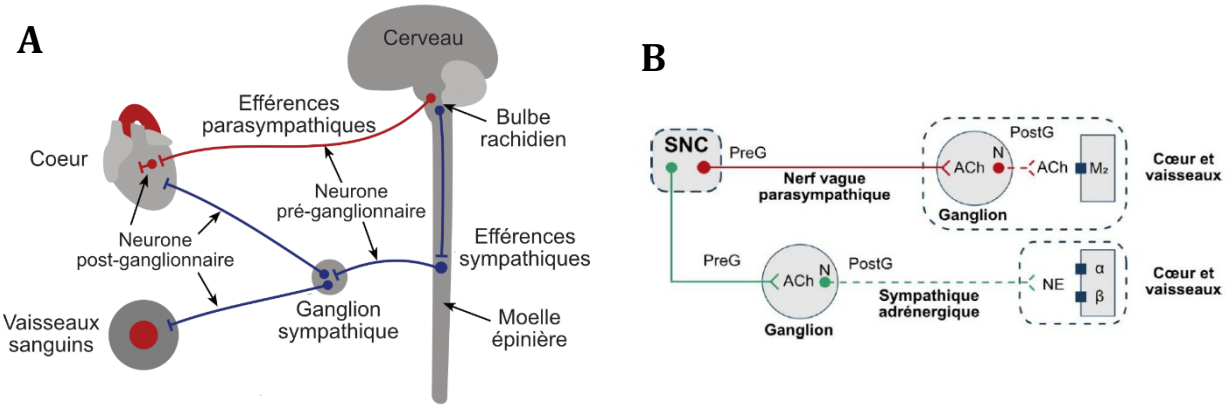


Figure 13. Contrôle nerveux autonome de l'activité cardiovasculaire (Adapté de Klabunde, 2021). (**A**) Trajet des efférences sympathiques et parasympathiques. (**B**) Neurotransmission sympathique et parasympathique. ACh : acéthylcholine ; N : récepteur nicotinique ; NE : norépinéphrine ; M2 : récepteur muscarinique de type 2 ; SNC : système nerveux central ; β : récepteur adrénergique ; α : récepteur adrénergique ; preG : neurone préganglionnaire ; postG : neurone postganglionnaire.

2.2.1. La régulation cardiovasculaire sympathique

Le système sympathique est composé de neurones préganglionnaires qui prennent origine dans la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière thoraco-lombaire (T1-L2). Ces neurones projettent par un axone court vers les ganglions sympathiques de la chaine paravertébrale ou les ganglions prévertébraux, où ils forment une synapse cholinergique avec les neurones post-ganglionnaires adrénergiques (Fig. 13). Les ganglions cervicaux et thoraciques supérieurs de la chaine paravertébrale innervent la partie supérieure du corps, et notamment le cœur par le ganglion stellaire. Les ganglions thoraciques inférieurs, lombaires et sacrés innervent les viscères abdominaux. Les ganglions prévertébraux, situés proches des artères principales de l'abdomen innervent également les organes abdominaux (Giannino, 2024 ; Wehrwein, 2016 ; Charkoudian & Wallin, 2014).

Les neurones post-ganglionnaires sympathiques contactent leurs cibles par de longs axones et leurs terminaisons libèrent majoritairement de la noradrénaline dont les effets cardiovasculaires passent par des récepteurs adrénergiques α1 et β1 (Fig. 13).

Concernant les vaisseaux sanguins, la liaison de la noradrénaline au récepteur α1 active la protéine Gq avec qui il est couplé et qui active la voie de la phospholipase C. Cela induit une augmentation

de calcium intracellulaire et la contraction des cellules musculaires lisses des parois des vaisseaux sanguins, entrainant une vasoconstriction.

Pour le cœur, l'activation du récepteur β1 active une protéine Gs qui, par des cascades de signalisation, augmente la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc se lie directement aux canaux cationiques responsables du courant If pacemaker du cœur, et les stimulent. De plus, l'AMPc active une protéine kinase A qui phosphoryle des canaux calciques de type L, augmentant leur activité. Ainsi, l'augmentation du tonus sympathique stimule l'activité cardiaque en augmentant la fréquence cardiaque, la vitesse de conduction du signal électrique intrinsèque, et la force de contraction myocardique. Cela a pour effet d'augmenter le débit cardiaque et la pression artérielle (Charkoudian & Wallin, 2014 ; Giannino, 2024 ; Wehrwein, 2016) (Fig. 13,14).

D'un point de vue neuroendocrinien, les neurones post-ganglionnaires sympathiques innervent plusieurs tissus neuroendocriniens qui régulent la pression artérielle et le débit cardiaque. L'activation des récepteurs adrénergique β1 exprimés par les cellules juxtaglomérulaires du rein induit la libération de rénine, une enzyme clé pour le système rénine-angiotensine-aldostérone, important pour la régulation cardiovasculaire. En effet, son activation lors d'une baisse de pression artérielle ou de volémie, permet la libération dans la circulation d'une neurohormone, l'angiotensine II, qui induit entre autres une puissante vasoconstriction par des effets directs, sur les vaisseaux sanguins, et indirects, par la stimulation des noyaux centraux autonomes cardiovasculaires (Allen, 2006 ; Guyenet, 2013).

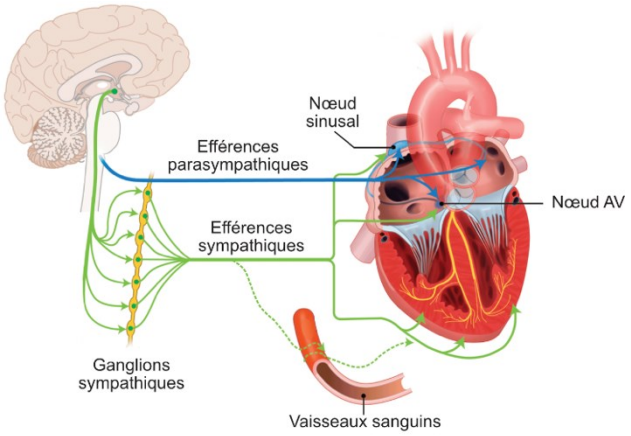
De même, les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale se comportent comme des neurones post-ganglionnaires sympathiques, et sont innervées par des neurones préganglionnaires sympathiques cholinergiques appelés nerfs splanchniques. L'activation des cellules chromaffines par les neurones préganglionnaires sympathiques splanchniques suite à un stress entraine la libération de catécholamines dans le sang qui augmentent la pression artérielle et le débit cardiaque en agissant sur les récepteurs α1 et β1 du cœur et des vaisseaux sanguins (Werhwein, 2016).

Bien que ce système neuroendocrinien autonome soit important pour la régulation fine du système cardiovasculaire, nous ne le détaillerons pas dans cette thèse.

Concernant la distribution de l'innervation sympathique, les neurones post-ganglionnaires sympathiques droits et gauches innervent le cœur d'une manière asymétrique bien qu'il y ait un

certain chevauchement dans leur distribution. Le nœud sinusal (Fig. 14), constitué de cellules autorythmiques qui génèrent le rythme intrinsèque du cœur, est majoritairement innervé par des neurones post-ganglionnaires du côté droit qui sont donc cruciaux pour l'effet chronotrope positif de l'activité sympathique. Le nœud atrioventriculaire (Fig. 14), qui transmet l'impulsion électrique générée par le nœud sinusal, est majoritairement innervé par les neurones post-ganglionnaires du côté gauche qui sont donc plus impliqués dans l'effet dromotrope positif. Enfin, les ventricules et les oreillettes reçoivent une innervation bilatérale, et il ne semble pas y avoir de latéralisation dans l'effet inotrope positif de l'activité sympathique (Chauhan, 2018 ; Giannino, 2024 ; Zandstra, 2021).

Les fibres sympathiques innervent les vaisseaux sanguins au niveau de la media et libèrent la noradrénaline par des varicosités. La densité en innervation sympathique est inversement proportionnelle au diamètre des vaisseaux. Ainsi, les petites artères et artérioles sont les plus innervées. En revanche, les capillaires ne sont que peu ou pas innervés (Klabunde, 2021).



	Sympathique	Parasympathique
Coeur		
Chronotropie	+++	---
Inotropie	+++	- oreillette > ventricule
Dromotropie	++	---
Vaisseaux sanguins		
Vasoconstriction	+++	--- *

Figure 14. Localisation et effets de l'innervation autonome du cœur et des vaisseaux (adapté de Nederend, 2016) : (**A**) Schéma de l'innervation autonome du cœur et des vaisseaux. (**B**) Tableau récapitulant les effets principaux des systèmes sympathique et parasympathique sur la fonction cardiovasculaire. L'importance de la réponse induite est représentée par le nombre de + ou – (+ étant une stimulation et – une diminution). * Il existe une innervation parasympathique des artères de certains organes induisant une forte vasodilatation comme dans les glandes salivaires ou les organes génitaux. Nœud AV : nœud atriventriculaire.

2.2.1.1. Modulation respiratoire de l'activité sympathique

Adrian et al (1932) ont été les premiers à enregistrer l'activité des nerfs sympathiques chez le lapin anesthésié et à montrer que l'activité sympathique est modulée par la respiration. Cette observation a depuis été confirmée chez plusieurs espèces incluant l'humain (Eckberg, 1985 ; Dempsey, 2002 ; Menuet, 2020 ; Bachoo, 1985 ; Boscan, 2001) (Fig. 15a). Tout comme les patrons de décharge des neurones sympathiques varient avec les caractéristiques du tissu ciblé, la modulation respiratoire de l'activité sympathique diffère en fonction du nerf enregistré (Numao, 1987 ; Haselton & Guyenet, 1989 ; Häbler, 1994). Néanmoins, la grande majorité des études où est enregistrée l'activité nerveuse sympathique chez différentes espèces s'accorde à dire que la modulation respiratoire sympathique est caractérisée par une augmentation de l'activité sympathique pendant l'inspiration, qui atteint un maximum en tout début de post-inspiration, et qui décroit rapidement pendant la post-inspiration (Häbler, 1994 ; Okada & Fox, 1967 ; Numao, 1987 ; Czyzyk-Krzeska, 1990 ; Menuet, 2020) (Fig. 15a).

Cette modulation d'activité nerveuse sympathique liée à la respiration produit des changements phasiques du tonus musculaire lisse des vaisseaux sanguins. Cela induit une succession d'augmentations transitoires de la pression artérielle la rendant oscillatoire, et qui sont les ondes TH (Bachoo, 1985 ; Briant, 2015b ; Adrian, 1932 ; Shantsila, 2015) (Fig. 15). Il existe un décalage dans le temps entre les ondes TH, dont le pic est atteint en milieu d'expiration, et la modulation respiratoire de l'activité sympathique qui atteint son pic en début de post-inspiration. Cela s'explique par la cinétique lente des cascades intracellulaires impliquées dans la signalisation noradrénergique, et des propriétés de contraction des muscles lisses (Ng, 2001).

La modulation respiratoire de l'activité sympathique pourrait également être impliquée dans la genèse de la RespVRC. L'augmentation de l'activité sympathique pendant l'inspiration pourrait être en partie responsable de l'augmentation de la fréquence cardiaque pendant l'inspiration caractéristique de la RespVRC (Boscan, 2001). Cependant, ce phénomène persiste après une section de la moelle épinière ou après blocage pharmacologique des récepteurs adrénergiques cardiaques (Montano, 2000 ; Pitzalis, 1998 ; Warner, 1986), alors que la suppression de l'influence parasympathique cardiaque par blocage pharmacologique réduit très fortement la RespVRC (Menuet, 2020 ; Warner, 1986 ; Farmer, 2016). Ces résultats montrent que l'activité sympathique

cardiaque n'est pas essentielle à la génération de la RespVRC, contrairement à l'activité parasympathique cardiaque.

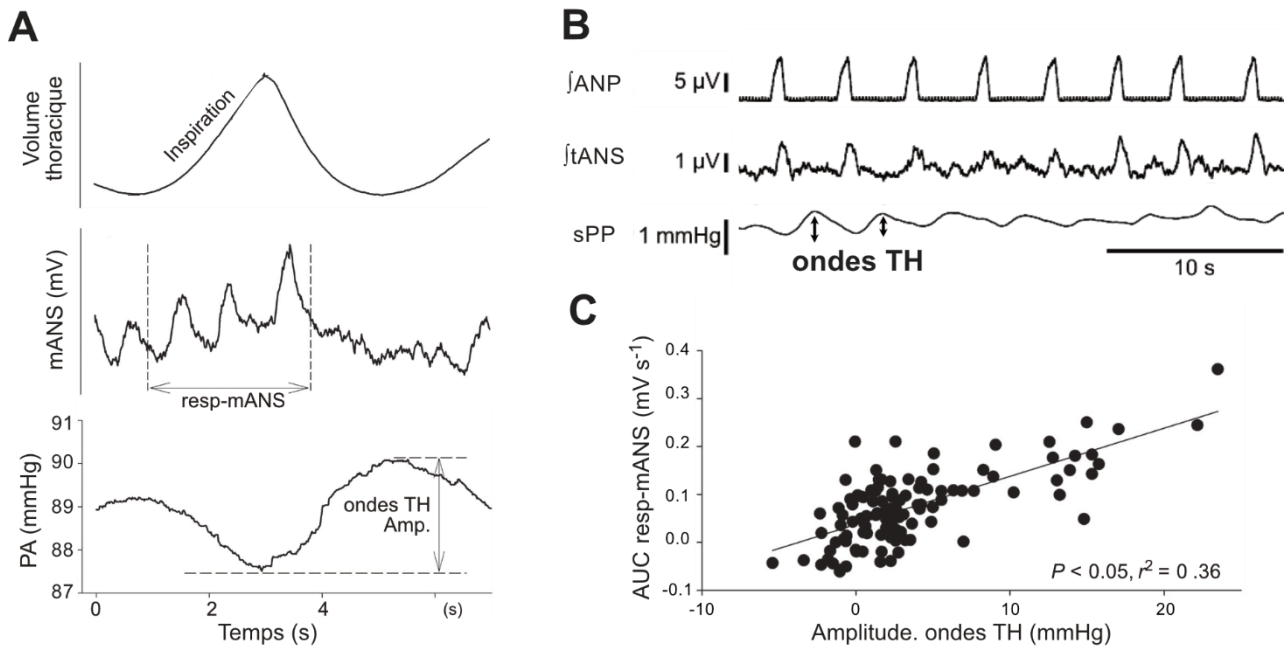


Figure 15. La modulation respiratoire de l'activité sympathique dans la genèse des ondes TH (adapté de Menuet 2020 et Shantsila, 2015). La modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique contribue à générer les ondes TH chez l'humain (**A**) et le rat *in situ (**B**)*. *L*'augmentation phasique de l'activité nerveuse sympathique lors de l'inspiration et le début de la post-inspiration est responsable d'une succession de vasoconstrictions transitoires faisant osciller la pression artérielle, ce sont les ondes TH (**A**) Représentations moyennées sur plusieurs cycles respiratoires du volume intrathoracique (respiration), de l'activité nerveuse sympathique musculaire (mANS) et de la pression artérielle déclenchées sur le début de l'inspiration. (**B**) Enregistrements de l'activité nerveuse phrénique (ANP), sympathique thoracique (tANS) et de la pression de perfusion systolique (équivalent *in situ de la* pression artérielle systolique *in vivo) obten*us sur la préparation *in situ cœur-t*ronc cérébral isolés perfusés qui est décérébrée, paralysée, et vagotomisée. Les patrons d'activités nerveuses et le contrôle respiratoire et cardiovasculaire sont comparables à ceux obtenus *in vivo*. *(**C**) L*es ondes TH varient positivement avec la modulation respiratoire de l'activité sympathique musculaire (resp-mANS) comme illustré par cette analyse de corrélation entre l'aire sous la courbe respmANS (AUC resp-mANS) et l'amplitude des ondes TH chez l'humain. sPP : pression de perfusion systolique, ANP : activité nerveuse phrénique, tANS = activité nerveuse sympathique thoracique ; resp-mANS : modulation respiratoire de l'activité sympathique musculaire ; AUC resp-mANS : aire sous la courbe de la modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique musculaire ; ondes TH : ondes de Traube-Hering ; ondes TH Amp. : amplitude des ondes de Traube-Hering ; PA : pression artérielle.

La modulation respiratoire de l'activité sympathique résulte en partie de boucles réflexes médullaires ou spinales mises en jeu par des afférences (Häbler, 1994 ; Montano, 2000). Les neurones préganglionnaires sympathiques sont influencés par des circuits locaux spinaux, notamment par la mise en jeu de réflexes spinaux en réponse à l'activation de barorécepteurs. Les barorécepteurs sont les mécanorécepteurs présents dans la paroi des artères et qui sont sensibles à leur distension. Leur activité est stimulée quand l'étirement des parois artérielles augmente, comme lors d'une élévation de pression artérielle (le réseau du baroréflexe est détaillé en chapitre 2.2.4). La stimulation des barorécepteurs par une constriction aortique augmente la modulation respiratoire de l'activité sympathique même après une section de la moelle épinière cervicale, suggérant un mécanisme d'amplification de cette activité par des circuits spinaux. De plus, la section des racines dorsales thoraciques, par lesquelles entrent des afférences sympathiques cardiovasculaires, abolit ce réflexe et l'amplification de la modulation respiratoire de l'activité sympathique associée, démontrant que les afférences périphériques sont impliquées dans ces réponses (Montano, 2000).

La modulation respiratoire de l'activité sympathique peut également résulter de l'activation de barorécepteurs et autres mécanorécepteurs présents dans les poumons ou la paroi thoracique dont l'activité fluctue avec les variations de la ventilation (Darnall & Guyenet, 1990). Cependant, cette activité persiste sur des préparations de rats paralysés, déafférentés (i.e. après vagotomie et dénervation des barorécepteurs) et ventilés mécaniquement. Ces résultats associés à ceux montrant qu'une section spinale cervicale réduit considérablement l'amplitude de la modulation respiratoire sympathique montrent que cette activité est principalement générée dans le tronc cérébral, par un couplage entre des neurones respiratoires et des neurones cardiovasculaires (Montano, 2000 ; Numao, 1987 ; Darnall & Guyenet, 1990). En effet, des enregistrements de neurones du bulbe rostral ventro-latéral (RVLM), centre régulateur de la fonction cardiovasculaire qui contient les corps cellulaires de neurones sympathoexcitateurs, montrent que leur activité est modulée par la respiration (Miyawaki, 1995 ; Moraes, 2013).

2.2.2. La régulation cardiaque parasympathique

Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques prennent leur origine dans le tronc cérébral, dans les noyaux contenant les neurones moteurs du nerf vague, par lequel transitent la majorité des fibres parasympathiques cardiaque. Ces neurones projettent par un long axone jusqu'aux ganglions intracardiaques, situés dans la paroi du cœur ou dans le tissu adipeux épicardique, où ils contactent les neurones post-ganglionnaires par une synapse cholinergique. Les ganglions étant à la surface de l'organe cible, les neurones post-ganglionnaires ont un axone court (Werhwein, 2016 ; Giannino, 2024) (Fig. 13).

Les neurones post-ganglionnaires sont cholinergiques et leurs effets passent par la liaison de l'acétylcholine aux récepteurs muscariniques de type M2 exprimés par les cellules cardiaques (Fig. 13b). Cela active la protéine Gi inhibitrice couplée à ce récepteur qui, par des cascades moléculaires, active une conductance potassique produisant des courants sortants hyperpolarisants qui s'opposent au courant entrant If. De plus, les concentrations intracellulaires en AMPc sont réduites ce qui induit les effets inverses du système nerveux sympathique sur les canaux If et calciques cardiaques. Ainsi, l'augmentation d'activité parasympathique diminue la fréquence cardiaque, la vitesse de conduction du signal électrique cardiaque et la contractilité myocardique (Werhwein, 2016 ; Gordan, 2015 ; Giannino, 2024) (Fig. 13b, 14). Les effets de l'activité parasympathique sur l'activité cardiaque, presque instantanés, sont plus rapides que ceux de l'activité sympathique en raison de la cinétique accélérée des cascades intracellulaires déclenchées par la fixation de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques (Ng, 2001).

A l'instar des efférences sympathiques, les efférences parasympathiques vagales cardiaques présentent une certaine asymétrie dans les zones du cœur qu'elles innervent, selon qu'il s'agisse du nerf vague droit ou du nerf vague gauche. Le nœud sinusal est principalement innervé par le nerf vague droit alors que le nœud atrio-ventriculaire l'est plus par le nerf vague gauche. Les études chez l'animal confirment une influence préférentielle du nerf vague droit sur la fréquence cardiaque qui est donc plus impliqué dans l'effet chronotrope négatif du parasympathique, alors que le nerf vague gauche est plus responsable de la régulation de la conduction du signal électrique, et donc de l'effet dromotrope négatif du parasympathique (Geis & Wurster, 1980 ; Ng, 2001). L'effet inotrope négatif parasympathique ne semble pas latéralisé non plus puisque les oreillettes et les ventricules sont innervés par les deux nerfs vagues (Zandstra, 2021).

2.2.2.1. Modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque

Les enregistrements de la branche cardiaque vagale cervicale montrent que son activité est modulée de manière rythmique avec la respiration (Fig. 16). Son activité est faible pendant l'inspiration, et augmente fortement en tout début de post-inspiration avant de diminuer progressivement pendant l'expiration (Farmer, 2016 ; Shanks, 2023 ; Ottaviani, 2020). Cette modulation rythmique de l'activité cardiaque parasympathique avec la respiration induit une variabilité du rythme cardiaque en phase avec le cycle respiratoire, qui est la RespVRC.

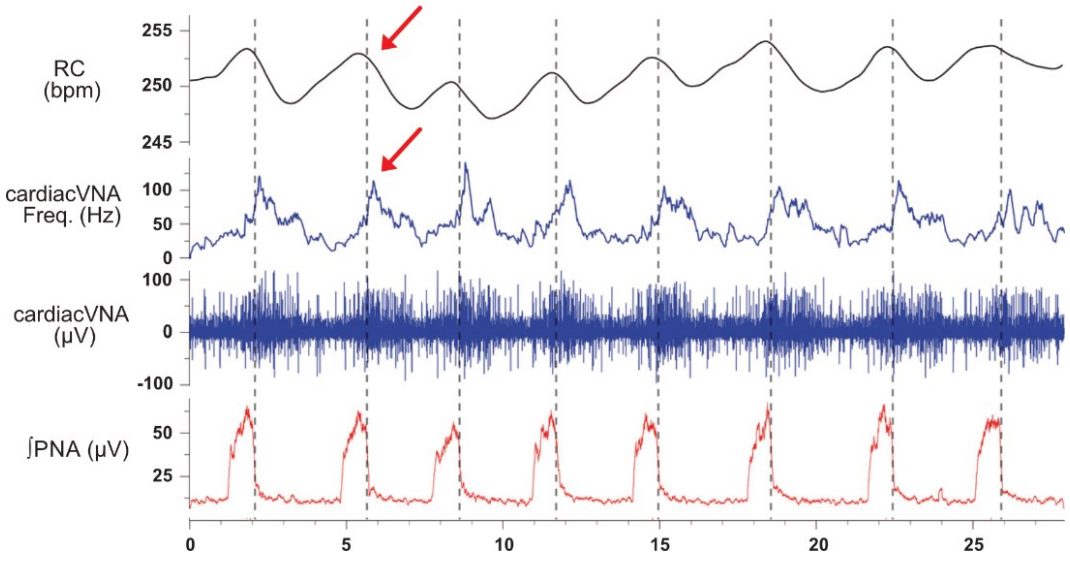


Figure 16. Modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque chez le rat (adapté de Farmer, 2016). Enregistrements de la branche parasympathique cardiaque cervicale gauche (cardiacVNA) sur la préparation *in situ cœur-tronc cérébral isolés-perfusés*. L'activité parasympathique cardiaque est maximale en tout début de post-inspiration ce qui correspond à la chute du rythme cardiaque à ce moment (illustré par les flèches). RC : rythme cardiaque ; PNA : activité phrénique.

La modulation de l'activité parasympathique cardiaque pourrait résulter de boucles réflexes mises en jeu par des afférences dont l'activité fluctue avec la ventilation. Lors de l'inspiration, l'augmentation du retour veineux par l'augmentation du volume intrathoracique élève le débit cardiaque et la pression artérielle, activant les barorécepteurs artériels. Cela stimule la boucle de rétrocontrôle médullaire du baroréflexe qui augmente l'activité de la branche cardiaque vagale et induit une bradycardie réflexe (McAllen & Spyer, 1978 ; Anrep, 1936). Inversement, la baisse de la

fréquence cardiaque diminue la pression artérielle, ce qui réduit l'activation des barorécepteurs et leur influence sur l'activité parasympathique cardiaque. De même, au cours de l'inspiration, les récepteurs à l'étirement pulmonaire sont progressivement stimulés. Les fibres A, recrutées à de faibles niveaux d'inflation, inhiberaient les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques, réduisant l'activité de la branche cardiaque vagale ce qui entraine une tachycardie (Anrep, 1936 ; Kaufman, 1982). Les fibres C, recrutées lors d'un étirement pulmonaire plus important (lors d'inspirations profondes), stimulent les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques ce qui augmente l'activité parasympathique cardiaque et induit une bradycardie (Kaufman, 1982 ; Angell-James & Daly, 1977 ; Daly & Kirkman, 1989). Cependant, la modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque persiste sur des préparations de rats paralysés, dont la cage thoracique est ouverte et les poumons retirés, et dont on a sectionné les afférences barosensibles, ce qui montre que cette activité repose en partie sur un couplage dans le tronc cérébral entre des neurones respiratoires et des neurones cardiovasculaires (Farmer, 2016 ; Anrep, 1936 ; Menuet, 2020) (Fig. 16). En effet, des enregistrements de neurones cardiaques vagaux préganglionnaires dans le noyau ambigu, montrent que leur activité est directement modulée par des neurones respiratoires (Gilbey ; 1984 ; Farmer, 2016 ; Neff, 2003).

Le contrôle autonome du système cardiovasculaire repose sur les efférences sympathiques et parasympathiques dont l'activité est régulée par des structures du tronc cérébral. En effet, le bulbe rachidien contient les neurones préganglionnaires cardiaques parasympathiques ainsi que des régions dites présympathiques qui constituent une source majeure d'entrées synaptiques excitatrices pour les neurones préganglionnaires sympathiques spinaux. L'activité des neurones autonomes cardiovasculaires varie avec les besoins métaboliques de l'organisme et est modulée à chaque instant par les entrées sensorielles.

2.2.3. Noyaux autonomes cardiovasculaires

2.2.3.1. Les noyaux centraux présympathiques cardiovasculaires

Contrairement aux neurones préganglionnaires cardiaques parasympathiques dont les corps cellulaires sont dans des noyaux bulbaires, les neurones préganglionnaires sympathiques ont leur corps cellulaire au niveau médullaire spinal. Cependant, certains noyaux dans le tronc cérébral et l'hypothalamus contiennent des neurones dits présympathiques, qui projettent directement sur les neurones préganglionnaires sympathiques. Ces neurones travaillent en réseau pour moduler l'activité sympathique en réponse à des stimuli internes ou externes et organisent les réponses réflexes participant au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire.

La région du bulbe rachidien rostral ventrolatéral (RVLM) contient des neurones présympathiques et est une région particulièrement importante pour la régulation cardiovasculaire à laquelle je me suis intéressée au cours de mon travail doctoral.

2.2.3.1.1. Le bulbe rostral ventro-latéral (RVLM)

Les travaux pionniers d'Adrian et al. (1932) sur l'activité sympathique ont incité les chercheurs à étudier les mécanismes qui sous-tendent la régulation de la pression artérielle. Une des premières preuves de l'implication de structures du tronc cérébral dans la régulation de la pression artérielle a été obtenue après que l'injection d'un agoniste GABAergique dans l'espace sous-arachnoïdien, à la surface ventrale du pont, ait entrainé une diminution de la pression artérielle chez le chat anesthésié. Puis, grâce à une application topique de ce même agoniste GABAergique à la surface du tronc, les auteurs ont rapporté que la région responsable de cet effet vasomoteur est une petite zone située non loin de la surface ventrale du bulbe rachidien, latérale aux pyramides et caudale au noyau rétrotrapézoïde (Feldberg & Guertzenstein, 1972). S'en sont suivies plusieurs études qui ont démontré que la RVLM joue un rôle clé dans le maintien de la pression artérielle, par diverses techniques de stimulation et de lésions (Guertzenstein & Silver, 1974 ; Dampney, 1982 ; Ross, 1984) (Fig. 17b) et que ses effets sont médiés par des projections vers les neurones préganglionnaires sympathiques vasomoteurs de la moelle épinière thoracique (Ross, 1981 ; Brown & Guyenet, 1984).

La RVLM est une région aux frontières assez diffuses s'étendant longitudinalement sous la colonne ventrale respiratoire, de la limite caudale du noyau moteur du facial jusqu'au bulbe rachidien caudal ventrolatéral (CVLM), région contenant des neurones GABAergiques impliqués dans le baroreflexe, avec laquelle il y a un certain recouvrement (Paxinos & watson, 2013 ; Schreihofer & Guyenet, 2002) (Fig. 17a). La RVLM est une région essentiellement composée de neurones présympathiques glutamatergiques neurochimiquement hétérogènes dont un sous-groupe synthétise également de l'adrénaline et qui sont appelés neurones C1. Les neurones glutamatergiques de cette région n'exprimant pas les enzymes de synthèse de l'adrénaline sont appelés neurones non-C1, et ont un phénotype fonctionnel et anatomique différent des neurones C1 (Stornetta, 2009 ; Phillips, 2001 ; Schreihofer & Guyenet, 1997 ; Guyenet, 2006). Les neurones présympathiques de la RVLM expriment également différents co-transmetteurs comme les enképhalines, le polypeptide activateur de l'adénylate cyclase (connu sous le nom de PACAP) ou le neuropeptide Y, ainsi que des récepteurs à une grande variété de transmetteurs permettant une régulation fine de leur activité (Stornetta, 2009 ; Guyenet, 2006). En effet, la RVLM fournit un tonus sympathoexcitateur aux neurones préganglionnaires sympathiques qui doit pouvoir être augmenté ou diminué afin de réguler les niveaux de pression artérielle avec les besoins métaboliques et comportementaux. Elle agit comme un centre intégrateur et reçoit donc une multitude d'entrées synaptiques en provenance de régions impliquées dans le maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine et hémodynamique comme les noyaux respiratoires, l'hypothalamus, la CVLM ou encore le NTS, par qui la RVLM reçoit entre autres les informations des barorécepteurs et des chémorécepteurs (Shao, 2024 ; Ross, 1984 ; Dempsey, 2017 ; Oliveira, 2014 ; Yang & Feldman, 2018). La RVLM est également impliquée dans la régulation d'autres processus comme l'homéostasie du glucose mais nous ne traiterons pas ces aspects.

Les neurones C1 sont historiquement les neurones les plus étudiés de la RVLM et ils représentent 70% des neurones présympathiques de la RVLM qui projettent dans la moelle épinière. Leurs fibres sont peu ou pas myélinisées et ont une vitesse de conduction plus lente que les neurones non-C1 dont les fibres sont myélinisées (Schreihofer & Guyenet, 1997 ; Sun, 1988). Ils sont glutamatergiques ainsi que catécholaminergiques et sont donc classiquement identifiés par un marquage positif à la tyrosine hydroxylase. Mais bien qu'ils expriment toutes les enzymes de synthèse nécessaires à la

production des catécholamines, il semblerait que leur neurotransmission rapide passe principalement par le glutamate (Stornetta, 2009 ; Guyenet, 2006 ; Morrison, 2003). En effet, les neurones C1 contactent les neurones préganglionnaires sympathiques par des synapses contenant des vésicules glutamatergiques, et le blocage pharmacologique des récepteurs glutamatergiques dans la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière abolit la réponse sympathoexcitatrice des neurones préganglionnaires sympathiques lors d'une stimulation des neurones présympathiques de la RVLM (Morrison, 1989, 2003).

Les neurones non-C1 sont moins étudiés, notamment du fait de la difficulté à les cibler spécifiquement. Ils représentent environ 30% des neurones présympathiques de la RVLM qui projettent dans la moelle épinière par des fibres myélinisées, et ils semblent utiliser le glutamate comme neurotransmetteur (Schreihofer & Guyenet, 1997 ; Morrison, 1989, 2003 ; Stornetta, 2009).

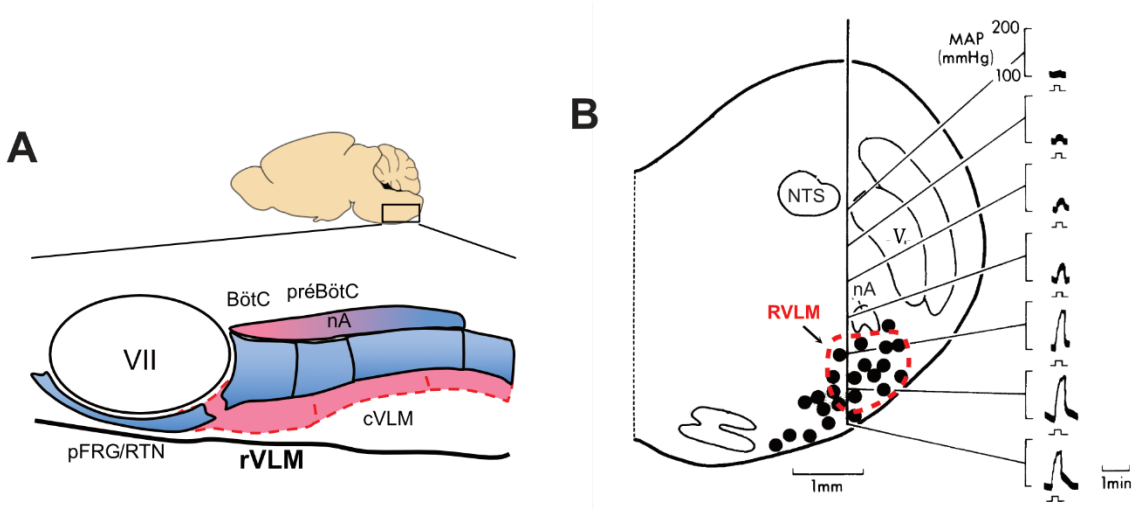


Figure 17. Caractérisation anatomique et fonctionnelle des neurones présympathiques de la RVLM (adapté de Dampney, 1982 et Moraes, 2013). (**A**) Représentation schématique sagittale du bulbe rachidien d'un rat. En bleu sont représentés les groupes respiratoires de la colonne respiratoire ventrale (et le nA qui contient des motoneurones des voies aériennes supérieures) et en rouge sont représentées les régions impliquées dans la régulation cardiovasculaire. (**B**) Réponses vasculaires à la stimulation électrique de différentes régions du bulbe rachidien chez le lapin anesthésié. La pression artérielle n'est significativement augmentée que pour des stimulations dans la RVLM. Les ronds noirs correspondent à la distribution des neurones présympathiques bulbospinaux à ce niveau du bulbe rachidien. BötC : complexe de Bötzinger ; préBötC : complexe de pré-Bötzinger ; nA : noyau ambigu ; pFRG/RTN : groupe respiratoire parafacial/noyau rétrotrapézoïde ; RVLM : bulbe rostral ventro-latéral ; CVLM : bulbe caudal ventro-latéral ; NTS : noyau du tractus solitaire ; VII : noyau du facial ; V : noyau trigéminal ; MAP : pression artérielle moyenne.

Bien qu'il soit accepté que la RVLM est responsable d'une partie conséquente du tonus vasomoteur et de sa modulation, les contributions respectives des neurones C1 et non-C1 à la régulation de la pression artérielle restent incertaines. La délétion sélective et définitive de la quasi-totalité des neurones C1 par l'injection d'une immunotoxine (la saporine) couplée à un anticorps dirigé contre la Dopamine-β-Hydroxylase (enzyme de synthèse catécholaminergique) entraine une réduction modeste de la pression artérielle, suggérant soit un rôle non essentiel, soit des mécanismes compensatoires (Schreihofer, 2000 ; Madden & Sved, 2003, 2006). Cependant, la modulation aiguë de leur activité par optogénétique ou par l'activation d'un canal potassique à l'expression conditionnelle grâce à un neuropeptide exogène induit des effets marqués sur l'activité sympathique et la pression artérielle (Abbott, 2009 ; Marina, 2011, Wenker, 2017). Le point commun entre ces études est que la mise au silence aiguë ou la perte définitive de ces neurones est associée à une altération des réponses cardiovasculaires normalement induites par le chémoréflexe ou le baroréflexe lors d'une variation métabolique (Wenker, 2017 ; Madden & Sved, 2003, 2006 ; Schreihofer, 2000 ; Marina, 2011). Ainsi, les neurones C1 seraient impliqués dans la stabilisation de la pression artérielle à court terme en étant nécessaires aux réflexes maintenant l'homéostasie gazeuse sanguine (Wenker, 2017 ; Souza, 2022). Mais un potentiel rôle dans le maintien de la pression artérielle à long terme reste à confirmer (Guyenet, 2013).

La contribution des neurones non-C1 à ces fonctions est encore plus incertaine, en grande partie en raison de la difficulté à moduler sélectivement leur activité. Toutefois, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'ils participent à la régulation de la pression artérielle. L'une des raisons est qu'ils représentent 30 % des neurones présympathiques de la RVLM projetant vers les neurones préganglionnaires sympathiques. De plus, l'inhibition pharmacologique de la RVLM dans sa globalité entraîne une chute de pression artérielle plus marquée que la mise au silence sélective des neurones C1 (Ross, 1984). Enfin, la suppression chronique des neurones C1, laissant intacts les non-C1, n'induit qu'une diminution mineure de la pression artérielle, suggérant que ces derniers pourraient compenser, au moins en partie, la perte des neurones C1 et contribueraient au maintien du tonus vasomoteur (Madden & Sved, 2003 ; Schreihofer, 2000 ; Guyenet, 2013).

Les neurones présympathiques de la RVLM constituent une population neuronale aux propriétés électrophysiologiques hétérogènes. La fréquence de leur décharge est comprise entre 8 et 22 Hz et bien que certains neurones aient des propriétés autorythmiques *in vitro* et *in situ* (Moraes, 2013 ;

Sun, 1988 ; Guyenet, 2006), leur activité semble dépendre essentiellement des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices qu'ils reçoivent (Moraes, 2013 ; Lipski, 1996 ; Ross, 1984). Les neurones présympathiques sont constamment soumis à un tonus inhibiteur GABAergique puisque la désinhibition de la RVLM par l'injection d'un antagoniste des récepteurs GABAergiques entraine une élévation marquée de la pression artérielle (Ross, 1984 ; Cravo & Morrison, 1993). Cette inhibition provient d'interneurones GABAergiques de la CVLM dont l'influence inhibitrice sur la RVLM augmente avec la pression artérielle *via* le baroréflexe (Terui, 1986 ; Schreihofer & Guyenet, 2002). Une source majeure d'entrées excitatrices provient des neurones de second ordre du NTS du réseau du chémoréflexe périphérique. L'activation des corps carotidiens par une hypoxie stimule les neurones du NTS qui envoient des projections excitatrices vers les neurones présympathiques de la RVLM (Terui, 1986). La stimulation pathologique de cette voie est d'ailleurs impliquée dans une forme de plasticité de l'activité des neurones de la RVLM associée au développement d'hypertension (Guyenet, 2006 ; Zoccal, 2008 ; Moraes, 2015).

Comme les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques, les neurones présympathiques de la RVLM ont plusieurs modulations rythmiques de leur activité. Ces neurones étant modulés par le baroréflexe, leur activité est modulée par le pouls artériel, reflet du rythme cardiaque (Terui, 1986). Ces neurones ont également une modulation respiratoire de leur activité. Les premiers travaux sur le sujet montraient classiquement par enregistrement intracellulaire que l'activité des neurones présympathiques de la RVLM était augmentée à la fin de l'activité inspiratoire phrénique (Terui, 1986 ; Haselton & Guyenet, 1989). Des enregistrements plus étendus de ces neurones ont montré qu'ils ne reçoivent pas tous le même type de modulation respiratoire et qu'il existe une certaine spécificité en fonction de leur phénotype (Moraes, 2013 ; Miyawaki, 1995). En effet, certains neurones reçoivent des courants excitateurs pendant la post-inspiration et ils sont tous négatifs à la tyrosine hydroxylase mais positifs pour Vglut2, un marqueur caractéristique du phénotype glutamatergique, montrant qu'ils appartiennent aux neurones non-C1. D'autres neurones reçoivent des courants excitateurs ou inhibiteurs pendant l'inspiration et sont positifs à la tyrosine hydroxylase ainsi qu'à Vglut2, montrant qu'ils font partie des neurones C1 (Moraes, 2013) (Fig. 22b). Cette hétérogénéité suggère que les divers types de modulation respiratoire des neurones présympathiques de la RVLM proviennent de neurones respiratoires différents.

2.2.3.1.2. L'hypothalamus

La RVLM joue un rôle important dans la régulation de l'activité nerveuse sympathique et de la pression artérielle mais elle n'agit pas seule. D'autres régions faisant partie du réseau régulateur de la fonction cardiovasculaire y contribuent, y compris l'hypothalamus.

L'hypothalamus, situé dans le cerveau antérieur, autour du 3è ventricule, est un centre intégrateur homéostatique. Un de ses noyaux, le noyau paraventriculaire, est impliqué dans la régulation cardiovasculaire et dans la modulation du système nerveux autonome. Il reçoit des informations sur l'état de l'organisme via plusieurs systèmes y compris les chémorécepteurs et les barorécepteurs (Dampney, 1984 ; Guyenet, 2006). De plus, certains neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire envoient des projections vers la moelle épinière, où ils contactent des neurones préganglionnaires sympathiques cardiovasculaires (Ranson, 1998), et vers le bulbe rachidien, où ils contactent plusieurs régions respiratoires et cardiovasculaires autonomes incluant le préBötC, le NTS, le nA et la RVLM. Les neurones du noyau paraventriculaire peuvent moduler l'activité des neurones des régions respiratoires et cardiovasculaires en utilisant plusieurs transmetteurs et peptides (incluant la vasopressine et l'ocytocine) en fonction des besoins métaboliques et de l'état psychologique du sujet (Son, 2022 ; Buron, 2023 ; Lee, 2013 ; Kc, 2002 ; Mack, 2002). C'est par exemple le cas lors de la thermorégulation ou en cas de stress physique ou émotionnel (Quintana, 2013 ; Wsol, 2008).

Notre groupe a montré que des neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus amplifient la RespVRC en influençant le couplage entre les neurones respiratoires du préBötC et les neurones parasympathiques cardiaques du nA grâce à l'ocytocine (cf. Partie 2 de l'annexe). J'ai participé à ce travail au cours de ma thèse et les résultats sont en partie 3 des résultats.

2.2.3.2. Les noyaux centraux parasympathiques cardiovasculaires

L'intersection d'études anatomiques utilisant des traceurs rétrogrades injectés dans la paroi cardiaque ou la cavité péricardique, et fonctionnelles, où ont été enregistrées les réponses antidromiques à des stimulations des efférences parasympathiques cardiaques, a permis d'identifier deux régions du bulbe rachidien où sont localisés les neurones préganglionnaires

parasympathiques cardiaques : le noyau Ambigu (nA) et le noyau moteur dorsal du vague (Gourine, 2016 ; Nosaka,1982 ; Mendelowitz & Kunze, 1991 ; Takanaga, 2003). La majorité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques sont dans le nA et ont des propriétés anatomiques et fonctionnelles distinctes de ceux étant dans le noyau moteur dorsal du vague (Takanaga, 2003 ; Gourine, 2016).

2.2.3.2.2. Le noyau Ambigu (nA)

Le nA est une région fonctionnellement hétérogène qui forme une colonne longitudinale et étroite dans la région ventrolatérale du bulbe rachidien, juxtaposée dorsalement à la colonne respiratoire ventrale. Il est classiquement décrit en trois segments caractérisés par la densité neuronale et sa dispersion : la partie rostrale, délimitée par le noyau moteur du facial, est dense et compacte, la partie caudale est plus dispersée, et la portion intermédiaire, à la transition entre le nA caudal et le nA rostral, est semi compacte (Fig. 18a).

Le noyau ambigu (nA) contient des motoneurones somatiques impliqués dans la déglutition, la vocalisation et la respiration, ainsi que des neurones préganglionnaires parasympathiques innervant les viscères thoraco-abdominaux. Il regroupe notamment les corps cellulaires des neurones moteurs qui innervent les muscles striés des voies aériennes supérieures, avec les motoneurones pharyngés situés dans le nA semi-compact et les motoneurones laryngés dans le nA caudal. Par ailleurs, les neurones préganglionnaires parasympathiques du nA contrôlent l'innervation des viscères thoraco-abdominaux et du cœur (Bieger & Hopkins, 1987 ; Werhwein, 2016).

La localisation des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques au sein de ce noyau a fait débat et n'est toujours pas certaine du fait de la difficulté à les cibler précisément. Entre autres, les traceurs rétrogrades injectés dans l'espace péricardique pour marquer ces neurones peuvent fuiter à travers cette fine membrane et infiltrer les tissus avoisinants, incluant l'œsophage, dont les motoneurones sont également dans le nA (Grkovic, 2005 ; Takanaga, 2003). Cependant, les résultats des études historiques anatomo-fonctionnelles associés à ceux d'études plus récentes utilisant des techniques améliorées ont permis de localiser les neurones dans la formation externe

du nA (qui entoure le nA caudal épar) ainsi que ventralement au nA rostral compact et semi-compact (Bieger & Hopkins, 1987 ; McAllen & Spyer, 1978a ; Takanaga, 2003 ; Veerakumar, 2022) (Fig. 18a).

D'un point de vue moléculaire, les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA étaient classiquement caractérisés comme des neurones cholinergiques n'exprimant pas le peptide lié au gène de la calcitonine (ou CGRP), contrairement aux neurones moteurs des voies aériennes supérieures et de l'œsophage (Takanaga, 2003). Mais des travaux récents basés sur le séquençage de l'ARN en cellule unique sur ces neurones ont mis en évidence qu'il existait plusieurs sous-types de neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques ayant des profils moléculaires différents. La modulation optogénétique de l'activité de ces différents neurones *in vivo montre* qu'ils sont impliqués dans des fonctions cardio-respiratoires distinctes (Jalil, 2023 ; Veerakumar, 2022 ; Coverdell, 2024). Un premier sous-groupe dit « cardiovasculaire » n'innerve que les ganglions cardiaques et les stimuler provoque une bradycardie robuste. Ces neurones pourraient également être impliqués dans le réflexe de plongée, déclenché quand le visage est au contact de l'eau froide, et qui induit un ensemble de réponses respiratoires et cardiovasculaires (dont une bradycardie) optimisant la distribution d'O_2 disponible lors d'une immersion prolongée (Jalil, 2023 ; Coverdell, 2024). Un autre sous-groupe, appelé « cardiopulmonaire », innerve à la fois les ganglions cardiaques et pulmonaires, et la stimulation de ces neurones cause une bradycardie ainsi qu'une bronchoconstriction (Veerakumar, 2022 ; Coverdell, 2024). Toutefois la description de ces sous-groupes de neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA est récente et leur contribution relative à la fonction cardiovasculaire est encore méconnue.

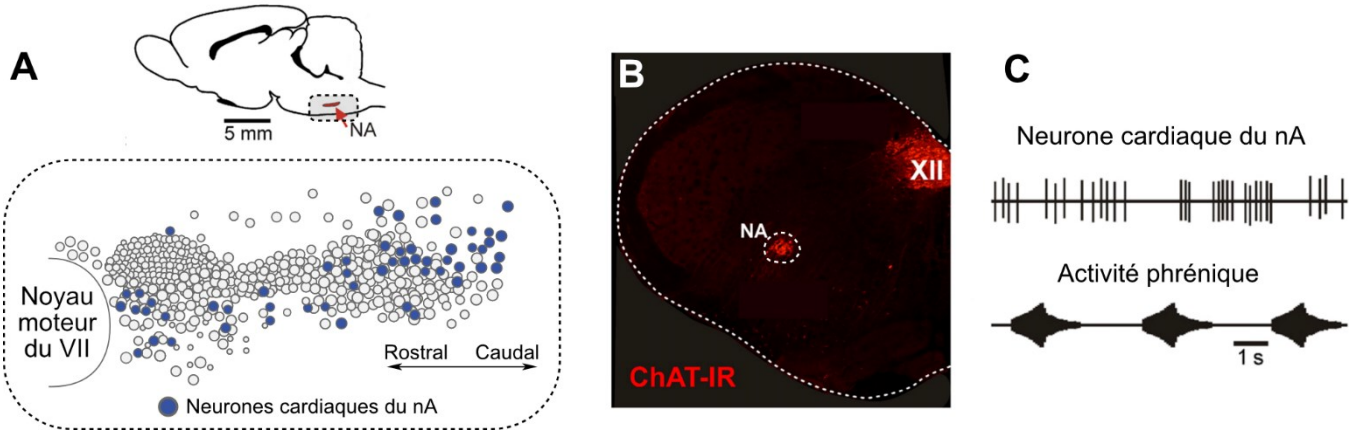


Figure 18. Caractérisation anatomique et fonctionnelle des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA chez le rongeur (Adapté de Veerakumar, 2022 et Gourine, 2016). (**A**) Coupe sagittale du cerveau d'une souris avec la localisation schématique du nA (en haut) et représentation de la distribution neuronale dans ce noyau (en bas). Les neurones cardiaques ont été localisés chez la souris en combinant traçage rétrograde à partir du cœur et immunomarquage. (**B**) Coupe coronale de bulbe rachidien montrant la localisation des neurones du nA grâce au marquage par la choline acétyltransférase (ChAT). (C) Enregistrement extracellulaire d'un neurone parasympathique cardiaque du nA et de l'activité nerveuse phrénique inspiratoire chez le chat anesthésié. nA : noyau ambigu.

Fonctionnellement, chez le rongeur, les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA sont la voie rapide de la régulation du rythme cardiaque puisqu'ils ont des fibres myélinisées de type B, alors que les neurones du noyau moteur dorsal du vague ont des fibres non myélinisées de type C (McAllen & Spyer, 1976 ; 1978a ; Gourine, 2016). Lorsqu'ils sont stimulés, ces neurones diminuent la fréquence cardiaque et la vitesse de conduction atrioventriculaire (Sampaio, 2014 ; Veerakumar, 2022).

Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA sont intrinsèquement silencieux et la genèse ainsi que la modulation de l'activité parasympathique cardiaque dépend donc de la balance entre les différentes entrées inhibitrices et excitatrices synaptiques que reçoivent ces neurones (McAllen & Spyer, 1978a ; Mendelowitz, 1996 ; Gilbey, 1984). La principale source d'entrées synaptiques excitatrices des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA est le NTS qui relaie l'information des barorécepteurs artériels et des chémorécepteurs périphériques par des projections glutamatergiques (Gilbey, 1984 ; McAllen & Spyer, 1978b ; Wang, 2006 ; Shao, 2024). La mise en jeu du chémoréflexe périphérique active cette voie excitatrice entre le NTS et le nA qui induit une augmentation d'activité parasympathique responsable de la bradycardie réflexe. La décharge des barorécepteurs est augmentée lors d'une

augmentation de pression, ce qui est le cas à chaque battement cardiaque. Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA ont donc un premier type d'activité rythmique lié au pouls artériel (Gilbey, 1984 ; McAllen & Spyer, 1978b). L'activité de ces neurones est également modulée par la respiration (Fig. 18c). Ils reçoivent des courants inhibiteurs pendant l'inspiration et des courants excitateurs pendant la post inspiration qui proviennent de neurones respiratoires (Gilbey ; 1984 ; Farmer, 2016 ; Neff, 2003) (Fig. 18c). Cette modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque qui est diminuée pendant l'inspiration et augmentée pendant la post-inspiration, est majoritairement responsable de la genèse de la RespVRC.

3.2.2.2.1. Le noyau moteur dorsal du vague

Le noyau moteur dorsal du vague est localisé dans le bulbe rachidien dorsal, sous le plancher du 4è ventricule et entre le NTS et le noyau hypoglosse (Fig. 19a,b). Cette région longitudinale contient une petite proportion de neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques distribués le long de l'axe rostro-caudal (Nosaka, 1982 ; Takanaka, 2003 ; Gourine, 2016).

Chez le rongeur, les neurones cholinergiques du noyau moteur dorsal du vague projettent vers les ganglions cardiaques par des fibres non myélinisées de type C. La stimulation des neurones préganglionnaires cardiaques du noyau moteur dorsal du vague induit une bradycardie d'amplitude moindre par rapport à la stimulation des neurones préganglionnaires cardiaques du nA (Geis & Wurster, 1980 ; Machhada, 2016). Ces neurones sont plus responsables des effets dromotrope et inotrope négatifs de l'activité parasympathique, en étant modulateurs de la conduction atrioventriculaire et de la contractilité myocardique (Machhada, 2016 ; gourine 2016 ; Geis and wurster 1980).

Contrairement aux neurones préganglionnaires du nA, les neurones cardiaques du noyau moteur dorsal du vague ont un patron de décharge tonique ni modulé par la respiration, ni par la stimulation des barorécepteurs et des chémorécepteurs (Nosaka, 1982 ; Gourine, 2016) (Fig. 19c). Ils ne semblent donc pas impliqués dans la genèse de la RespVRC.

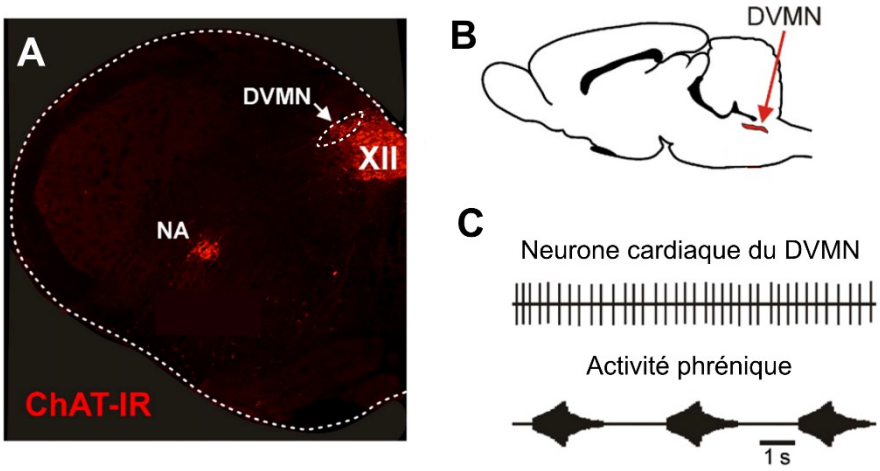


Figure 19. Caractérisation anatomique et fonctionnelle des neurones préganglionnaires cardiaques du Noyau Moteur Dorsal du Vague (Adapté de Gourine, 2016) (**A**) Coupe coronale de bulbe rachidien d'une souris montrant la localisation des neurones préganglionnaires parasympathiques du Noyau Moteur Dorsal du Vague (DVMN) grâce au marquage par la choline acétyltransférase (ChAT). (**B**) Coupe sagittale du cerveau d'une souris avec la localisation schématique du DVMN. (**C**) Enregistrement extracellulaire d'un neurone parasympathique cardiaque du DVMN et de l'activité nerveuse phrénique inspiratoire chez le chat anesthésié. nA : noyau ambigu ; DVMN : noyau moteur dorsal du vague.

2.2.4. Modulation périphérique : le baroréflexe

Les réflexes périphériques jouent un rôle essentiel dans la régulation du système cardiovasculaire, assurant une adaptation rapide et précise aux changements de l'environnement interne et externe. Parmi les réflexes les plus importants, nous pouvons citer le chémoréflexe périphérique, responsable de la régulation de l'homéostasie gazeuse sanguine et dont l'activation induit des réponses cardiovasculaires incluant une bradycardie médiée par les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA, et une augmentation de pression artérielle médiée par les neurones présympathiques de la RVLM (cf. chapitre 2.1.2 ; Fig. 12). Un autre réflexe crucial pour l'intégrité et l'équilibre du système cardiovasculaire est le baroréflexe. Les paramètres circulatoires et cardiaques sont directement liés et s'influencent l'un l'autre. Le baroréflexe assure la stabilisation des niveaux de pression artérielle dans une fourchette physiologique étroite, compatible avec une perfusion adéquate des organes, et permet d'atténuer les larges fluctuations de pression artérielle. En outre, le baroréflexe régule de manière dynamique les activités sympathique et parasympathique permettant de contrôler la résistance vasculaire et le débit

cardiaque, deux paramètres déterminants pour la valeur de pression artérielle (La Rovere & Pinna, 2014).

Les barorécepteurs sont des récepteurs sensibles à l'étirement. On trouve des mécanorécepteurs dans le cœur qui sont sensibles aux variations de volume sanguin cardiaque et à l'étirement des oreillettes et ventricules. Mais les principaux barorécepteurs sont situés dans la crosse aortique et proche des corps carotidiens, dans les sinus carotidiens (Fig. 20). Les barorécepteurs aortiques, situés dans la crosse aortique laquelle fournit le sang à la circulation artérielle systémique dans sa globalité, joueraient un rôle important dans la régulation de la pression artérielle systémique. Les barorécepteurs carotidiens, eux, sont bien placés pour contrôler la pression artérielle arrivant au cerveau et seraient plus importants pour le maintien d'une pression artérielle et d'un débit sanguin cérébraux stables. Les barorécepteurs sont sensibles au degré d'étirement des parois artérielles concernées, et lors d'une augmentation de pression artérielle, les parois se distendent ce qui stimule l'activité des barorécepteurs. A l'inverse, lors d'une diminution de la pression artérielle, les artères sont moins étirées, et les barorécepteurs déchargent moins. Les barorécepteurs aortiques ont un seuil de détection des variations de pression artérielle plus bas que les barorécepteurs carotidiens (plus proche des niveaux physiologiques), pouvant suggérer une implication différentielle de ces deux sites barosensibles dans les différentes réponses induites par le baroréflexe (Lau, 2016 ; Pickering, 2008 ; Donald & Edis, 1971 ; Simms, 2007). Il semblerait d'ailleurs que les barorécepteurs aortiques soient plus importants pour la composante parasympathique cardiaque du baroréflexe que les barorécepteurs carotidiens, mais que la composante sympathique vasculaire, elle, soit organisée par les deux sites (Pickering, 2008 ; Simms, 2007). Le seuil de détection des barorécepteurs peut varier en situation physiologique, comme lors d'un exercice physique et avec l'âge, ou en contexte pathologique, comme chez les patients hypertendus (Suarez-Rosa, 2021 ; Simms, 2007 ; La Rovere & Pinna, 2014).

Les barorécepteurs du sinus carotidien sont innervés par le nerf de Hering (ou nerf du sinus carotidien), une branche du nerf glossopharyngien, et les barorécepteurs de la crosse aortique sont innervés par les fibres du nerf de Cyon, branche du nerf vague (Suarez-Rosa, 2021) (Fig. 20). Les corps cellulaires de ces fibres afférentes sont respectivement dans le ganglion pétreux et le ganglion plexiforme. Les afférences projettent vers les centres, où elles contactent des neurones de second ordre dans les sous-divisions dorsales, médianes et commissurales du NTS (Paton, 2001 ; Pilowksi & Goodchild, 2002). Les neurones du NTS, activés par le glutamate libéré par les afférences

barosensibles, projettent vers les différents centres autonomes cardiovasculaires et respiratoires et modulent leur activité afin d'ajuster différents paramètres respiratoires et cardiovasculaires en fonction des besoins métaboliques.

Une des cibles des neurones du NTS est le bulbe caudal ventro-latéral (CVLM), maillon essentiel du baroréflexe (Paton, 2001 ; Gordon, 1987 ; Shao, 2024). Cette région située caudalement à la RVLM et avec qui elle a un certain recouvrement, contient des neurones GABAergiques dont l'activité est modulée par le baroréflexe qui exercent un tonus inhibiteur sur les neurones présympathiques de la RVLM (Terui, 1986 ; Miyawaki, 1997 ; Schreihofer & Guyenet, 2002). Lorsque la pression artérielle augmente, les neurones GABAergiques de la CVLM sont stimulés, ce qui augmente l'inhibition des neurones présympathiques de la RVLM. Cela a pour effet de diminuer le tonus sympathique vasomoteur, ce qui réduit la résistance vasculaire et donc la pression artérielle (Miyawaki, 1997 ; Schreihofer & Guyenet, 2002) (Fig. 20). L'activation du baroréflexe entraine également une bradycardie liée à une augmentation de l'activité parasympathique cardiaque grâce aux projections excitatrices du NTS vers les neurones préganglionnaires cardiaques du nA (Cheng, 2004 ; Simms, 2007) (Fig. 20). Cette bradycardie contribue à réduire la pression artérielle par une diminution du débit cardiaque.

Les réponses cardiovasculaires induites par la stimulation des barorécepteurs et leurs mécanismes sont bien caractérisés. En revanche, les effets sur la respiration sont plus variables et semblent dépendre de plusieurs paramètres incluant l'espèce étudiée, le type de préparation et la présence ou non d'anesthésique (McMullan, 2009). Cependant, la stimulation des barorécepteurs a généralement un effet inhibiteur sur l'inspiration et prolongateur de l'expiration. Ces effets sont médiés par le NTS qui envoie des projections excitatrices vers les neurones post-inspiratoires du BötC (Brunner, 1982 ; Li, 1999 ; Baekey, 2010).

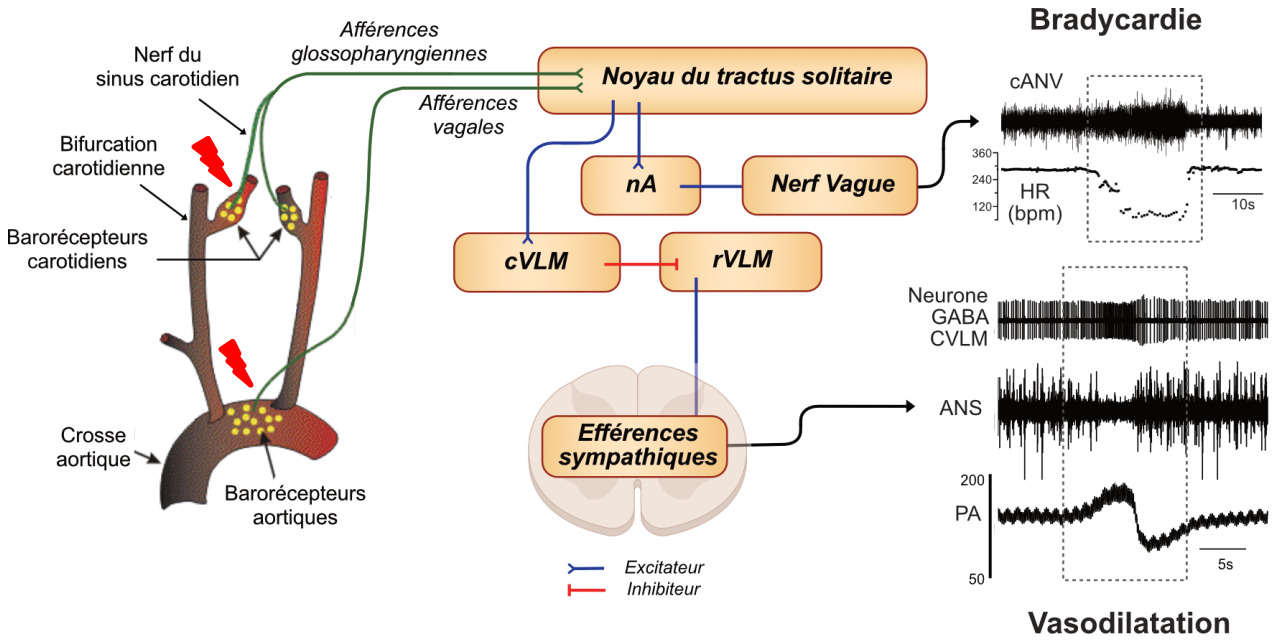


Figure 20. Schématisation du réseau médullaire essentiel aux réponses cardiovasculaires induites par l'activation du baroréflexe (adapté de Mandel & Schreihofer, 2006 & Simms, 2007). La stimulation des barorécepteurs par une augmentation de pression artérielle recrute plusieurs régions du tronc cérébral pour produire une bradycardie et une vasodilatation amenant à la diminution de la pression artérielle. La bradycardie est liée à une augmentation d'activité parasympathique cardiaque et la vasodilatation à une baisse d'activité sympathique. La sympathoinhibition est médiée par les neurones GABAergiques de la CVLM, stimulés par le baroréflexe (comme illustré par l'augmentation d'activité unitaire d'un neurone de la CVLM) et qui augmentent leur tonus inhibiteur sur les neurones présympathiques de la RVLM. Les enregistrements de la composante cardiaque ont été obtenus chez le rat *in situ et ceux* de la composante vasculaire chez le rat anesthésié. nA : noyau ambigu ; RVLM : bulbe rostral ventro-latéral ; CVLM : bulbe caudal ventro-latéral ; ANS : activité nerveuse sympathique ; PA : pression artérielle ; cANV : activité nerveuse vagale cardiaque ; HR : rythme cardiaque.

Ainsi, les mécanismes de rétrocontrôle de la fonction cardiovasculaire incluant le chémoréflexe et surtout le baroréflexe, constituent une première ligne de défense pour préserver la stabilité hémodynamique et gazeuse sanguine. Elles sont également impliquées dans une forme de régulation plus fine de l'homéostasie gazeuse sanguine en participant au couplage entre les activités respiratoires et cardiovasculaires.

2.3. Couplage central respiratoire-cardiovasculaire

La respiration module les activités nerveuses sympathique et parasympathique, générant des oscillations de la pression artérielle et du rythme cardiaque, les ondes TH et la RespVRC, respectivement (Fig. 15, 16). Comme nous l'avons expliqué précédemment, cette modulation prend son origine dans le tronc cérébral, reposant majoritairement sur le couplage entre des neurones respiratoires et des neurones autonomes cardiovasculaires. Nous allons maintenant détailler les partenaires de ce couplage central respiratoire-cardiovasculaire.

2.3.1. Modulation respiratoire des neurones cardiaques du nA

Les enregistrements des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA montrent qu'ils reçoivent des courants inhibiteurs pendant l'inspiration et des courants excitateurs pendant la post-inspiration (Gilbey, 1984) (Fig, 18c, 21a). Cette modulation de leur activité est à l'origine de la modulation de l'activité parasympathique cardiaque et de la RespVRC (Fig. 21a). Elle repose majoritairement sur une modulation directe de l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques du nA par des neurones respiratoires.

La transsection du tronc cérébral entre le pont et le bulbe rachidien atténue fortement l'amplitude de la RespHRV *in situ, ce qu*i suggère une origine pontique à la modulation de l'activité des neurones préganglionnaires cardiaques du nA (Baekey, 2008). Le noyau Kolliker-Fuse, situé dans le pont, contient des neurones avec un profil d'activité post-inspiratoire qui projettent dans le bulbe rachidien, vers la colonne respiratoire ventrale mais aussi vers le nA (Dutschmann & Dick, 2012 ; Song, 2012). De plus, l'inhibition pharmacologique des neurones de ce noyau *in situ,* de même qu'une transsection ponto-bulbaire, supprime le pic post-inspiratoire de la modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque et atténue fortement l'amplitude de la RespVRC (Farmer, 2016). Ces résultats anatomiques et fonctionnels montrent bien une implication des neurones excitateurs du noyau Kolliker-Fuse dans la modulation excitatrice post-inspiratoire de l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA.

L'utilisation d'agents pharmacologiques a montré que les courants inhibiteurs reçus par neurones préganglionnaires cardiaques du nA pendant l'inspiration sont GABAergiques et glycinergiques (Neff, 2003 ; Frank, 2009) (Fig. 21b).

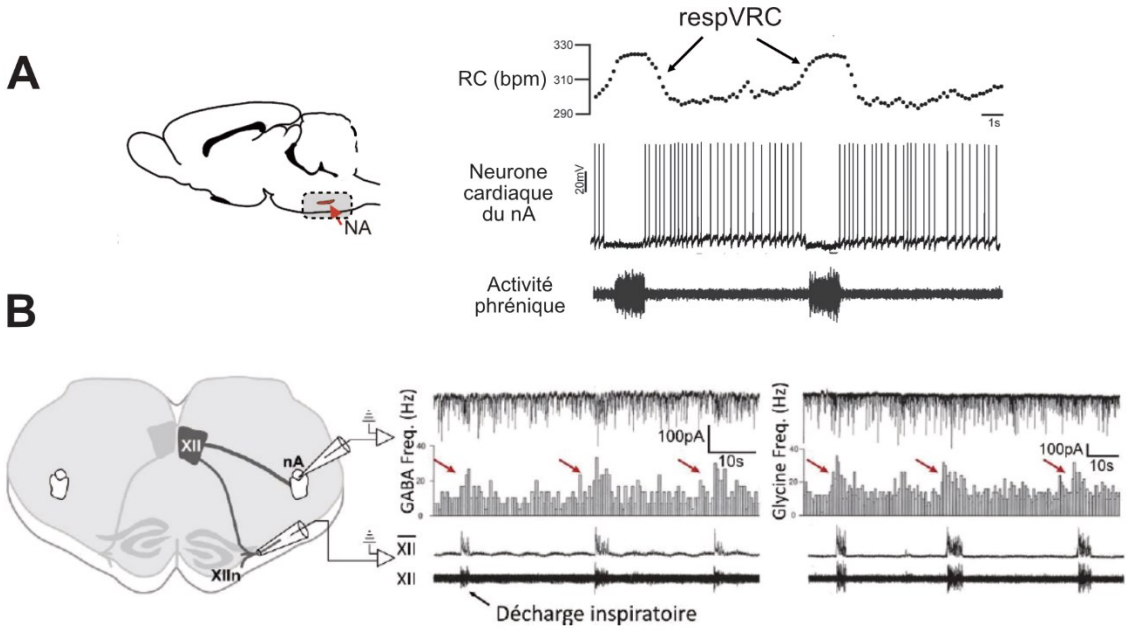


Figure 21. Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA sont hyperpolarisés pendant l'inspiration par des courants inhibiteurs glycinergiques et GABAergiques (adapté de Neff, 2003 et Machado, 2016). (**A**) Enregistrements simultanés chez le rat *in situ d'un n*eurone préganglionnaire parasympathique cardiaque du nA, du nerf phrénique et du rythme cardiaque (RC). Notez l'inhibition inspiratoire et l'excitation post-inspiratoire de la décharge du neurone cardiaque du nA. (**B**) Enregistrement *in vitro* des courants post-synaptiques inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques des neurones cardiaques du nA et de la sortie motrice inspiratoire hypoglosse sur une tranche rythmique de bulbe rachidien chez la souris. Cette préparation in vitro génère une activité inspiratoire rythmique puisqu'elle contient le générateur du rythme inspiratoire (le préBötC, cf. chapitre 2.1.1.1.1 ; Fig.10). Notez l'augmentation de fréquence des courants inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques à chaque inspiration (indiquée par les flèches rouges). nA : noyau ambigu ; RC : rythme cardiaque ; XII : noyau moteur hypoglosse ; XIIn : nerf hypoglosse.

L'équipe de Gilbey et al. (1984) qui avait enregistré pour la première fois les courants inhibiteurs inspiratoires des neurones cardiaques du nA avait déjà émis l'hypothèse qu'ils proviendraient de neurones respiratoires déchargeant pendant l'inspiration. De manière à déterminer l'origine de ces courants inhibiteurs, Frank et al. (2009) ont réalisé des applications focales de glutamate sur des coupes coronales de bulbe rachidien, tout en enregistrant l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA. Grâce à cela, ils ont identifié deux régions où l'application de glutamate amplifie les courants inhibiteurs des neurones cardiaques du nA, l'une d'elle étant

localisée ventromédialement au nA, où le préBötC est situé. Une étude récente combinant anatomie et modulation optogénétique *in vivo et in situ* des neurones respiratoires du préBötC a mis en évidence que des neurones de ce groupe sont impliqués (Menuet, 2020). En effet, la modulation de leur activité a révélé une influence inhibitrice des neurones du préBötC sur les neurones préganglionnaires cardiaques du nA qui participe à générer la RespVRC. Or, l'enregistrement *in vitro* des neurones préganglionnaires cardiaques du nA associé à l'utilisation de bloqueurs pharmacologiques a permis de montrer que les courants inhibiteurs reçus par les neurones cardiaques du nA pendant l'inspiration sont GABAergiques et glycinergiques (Neff, 2003 ; Frank, 2009) (Fig. 21c). Ainsi, l'effet parasympathoinhibiteur du préBötC pourrait reposer sur des neurones glycinergiques et/ou GABAergiques.

Une première indication que les neurones glycinergiques du préBötC y contribuent à ce phénomène a été apportée par l'observation *in situ* que le blocage pharmacologique des récepteurs glycinergiques du préBötC diminue la RespVRC (Furuya, 2021). Puis des travaux auxquels j'ai participé pendant ma thèse confirment par traçage viral et transcriptomique *in situ* que des neurones glycinergiques du préBötC contactent directement les neurones préganglionnaires cardiaques du nA, puis par optogénétique et enregistrements électrophysiologiques qu'ils inhibent leur activité pendant l'inspiration par leur profil de décharge inspiratoire phasique (Buron, 2023). Les neurones glycinergiques du préBötC contribuent donc à la modulation inhibitrice inspiratoire de l'activité des neurones préganglionnaires cardiaques du nA et à la RespVRC. Mais les neurones cardiaques du nA reçoivent aussi des courants GABAergiques inspiratoires qui n'ont que très peu été étudiés et dont la source est inconnue.

Les neurones préganglionnaires cardiaques du nA reçoivent des courants inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques pendant l'inspiration qui contribuent à la modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque, responsable de la RespVRC. Nous avons mis en évidence l'implication des neurones glycinergiques du préBötC dans ce phénomène mais la source des courants GABAergiques inspiratoires reçus par les neurones cardiaques du nA reste à étudier. Les résultats obtenus à ce sujet sont détaillés dans les résultats du projet investiguant l'implication dans le couplage respiratoire-cardiovasculaire des neurones GABAergiques du préBötC, qui a constitué une grande partie de mon travail de thèse (cf. Partie 1 des résultats).

2.3.2. Modulation respiratoire des neurones présympathiques de la RVLM

Les enregistrements des neurones présympathiques de la RVLM ont révélé que ces neurones reçoivent différents types de modulation respiratoire de leur activité : les neurones C1 reçoivent des courants excitateurs ou inhibiteurs pendant l'inspiration et les neurones non-C1 reçoivent des courants excitateurs pendant la post-inspiration (Moraes, 2013 ; Miyawaki, 1995) (Fig. 22b). La source de ces modulations est encore méconnue du fait de la complexité des réseaux impliqués et du connectome diffus de la RVLM, mais elle semble reposer sur le couplage avec différentes populations de neurones respiratoires.

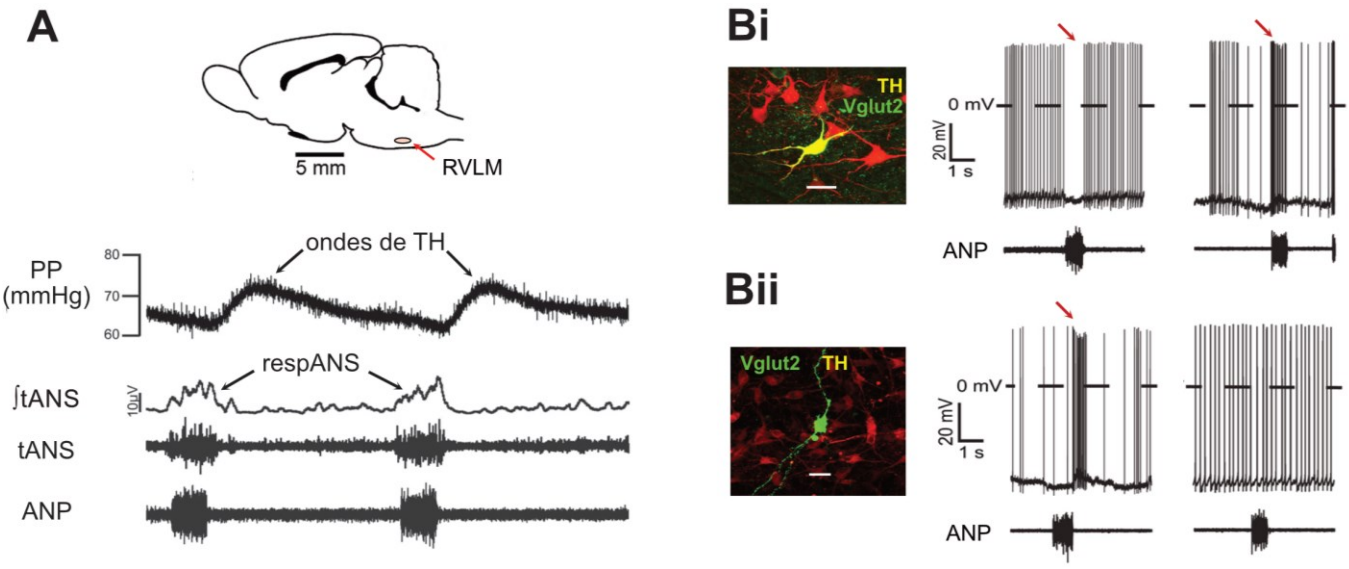


Figure 22. Les neurones présympathiques de la RVLM qui contribuent à générer les ondes TH reçoivent plusieurs modulations respiratoires de leur activité (Adapté de Machado, 2016 et Moraes, 2013). (**A**) Enregistrements chez le rat *in situ de la* pression de perfusion (PP), de l'activité sympathique thoracique (tANS) et de l'activité phrénique (ANP). (**B**) Profils de décharge des neurones présympathiques C1 (**Bi**) et non-C1 (**Bii**) caractérisés par enregistrements intracellulaires *in situ* chez le rat. (**Bi**) Les neurones C1, identifiés par le double marquage Vglut2 (transporteur vésiculaire glutamatergique) et TH (Tyrosine Hydroxylase), sont soit inhibés soit stimulés pendant l'inspiration (illustrée par l'activité phrénique, ANP). (**Bii**) Les neurones non-C1 (positifs à Vglut2 mais négatifs à la TH) sont soit stimulés pendant la post-inspiration, soit n'ont pas de modulation respiratoire de leur activité. Barre d'échelle : 20µm.

Puisque la modulation respiratoire de l'activité sympathique a une composante post-inspiratoire importante (Fig. 22a ;15), des études se sont intéressées au Complexe Post-Inspiratoire (PiCO) qui contient des neurones excitateurs à décharge phasique post-inspiratoire qui projettent vers la RVLM

(Dempsey, 2017 ; Oliveira, 2024). Un des éléments suggérant que le PiCo est impliqué dans cette modulation est que la stimulation optogénétique des neurones du PiCO augmente la décharge de la branche sympathique cervicale *in vivo,* soulignant un rôle sympathoexcitateur de ces neurones (Karlen-Amarante, 2024). Cependant, cet effet pourrait pourrait être médié par une connexion du PiCo sur les neurones de la RVLM ou encore par une projection directe sur les neurones préganglionnaires sympathiques spinaux. En revanche, une étude investiguant le couplage des neurones du PiCO avec plusieurs activités nerveuses rapporte que le blocage pharmacologique de l'activité de ce groupe *in vivo* réduit l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité sympathique (Toor, 2019). Cette étude est la première preuve d'une contribution de ces neurones à activité post-I dans la modulation respiratoire de l'activité sympathique. Cependant, ils ne seraient pas les seuls responsables de cette composante post-inspiratoire de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et seraient plus un relai de l'activité de neurones pontiques puisque l'inhibition pharmacologique du PiCO atténue moins la modulation respiratoire de l'activité sympathique qu'une transsection ponto-bulbaire (Toor, 2019 ; Baekey, 2008). Et en effet, la mise au silence pharmacologique du noyau Kölliker-Fuse, essentiel à la post-inspiration et qui envoie cette information au Complexe Post-Inspiratoire, réduit de manière plus conséquente la modulation respiratoire de l'activité sympathique (Toor, 2024). Ainsi les neurones post-inspiratoires du noyau Kölliker-Fuse et du PiCO sont impliqués dans la genèse de la modulation respiratoire de l'activité sympathique, et pourraient être à l'origine des courants excitateurs post-inspiratoires reçus par les neurones non-C1 de la RVLM (Fig. 22Bii).

Les neurones du noyau Kölliker-Fuse et du PiCO ne sont pas les seuls responsables de cette activité puisque la suppression de l'activité de ces groupes n'abolit pas la modulation respiratoire de l'activité sympathique. Le préBötC est une source importante de modulation respiratoire de l'activité des neurones présympathiques de la RVLM. Dans un premier temps, il a été montré par traçage viral que les neurones excitateurs du préBötC contactent les neurones présympathiques de la RVLM (Dempsey, 2017 ; Yang & Feldman, 2018), puis par optogénétique qu'ils ont un effet sympathoexcitateur puisque la stimulation de leur activité induit une augmentation d'activité sympathique (Karlen-Amarante, 2024). Enfin, l'inhibition optogénétique des neurones du préBötC amoindrit l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité sympathique (Menuet, 2020 ; Karlen-Amarante, 2024). Ainsi, les neurones glutamatergiques inspiratoires du préBötC sont également impliqués dans la genèse de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et

pourraient être responsables des courants excitateurs inspiratoires reçus par les neurones C1 de la RVLM (Fig. 22Bi).

Enfin, les neurones présympathiques de la RVLM reçoivent un dernier type de modulation respiratoire de leur activité, qui est une inhibition de leur activité pendant l'inspiration (Fig. 22Bi). Les mécanismes à l'origine de cette modulation inhibitrice ont reçu moins d'attention que ceux à l'origine des modulations excitatrices et sont donc très peu caractérisés. Nous pouvons cependant faire l'hypothèse que cette modulation inspiratoire inhibitrice a une origine soit 1) indirecte par des neurones inspiratoires excitateurs qui projettent sur des neurones GABAergiques de la CVLM dont l'activité sympathoinhibitrice est également modulée par la respiration (Mandel & Schreihofer, 2006), soit 2) directe par des neurones respiratoires inhibiteurs à décharge inspiratoire.

Plusieurs éléments suggèrent que le préBötC pourrait être impliqué. D'un point de vue anatomique, ce groupe contient des neurones inspiratoires inhibiteurs qui projettent vers la RVLM et dont les terminaisons synaptiques sont observées à proximité des neurones présympathiques (Yang & Feldman, 2018 ; Menuet, 2020). Fonctionnellement, la stimulation optogénétique des neurones du préBötC réduit l'amplitude de la modulation respiratoire sympathique (Menuet, 2020). Cet effet pourrait s'expliquer par la réduction de l'amplitude respiratoire associée ou bien par une synchronie plus importante des neurones inhibiteurs du préBötC, ce qui augmenterait le nombre de neurones présympathiques de la RVLM inhibés pendant l'inspiration et réduirait de fait la modulation respiratoire de l'activité sympathique. Par ailleurs, les neurones responsables de cette modulation inspiratoire inhibitrice des neurones présympathiques de la RVLM seraient GABAergiques puisque l'administration d'un antagoniste des récepteurs GABAergiques dans la RVLM augmente l'amplitude de la modulation respiratoire sympathique contrairement aux antagonistes des récepteurs glycinergiques qui n'ont pas d'effet (Guyenet, 1990 ; Miyawaki, 2002 ; Menuet, 2017). Des neurones GABAergiques du préBötC pourraient donc être impliqués dans la modulation respiratoire de l'activité sympathique en étant responsables de l'inhibition inspiratoire reçue par certains neurones présympathiques de la RVLM.

Cette hypothèse est étayée par les résultats de mon travail de thèse au cours du projet portant sur l'implication dans le couplage respiratoire-cardiovasculaire des neurones GABAergiques du préBötC (cf. Partie 1 des résultats).

Ainsi, la modulation respiratoire de l'activité sympathique, à l'origine des ondes TH, résulte de l'intégration de diverses modulations respiratoires agissant sur les neurones présympathiques de la RVLM, elles-mêmes générées de manière indépendante par des populations distinctes de neurones respiratoires localisées dans différentes régions du tronc cérébral.

Le couplage respiratoire-cardiovasculaire est essentiel à l'homéostasie gazeuse sanguine et repose sur des interactions complexes entre plusieurs populations neuronales du tronc cérébral modulant les activités sympathique et parasympathique avec le cycle respiratoire. Malgré son importance physiologique, les mécanismes précis sous-tendant ce couplage restent partiellement caractérisés. Comprendre ces circuits est crucial, car des altérations du couplage sont observées dans diverses pathologies cardiovasculaires, respiratoires et neurologiques. Identifier les mécanismes impliqués permettrait d'améliorer notre compréhension des régulations cardiovasculaires et respiratoires en condition physiologique, mais ouvrirait également la voie à des approches thérapeutiques ciblées en contexte pathologique.

Chapitre 3 : Les modulations physiopathologiques du couplage respiratoire-cardiovasculaire

Le couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV) est un reflet du bon fonctionnement et de l'intégrité des systèmes respiratoires et cardiovasculaires. Ainsi, la modulation à la hausse ou à la baisse de ce couplage dans différentes conditions peut être associée à une bonne santé cardiovasculaire ou à l'inverse, à certaines pathologies.

3.1. Altérations pathologiques du CRCV

Les pathologies cardiovasculaires, qui sont la première cause de mortalité dans le monde (NCD Risk Factor Collaboration, 2021 ; Organisation Mondiale de la santé [OMS], 2021) sont généralement associées à un déséquilibre du système nerveux autonome caractérisé par une hypoactivité du système parasympathique et une hyperactivité du système sympathique (Porter, 1990 ; La Rovere, 1998 ; Schlaich, 2004). Ces pathologies sont également associées à des altérations du couplage respiratoire-cardiovasculaire (Thayer, 2010 ; Porter, 1990 ; Stevens, 2016). Parmi ces dysfonctionnements, on retrouve une forte réduction, voire une disparition, de la RespVRC qui est d'ailleurs utilisée en tant qu'indicateur pronostique de morbidité et mortalité cardiovasculaire (Porter, 1990 ; O'Callaghan, 2020 ; La Rovere, 1998 ; Haigney, 2014 ; Narkiewicz 1998). A l'inverse, les ondes TH peuvent être amplifiées (Xie, 2019 ; Simms, 2009 ; Menuet, 2017). Or l'augmentation de la variabilité de la pression artérielle incluant la variabilité à court terme dont font partie les ondes TH est associée à une augmentation du risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire, indépendamment des niveaux de pression artérielle (Xie, 2019 ; Stevens, 2016 ; Tatasciore, 2007 ; Rothwell, 2010) et a par ailleurs été mise en cause dans le développement de l'hypertension neurogénique (Menuet, 2017).

Toutes les pathologies pour lesquelles le CRCV est impacté ne seront pas développées et nous nous concentrerons sur celles ayant un lien avec mes études.

3.1.1. Hypertension, couplage respiratoire-sympathique vasomoteur exacerbé et dysfonctionnement des corps carotidiens

L'hypertension artérielle est une condition caractérisée par une élévation persistante de la pression artérielle au repos (c'est-à-dire une pression systolique ≥ 140 mmHg et une pression diastolique ≥ 90 mmHg) (Brouwers, 2021). On distingue l'hypertension essentielle ou primaire, qui concerne la majorité des patients hypertendus et pour laquelle il n'existe pas de cause apparente et l'hypertension secondaire, qui concerne environ 10% des patients et dont la cause sous-jacente est identifiable et peut être potentiellement corrigée (Brouwers, 2021). Si elle n'est pas traitée, l'hypertension artérielle entraîne un épaississement et une rigidification des artères, ainsi qu'un épaississement de la paroi du ventricule gauche et une diminution de sa contractilité, en raison de l'augmentation de la charge de travail du cœur. C'est un problème de santé publique majeure puisqu'on estime qu'elle touche plus d'un milliard de personnes dans le monde, que sa prévalence a doublé entre 1990 et 2019 et qu'elle est le principal contributeur de la mortalité prématurée avec 10.8 millions de décès à travers le monde en 2019 (GBD Risk Factors Collaborators, 2019 ; NCD Risk Factor Collaboration, 2021). L'hypertension artérielle est également caractérisée par une diminution de sa composante cardiaque parasympathique, induisant une baisse de la RespVRC, et par une augmentation de la composante sympathique vasomotrice du couplage respiratoire-cardiovasculaire, induisant une augmentation des ondes TH (Menuet, 2017 ; Xie, 2019), un aspect qui nous intéresse particulièrement.

3.1.1.1. L'hypertension neurogénique

L'hypertension neurogénique est caractérisée par un dysfonctionnement du système nerveux autonome incluant une activité sympathique élevée et des réflexes régulateurs de la fonction cardiovasculaire altérés (Gonzalez, 1983 ; Grassi, 2009). Cette hyperactivité sympathique est observée dès la période pré-hypertensive (qui correspond à une phase où la pression artérielle est plus élevée que la normale mais n'est pas encore au seuil diagnostique de l'hypertension) et persiste après installation de l'hypertension chronique (Julius, 1991 ; Grassi, 2015 ; Lee, 1987).

Il semblerait qu'elle participe au développement de l'hypertension puisque l'ablation globale des nerfs sympathiques pendant la période pré-hypertensive sur un modèle de rat développant

spontanément de l'hypertension atténue l'augmentation de la pression artérielle de ces rats à l'âge adulte (Lee, 1987) (Fig. 23e).

Toutefois, que ce soit chez les patients ou les modèles animaux d'hypertension, cette augmentation d'activité sympathique est associée à une exacerbation de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et des ondes TH qui en résultent (Menuet, 2017 ; Xie, 2019 ; Simms, 2009 ; Zoccal, 2008) (Fig. 23a-c). Ces oscillations, présentes en période pré-hypertendue, semblent directement impliquées dans le développement de l'hypertension. En effet, des modélisations mathématiques dont les résultats ont été confirmés *in vivo* montrent que les vaisseaux répondent mieux à des stimulations phasiques qu'à des stimulations toniques, pour une même fréquence. Ainsi l'amplification de la modulation respiratoire de l'activité sympathique, en augmentant les ondes TH, induit une vasoconstriction accrue et contribuerait à la réduction de la compliance vasculaire caractéristique de l'hypertension (Briant, 2015a, b). De plus, la diminution spécifique de la modulation respiratoire de l'activité sympathique (et donc des ondes TH) pendant la période pré-hypertendue chez le rat spontanément hypertendu juvénile atténue l'augmentation de la pression artérielle normalement observée à l'âge adulte, et ce, dans une proportion similaire à l'ablation globale des nerfs sympathiques (Menuet, 2017 ; Lee, 1987) (Fig. 23d,e).

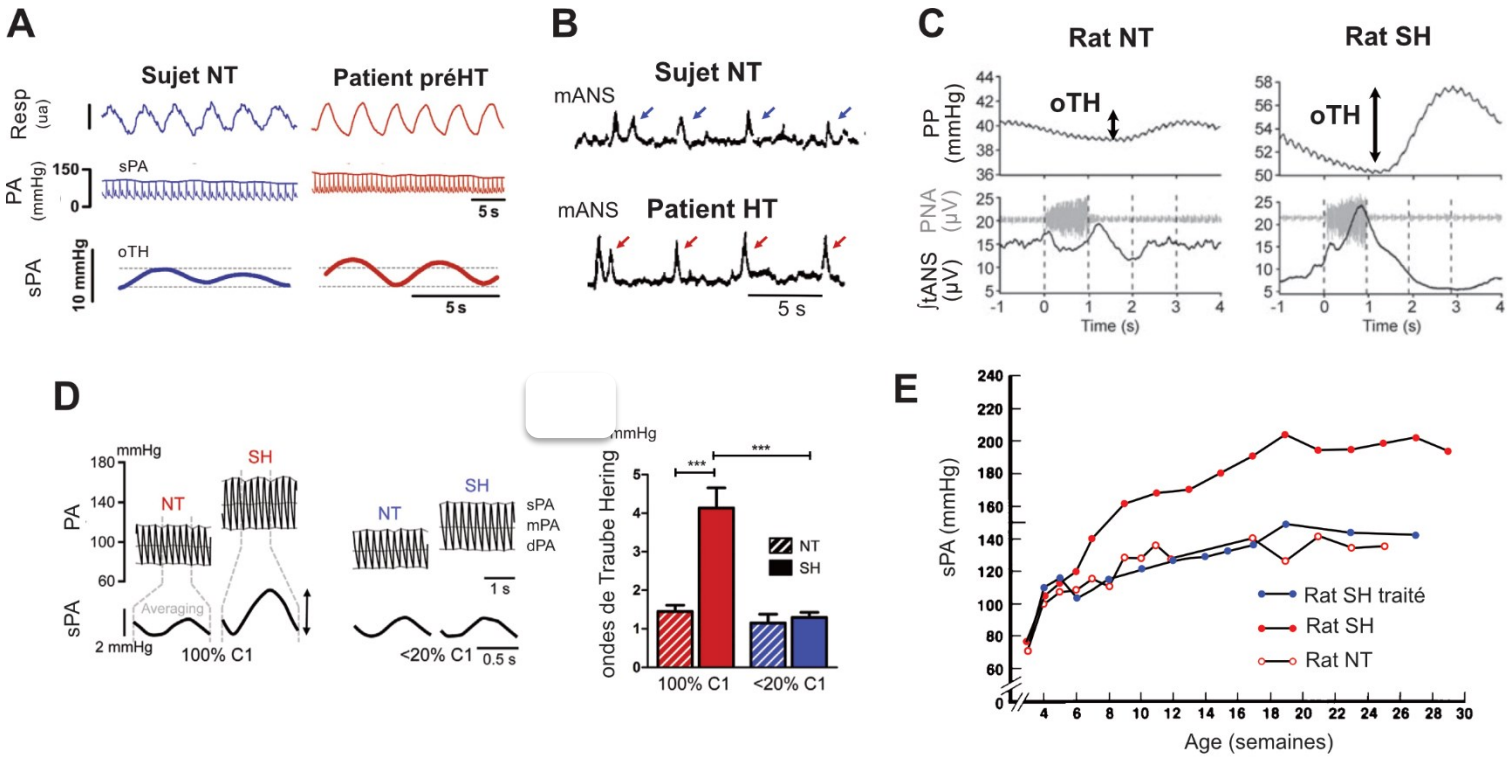


Figure 23. L'hypertension neurogénique est liée à une modulation respiratoire de l'activité sympathique excessive (adapté de Menuet, 2017 ; Simms, 2009 ; Somers, 1988 et Lee, 1987). (**A**) Les ondes TH sont amplifiées chez des patients pré-hypertendus (préHT, à droite) par rapport à des sujets normotendus (NT, à gauche). La pression artérielle et la respiration ont été respectivement mesurées grâce à un moniteur de pression artérielle non invasif placé autour des doigts et d'une ceinture respiratoire piezoélectrique placée autour du thorax. (**B**) L'activité nerveuse sympathique musculaire vasomotrice mesurée par microneurographie est plus importante chez le patient hypertendu (HT) que chez le sujet normotendu. (**C**) Le moyennage de la pression de perfusion (PP, équivalent de la pression artérielle dans cette condition expérimentale) et de l'activité nerveuse sympathique thoracique (tANS) par rapport à la décharge phrénique (PNA) sur 20 cycles respiratoires montre que les ondes TH et la modulation respiratoire de l'activité sympathique sont exacerbées chez les rats spontanément hypertendus (à droite) par rapport aux rats normotendus (à gauche). (**D**) Mesure par télémétrie de la pression artérielle de rats adultes spontanément hypertendus (SH) ou normotendus (NT) intacts (à gauche) ou chez qui la majorité des neurones C1 ont été supprimés en période juvénile pré-hypertendue (à droite). Les neurones C1 ont une activité excitatrice modulée par des neurones respiratoires et qui est impliquée dans la modulation de l'activité sympathique. Il a été montré que certains de ces neurones ont une décharge liée à l'inspiration amplifiée chez le rat hypertendu. La suppression des neurones C1 en période pré-hypertendue chez le rat SH diminue les ondes TH ainsi que la pression artérielle de ces rats à l'âge adulte. (**E)** La sympathectomie pharmacologique pendant la période pré-hypertendue diminue la pression artérielle systolique et l'hypertension du rat SH adulte (rat SH traité) par rapport au rat SH non traité (rat SH). Resp : respiration, PA : pression artérielle, sPA : pression artérielle systolique, oTH : ondes de Traube-Hering, mANS : activité nerveuse sympathique musculaire.

3.2.2.2.1. Implication des corps carotidiens dans l'hypertension neurogénique

Les systèmes de régulation respiratoire et cardiovasculaire interagissent étroitement. Parmi les mécanismes physiologiques modulant directement l'activité sympathique et pouvant contribuer à son amplification ainsi qu'au développement de l'hypertension artérielle, les corps carotidiens (CC) ont suscité un intérêt croissant ces dernières années. En effet, le réseau central du chémoréflexe périphérique comprend des projections des neurones du NTS vers la RVLM, et la stimulation des corps carotidiens entraîne une forte sympathoexcitation par la stimulation de cette région présympathique (Shao, 2024 ; Terui, 1986 ; Zera, 2019) (Fig. 12).

Des autopsies menées sur des patients décédés de diverses pathologies ont révélé une hyperplasie des CC chez les patients hypertendus, suggérant un dysfonctionnement de ces organes dans l'hypertension (Edwards, 1971). Toutefois, ces observations ne permettent pas de déterminer si cette altération est une cause ou une conséquence de la maladie, ni si elle entraînait des conséquences fonctionnelles. Peu de temps après, Przybylski et al. (1978) ont observé que les rats spontanément hypertendus juvéniles présentaient une hyperventilation alvéolaire associée à une alcalose respiratoire, suggérant une hyperactivité des CC, ce qui constituait la première preuve fonctionnelle d'un lien entre ces organes et l'hypertension. Cette altération fonctionnelle des CC en lien avec l'hypertension, caractérisée par une augmentation de leur activité spontanée et une hyperréflexie lors d'un challenge hypoxique a par la suite été rapportée chez le patient pré-hypertendu (Somers, 1988), hypertendu (Trzebski, 1982) et le modèle animal (McBryde, 2013 ; Pijacka, 2016) (Fig. 24a,b).

La preuve que ces altérations fonctionnelles des CC sont impliquées dans la mise en place et le maintien de l'hypertension ainsi que dans l'amplification du couplage respiratoire-cardiovasculaire a été obtenue chez le modèle rongeur et l'humain. D'une part, la déafférentation des corps carotidiens par section des nerfs du sinus carotidien chez le rat spontanément hypertendu adulte entraîne une atténuation de la modulation respiratoire de l'activité sympathique, des ondes TH et à terme de la pression artérielle moyenne, ramenant ces paramètres à des niveaux comparables à ceux des rats normotendus (McBryde, 2013 ; Abdala, 2012) (Fig. 24c). De plus, si la déafférentation est réalisée en période pré-hypertendue sur le modèle spontanément hypertendu, cela atténue l'hypertension normalement développée par ces rats à l'âge adulte (Abdala, 2012). Ces effets anti-

hypertenseurs de la résection des CC ont conduit à des essais cliniques pour les patients hypertendus réfractaires aux thérapies médicamenteuses. La résection, bien qu'unilatérale, a réduit la modulation respiratoire de l'activité sympathique de ces patients ainsi que leur pression artérielle (Narkiewicz, 2016). Par ailleurs, l'inhibition de la neurotransmission purinergique excitatrice des corps carotidiens—principalement impliquée dans la réponse sympathoexcitatrice du chémoréflexe périphérique et dont les récepteurs sont surexprimés chez le rat hypertendu—par un blocage pharmacologique des récepteurs P2X3, a des effets similaires à ceux obtenus par la déafférentation des CC chez le rat spontanément hypertendu (Pijacka, 2016).

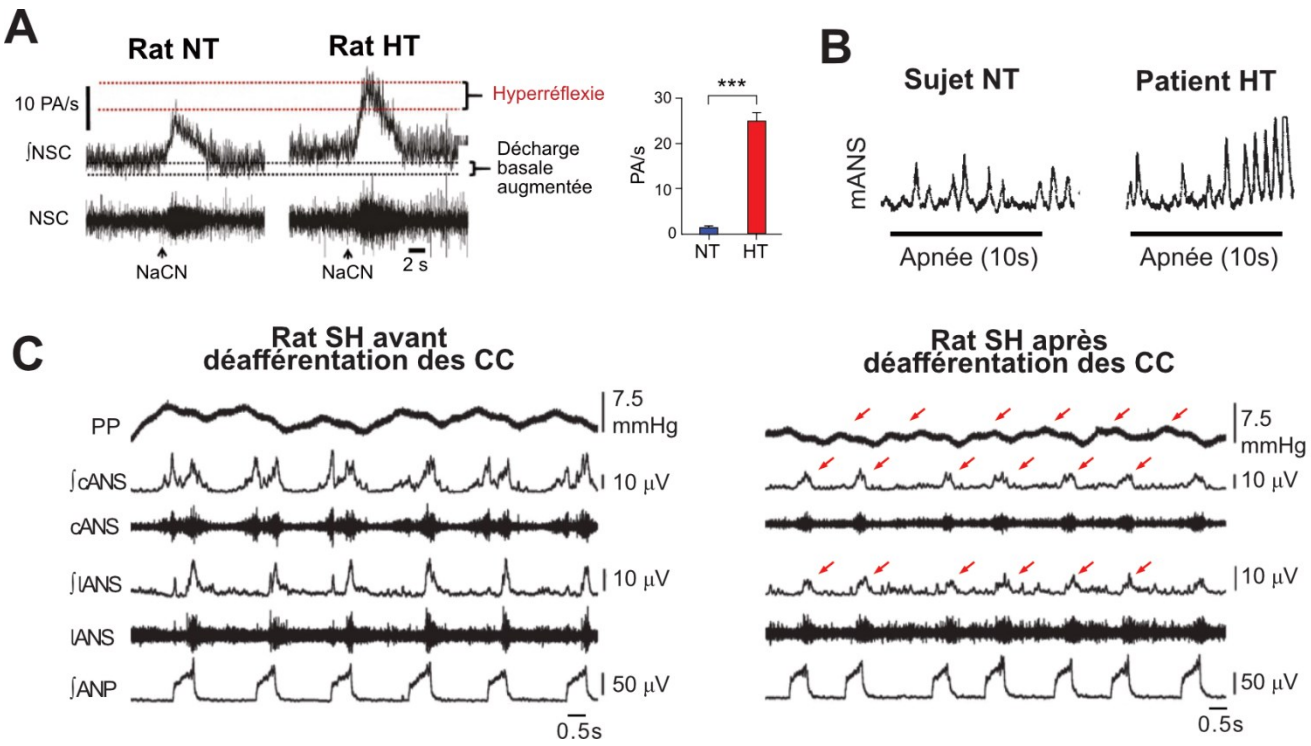


Figure 24. L'hypertension neurogénique est associée à une hypersensibilité des corps carotidiens impliquée dans le maintien de l'hyperactivité sympathique (adapté de Pijacka, 2016 ; Somers, 1988 et McBryde, 2013). (**A**) Enregistrements du nerf du sinus carotidien (NSC) en condition contrôle et lors d'un challenge hypoxique au cyanure de sodium chez un rat normotendu (à gauche) et chez un rat spontanément hypertendu (à droite). La décharge basale ainsi que la réponse des corps carotidiens à l'hypoxie est doublée indiquant une hypersensibilité des CC (graphe à droite). (**B**) Enregistrements de l'activité nerveuse sympathique musculaire vasomotrice chez un sujet normotendu (à gauche) et hypertendu (à droite) lors d'une apnée de 10 secondes. (**C**) Enregistrements *in situ* de la pression de perfusion (PP, équivalent de la pression artérielle dans cette préparation), de l'activité nerveuse sympathique cervicale (cANS) et lombaire (lANS) et de l'activité phrénique intégrée (ANP) chez le rat spontanément hypertendu avant (à gauche) et 40 minutes après (à droite) déafférentation des CC par section des nerfs du sinus carotidien. La déafférentation des CC réduit fortement la modulation respiratoire de l'activité sympathique, l'amplitude des ondes TH et la pression de perfusion. NT : Normotendu ; HT : hypertendu, PA : potentiels d'action ; NaCN, cyanure de sodium ; mANS : activité nerveuse sympathique musculaire ; CC : corps carotidiens.

La modulation respiratoire de l'activité sympathique est amplifiée dans ce contexte et l'enregistrement des nerfs sympathiques chez le rat spontanément hypertendu montre que le patron de la modulation respiratoire de l'activité sympathique est modifié. Elle démarre plus tôt dans l'inspiration et sa composante la plus ample, qui atteint normalement un pic à la transition entre l'inspiration et la post-inspiration, est amplifiée et est décalée plus tôt dans l'inspiration (Simms, 2009 ; Menuet, 2017) (Fig. 23c). Ces modifications semblent résulter de plusieurs mécanismes puisque la dénervation des CC n'induit pas la restauration immédiate du patron de la modulation respiratoire sympathique, qui n'est significativement réduite qu'à partir d'une heure après la déafférentation (McBryde, 2013 ; Pijacka, 2016). Cela proviendrait en partie d'altérations centrales affectant le couplage entre les neurones respiratoires et les neurones présympathiques (Moraes, 2014) puisque la déafférentation des CC ainsi que des barorécepteurs sur la préparation *in situ de rats* spontanément hypertendus (paralysés) n'affecte pas la cinétique de la diminution de l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité sympathique (Simms, 2009).

L'ensemble de ces travaux semble indiquer que les corps carotidiens ont un effet hypertenseur *via* une plasticité pathologique de la voie sympathoexcitatrice du chémoréflexe périphérique, et qu'ils sont impliqués dans l'amplification du couplage respiratoire-sympathique vasomoteur, laquelle joue un rôle causal dans l'hypertension neurogénique. Cependant, la plupart des données décrites jusqu'ici sont basées chez l'Humain et sur un modèle rongeur d'hypertension dont les mécanismes impliqués dans le développement de l'hypertension sont très probablement multifactoriels (Simms, 2009 ; Yamori, 1977 ; Trippodo & Frolich, 1981). Par ailleurs, ces études n'identifient pas de mécanisme précis qui serait à l'origine du dysfonctionnement des CC et de l'altération du couplage respiratoire-sympathique vasomoteur.

En revanche, il existe une pathologie qui implique directement la sur-stimulation des corps carotidiens dans le développement de l'hypertension artérielle : les apnées du sommeil.

3.1.1.2. Hypertension et altérations du CRCV : les apnées obstructives du sommeil

Les apnées du sommeil sont des troubles respiratoires caractérisés par des arrêts répétés de la respiration pendant le sommeil qui résultent en des épisodes hypoxiques répétés et une désaturation en dioxygène sanguin. Elles se scindent en deux catégories : les apnées du sommeil centrales, causées par un dysfonctionnement du contrôle central respiratoire, et les apnées du sommeil obstructives, liées à une obstruction des voies aériennes supérieures malgré un effort respiratoire maintenu (Dempsey, 2019 ; Brown, 2022). L'obstruction des voies aériennes supérieures chez les patients souffrant d'apnées obstructives résulte de plusieurs facteurs incluant un indice de masse corporelle élevé caractérisé par une accumulation de tissu adipeux au niveau du cou qui rétrécit les voies aériennes, et le vieillissement, qui est associé à une perte de la tonicité des muscles laryngo-pharyngés (Tufik, 2010 ; Venkataraman, 2020). Ces facteurs s'ajoutent à la diminution physiologique du tonus musculaire pendant le sommeil provoquant plusieurs épisodes d'obstruction partielle ou totale des voies aériennes supérieures pendant le repos (Venkataraman, 2020).

Bien que les apnées centrales soient aussi associées à des pathologies cardiovasculaires (Dempsey, 2019), nous ne nous concentrerons que sur l'hypertension induite par les apnées obstructives. En effet, l'amplification du couplage respiratoire-sympathique vasomoteur, qui est causale à l'hypertension neurogénique, implique des altérations du couplage central entre les neurones respiratoires et les neurones présympathiques (Moraes, 2014 ; Simms, 2009 ; Menuet, 2017). Or, les patients atteints d'apnées centrales présentent un dysfonctionnement du contrôle respiratoire central qui pourrait potentiellement faire partie des mécanismes à l'origine de l'hypertension, en affectant directement le couplage central respiratoire-sympathique vasomoteur, en plus des apnées observées. Ce dysfonctionnement est un facteur confondant important qui complexifie l'établissement d'un lien de causalité entre stimulation des CC, amplification du couplage respiratoire-sympathique vasomoteur et hypertension.

Les patients atteints du syndrome d'apnées obstructives du sommeil présentent un risque accru de développer une hypertension artérielle, souvent réfractaire. Un risque qui augmente avec la sévérité du syndrome, caractérisé par le nombre d'épisodes apnéiques par nuit (Hou, 2018 ; Brown, 2022 ; Peppard, 2000). Cela suggère un déséquilibre du système nerveux autonome chez ces patients. En

effet, ils présentent des niveaux de pression artérielle élevés, y compris en journée en l'absence d'apnées (Peppard, 2000 ; Narkiewicz, 1998). Cette pression artérielle élevée est liée à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique, observée directement par microneurographie et indirectement par la mesure des taux en catécholamines circulantes et urinaires (Somers, 1995 ; Narkiewicz, 1998 ; Carlson, 1993).

Les corps carotidiens, particulièrement sensibles à l'hypoxie, sont stimulés par les apnées répétées de ces patients et semblent directement impliqués dans les déséquilibres sympathiques et parasympathiques associés à cette condition. Pour commencer, le nombre d'apnées nocturnes est corrélé aux taux en catécholamines circulantes, montrant un lien entre stimulation des CC et activation sympathique (Peppard, 2000 ; Carlson, 1993 ; Hou, 2018). Par ailleurs, l'utilisation d'assistances respiratoires en pression positive continue qui gardent les voies respiratoires ouvertes et diminuent le nombre d'épisodes hypoxiques nocturnes, réduit l'activité nerveuse sympathique vasomotrice chez certains patients (Sommers, 1995). De plus, la diminution de la décharge des CC par une ventilation hyperoxique à 100% d'O_2 (test de Dejours), atténue l'activité nerveuse sympathique ainsi que la pression artérielle des patients pendant la durée du test (Narkiewicz, 1998). Enfin, l'enregistrement de l'activité nerveuse sympathique de ces patients révèle une hyperréflexie des CC qui induit une réponse sympathoexciatrice et vasomotrice plus marquée que les sujets sains lors d'un challenge hypoxique ou d'une apnée (Narkiewicz, 1999).

L'ensemble de ces travaux met en évidence que les CC des patients atteints d'apnées obstructives du sommeil sont hyperactifs, hypersensibles et sont liés à l'hyperactivité sympathique mesurée chez ces patients. De manière intéressante, il a été rapporté que la modulation respiratoire de l'activité sympathique des patients souffrant d'apnées obstructives est altérée, avec une proportion plus importante de la composante à la transition entre l'inspiration et la post-inspiration, et que l'utilisation d'assistances respiratoires nocturnes qui aident à l'oxygénation restore un patron de modulation respiratoire sympathique normal (Fatouleh, 2014).

3.2.2.2.1. Hypertension et altérations du CRCV : l'hypoxie intermittente chronique

Afin de mieux investiguer la relation entre l'activation chronique des CC par les épisodes hypoxiques répétés nuit après nuit sur plusieurs mois voire plusieurs années et le développement de l'hyperactivité sympathique ainsi que de l'hypertension d'un point de vue mécanistique, un modèle rongeur d'hypoxie intermittente chronique (HIC) a été mis au point (Fletcher, 1992). Les rats sont soumis à des cycles d'hypoxie-normoxie (5 minutes de normoxie à 21% d'O_2 suivies d'environ 1 à 4 minutes d'hypoxie à 5% d'O_2) pendant la phase de repos du rat, 8 heures par jour, pour une période allant d'une dizaine de jours à un mois en fonction des effets recherchés (Fletcher, 1992 ; Zoccal, 2008, 2007 ; Machado, 2016).

Les rats exposés à l'HIC développent une hypersensibilité et une hyperactivité des CC ainsi qu'une hypertension associée à une augmentation d'activité sympathique et une diminution de l'activité parasympathique, mimant les effets des apnées du sommeil chez l'humain (Peng, 2003 ; Fletcher, 1992a ; Lesske, 1997 ; Zoccal, 2007 ; Del Rio, 2016). Le développement de l'hypertension chez ce modèle est lié à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique puisque l'ablation chimique des nerfs sympathiques empêche la pression artérielle d'augmenter en réponse à l'HIC (Lesske, 1997). De plus, la mise en place ainsi que le maintien de l'hyperactivité sympathique et de l'hypertension développée suite à l'HIC est dépendante de la sensibilisation des corps carotidiens puisque 1) la section des nerfs des sinus carotidiens ou l'ablation des CC avant l'HIC prévient le développement de l'hypertension (Fletcher, 1992b ; Souza, 2019), et 2) la cryoablation des CC après HIC diminue les niveaux de pression artérielle, et améliore la balance autonome du cœur au profit du parasympathique (Del Rio, 2016) (Fig. 25b).

Les ondes TH sont amplifiées après l'HIC ce qui est la conséquence de l'augmentation de la modulation respiratoire de l'activité sympathique de ces rats. Les enregistrements *in situ* de l'activité nerveuse sympathique chez les rats HIC révèlent une amplification de la composante post-inspiratoire de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et mettent en évidence une décharge sympathique supplémentaire en phase avec l'activité expiratoire tardive abdominale, qui est elle-même induite par l'hypoxie (Zoccal, 2008 ; Molkov, 2011 ; Machado, 2016 ; Zoccal, 2009) (Fig. 25a). Ces variations résultent d'altérations centrales du couplage entre les neurones

respiratoires et présympathiques de la RVLM (Machado, 2016 ; Moraes, 2013). Les enregistrements *in situ* des neurones présympathiques de la RVLM révèlent une augmentation de leur décharge liée à la respiration non pas causée par une augmentation de l'excitabilité intrinsèque des neurones présympathiques mais par une augmentation des courants post-synaptiques excitateurs qu'ils reçoivent pendant la respiration (Moraes, 2013). Cela proviendrait d'une augmentation de l'excitabilité intrinsèque des neurones respiratoires, notamment au sein du préBötC, du BötC, du Noyau Kolliker-Fuse et du noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial (Moraes, 2015 ; Molkov, 2011 ; Moraes, 2014 ; da Silva, 2022).

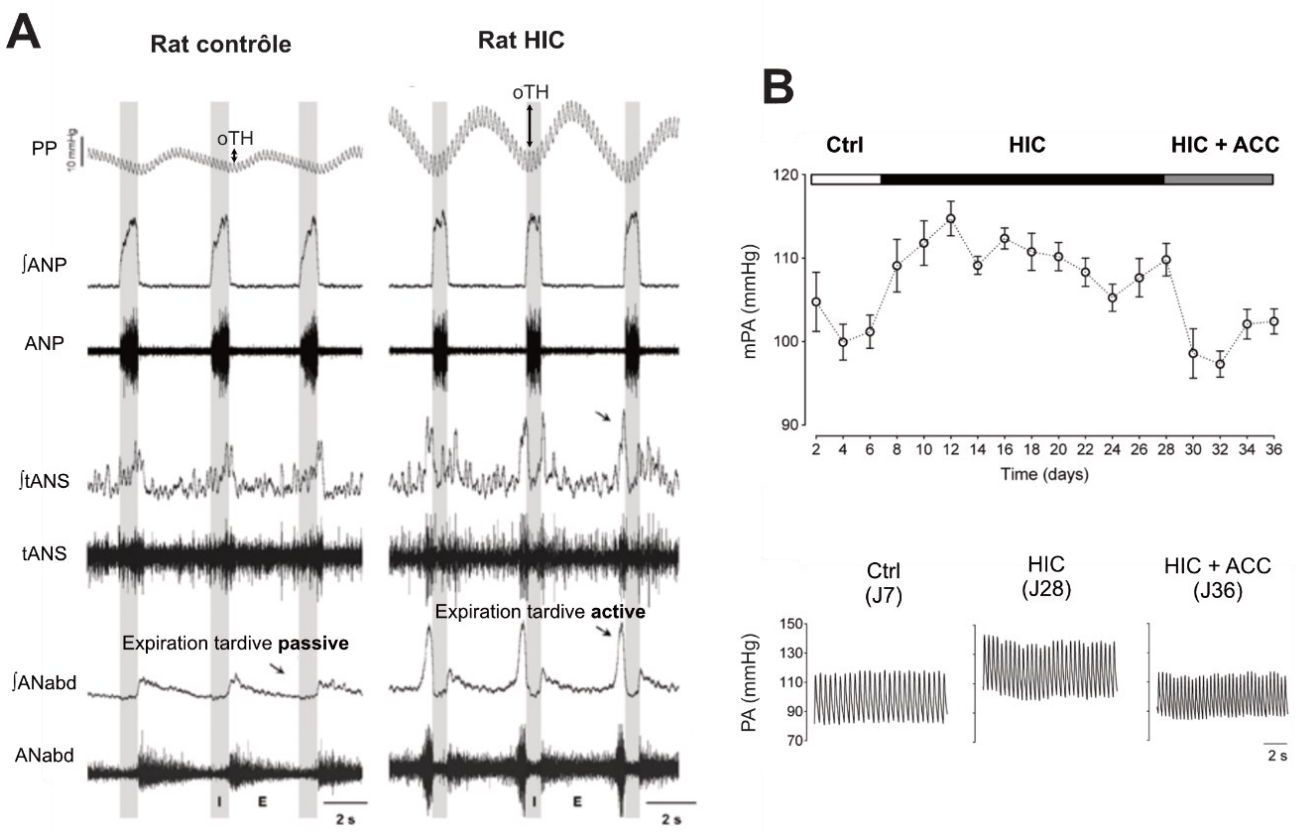


Figure 25. L'HIC cause une hypertension médiée par les corps carotidiens (adapté de Moraes, 2012 et Del Rio 2016). (**A**) Enregistrements *in situ* de l'activité des nerfs abdominaux (ANabd), de la chaîne sympathique thoracique (tANS), du nerf phrénique (ANP) et de la pression de perfusion (PP) chez un rat contrôle (à gauche) et soumis à l'HIC (à droite). L'HIC entraine le développement d'une expiration tardive active pour palier l'augmentation métabolique. La modulation respiratoire de l'activité sympathique et les ondes TH sont augmentées après HIC. Notez le pic à la transition entre l'expiration et l'inspiration, en phase avec l'activité abdominale (indiqué par les flèches) lequel est absent chez le rat non exposé à l'HIC. (**B**) Effets de la cryoablation des corps carotidiens (HIC + ACC) sur la pression artérielle d'un rat soumis 20 jours à l'HIC. La pression artérielle décroit immédiatement après ablation des CC. oTH : ondes TH ; mPA : pression artérielle moyenne ; PA : pression artérielle ; Ctrl : Période contrôle ; HIC : hypoxies intermittentes chroniques ; HIC + ACC : hypoxies intermittentes chroniques + ablation des corps carotidiens.

Ainsi, la stimulation répétée des CC par des épisodes hypoxiques intermittents entraîne une plasticité pathologique de ces organes liée à la dérégulation de facteurs de transcriptions activés par l'hypoxie, les rendant hyperactifs (Prabhakar & Semenza, 2012, Del Rio, 2010). L'amplification des entrées sensorielles du chémoréflexe périphérique liée à l'hypersensibilité des CC est impliquée dans l'altération de l'activité des réseaux respiratoires et cardiovasculaires entrainant une augmentation d'activité sympathique et de sa modulation respiratoire, responsables d'une élévation des ondes TH ainsi que de la pression artérielle, et à terme, de l'hypertension.

L'ensemble des études chez l'humain ou l'animal qui montrent que le couplage respiratoire-cardiovasculaire est altéré ne s'y intéressent que d'un point de vue chronique, une fois que la plasticité pathologique est déjà établie. L'objectif de mon second projet de thèse a été d'investiguer la relation causale entre la stimulation répétée aiguë des corps carotidiens et l'amplification de la composante respiratoire-sympathique vasomotrice du couplage respiratoire-cardiovasculaire (cf. Résultats partie 2).

3.1.2. Insuffisance cardiaque chronique et altérations du CRCV

L'insuffisance cardiaque chronique est une pathologie caractérisée par un ensemble d'altérations structurelles et fonctionnelles du cœur qui affectent la fonction cardiaque au repos et/ou pendant l'exercice (Heindenreich, 2022 ; McDonagh, 2021). Sont fréquemment retrouvés chez les patients insuffisants cardiaques : une hypertrophie des parois cardiaques, un dysfonctionnement ventriculaire associé à un volume d'éjection systolique et un débit cardiaque réduits ou encore une fréquence cardiaque élevée (Heindenreich, 2022 ; Shanks, 2022). L'insuffisance cardiaque chronique peut résulter de multiples causes et les facteurs de risque les plus importants ainsi que plus communément observés incluent les infarctus du myocarde, les cardiomyopathies et l'hypertension artérielle (McDonagh, 2021 ; Lloyd-Jones, 2002).

Cette pathologie, qui est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde (McDonagh, 2021 ; Lloyd-Jones, 2002), est également liée à un déséquilibre autonome incluant une hyperactivité sympathique vasomotrice et une hypoactivité parasympathique cardiaque associée à la perte de la RespVRC (La Rovere, 1998 ; Del Rio, 2013 ; Haigney, 2014 ; Thayer, 2010).

Le stimulateur cardiaque (ou pacemaker) est un dispositif médical utilisé pour atténuer les symptômes des patients insuffisants cardiaques, notamment lorsqu'ils sont réfractaires aux traitements médicamenteux (McDonagh, 2021). Il optimise la fonction cardiaque en améliorant la synchronicité cardiaque et en augmentant la fraction d'éjection ventriculaire gauche, ce qui favorise un débit cardiaque plus efficace et réduit la charge de travail du cœur affaibli (Hochleitner, 1990 ; Abraham, 2002). Toutefois, la plupart des stimulateurs cardiaques impose un rythme constant et tonique, alors que les données tendent à montrer que la variabilité cardiaque, en particulier la RespVRC, optimise la fonction cardiaque en réduisant son travail et est associée à une bonne santé cardiovasculaire (Ben-Tal, 2012 ; Elstad, 2018).

Des études récentes ont exploré les effets de la restauration de la RespVRC à l'aide d'un stimulateur cardiaque synchronisé avec l'activité électromyographique diaphragmatique chez des modèles animaux d'insuffisance cardiaque. Restaurer la RespVRC a permis d'améliorer la fonction cardiaque et la survie de ces animaux grâce à une augmentation du débit cardiaque résultant d'une meilleure fonction ventriculaire ainsi que d'une réduction de la résistance vasculaire systémique. De plus ce mode de stimulation cardiaque a réduit l'hypertrophie des cardiomyocytes caractéristique de cette pathologie et ainsi restauré la morphologie du tissu cardiaque (O'Callaghan, 2020 ; Shanks, 2022). Ces résultats, qui soulignent l'importance physiologique de la RespVRC dans la fonction cardiovasculaire, offrent de nouvelles perspectives de stratégies thérapeutiques.

3.2. Modulations physiologiques du CRCV, une lueur d'espoir ?

Les altérations du couplage respiratoire-cardiovasculaire jouent un rôle clé dans le développement et l'aggravation de nombreuses pathologies, notamment l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque chronique. Ces dysfonctionnements, qui entraînent une surcharge du système cardiovasculaire et contribuent à son usure prématurée ainsi qu'à un risque accru de mortalité, soulignent l'importance du CRCV dans l'intégrité des organismes. Comme l'ont montré les résultats obtenus par O'Callaghan (2020) et Shanks (2022), la RespVRC exerce un rôle cardioprotecteur majeur. Comprendre comment amplifier physiologiquement ce phénomène permettrait d'innover dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

3.2.1. Facteurs physiologiques modulant la RespVRC

Plusieurs facteurs physiologiques et comportementaux influencent la RespVRC. Tout d'abord la pratique régulière d'un exercice physique augmente le tonus parasympathique cardiaque basal ce qui permet notamment une meilleure réactivité du tonus parasympathique sur le cœur au repos ou lors d'efforts. De plus, les athlètes ont une RespVRC plus ample que les personnes sédentaires (Korsak, 2023 ; De Meersman, 1992, 1993).

Ensuite, l'état psychologique influence de manière significative la RespVRC et l'état de stress diminue son amplitude (Grippo, 2009 ; Quintana, 2013). Une des premières méthodes empiriques pour auto-réguler l'anxiété consiste à moduler sa respiration, en prenant des inspirations lentes et profondes qui permettent de calmer son rythme cardiaque et promeuvent la relaxation (Jerath, 2015 ; Zaccaro, 2018). De nombreuses études montrent que les techniques de respiration lente et profonde (environ six cycles respiratoires par minute) entraînent une réduction de l'activité du système nerveux sympathique au profit d'une activation parasympathique accrue accompagnée d'une amplification de la RespVRC (Dick, 2014 ; Ben-Tal, 2012 ; Jerath, 2015). Ces effets de la fréquence respiratoire sur la balance entre activité sympathique et parasympathique ainsi que sur la RespVRC jouent un rôle clé dans les effets relaxants ressentis lors de pratiques comme le Yoga ou la méditation, qui utilisent ces techniques respiratoires (Zaccaro, 2018 ; Dick, 2014 ; Jerath, 2015).

Par ailleurs, la RespVRC est influencée par les interactions sociales, notamment lors des interactions positives entre un parent et son enfant. Ainsi, l'amplitude de la RespVRC est amplifiée chez les mères jouant avec leur enfant (Giuliano, 2015) ou chez le nouveau-né et la mère lors du contact peau à peau (Van Puyvelde, 2015).

Le système ocytocinergique participe à la régulation des comportements pro-sociaux, et particulièrement le comportement parental. Il a été montré que les interactions parents-enfants positives incluant les contacts affectueux favorisent la libération d'ocytocine (Feldman, 2010 ; Quintana, 2013). De plus, ces comportements sont associés à une amplitude de la RespVRC augmentée (Giuliano, 2015 ; Van Puyvelde, 2015 ; Quintana, 2013). Or il est connu que l'ocytocine joue un rôle dans la régulation cardiovasculaire (Higa, 2002 ; Petersson, 1996 ; Quintana, 2013 ; Japundžić-Žigon, 2020).

3.2.2. Rôle de l'ocytocine dans la modulation de la RespVRC

3.2.2.1. Régulation cardiovasculaire périphérique par l'ocytocine

L'ocytocine est un neuropeptide principalement synthétisé par les neurones magnocellulaires et parvocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus (Fig. 26). Ces noyaux contiennent également une population distincte de neurones, non ocytocinergiques, lesquels synthétisent de la vasopressine. Ce neuropeptide qui diffère de l'ocytocine par 2 acides aminés, module également la fonction cardiovasculaire, en exerçant généralement des effets opposés à ceux de l'ocytocine (Quintana, 2013 ; Japundžić-Žigon, 2020).

L'ocytocine, libérée dans la circulation systémique par la neurohypophyse qui reçoit les projections des neurones ocytocinergiques hypothalamiques, a une action périphérique sur la fonction cardiovasculaire *via* ses récepteurs notamment localisés dans les parois du cœur et dans l'épithélium vasculaire (Jankowski, 1998 ; Thibonnier, 1999). Cette hormone tend à avoir un effet cardioprotecteur puisque d'une part l'injection d'ocytocine diminue la pression artérielle et la fréquence cardiaque chez la souris, ainsi que la pression artérielle chez la femme lors de l'accouchement (Petersson, 1996 ; Thomas, 2007). Par ailleurs, l'ocytocine atténue la vasoconstriction et la cardioaccélération en réponse au stress (Bernatova, 2004 ; Wsol, 2008 ; Braga, 2000). Ces effets vagomimétiques sont médiés en partie par la production vasculaire de l'oxyde nitrique synthase et d'un peptide cardiaque (le facteur natriurétique auriculaire) qui induisent une vasodilatation (Japundžić-Žigon, 2020). De plus, l'ocytocine favorise la cardiomyogenèse et la régénération des cardiomyocytes après un infarctus (Kobayashi, 2009 ; Japundžić-Žigon, 2020). Mais outre son action périphérique, l'ocytocine agit aussi centralement pour réguler la fonction cardiovasculaire, par la modulation des réseaux autonomes cardiovasculaires.

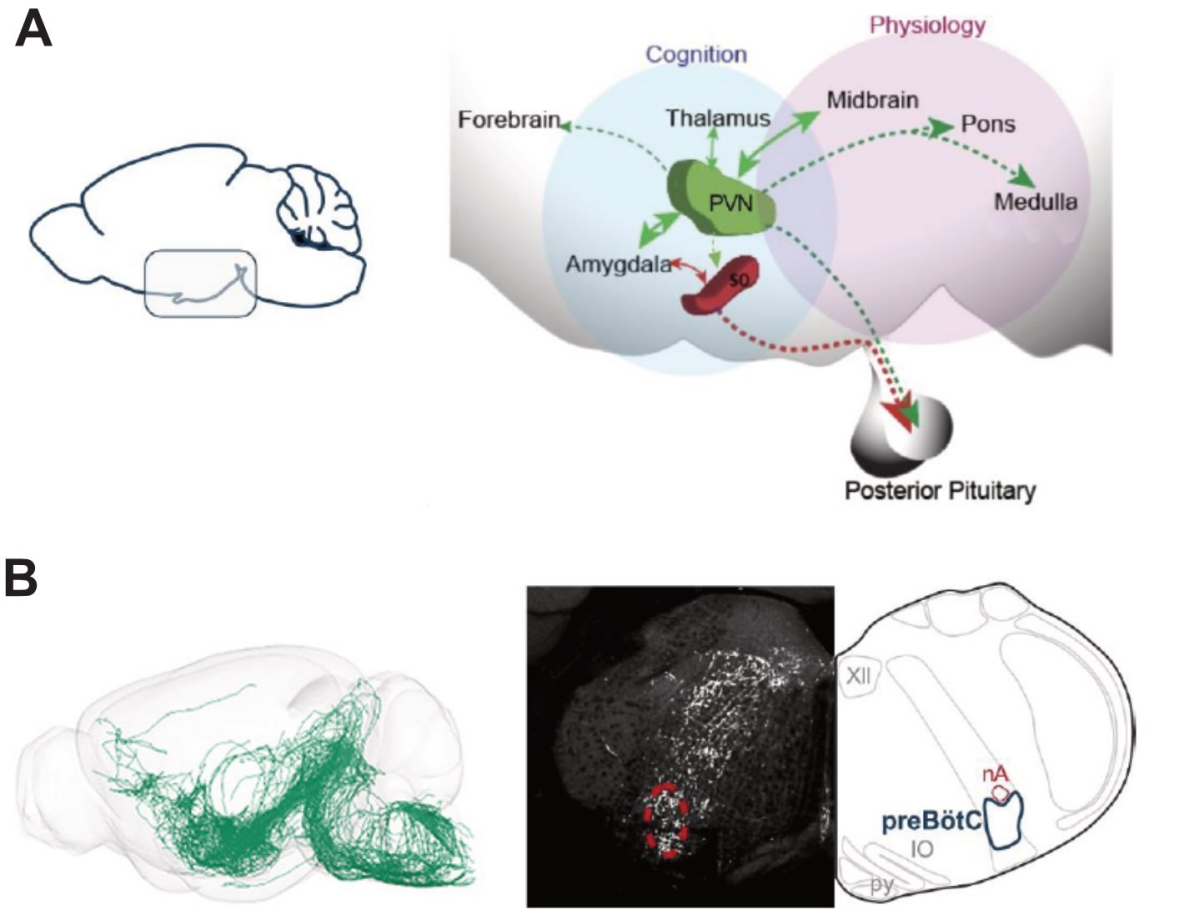


Figure 26. Projections des neurones ocytocinergiques (adapté de Li, 2024). (**A**) Schéma des projections des neurones ocytocinergiques du PVN (vert) et du noyau supraoptique (rouge). (**B**) A gauche : reconstruction des projections ocytocinergiques du cerveau d'une souris OT-cre injectée avec un virus de traçage antérograde (AAV-DiO-YPET-mGFP) dans le noyau paraventriculaire. A droite : Les neurones ocytocinergiques projettent dans la région du préBötC et du nA (pointillés rouges). IO : olives inférieures ; nA : noyau Ambigu ; préBötC : complexe de pré-Bötzinger ; PVN : noyau paraventriculaire ; py : tractus pyramidal ; SO : noyau supraoptique ; XII : noyau moteur hypoglosse.

3.2.2.2. Régulation cardiovasculaire centrale par l'ocytocine

Les neurones parvocellulaires ocytocinergiques du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus projettent dans plusieurs régions du cerveau antérieur et du tronc cérébral où l'ocytocine, co-libérée avec des neurotransmetteurs comme le glutamate, va moduler l'activité des réseaux neuronaux (Son, 2022 ; Piñol, 2014) (Fig. 26). Ils contactent notamment plusieurs régions du tronc cérébral essentielles pour le contrôle respiratoire et la régulation cardiovasculaire, incluant le

noyau moteur dorsal du vague, le nA, la RVLM, le préBötC et le NTS (Son, 2022 ; Lee, 2013 ; Li, 2024) (Fig. 26b).

Concernant la régulation cardiovasculaire parasympathique, la plupart des études se sont concentrées sur les effets de l'ocytocine sur le noyau moteur dorsal du vague. L'injection d'ocytocine dans le noyau moteur dorsal du vague est responsable d'une bradycardie chez le rat anesthésié (Rogers & Hermann, 1985). Cet effet passe par une augmentation d'excitabilité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques induite par l'ocytocine, qui potentialise la transmission glutamatergique des fibres ocytocinergiques vers ces neurones (Charpak, 1984 ; Piñol, 2014). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans l'augmentation d'activité des neurones préganglionnaires cardiaques du noyau moteur dorsal du vague observée chez les rats entrainés puisqu'il a été montré que l'entraînement physique augmente le nombre de projections ocytocinergiques ainsi que les concentrations en ocytocine dans cette région (Korsak, 2023 ; Braga, 2000 ; Rochas-Santos, 2020). Ainsi, bien qu'il n'y ait pas d'étude à ce sujet, un mécanisme similaire pourrait contribuer à l'amplification de la RespVRC observée chez les athlètes puisque l'entrainement augmente les concentrations d'ocytocine circulante et intracérébrale dans la région du bulbe ventral où sont localisés les neurones préganglionnaires cardiaques du nA (Hew-Butler, 2008 ; de Jong, 2015 ; Braga, 2000). Par ailleurs, les autres situations physiologiques qui sont associées à une amplification de la RespVRC, comme la méditation ou les interactions positives parents-enfants, sont également des états qui favorisent la libération d'ocytocine (Feldman, 2010 ; Quintana, 2013 ; Bellosta-Batalla, 2020 ; Jayaram, 2013). L'ensemble de ces observations tend à montrer un lien entre l'ocytocine et l'amplification de la RespVRC mais seulement très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués.

3.2.2.2.1. Modulation centrale des réseaux de la RespVRC par l'ocytocine

Quelques études ont démontré que l'administration intranasale d'ocytocine augmente la RespVRC chez l'humain au repos ou chez les patients souffrant d'apnées du sommeil (Kemp, 2012 ; Cosme, 2023 ; Norman, 2011 ; Jain, 2017) (Fig. 27). Mais une injection intranasale peut avoir des effets périphériques et centraux et ces études ayant été réalisées chez l'humain, les mécanismes impliqués n'ont pas été investigués. Par ailleurs, il n'y a que très peu de données expérimentales sur la modulation ocytocinergique de l'activité des neurones impliqués dans le couplage respiratoire-cardiovasculaire.

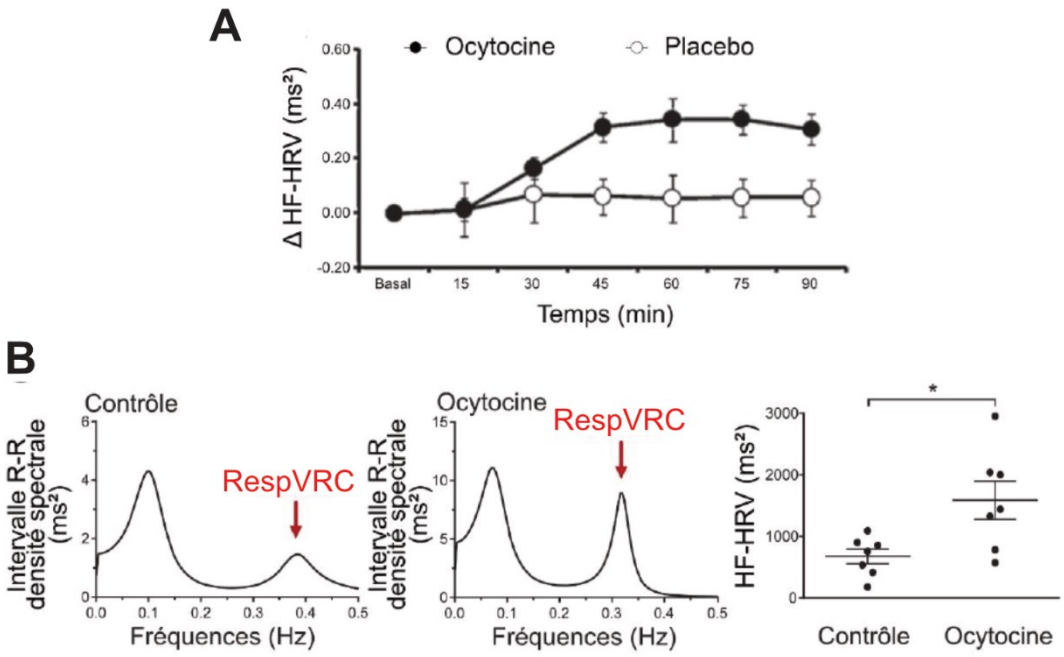


Figure 27. L'injection intranasale d'ocytocine amplifie la RespVRC (adapté de Norman, 2011 et Jain, 2017). Effets de l'injection intranasale d'ocytocine chez des sujets sains (**A**) et chez des patients souffrants d'apnées obstructives du sommeil (**B**). (**B**) L'augmentation de la RespVRC à la suite de l'injection intranasale d'ocytocine est ici représentée par une augmentation de la densité spectrale dans le domaine des hautes fréquences (HF-HRV) correspondant à la fréquence respiratoire des patients.

Une étude montre que l'injection intrapéritonéale d'ocytocine chez des campagnols de prairies induit un couplage fonctionnel entre l'activité des neurones du nA et du noyau paraventriculaire (Yee, 2016). Toutefois, les mesures d'activité globale du nA n'ont pas distingué les sous-types neuronaux au sein de ce noyau, ce qui ne permet donc pas d'établir un lien spécifique avec les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaque. Quelques études rapportent aussi que l'ocytocine participe à la modulation des activités respiratoires et cardiovasculaires en partie par une action dans la région du préBötC (Yeh, 1997 ; Mack, 2002 ; Mack, 2007). En effet, la stimulation pharmacologique du noyau paraventriculaire augmente la fréquence respiratoire et l'amplitude inspiratoire. Ces effets sont bloqués par l'injection d'un antagoniste ocytocinergique dans le préBötC (Yeh, 1997 ; Mack, 2007). De plus, l'injection d'ocytocine dans le préBötC induit les mêmes effets respiratoires (Mack, 2002). Puisque le patron de la décharge inspiratoire est modulé par les neurones inhibiteurs du préBötC, cela pourrait suggérer que les effets respiratoires de l'ocytocine dans le préBötC sont au moins en partie médiés par ces neurones. Les neurones du préBötC étant impliqués dans la RespVRC par le couplage avec les neurones du nA, on pourrait s'attendre à une variation de la RespVRC quand l'activité du préBötC est modulée. Cependant, aucune mesure de la RespVRC n'a été réalisée dans ces travaux.

L'ensemble de ces travaux indique que l'ocytocine potentialise l'amplitude de la RespVRC et suggère que cet effet pourrait passer par la modulation ocytocinergique centrale des neurones impliqués dans la génération du couplage respiratoire-cardiovasculaire. L'étude menée par Buron et al. 2023, à laquelle j'ai participé et qui constitue mon troisième projet de thèse, avait pour objectif d'identifier si l'amplification de la RespVRC par l'ocytocine passait bien par un effet sur le préBötC ou le nA, et de caractériser les neurones impliqués (cf. résultats partie 3 et Annexe partie 2).

Pour conclure ce troisième chapitre, le couplage respiratoire-cardiovasculaire est essentiel à l'homéostasie gazeuse sanguine et à la santé cardiovasculaire. Son altération, impliquée dans des pathologies comme l'hypertension neurogénique, l'insuffisance cardiaque chronique et les apnées du sommeil, contribue à une usure prématurée du système cardiovasculaire et à une morbidité accrue, soulignant l'importance physiologique de ce phénomène. Par ailleurs, les effets bénéfiques de la restauration de la RespVRC dans l'insuffisance cardiaque chronique et dans les apnées du sommeil ouvrent la voie à des perspectives de traitements prometteuses pour les pathologies cardiovasculaires. En conclusion, ces données soulignent l'importance et la nécessité de continuer à investiguer les mécanismes physiopathologiques du CRCV, contexte dans lequel mon travail de thèse s'inscrit.

Objectifs de la thèse

Nous avons vu par cette introduction que l'intégrité du couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV) est essentielle au bon fonctionnement cardiovasculaire et à la survie puisque son altération est liée à des pathologies représentant la première cause de mortalité dans le monde. Malgré cela, les mécanismes impliqués dans sa genèse en condition basale ou dans ses modulations à la hausse ou à la baisse sont encore méconnus.

ETUDE DE L'IMPLICATION DES NEURONES GABAERGIQUES DU PREBÖTC DANS LA GENESE DU CRCV

Une composante majoritaire dans la genèse du CRCV est centrale, liée au couplage fonctionnel entre des neurones respiratoires et des neurones autonomes cardiovasculaires. La composante cardiaque du CRCV, la RespVRC, résulte de la modulation respiratoire de l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA. Ces neurones reçoivent des entrées excitatrices par des neurones post-inspiratoires du noyau Kolliker-Fuse, entre autres, et inhibitrices GABAergiques et glycinergiques pendant l'inspiration qui proviendraient de neurones inspiratoires. Il a été démontré que le préBötC, groupe respiratoire générant le rythme inspiratoire, contient des neurones impliqués dans la genèse de la RespVRC. Récemment, des travaux auxquels je suis associée ont démontré l'implication de neurones inspiratoires glycinergiques du preBötC dans la genèse et la modulation de l'amplitude de la RespVRC. Cependant, la source des courants GABAergiques inspiratoires reçus par les neurones préganglionnaires cardiaques du nA et qui contribuent à générer la RespVRC reste indéterminée.

Par ailleurs, la composante vasculaire du CRCV, les ondes TH, découle de la modulation respiratoire de l'activité des neurones présympathiques de la RVLM. Ces neurones reçoivent différentes entrées respiratoires modulatrices : certains sont excités pendant l'inspiration, d'autres pendant la post-inspiration et d'autres encore sont inhibés pendant l'inspiration. Les neurones responsables de ces modulations proviennent de différents groupes respiratoires, incluant le Complexe Post-Inspiratoire et le noyau Kolliker-Fuse (qui seraient impliqués dans la modulation excitatrice post-inspiratoire) ainsi que le préBötC (pour la modulation excitatrice inspiratoire). Mais aucun travail n'a investigué l'origine de la modulation inspiratoire inhibitrice des neurones présympathiques de la RVLM. Cependant, des neurones inhibiteurs du préBötC pourraient être impliqués puisque la stimulation optogénétique des neurones de ce groupe diminue l'amplitude de la modulation respiratoire de

l'activité sympathique. Elle proviendrait également de neurones GABAergiques puisque les injections de strychnine, un antagoniste des récepteurs à la glycine, n'ont pas d'effet sur la modulation respiratoire de l'activité sympathique contrairement à la bicuculline, un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, qui l'amplifie.

Ainsi nous formulons une première hypothèse selon laquelle les neurones GABAergiques du préBötC sont impliqués dans la génèse du CRCV en jouant un rôle dans la modulation respiratoire des activités sympathiques vasomotrices et parasympathiques cardiaques. Pour étudier cette question nous avons caractérisé anatomiquement et fonctionnellement les neurones GABAergiques du préBötC chez le rat GAD-Cre. Ce rat transgénique exprime la cre-recombinase dans les neurones GABAergiques nous permettant de les cibler spécifiquement grâce au système de recombinaison cre-lox. Dans un premier temps nous avons étudié le phénotype de ces neurones par hybridation *in situ* fluorescente, ainsi que les cibles de leurs projections par traçage viral. Puis, nous avons étudié les effets de la modulation optogénétique de cette population sur les activités respiratoires et cardiovasculaires ainsi que sur leurs commandes nerveuses, sur des préparations de rat *in situ* cœur-tronc cérébral isolés-perfusés, puis sur des préparations plus intégrées, chez le rat anesthésié.

La préparation *in situ* cœur-tronc cérébral isolés-perfusés est un modèle de choix pour l'étude du CRCV, notamment parce qu'elle est décérébrée et ne requiert donc pas d'anesthésiques qui déprime ce couplage (Bouairi, 2004). Son aspect réduit, incluant un thorax ouvert et des poumons enlevés, permet d'étudier le contrôle central du CRCV en limitant les paramètres qui pourraient être confondants, et cela permet également un accès facilité à l'enregistrement simultané de plusieurs sorties physiologiques et nerveuses qui seraient très voire trop compliquées à obtenir *in vivo* (Paton, 2022).

Cependant, la préparation *in situ* reste une préparation réduite. Il est donc important de confirmer les résultats obtenus chez ce modèle sur des préparations plus intégrées, ce que nous avons fait grâce à des approches chez le rat *in vivo* anesthésié.

ETUDE DE LA POTENTIALISATION DE LA COMPOSANTE SYMPATHIQUE VASOMOTRICE DU CRCV PAR LES CORPS CAROTIDIENS

Nous avons vu que le CRCV peut être modulé dans plusieurs conditions physiologiques ou pathologiques. C'est notamment le cas lors de l'hypertension neurogénique, où la composante sympathique vasomotrice du CRCV est amplifiée, ce qui a été montré comme causal dans la mise

en place de l'hypertension artérielle. Par ailleurs, les CC de modèles animaux et de patients hypertendus sont hyperactifs et il est avéré que ce dysfonctionnement est impliqué dans la mise en place et le maintien d'une hypertension caractérisée par une modulation respiratoire de l'activité sympathique et des ondes TH exacerbées. De plus, chez le rat normotendu, la stimulation répétée des CC par des épisodes hypoxiques intermittents conduit au développement d'une hypertension artérielle similaire aux patients hypertendus, avec une modulation respiratoire sympathique et des ondes TH amplifiées. Cependant, la grande majorité des études sur ce phénomène ont été réalisées après la stimulation chronique des CC (sur plusieurs jours), alors qu'une plasticité pathologique s'est déjà installée, ce qui rend difficile la distinction entre une relation causale ou une relation corrélative entre le dysfonctionnement des CC et la potentialisation de la composante respiratoire - sympathique vasomotrice du CRCV.

L'objectif de mon second projet de thèse est d'étudier ce lien potentiellement causal ainsi que leurs mécanismes. **Nous formulons ainsi l'hypothèse que les CC impliqués dans la potentialisation du couplage respiratoire-sympathique vasomoteur, et que leur stimulation répétée et aiguë est suffisante pour exacerber la modulation respiratoire de l'activité sympathique ainsi que les ondes TH, un phénomène causal à la mise en place de l'hypertension.** Pour investiguer cette question, nous avons étudié les effets d'un protocole de stimulations répétées des CC sur les activités respiratoires et cardiovasculaires ainsi que leurs commandes nerveuses sur une préparation réduite *in situ* de rats normotendus.

Cette partie sera présentée sous un format hybride, pour montrer l'avancement actuel de l'article qui portera sur ce projet, pour lequel je serai en premier auteur et qui sera soumis avant ma soutenance de thèse.

ETUDE DE L'AMPLIFICATION DE LA RESPVRC PAR UN EFFET DE L'OCYTOCINE DANS LA REGION DU PREBÖTC/NA

Il est établi que certaines des pathologies cardiovasculaires, qui constituent la principale cause de mortalité dans le monde, sont caractérisées par une augmentation de la composante sympathique vasomotrice du CRCV et une diminution de sa composante parasympathique cardiaque. Cependant, la modulation à la hausse de la composante parasympathique cardiaque du CRCV pourrait constituer un moyen d'améliorer la santé cardiovasculaire de ces patients. Un

exemple est que la restauration d'une amplitude physiologique de RespVRC sur des modèles animaux d'insuffisance cardiaque chronique améliore leur fonction cardiaque et leur survie, ce qui ouvre la porte à des perspectives de traitement innovantes. Il existe plusieurs situations et contextes physiologiques pour lesquelles la RespVRC est amplifiée. C'est le cas chez les athlètes, ou lors d'interactions relationnelles positives. Ces contextes sont généralement associés à un tonus parasympathique cardiaque plus élevé et à une libération d'ocytocine centrale accrue, ce qui pourrait sous-tendre les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la RespVRC observée dans ces situations. En effet, quelques études ont démontré qu'une injection intranasale d'ocytocine augmente la RespVRC chez l'humain, mais aucune n'investigue les mécanismes impliqués. Puisqu'il est connu que l'ocytocine régule l'activité des réseaux neuronaux cardiovasculaires et puisque les neurones ocytocinergiques du noyau paraventriculaire projettent vers le préBötC et le nA, responsables de la genèse de la RespVRC, **nous avons formulé l'hypothèse que l'ocytocine amplifie la RespVRC par une action centrale sur le préBötC et/ou le nA**. Ma participation à ce travail a consisté en la confirmation des résultats obtenus *in situ,* chez le rat *in vivo* anesthésié, et en l'étude du phénotype des neurones exprimant le récepteur à l'ocytocine dans ces régions par hybridation *in situ* fluorescente.

Matériels et méthodes

Cette partie regroupe les principales méthodes communes à l'ensemble du travail effectué. Toutes les spécificités relatives aux différents projets seront détaillées dans les chapitres correspondants des résultats.

➢ ANIMAUX UTILISES

Les animaux ont été traités et manipulés conformément au Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (N.R.C., 1996) et à la Directive du Conseil des Communautés Européennes du 22 septembre 2010 (2010/63/EU,74). Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Comité d'éthique institutionnel pour la recherche animale du Ministère français de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (autorisation APAFIS #12006, et #44474). Les animaux ont été hébergés en groupe avec un cycle jour/nuit de 12 heures, à une température constante (22 ± 1°C), ainsi qu'avec un accès *ad libitum* à une nourriture standard et à de l'eau. Tous les efforts ont été faits pour réduire la souffrance des animaux et minimiser leur nombre, conformément à toutes les réglementations éthiques applicables à l'expérimentation et à la recherche sur les animaux. Les expérimentations ont été réalisées sur des rats transgéniques GAD-Cre (dont le modèle est décrit dans la partie matériel et méthodes de la partie 1 des résultats) ainsi que des rats et souris « sauvages » (Cf. Tableau 1).

➢ PREPARATION *IN SITU* CŒUR - TRONC CEREBRAL ISOLES PERFUSES

La préparation de rat *in situ* cœur-tronc cérébral isolés perfusés (ou préparation *in situ*) est une préparation décérébrée, perfusée par voie artérielle *via* l'aorte descendante grâce à une circulation extracorporelle de liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) contenant un agent oncotique (pour prévenir la formation d'œdèmes) et paralysée (Paton, 1996b ; Pickering & Paton, 2006 ; Paton, 2022). Puisque la préparation est décérébrée, elle ne nécessite pas l'utilisation d'anesthésiques. Cette préparation a l'avantage de conserver l'intégrité des réseaux neuronaux du contrôle central respiratoire et cardiovasculaire (dans le tronc cérébral), dont les patrons d'activités sont similaires à ceux observés *in vivo*, et dont l'activité n'est pas déprimée par les anesthésiques (Bouairi, 2004). Elle permet donc l'étude des mécanismes du CRCV en supprimant certaines

paramètres confondants (comme les mouvements respiratoires, les variations des gaz du sang ou les produits anesthésiques) tout en permettant l'enregistrement des activités nerveuses qui représentent les sorties motrices du réseau ainsi que plusieurs paramètres physiologiques respiratoires et cardiovasculaires.

La mise en place de la préparation *in situ* peut se diviser en 2 parties : une première partie consistant à disséquer la préparation, et une seconde partie qui repose sur la reperfusion de la préparation dans la chambre d'enregistrement jusqu'à ce que les activités de réseaux soient relancées, que la préparation soit considérée viable et que les expérimentations puissent commencer. Dans certains cas, la dissection a dû être adaptée en fonction des besoins des projets afin d'accéder à certains éléments ou à la surface du tronc cérébral. Ces éléments seront précisés dans les matériels et méthodes des projets concernés et nous décrirons dans ce paragraphe le déroulé global des étapes de dissection communes aux expérimentations.

Les expérimentations sur la préparation *in situ* ont toutes été réalisées chez des rats juvéniles Wistar et Long-Evans (mâles et femelles âgés entre 25 et 30 jours). Pour commencer, les animaux sont profondément anesthésiés à l'isoflurane (5 %, 80 % O_2, Isorane, 1000 mg/g, Axience, France), sectionnés sous le diaphragme, exsanguinés, décérébrés puis refroidis dans une solution d'aCSF à 4°C (composition en mM : 125 NaCl, 24 NaHCO3, 3 KCl, 2. 5 CaCl2, 1,25 MgSO4, 1,25 KH2PO4 et 10 D-glucose, pH 7,3 après saturation avec du gaz carbogène). La décérébration est effectuée au niveau pré-colliculaire. Les poumons sont retirés, les nerfs d'intérêt ainsi que l'aorte descendante sont disséqués par dilacération, en retirant leurs tissus conjonctifs adjacents. La préparation est ensuite transférée dans une chambre d'enregistrement en position ventrale. La re-perfusion rétrograde du thorax et de la tête est réalisée à l'aide d'un cathéter à double lumen (ø1.27 mm, PowerPICC, Bard, NJ, USA) inséré dans l'aorte descendante. La solution de perfusion est constituée d'aCSF contenant du Ficoll (un agent oncotique, à 1,25 %), de l'acétate de vasopressine (pour son effet presseur qui aide à relancer la préparation, à 2nM) et du bromure de vécuronium (agent paralysant, à 2-4 µg.ml-1). La solution de perfusion est réchauffée à 31°C et est gazée au carbogène (circuit de re-perfusion en boucle fermée, 25-30 ml/min). Un transducteur connecté au deuxième lumen du cathéter permet la mesure de la pression de perfusion (PP) dans l'aorte. La tête de la préparation est fixée à l'aide de barres auriculaires et de pinces buccales. Une pompe péristaltique (520S, Watson-Marlow Bredel Pumps, UK) est utilisée pour augmenter progressivement, en 3 paliers, le débit de la perfusion afin de restaurer la perfusion cérébrale et réanimer la préparation.

La préparation *in situ* est considérée comme viable lorsque l'activité cardiaque est régulière avec un ECG physiologique, et lorsque la commande nerveuse respiratoire présente un patron moteur eupnéique.

Pour chaque expérimentation, des enregistrements simultanés de l'activité du nerf phrénique (ANP), de la chaîne paravertébrale sympathique thoracique (tANS, entre T8 et 10) et du nerf vague cervical gauche (cerANV) ont été obtenus à l'aide d'électrodes d'aspiration en verre. Des activités nerveuses supplémentaires ont été enregistrées pour le projet relatif aux effets respiratoires et cardiovasculaires de la stimulation intermittente aigue des corps carotidiens et sont détaillées en partie 2 des résultats. La fréquence cardiaque instantanée a été reconstruite en utilisant un seuil de détection de l'onde P de l'ECG, enregistré simultanément par l'électrode du nerf phrénique.

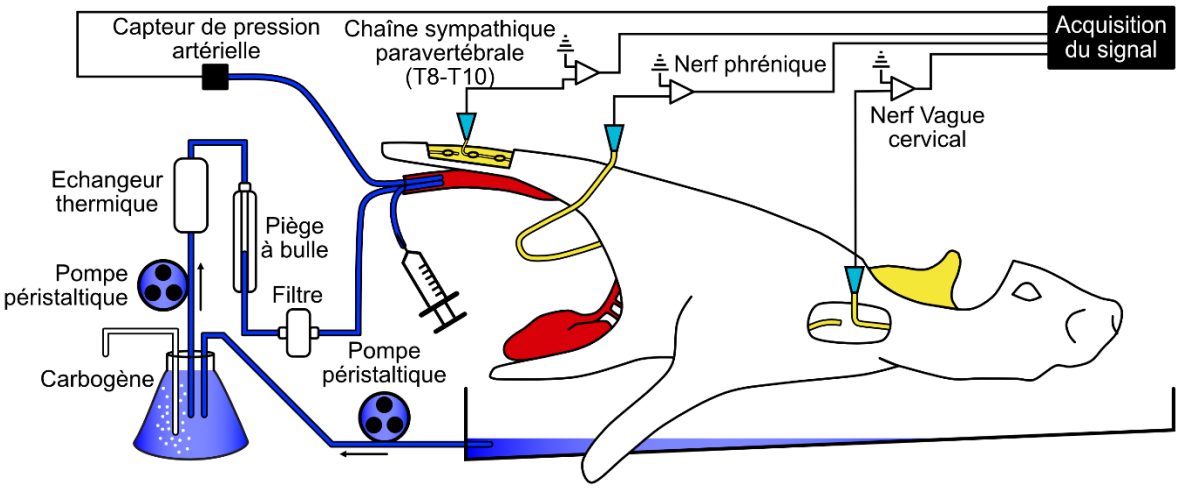


Figure 28. La préparation *in situ* cœur-tronc cérébral isolés perfusés (adapté du graphisme de C. Menuet)

➢ ENREGISTREMENTS *IN VIVO* ANESTHESIES

La préparation *in situ* présente de nombreux avantages pour l'étude du CRCV mais elle comprend des limites, comme tout modèle. Elle est notamment une préparation réduite, et pour comprendre comment les résultats obtenus s'intègrent à l'échelle du réseau intégral du CRCV en condition physiologique, il est important de les confirmer chez des modèles plus intégrés, incluant la condition *in vivo*. Les enregistrements et mesures sur rongeurs éveillés restent les modèles les plus physiologiques et intégrés en matière de modèles *in vivo*, mais sont complexes à mettre en

place. Par souci de temps, nous avons plutôt utilisé la condition *in vivo* anesthésiée, suffisante dans notre cas pour appuyer les résultats obtenus en condition *in situ*.

Toutes les expérimentations ont été réalisées chez des rats juvéniles Wistar et Long-Evans (mâles et femelles, âgés entre 25 et 40 jours). Trente minutes avant le début de l'intervention chirurgicale, les rats recevaient une injection sous-cutanée d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (carprofen, Rimadyl®, 5mg/kg). Les animaux ont d'abord été anesthésiés dans une boîte à induction par inhalation d'isoflurane (5 %, 80 % O_2, Isorane, 1000 mg/g, Axience, France), puis une demi-dose d'un mélange de kétamine et de xylazine (dose complète : ketamine: 80 mg/kg, Imalgene 1000 ; xylazine: 10 mg/kg, Rompun 2%) a été injectée par voie intra-péritonéale. Les rats ont ensuite été placés dans un cadre stéréotaxique avec la tête maintenue en ventroflexion dans un masque diffusant de l'isoflurane (≈2%). L'intervention chirurgicale ne commençait que lorsque le plan anesthésique était suffisamment profond, comme indiqué par la perte du réflexe occulo-palpébral et du retrait de la patte. La température corporelle a été monitorée et maintenue à 37.5°C grâce à une sonde rectale reliée à un tapis chauffant (40-90-8D model, FHC, ME, USA).

Pour chaque expérimentation, l'activité respiratoire a été enregistrée par la technique d'électromyographie (EMG) en insérant deux électrodes constituées d'un fil de cuivre dans les espaces intercostaux. L'activité électrique cardiaque (ou électrocardiogramme, ECG) a été obtenue à partir de trois électrodes placées sous la peau (deux au niveau de la colonne vertébrale et une sur la patte arrière droite) (Fig. 29). Une mesure de la pression artérielle a été nécessaire pour un des projets, ce qui est détaillé dans le sous-chapitre matériels et méthodes de la partie 1 des résultats.

❖ CARTOGRAPHIE FONCTIONNELLE DU PREBÖTC PAR ENREGISTREMENTS EXTRACELLULAIRES

Durant mon travail de thèse, il a été nécessaire de cibler précisément le préBötC, pour réaliser des injections virales ou de soluté de quelques dizaines de nanolitres, ainsi que pour implanter des canules optiques dans cette région. Il est compliqué de cibler précisément le préBötC en se basant sur des coordonnées stéréotaxiques car c'est une très petite région et qu'un léger décalage de la tête du rat dans les barres d'oreilles peut fausser les coordonnées. Mais le préBötC a une activité neuronale populationnelle phasique inspiratoire facilement identifiable. Nous avons

donc réalisé, pour chaque expérimentation nécessitant de cibler le préBötC, la cartographie fonctionnelle de ses coordonnées et de ses limites anatomiques par des enregistrements extracellulaires multi-unitaires.

De manière à accéder au tronc cérébral, une incision médiane des plans cutanés et musculaires a été pratiquée au niveau occipital chez le rongeur anesthésié (comme décrit ci-dessus). Une fenêtre crânienne a été ouverte à l'aide d'un foret dentaire au niveau caudal de l'os occipital. La membrane atlanto-occipitale et la dure mère ont été disséquées pour exposer la surface du tronc cérébral. Une micropipette en verre (diamètre à l'extrémité ≈ 30 µm) a été remplie de la solution à injecter et connectée par un fil d'argent à un amplificateur électrophysiologique (Neuro Amp Ex, ADInstruments) pour permettre l'enregistrement de l'activité neuronale. Le bras tenant la pipette a été incliné de 20° dans l'axe rostro-caudal, vers l'avant de l'animal placé en ventroflexion pour ne pas avoir à traverser le cervelet (source de débris qui bouchent la micropipette). La coordonnée 0 de référence que nous prenons est l'extrémité caudale de l'ouverture du 4è ventricule à la surface du tronc cérébral (le *calamus scriptorius*). A partir de cette coordonnée, la pipette était lentement descendue dans le tronc cérébral à une coordonnée initiale de ±1.65 mm latéralement pour les rats âgés de 21 jours, ou ±1.7 mm latéralement pour les rats âgés de 30 jours, et de +0.6 mm rostralement au *calamus scriptorius*. La pipette était ensuite déplacée à différentes coordonnées rostro-caudales et dorso-ventrales pour cartographier par enregistrements extracellulaires « le cœur » du préBötC, défini comme le point le plus rostral où une forte activité pré-inspiratoire/inspiratoire est enregistrée (Fig. 29).

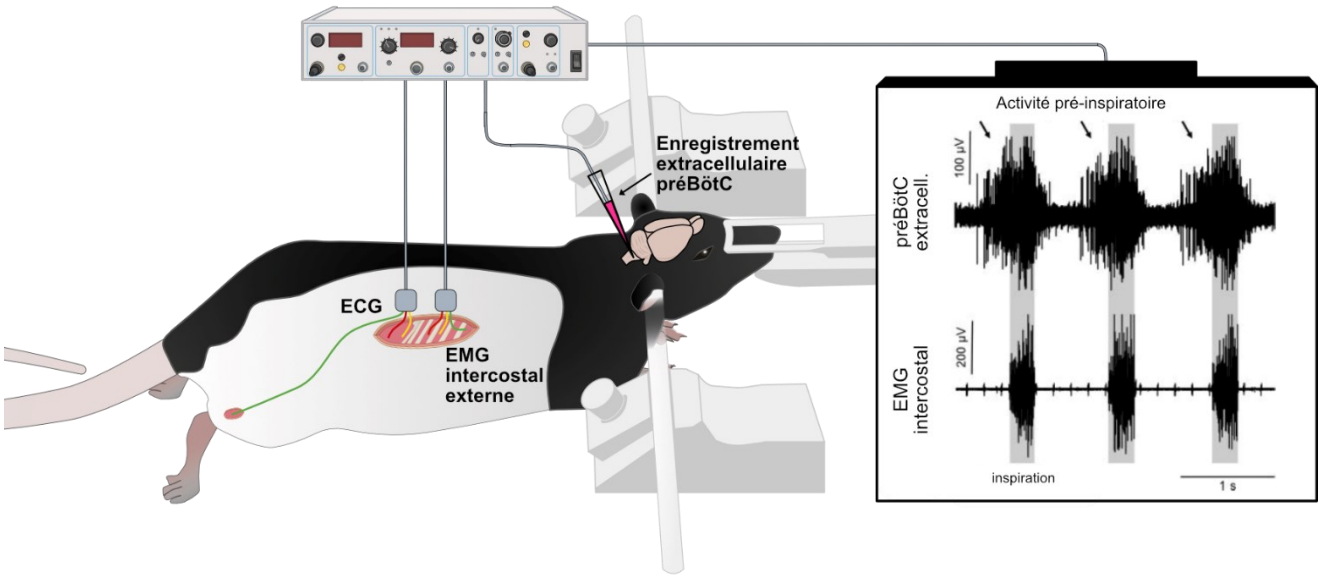


Figure 29. Cartographie fonctionnelle du préBötC. Enregistrements extracellulaires dans le préBötC et EMG des muscles intercostaux externes (inspiratoires) chez le rat anesthésié. L'activité pré-inspiratoire pointée par les flèches est caractéristique de certains neurones du préBötC. ECG : électrocardiogramme ; EMG : électromyogramme ; préBötC extracell : enregistrements extracellulaires du préBötC.

➢ HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE (RNASCOPE)

Au cours de ce travail, nous avons dû caractériser anatomiquement le phénotype de neurones d'intérêts du préBötC dans deux projets. Or une révélation par immunohistochimie n'a pas été possible puisque les anticorps dirigés contre les protéines qui nous intéressent (le GABA, la glycine ou le récepteur à l'ocytocine) ne fonctionnent pas ou peu dans le tronc cérébral. Nous avons contourné cet écueil en utilisant la technique de l'hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) nous permettant de visualiser les acides ribonucléiques messagers (ARNm) codant pour les protéines qui nous intéressaient.

L'hybridation *in situ* repose sur le principe de complémentarité entre plusieurs séquences nucléiques permettant de visualiser leur localisation dans un tissu. Elle consiste à utiliser des sondes qui sont des séquences de bases nucléiques conçues pour être complémentaires à certaines séquences d'un ARNm et s'y associer. Une fois les séquences hybridées, un processus d'amplification est réalisé, puis les sondes sont marquées par des fluorophores permettant leur visualisation (Fig. 30). La technique du RNAscope est une méthode d'hybridation *in situ* adaptée adaptée pour augmenter la sensibilité et la spécificité tout en réduisant le bruit de fond (Wang,

2012). Nous avons utilisé le RNAscope dans deux projets dont les spécificités des sondes et révélateurs fluorescents sont détaillées dans les parties résultats correspondants.

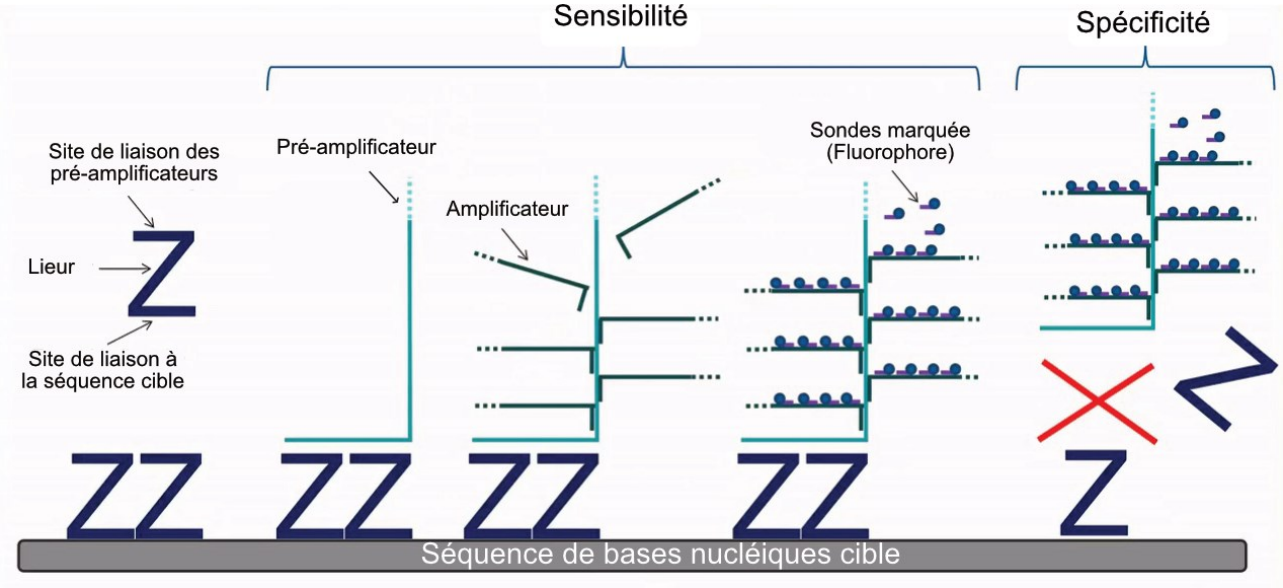


Figure 30. Principe de l'hybridation *in situ* par RNAscope. Après plusieurs étapes de prétraitement des tissus, les sondes sont mises en incubation. Les sondes s'hybrident à la séquence cible par leur site de liaison (entre 18 et 25 bases (Wang, 2012)). L'amplification du signal passe par l'hybridation d'un préamplificateur avec la sonde hybridée, sur lequel viendront se lier des amplificateurs du signal. Les fluorophores se lient aux amplificateurs. La spécificité du RNAscope repose sur 2 caractéristiques : la nécessité pour chaque sonde que chacun de ses motifs soit compatible avec la séquence d'ARNm ciblée, et l'hybridation appairée de deux sondes ciblant chacune des motifs différents d'un même ARNm. Si tous les motifs d'une sonde ne sont pas compatibles avec ceux de la séquence ciblée, l'hybridation ne se fera pas. De même, si l'hybridation des sondes n'est pas faite en tandem, les arbres d'amplification et les fluorophores ne se fixeront pas, réduisant ainsi le bruit de fond.

L'hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) a été réalisée à l'aide du kit de réactifs fluorescents RNAscope Multiplex v2 (Advanced Cell Diagnostics, USA). Nous avons adapté les protocoles fournis par le fabricant sur la base de la littérature, des recommandations du fabricant et empiriquement. Dans nos expériences, des souris C57Bl6J sauvages (âgées de 2 mois) et des rats Long Evans GAD-cre (âgés de 30 jours, cf. résultats partie 1 pour l'explication du modèle transgénique) chez lesquels le virus BIPOLES a été injecté au préalable dans le préBötC. Les animaux ont été perfusés par voie transcardiaque avec du tampon phosphate salin (PBS, 20 ml /10 g) puis avec une solution d'Antigenfix (15 ml / 10 g). Les troncs cérébraux ont été prélevés, post-fixés dans de l'Antigenfix pendant 24 heures à 4°C et cryoprotégés dans 30% de saccharose pendant 3 jours à 4°C. Les tissus

ont été congelés et des coupes coronales de 30 µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat. Les sections ont été conservées pendant une nuit à 4°C dans du tampon TBST (solution saline tamponnée au tris avec 0,1% de détergent Tween20). Les sections flottantes ont été incubées dans du peroxyde d'hydrogène pendant 20 minutes et rincées 5 fois dans de l'eau distillée. Les sections ont été montées sur des lames Superfrost Plus (ThermoFisher Scientific, USA) et séchées à l'air avant d'être post-fixées pendant 15 minutes dans de l'Antigenfix à 4°C. Après 3 lavages dans une solution de tampon phosphate saline (PBS), les tissus ont été déshydratés successivement dans de l'éthanol à 50%, 70% puis 100%, placés à 60°C pendant 30 minutes et laissés à l'air libre pendant 1 heure. Après une étape de démasquage des sites, une protéase a été appliquée pendant 30 minutes à 40°C et les sections ont été rincées dans de l'eau distillée. Après ces étapes de pré-traitements des tissus, les sondes (chacune spécifique d'un canal) sont incubées pendant 2 heures à 40°C puis rincées avec une solution tampon de lavage. Les coupes ont été conservées pendant une nuit dans une solution saline de citrate de sodium et rincées dans une solution tampon le matin. Les deux premiers réactifs pour l'amplification du signal sont laissés 30 minutes à 40°C, et le troisième est laissé pendant 15 minutes à 40°C. Chaque canal associé à une sonde nécessite son amplification avant sa détection. Donc, la sonde en C1 a été amplifiée par la peroxydase de Raifort (HRP)-C1 pendant 15 mins à 40°C, puis est révélée par l'ajout d'un fluorophore. Le canal C1 est ensuite bloqué par un bloqueur HRP incubé pendant 15 minutes à 40°C. Ce processus est répété pour chacune des sondes. Des lamelles sont ensuite montées sur les coupes avec du milieu de montage Vectashield sans DAPI.

➢ ENREGISTREMENTS, ANALYSES ET STATISTIQUES

❖ ENREGISTREMENTS ET ANALYSE DES SIGNAUX NERVEUX ET DES PARAMETRES RESPIRATOIRES ET CARDIOVASCULAIRES

Les enregistrements EMG, ECG et des signaux nerveux pendant les expérimentations *in vivo* ou *in situ* ont été obtenus à une fréquence d'échantillonnage de 3000 Hz. L'enregistrement de la pression de perfusion sur la préparation *in situ* ou de la pression artérielle *in vivo* a été obtenu à une fréquence d'échantillonnage de 1000 Hz. Tous les enregistrements ont été amplifiés, filtrés (A-M system, 1700 Model, Carlsborg, USA), digitalisés (Power 1401, Cambridge Electrical Design,

Cambridge, UK), rectifiés et intégrés dans le logiciel Spike2 (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK). Les enregistrements nerveux bruts ont été intégrés et lissés (constante d'intégration de 3 ms et constante de lissage de 50 ms) pour obtenir l'enveloppe de la décharge nerveuse, correspondant aux tracés nerveux intégrés sur les enregistrements (exemple en figure 31.a).

L'analyse des différents paramètres physiologiques et nerveux a été réalisée sur des fenêtres temporelles de 30 ou 60 secondes (selon les expérimentations) comprenant plusieurs cycles respiratoires et permettant d'avoir une bonne estimation des paramètres mesurés en augmentant le nombre de valeurs moyennées (Fig. 31a).

Le rythme cardiaque moyen et la fréquence respiratoire moyenne ont été mesurés sur les tracés reconstruits de fréquence cardiaque instantanée (à partir de l'onde P de l'ECG) et de fréquence respiratoire instantanée (reconstruite à partir de la fin du signal d'activité nerveuse ou EMG inspiratoire). Les pressions systolique, diastolique et moyenne ont été reconstruites par un script du logiciel Spike2 à partir des tracés enregistrés de pression de perfusion (*in situ*) ou artérielle (*in vivo*). Les valeurs de pression de perfusion et artérielle moyennes ont été mesurées sur le tracé reconstruit de pression moyenne.

L'analyse des paramètres dont l'activité est modulée par la respiration a été faite grâce à des moyennages déclenchés par l'activité respiratoire (Fig. 31b). Cette méthode d'analyse permet de voir comment un paramètre se comporte par rapport au cycle respiratoire, et est obtenue en moyennant la valeur du paramètre mesuré à partir d'une fenêtre d'analyse glissante centrée sur un instant précis de chaque cycle respiratoire dans une période donnée. Dans notre cas, les fenêtres d'analyse étaient centrées sur la fin de l'inspiration, mesurée sur l'activité phrénique *in situ* ou sur l'EMG intercostal externe *in vivo* (Fig. 31). Pour une analyse spécifique du projet sur les CC, le signal déclencheur était le début de l'inspiration, ce qui sera explicité dans la partie correspondante. Le moyennage des activités nerveuses a toujours été fait sur les tracés intégrés.

L'amplitude des ondes TH et de la RespVRC a été mesurée sur les moyennages déclenchés par la fin de l'inspiration de la pression (artérielle ou de perfusion) systolique et du rythme cardiaque, respectivement (Fig. 31b,c).

Concernant les différentes activités nerveuses, plusieurs paramètres ont été mesurés. Le moyennage de l'activité nerveuse sympathique intégrée a permis de quantifier l'aire sous la courbe

et l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité sympathique ainsi que l'activité nerveuse sympathique tonique moyenne (composante tonique vasomotrice de l'activité sympathique, en dehors de la modulation respiratoire sympathique et qui découle de mécanismes différents cf. Fig. 31b). Le moyennage de l'activité nerveuse phrénique intégrée ou de l'EMG intercostal intégré a permis de quantifier l'amplitude et l'aire sous la courbe de l'activité inspiratoire, ainsi que les durées inspiratoire et expiratoire (Fig. 31d). Le moyennage de l'activité nerveuse vagale intégrée a permis de quantifier l'aire sous la courbe de l'activité vagale pendant l'inspiration et pendant la post-inspiration (Fig. 31e).

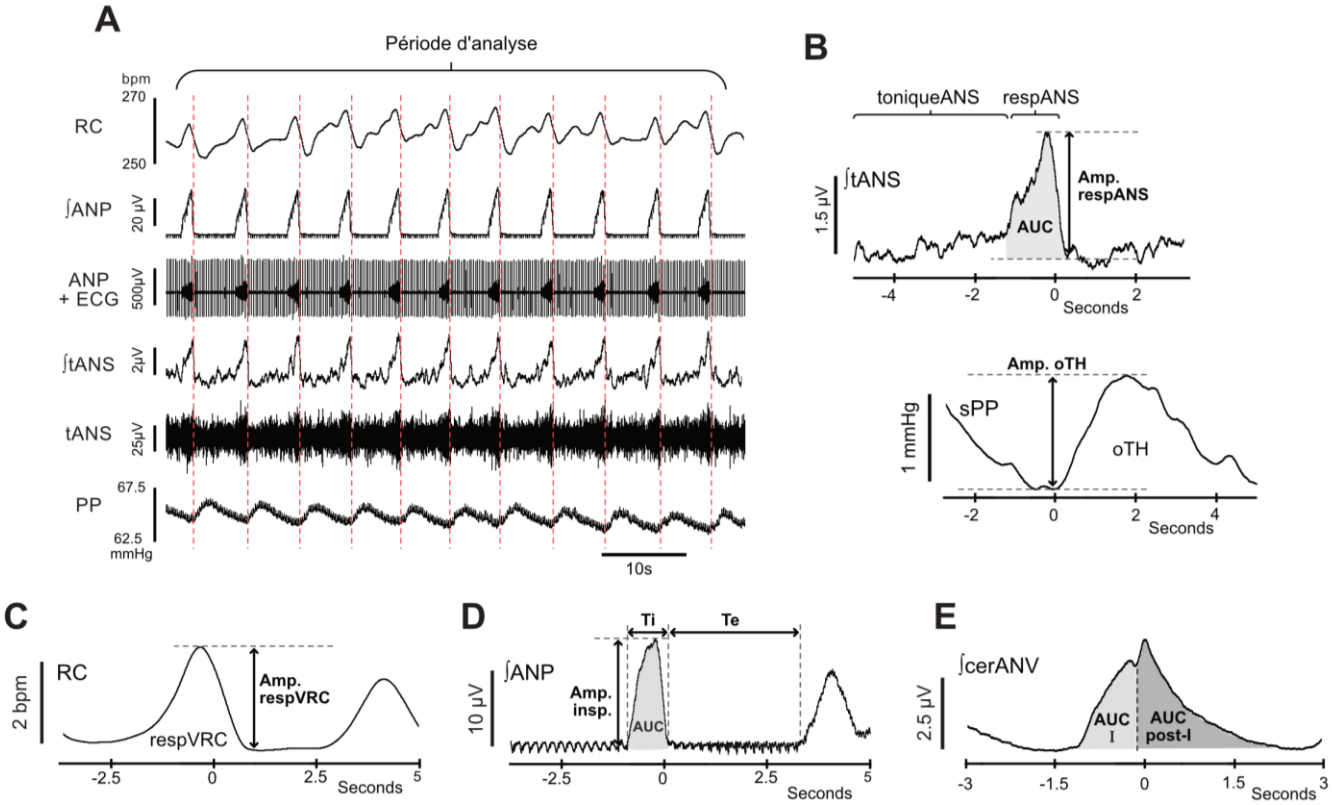


Figure 31. Moyennages déclenchés par la respiration et paramètres d'analyse des signaux nerveux et cardiovasculaires. (**A**) Enregistrement *in situ* du rythme cardiaque, de la pression de perfusion et des activités nerveuses sympathique thoracique et phrénique (brutes et intégrées). Exemple d'une période d'analyse dans laquelle sont générés les moyennages déclenchés par la respiration. Les lignes pointillées rouges représentent le signal sur lequel chaque fenêtre d'analyse est centrée (fenêtre glissante), permettant ensuite le moyennage des activités mesurées à travers tous les cycles respiratoires de la période d'analyse. (**B-E**) Moyennages déclenchés sur la fin de l'inspiration (correspond au 0 sur l'axe des abscisses) et explication des méthodes de quantification du signal. (**B**) Moyennages déclenchés par la respiration de l'activité nerveuse sympathique (haut) et de la pression de perfusion systolique (bas) obtenus à partir des tracés en (**A**). (**C**) Moyennage déclenchés par la respiration du rythme cardiaque. (**D**) Moyennage déclenché par la respiration de l'activité nerveuse phrénique. (**E**) Moyennage déclenché par la respiration de l'activité nerveuse vagale. RC :

rythme cardiaque ; ANP : activité nerveuse phrénique ; ∫ANP : activité nerveuse phrénique intégrée ; ECG : électrocardiogramme ; tANS : activité nerveuse sympathique thoracique ; ∫tANS : activité nerveuse sympathique thoracique ; PP : pression de perfusion ; toniqueANS : activité nerveuse sympathique tonique ; respANS : modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique ; Amp. Amplitude ; oTH : ondes de traube-hering ; Ti : temps inspiratoire ; Te : temps expiratoire ; Amp.insp. : amplitude inspiratoire ; ∫cerANV : activité nerveuse vagale cervicale intégrée ; AUC : aire sous la courbe ; I : inspiration ; post-I : post-inspiration.

❖ ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été faite sur les valeurs brutes, ainsi que sur les variations individuelles de chacun des animaux pour chacun des paramètres. La distribution normale des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et l'égalité de la variance des données a été testée. Les données brutes ayant une distribution normale et une variance égale ont été analysées à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées, lorsqu'il n'y avait qu'un groupe, et par des ANOVAs sur mesures répétées à deux facteurs, lorsqu'il y avait plusieurs groupes. Ces tests étaient respectivement suivis de tests *post hoc* de comparaisons multiples de Holm-Sidak et de Sidak. Les données dont la distribution n'était pas normale ou dont la variance n'était pas égale ont été analysées à l'aide d'analyses de variance à mesures répétées sur les rangs de Friedman lorsqu'il n'y avait qu'un groupe, et à l'aide d'analyses à effets mixtes avec une correction de Geisser-Greenhouse lorsqu'il y avait plusieurs groupes. Ces tests étaient respectivement suivis du test *post hoc* de comparaisons multiples de Dunn et de Sidak. Pour comparer deux groupes appariés ou indépendants dont la distribution était normale et la variance égale, le test t de Student a été utilisé. Si les données étaient non paramétriques et appariées, le test non paramétrique de Wilcoxon était utilisé. Si les données étaient non paramétriques et d'échantillons indépendants, un test de Kolmogorov-Smirnov était utilisé.

Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v. 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA). Les différences ont été considérées significatives pour des valeurs de $p<0.05$. Les statistiques dans le texte sont présentées sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard par rapport à la moyenne (sem) et les statistiques détaillées sont présentées dans la description des figures. Les données groupées sont représentées en tant que moyenne ± sem par des histogrammes ou avec des diagrammes en violons tronqués avec la médiane et les quartiles. Les données individuelles sont représentées par des points sur les graphiques (reliés lorsque les

mesures étaient répétées). Les spécificités propres aux projets sont détaillées au besoin dans les matériels et méthodes ainsi que dans les légendes des figures de la partie résultat correspondante.

TABLEAUX

1. Animaux utilisés

Espèces et fonds génétiques	Nom	Référence	Informations supplémentaires
Rat, Long-Evans	GAD-cre	RRID:RRRC_00751	Rat ressource & research center
Rat, Long-Evans	Sauvage (Wild Type)	RRID:RRRC_00751	Rat ressource & research center
Rat, Wistar	Sauvage (Wild Type)		Janvier labs
Souris, C57BL6/J	Sauvage (Wild Type)		Charles River

2. Vecteurs viraux et traceurs

Type	Nom	Source	Référence	Informations supplémentaires
Virus, AAV	AAV1-phSyn1-FLEX-tdTomato-T2A-sypEGFP-WPRE	Addgene	Addgene #51509	Titre : $1.8x10^{13}$ GC/ml

Virus, AAV	AAV9-hSyn-DIO-somBIPOLES-mCerulean	Addgene	Addgene #3154951	Titre : $1.7x10^{13}$ GC/ml
Traceur	Fluorogold	Fluorochrome	Fluorochrome LLC, CO, USA	0.2 % dans NaCl (500µL)
Traceur	Sous-unité B de la toxine cholérique associée au fluorophore 647 (CTB-647)	Thermofisher	C34777	0.01% intracérébral dans NaCl (12.5nl)
Traceur	Billes fluorescentes (580/605nm)	Thermofisher	F8793	0.5 % dans de l'aCSF sans glucose

3. **Anticorps primaires**

Nom	**Fournisseur**	**Référence**	**Dilution**
Rabbit polyclonal anti-NK1R (ou anti-Substance P receptor)	Sigma	S8305	1/5000
Rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (TH)	Sigma	AB152	1/2500
Chicken polyclonal anti-GFP	Avès	1020	1/500

Goat polyclonal anti-Choline Acetyltransferase (ChAT)	Sigma	AB144P	1/200
Rabbit polyclonal anti-CTB	Invitrogen	PA1-25635	1/1000
Mouse monoclonal anti-Tyrosine Hydroxylase	Merck Millipore	MAB318	1/1000
Rabbit polyclonal anti-DsRed	Clontech	632496	1/500

4. **Anticorps secondaires**

Nom	**Fournisseur**	**Référence**	**Dilution**
Alexa 488-conjugated donkey polyclonal anti-rabbit	Invitrogen	A21206	1/500
Alexa 488-conjugated donkey polyclonal anti-chicken	Jackson	703545155	1/500
Alexa 555-conjugated donkey polyclonal anti-goat	Invitrogen	A21432	1/500
Alexa 555-conjugated donkey polyclonal anti-rabbit	Invitrogen	A31572	1/500
Alexa 555-conjugated donkey polyclonal anti-mouse	Invitrogen	A31570	1/500

Alexa 647-conjugated donkey polyclonal anti-goat	Invitrogen	A21447	1/500
Alexa 647-conjugated donkey polyclonal anti-rabbit	Invitrogen	A31573	1/500
Alexa 647-conjugated donkey polyclonal anti-mouse	Invitrogen	A31571	1/500

5. **Composés chimiques**

Nom	**Fournisseur**	**Référence**	**Concentration**
Acétate de vasopressine	Sigma	V9879	2 nM
Bromure de vécuronium	Sigma	PHR1627	2 µg/mL
Cyanure de sodium (NaCN)	Sigma	1064371000	0.016%
Atropine	Sigma	A0132	0.2 µM
(Thr^4,Gly^7)-Oxytocin (TGOT)	Bachem	4013837.0005	0.5 µM
Ficoll	Sigma	17-0310-50	1.25 %

RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2	Advanced Cell Diagnostics	323100	
RNAscope 4-plex ancillary Kit	Advanced Cell Diagnostics	323120	
RNAscope® Probe - Mm-Slc6a5-C3 - Mus musculus solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter glycine) member 5 (Slc6a5) transcript variant b mRNA	Advanced Cell Diagnostics	409741-C3	1/50
RNAscope® Probe - Mm-Oxtr – Mus musculus oxytocin receptor (Oxtr) mRNA (C1)	Advanced Cell Diagnostics	412171	1/1
RNAscope® Probe - Mm-Slc17a6-C4 - Mus musculus solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter)member 6 (Slc17a6) mRNA	Advanced Cell Diagnostics	319171-C4	1/50
RNAscope® Probe - Rn-Slc6a5 - Rattus norvegicus solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 5 (Slc6a5) mRNA (C1)	Advanced Cell Diagnostics	447461	1/1

RNAscope® Probe - Rn-Gad1-C2 - Rattus norvegicus glutamate decarboxylase 1 (Gad1) mRNA	Advanced Cell Diagnostics	316401-C2	1/50
RNAscope® Probe - Chrimson-syn-C4 - Synthetic construct Chrimson gene complete cds	Advanced Cell Diagnostics	828791-C4	1/50
OPAL 520 Reagent Pack	Akoya Biosciences	FP1487001KT	1:1500
OPAL 620 Reagent Pack	Akoya Biosciences	FP1488001KT	1:1500
OPAL 690 Reagent Pack	Akoya Biosciences	FP1497001KT	1:1500

Résultats

Partie 1

Les neurones GABAergiques du Complexe de pré-Bötzinger régulent la variabilité respiratoire du rythme cardiaque, les ondes de Traube Hering et la pression artérielle moyenne *via* le système nerveux autonome.

Résumé

Le couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV) est un phénomène physiologique fondamental où les systèmes respiratoire et cardiovasculaire interagissent ensemble pour maintenir l'homéostasie gazeuse de l'organisme tout en optimisant le coût énergétique cardiaque. Le CRCV se manifeste par des oscillations de la pression artérielle (ondes de Traube Hering, ondes TH) et de la fréquence cardiaque (variabilité respiratoire du rythme cardiaque, RespVRC) en phase avec la respiration. Le CRCV est principalement lié au couplage entre les neurones générant la commande respiratoire et les neurones autonomes régulant l'activité cardiovasculaire, situés dans le tronc cérébral. Plus précisément, il a été démontré que les neurones du Complexe de pré-Bötzinger (préBötC), le groupe qui génère le rythme inspiratoire, modulent aussi directement l'activité des neurones autonomes qui régulent la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Le préBötC est un groupe neuronal hétérogène comprenant des neurones excitateurs et des neurones inhibiteurs. Un ensemble d'études suggère que les neurones inhibiteurs GABAergiques du préBötC (préBötC^{GABA}) participent à la genèse du CRCV. Afin de tester cette hypothèse, nous avons combiné des approches anatomiques et fonctionnelles permettant la caractérisation du rôle des neurones préBötC^{GABA} dans le CRCV. Pour caractériser le phénotype neurochimique des neurones préBötC^{GABA} nous avons utilisé l'hybridation *in situ* fluorescente. Pour étudier leur connectome et leurs rôles fonctionnels, nous avons injecté des virus adéno-associés avec des cassettes d'expression floxées dans le préBötC de rats GAD-Cre permettant d'exprimer sélectivement des protéines pour le traçage

neuronal (tdTomato et synaptophysine-GFP) ou pour la modulation optogénétique bidirectionnelle (somBiPOLES) dans les neurones préBötC^{GABA}. Nous avons constaté que les neurones préBötC^{GABA} sont constitués de deux sous-populations, les neurones exclusivement GABAergiques et les neurones co-exprimant le GABA et la glycine, et qu'ils établissent des contacts pré-synaptiques avec les neurones des régions autonomes impliquées dans la régulation de l'activité cardiovasculaire, le noyau Ambigu (nA) et le bulbe rostral ventro-latéral (RVLM). Sur la préparation *in situ* cœur-tronc cérébral isolés-perfusés et le rat anesthésié, la photoinhibition des neurones préBötC^{GABA} augmentait l'amplitude des ondes TH et de la RespVRC, augmentait la pression artérielle moyenne et diminuait la fréquence cardiaque moyenne, tandis que les photostimulations induisaient les effets inverses. La fonction respiratoire était peu affectée par les photomodulations des neurones préBötC^{GABA}, seule l'amplitude inspiratoire diminuait lors des photostimulations. L'injection systémique d'atropine, un antagoniste muscarinique, a bloqué les effets sur la fréquence cardiaque, mais pas sur la pression artérielle qui étaient liés aux effets des photomodulations sur l'activité nerveuse sympathique. Ce travail montre que les neurones préBötC^{GABA} sont impliqués dans la genèse du CRCV par la modulation des activités nerveuses parasympathique cardiaque et sympathique vasomotrice.

Introduction

Les systèmes respiratoire et cardiovasculaire agissent en synergie pour maintenir l'homéostasie des gaz sanguins chez les organismes. Au-delà de leurs rôles respectifs distincts, ces systèmes sont fonctionnellement couplés, ce que l'on appelle le couplage respiratoire-cardiovasculaire (CRCV). Ce couplage se manifeste par des oscillations de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque qui sont en phase avec le cycle respiratoire, respectivement appelées ondes de Traube-Hering (ondes TH), et variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC). Le couplage des systèmes respiratoire et cardiovasculaire est un phénomène jouant un rôle physiologique important puisqu'il est grandement conservé chez les vertébrés et que son dysfonctionnement est caractéristique de certaines pathologies cardiovasculaires représentant la principale cause de mortalité dans le monde (Machado, 2016 ; Menuet, 2017 ; Thayer, 2010 ; La Rovere, 1998 ; NCD Risk Factor Collaboration, 2021). Dans un contexte physiologique, le CRCV

contribuerait à optimiser l'homéostasie gazeuse sanguine : La RespVRC minimiserait le travail cardiaque tout en maintenant les gaz sanguins à des niveaux compatibles avec la vie (Ben Tal, 2012), et les ondes TH optimiseraient la perfusion tissulaire, particulièrement lors d'augmentations de la demande métabolique (Simms, 2010).

Bien que le CRCV ait été décrit pour la première fois il y a plus de deux cents ans, les mécanismes qui le génèrent restent mal caractérisés notamment du fait de leur complexité et de la multiplicité de leurs origines. Le CRCV résulte de mécanismes périphériques incluant les variations de pression intrathoracique et le retour sensoriel afférent, mais aussi de mécanismes centraux puisque ces oscillations persistent après la déafférentation des poumons et du cœur chez l'humain, ainsi que sur des modèles animaux déafférentés et paralysés (Dick, 2014 ; Taha, 1995 ; Simms, 2009 ; Farmer, 2016).

Cette composante centrale à l'origine du CRCV est liée au couplage fonctionnel entre des neurones respiratoires et des neurones autonomes cardiovasculaires au sein du tronc cérébral (Machado, 2016 ; Moraes, 2013 ; Gilbey, 1984 ; Neff, 2003).

La RespVRC résulte de la modulation par la respiration du tonus parasympathique vagal qui exerce une influence cardioinhibitrice sur le cœur. A chaque cycle respiratoire, l'activité parasympathique cardiaque est réduite pendant l'expiration tardive et l'inspiration, avant de réaugmenter et atteindre un pic pendant la post-inspiration (Farmer, 2016 ; Ottaviani, 2020 ; Shanks, 2023). Cela se traduit par des oscillations de la fréquence cardiaque, qui augmente pendant l'inspiration et diminue pendant l'expiration, ce qui est la RespVRC (Farmer, 2016). Cet effet repose sur la modulation de l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du noyau Ambigu (nA), dans le bulbe rachidien, qui sont hyperpolarisés pendant l'inspiration par des courants inhibiteurs glycinergiques et GABAergiques qui proviendraient de neurones respiratoires avec une décharge inspiratoire (Frank, 2009 ; Neff, 2003).

Les ondes TH sont produites par la modulation respiratoire du tonus sympathique vasomoteur, qui augmente pendant l'inspiration et atteint un pic en post-inspiration avant de rapidement diminuer. Les bouffées d'activité sympathique à chaque inspiration induisent une succession de vasoconstrictions transitoires qui font osciller la pression artérielle, qui sont les ondes TH (Simms, 2009 ; Menuet, 2017 ; Adrian, 1932 ; Shantsila, 2015). La lente cinétique de la signalisation noradrénergique sympathique associée aux propriétés de contraction des muscles lisses des

vaisseaux sanguins font que les vasoconstrictions liées aux bouffées sympathiques inspiratoires sont légèrement décalées dans le temps et que la pression artérielle atteint un maximum en milieu d'expiration (Ng, 2001). La modulation respiratoire de l'activité sympathique provient de la modulation de l'activité de neurones présympathiques excitateurs, situés dans le bulbe rostral ventro-latéral (RVLM), par des neurones respiratoires. Les neurones présympathiques de la RVLM reçoivent différentes entrées respiratoires : certains sont excités pendant l'inspiration, d'autres pendant la post-inspiration et d'autres encore sont inhibés pendant l'inspiration (Miyawaki, 1995 ; Moraes, 2013 ; Guyenet, 1990). Les neurones respiratoires responsables de la modulation de l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA et des neurones présympathiques de la RVLM proviennent de différents groupes respiratoires ponto-bulbaires et ne sont pas tous clairement identifiés (Menuet, 2020 ; Karlen-Amarante, 2024 ; Toor, 2019 ; 2024).

Le complexe de pré-Bötzinger (préBötC), le groupe générant le rythme inspiratoire (Smith, 1991), contient des neurones impliqués dans la genèse du CRCV (Menuet, 2020 ; Karlen-Amarante, 2024). Situé dans le bulbe rachidien ventrolatéral, le préBötC est un groupe hétérogène constitué de neurones excitateurs glutamatergiques et inhibiteurs glycinergiques et GABAergiques (Koizumi, 2013 ; Kuwana, 2006 ; Morgado-Valle, 2010 ; Bouvier, 2010 ; Ashad, 2020). L'étude du connectome des neurones du préBötC révèle qu'ils envoient des projections vers le nA et vers la RVLM suggérant qu'ils pourraient directement moduler l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA et des neurones présympathiques de la RVLM (Dempsey, 2017 ; Yang & Feldman, 2018 ; 2020). Des travaux réalisant des stimulations optogénétiques des neurones du préBötC ont démontré que les neurones inhibiteurs de ce noyau participent à la genèse de la RespVRC *via* le couplage avec des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA, et plus récemment, que des neurones inspiratoires glycinergiques du préBötC sont impliqués (Menuet, 2020 ; Buron, 2023). Cependant, l'inhibition inspiratoire des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA, un des mécanismes à l'origine de la RespVRC, ne repose pas que sur les neurones glycinergiques du préBötC puisqu'ils reçoivent également des courants GABAergiques inspiratoires (Frank, 2009 ; Neff, 2003). La source des courants GABAergique n'a toutefois jamais été étudiée et pourrait provenir des neurones GABAergiques du préBötC (préBötC^{GABA}).

Par ailleurs, les neurones préBötC^{GABA} pourraient également être responsables de la modulation inhibitrice reçue pendant l'inspiration par certains neurones présympathiques de la RVLM (Moraes,

2013 ; Guyenet, 1990). En effet, la stimulation optogénétique du préBötC réduit l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et des ondes TH qui en découlent. Cet effet pourrait passer par les neurones inhibiteurs de ce noyau qui projettent directement sur les neurones présympathiques de la RVLM (Menuet, 2020 ; Yang & Feldman, 2018). Cette modulation n'ayant jamais été investiguée, le phénotype des neurones inhibiteurs qui la sous-tendent reste inconnu. Cependant, l'inhibition de la neurotransmission GABAergique dans la RVLM par l'injection de bicuculline augmente l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique contrairement à l'inhibition de la neurotransmission glycinergique qui n'affecte pas cette activité (Miyawaki, 2002 ; Guyenet, 1990 ; Menuet, 2017).

A partir de l'ensemble de ces données, nous avons formulé l'hypothèse que les neurones préBötC^{GABA} sont impliqués dans la genèse du CRCV, en contribuant à la modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque et de l'activité sympathique vasomotrice, générant respectivement la RespVRC et les ondes TH. Nous avons commencé par caractériser anatomiquement le phénotype neurochimique des neurones préBötC^{GABA} par hybridation *in situ*, puis avons démontré par du traçage viral chez des rats GAD-Cre juvéniles que les neurones préBötC^{GABA} forment des contacts pré-synaptiques à proximité des neurones du nA et de la RVLM, régions clés du CRCV et de la régulation autonome cardiovasculaire. Nous avons ensuite démontré fonctionnellement par la modulation optogénétique bidirectionnelle de l'activité des neurones préBötC^{GABA} chez le rat GAD-Cre anesthésié ou en préparation *in situ* cœur-tronc cérébral isolés-perfusés, qu'en plus de leur rôle modulateur du patron de la décharge inspiratoire, les neurones préBötC^{GABA} contribuent à générer les ondes TH ainsi que la RespVRC, et jouent un rôle dans la régulation de la pression artérielle moyenne, le tout *via* la modulation de l'activité parasympathique cardiaque et de l'activité sympathique vasomotrice. L'ensemble de ce travail caractérise anatomo-fonctionnellement les neurones préBötC^{GABA} et met en lumière leur rôle de coordinateurs physiologiques majeurs.

Matériels et méthodes

Le principe général des différentes techniques utilisées ainsi que les références et compositions des produits sont détaillés dans le chapitre matériels et méthodes principal.

➢ ANIMAUX UTILISES

Cette étude a nécessité le marquage et la manipulation de l'activité des neurones préBötC^{GABA} spécifiquement. Nous avons pour cela utilisé des rats Long Evans transgéniques LE-Tg(Gad1-iCre)3Ottc (que nous appellerons rats GAD-Cre) (Sharpe, 2017).

Les rats GAD-Cre expriment la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la glutamate décarboxylase 1 (une enzyme impliquée dans la synthèse du GABA) que l'on trouve dans un sous-groupe des neurones GABAergiques. La cre-recombinase est une enzyme bactérienne capable de reconnaitre des motifs spécifiques dans l'ADN (loxP) et d'exciser ou d'inverser les séquences d'ADN situées entre ces motifs. Ce système de recombinaison appelé « cre-lox » nous a permis de restreindre aux neurones préBötC^{GABA} l'expression de protéines fluorescentes et d'outils optogénétiques exogènes apportés par des vecteurs viraux contenant des gènes floxés (exprimant les motifs loxP et dont l'expression de leur contenu dépend de la présence de la cre-recombinase).

➢ VECTEURS VIRAUX

Dans cette étude, deux vecteurs viraux ont été utilisés. Le premier a permis de caractériser fonctionnellement les neurones préBötC^{GABA}, et le second, d'identifier anatomiquement les structures qu'ils contactent.

Pour moduler par optogénétique les neurones préBötC^{GABA}, nous avons utilisé le virus AAV9-hSyn-DIO-somBIPOLES-mCerulean (que l'on appellera virus BiPOLES) et qui provient du catalogue Addgene (Vierock et al., 2021). Le virus BiPOLES est un virus adénoassocié (AAV) qui induit l'expression cre-dépendante d'une protéine composée de deux opsines (protéines sensibles à la

lumière) fusionnées entre elles ainsi qu'au gène rapporteur de mCerulean (protéine fluorescente). Les opsines du virus BiPOLES sont la channelrhodopsine Chrimson (mChrimson) qui est un canal cationique activé par la lumière rouge, et la channelrhodopsine anionique issue de guillardia theta 2 (*Gt*ACR2) qui est un canal anionique activé par la lumière bleue. Grâce à cet outil, les mêmes cellules peuvent être excitées (mChrimson) ou inhibées (*Gt*ACR2) en utilisant respectivement un laser rouge ou bleu. Par ailleurs, le BiPOLES a été conçu pour avoir une expression restreinte aux somas, il n'est donc pas exprimé dans les axones.

Pour réaliser les expériences de traçage, nous avons utilisé un virus qui induit l'expression Cre-dépendante de la protéine fluorescente rouge tdTomato dans les neurones et de la protéine fluorescente verte (eGFP) dans les compartiments pré-synaptiques, grâce à sa fusion à la synaptophysine, une glycoprotéine vésiculaire pré-synaptique. Le virus AAV1-phSyn1(S)-FLEX-tdTomato-T2A-SypEGFP-WPRE provient du catalogue Addgene (Oh et al., 2014).

➢ INJECTIONS VIRALES ET DE TRACEURS

Durant ce projet il a été nécessaire de réaliser des injections précises dans des régions du tronc cérébral à de multiples reprises : dans le préBötC pour la caractérisation anatomique (AAV1-phSyn1(S)-FLEX-tdTomato-T2A-SypEGFP-WPRE) et fonctionnelle (virus BiPOLES) des neurones préBötC^{GABA}, dans la CVLM pour la comparaison des effets sur l'activité nerveuse sympathique et la pression artérielle moyenne des neurones GABAergiques de ce groupe avec les neurones préBötC^{GABA} (virus BiPOLES), et dans la RVLM avec un traceur rétrograde (CTB, sous unité B de la toxine cholérique) permettant de visualiser les neurones qui projettent vers cette région.

Les injections virales ont été réalisées chez des rats Long Evans GAD-Cre et chez des rats Long-Evans sauvages (pour les expérimentations contrôles), mâles et femelles, âgés de 21 jours.

Trente minutes avant l'intervention chirurgicale, les rats recevaient une injection sous cutanée d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (carprofen, Rimadyl®, 5mg/kg). Les animaux ont d'abord été anesthésiés dans une boîte à induction par inhalation d'isoflurane (4 %, 80 % O_2, Isorane, 1000mg/g, Axience, France), puis ont été injectés en intra-péritonéal d'une demi-dose d'un mélange de kétamine et de xylazine (dose complète : kétamine: 80 mg/kg, Imalgene 1000 ; xylazine: 10 mg/kg,

Rompun 2%). Les rats ont ensuite été placés dans un cadre stéréotaxique avec la tête maintenue en ventroflexion à 40° dans un masque diffusant de l'isoflurane (≈2%). L'intervention chirurgicale ne commençait que lorsque le plan anesthésique était suffisamment profond, comme indiqué par la perte du réflexe optico-palpébral et du retrait de la patte. La température corporelle a été maintenue à 37,5°C à l'aide d'un tapis chauffant (40-90-8D model, FHC, ME, USA). Une incision médiane des plans cutanés et musculaires a été pratiquée au niveau occipital. Une fenêtre crânienne a été ouverte à l'aide d'un foret dentaire au niveau caudal de l'os occipital. La membrane atlanto-occipitale et la dure mère ont été disséquées pour exposer la surface du tronc cérébral. Une micropipette en verre (diamètre à l'extrémité ≈ 30 µm) a été remplie de la solution à injecter et connectée par un fil d'argent à un amplificateur électrophysiologique (Neuro Amp Ex, ADInstruments) pour permettre l'enregistrement de l'activité neuronale. Le bras tenant la pipette a été incliné de 20° dans l'axe rostro-caudal, pointe de la pipette vers l'avant de l'animal. Les coordonnées des injections dans le préBötC et dans la CVLM ont été déterminées à partir de la cartographie fonctionnelle du préBötC par enregistrements extracellulaires comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes principal (cf. Cartographie fonctionnelle du préBötC par enregistrements extracellulaires). Le cœur du préBötC était généralement observé ±1.65 mm latéralement, 0.75 ± 0.15 mm rostralement et -1.5 ± 0.25 mm ventralement au *calamus scriptorius*, l'ouverture caudale du 4è ventricule.

Les coordonnées d'injection du virus BiPOLES dans la CVLM ont aussi été fixées à partir de la cartographie fonctionnelle des limites du préBötC puisque cette région est localisée ventralement au préBötC (avec un certain recouvrement) *(*Guyenet & Schreihofer, 2002 ; Sved, 2000). Les limites ventrales du cœur du préBötC ont été identifiées lors de la perte de l'activité inspiratoire. Les injections étaient généralement réalisées ±1.65 mm latéralement, 0.75 ± 0.15 mm rostralement et –2.3 ± 0.2 mm ventralement au *calamus scriptorius*.

Certains animaux, en plus de l'injection du virus BiPOLES dans le préBötC, ont été injectés avec du CTB (traceur rétrograde) dans la RVLM afin de localiser les neurones qui y projettent. La RVLM est située caudalement au noyau moteur du nerf facial. De manière à cibler précisément la RVLM, nous avons cartographié fonctionnellement les bords caudal et ventral du noyau moteur du nerf facial par l'enregistrement des potentiels de champs antidromiques évoqués dans ce noyau par la stimulation électrique du nerf facial (Brown & Guyenet, 1985 ; McMullan, 2013) (Fig. 32). Pour cela, la peau de la joue a été incisée dans l'axe de la bouche et de l'œil pour exposer la branche mandibulaire du nerf

facial. Deux électrodes reliées à un stimulateur contrôlé par ordinateur ont été placées en contact avec le nerf. Une pipette en verre remplie de la solution à injecter et contenant une électrode reliée à un amplificateur électrophysiologique a permis d'enregistrer les potentiels de champ antidromiques évoqués dans le noyau du nerf facial par la stimulation du nerf facial. LA RVLM était généralement trouvée ±1.65 mm latéralement, 1.7 mm rostralement et -2.6 ± 0.1 mm ventralement au *calamus scriptorius*.

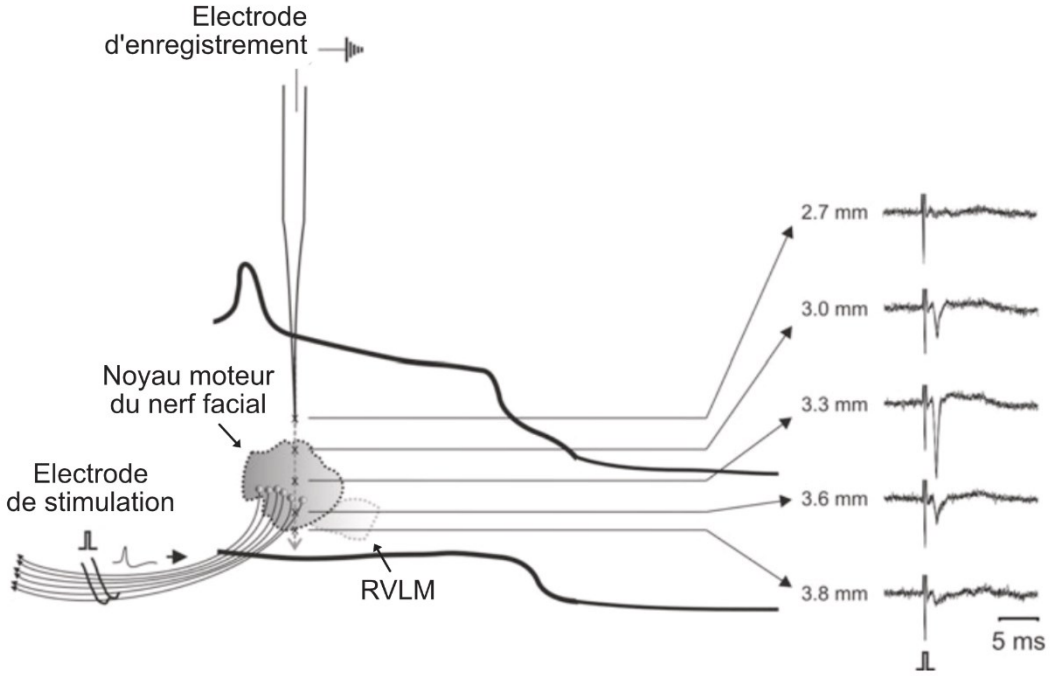


Figure 32. Cartographie électrophysiologique du noyau moteur du nerf facial (adapté de McMullan, 2013). Les enregistrements à droite correspondent aux variations de potentiel mesurées par l'électrode d'enregistrement placée à plusieurs coordonnées dorso-ventrales dans le noyau moteur du facial. L'amplitude de la déflexion enregistrée est liée à la proximité avec le centre du noyau.

Une fois les coordonnées d'injection fixées grâce aux cartographies électrophysiologiques, un picospritzer (PICOSPRITZER® III, Parker, NH, USA) et une monoculaire graduée ont été utilisés pour injecter précisément : 12.5nl de virus de traçage (deux injections rostro-caudales unilatérales) ou 35 nl de virus BiPOLES (deux injections rostro-caudales bilatérales) dans le préBötC ou la CVLM et 12.5 nl de CTB (un site d'injection bilatéral) dans la RVLM. Pour chaque site d'injection, les pipettes ont été laissées en place pendant 10 minutes après l'injection avant d'être retirées, de manière à limiter la diffusion de la solution injectée. Les plans musculaires et cutanés ont ensuite été suturés. Les

animaux étaient ensuite délicatement replacés dans leur cage posée sur un tapis chauffant et surveillés jusqu'à ce qu'ils aient repris conscience. Un suivi post-opératoire était réalisé chaque jour jusqu'à la cicatrisation complète des tissus, ou jusqu'à la sortie de l'animal pour les expérimentations réalisées rapidement après les injections virales.

Les expérimentations étaient ensuite réalisées trois semaines après les injections du virus de traçage, ou dix jours après les injections du virus BiPOLES. Tous les sites d'injection ont été vérifiés *a posteriori*.

➢ OPTOGENETIQUE SUR LA PREPARATION *IN SITU*

Afin de caractériser fonctionnellement les neurones préBötC^{GABA} et d'étudier leur implication dans le CRCV, nous avons utilisé l'optogénétique. Cette technique est basée sur l'expression de protéines exogènes sensibles à la lumière (les opsines) permettant de contrôler l'activité des neurones qui les expriment avec une précision spatiotemporelle élevée (Emiliani, 2022 ; Vierock, 2021). Dans notre cas, le virus BiPOLES induisait l'expression conditionnelle d'une opsine inhibitrice et d'une opsine excitatrice à la membrane du corps cellulaire d'un même neurone. Cela nous a permis d'alterner entre inhibition et excitation de l'activité des mêmes neurones au cours d'une même expérimentation en utilisant un laser bleu et un laser rouge.

Toutes les expérimentations ont été réalisées chez des rats Long-Evans GAD-Cre ou sauvages (mâles et femelles, âgés de 30 ± 1 jours) injectés avec le virus BiPOLES dans le préBötC ou dans la CVLM. La préparation était réalisée comme décrite dans le chapitre matériels et méthodes principal. Une étape de dissection supplémentaire a été ajoutée pour avoir accès au tronc cérébral et pour pouvoir implanter les canules optiques. Pour cela, les plans musculaires nucaux ont été enlevés et les premières vertèbres cervicales sectionnées. La dure mère a été disséquée pour permettre l'accès à la surface dorsale du tronc cérébral. La préparation était ensuite transférée dans la chambre d'enregistrement en position ventrale. Une fois la préparation réanimée et viable, une canule optique bilatérale (200 µm, ouverture numérique 0.22, Doric Lenses Inc., Québec, Canada) était progressivement implantée dans le tronc cérébral, ±1.75 mm latéralement, 0.75 mm rostralement et -1.45 mm ventralement au *calamus scriptorius* (≃200 µm dorsalement à la coordonnée dorso-ventrale du cœur du préBötC). Ces coordonnées ont été déterminées

fonctionnellement sur la base des effets maximums induits par la modulation optogénétique des neurones préBötC^{GABA}.

Dans le cadre de ces expérimentations, nous avons enregistré par des électrodes d'aspiration en verre l'activité du nerf phrénique pour mesurer la fonction respiratoire, du nerf vague cervical gauche pour mesurer des informations respiratoires et parasympathiques cardiaques, et de la chaine paravertébrale sympathique thoracique (entre T8 et T10) pour mesurer l'activité sympathique vasomotrice. La fréquence cardiaque instantanée a été reconstruite en utilisant un seuil de détection de l'onde P de l'ECG, enregistré simultanément par l'électrode du nerf phrénique.

À la fin du protocole de stimulation, de l'atropine, (0,2 µM diluée dans de l'aCSF), un antagoniste des récepteurs muscariniques bloquant la régulation parasympathique cardiaque, était ajouté dans la circulation de perfusion de certaines préparations. Vingt minutes après l'ajout d'atropine, de nouvelles illuminations ont été réalisées, nous permettant d'évaluer l'implication du système parasympathique dans certains des effets induits par la modulation optogénétique de l'activité des neurones préBötC^{GABA}.

❖ STIMULATION DES BARORECEPTEURS SUR LA PREPARATION *IN SITU*

Les frontières du préBötC et de la CVLM ne sont pas claires et il existe un certain recouvrement entre les neurones de ces deux groupes (Guyenet & Schreihofer, 2002 ; Sved, 2000). Aussi, des neurones GABAergiques de la CVLM auraient pu être infectés par le virus BiPOLES lors des injections dans le préBötC. Afin de vérifier la spécificité des effets observés après injections du virus BiPOLES dans le préBötC, des tests visant à stimuler le baroréflexe ont été pratiqués à la fin du protocole d'illuminations. Ces mêmes tests ont été effectués chez des rats GAD-Cre après injection du virus BiPOLES dans la CVLM.

Pour provoquer un baroréflexe sur la préparation *in situ*, nous avons augmenté le débit de la pompe de perfusion au maximum pendant 8 secondes, ce qui a augmenté la pression de perfusion et stimulé les barorécepteurs. Pour les baroréflexes réalisés en présence d'une photoinhibition, l'illumination était lancée simultanément à l'augmentation du débit de la pompe de perfusion. Les baroréflexes provoqués en l'absence de photoinhibitions servaient de baroréflexes contrôles. Les

préparations n'ayant pas répondu à la stimulation des barorécepteurs ont été exclues du test et de l'analyse.

➢ OPTOGENETIQUE *IN VIVO* EN CONDITION ANESTHESIEE

Pour confirmer les résultats de la modulation optogénétique des neurones préBötC^{GABA} *in situ* sur un modèle plus intégré, nous avons réalisé le même protocole d'illuminations optogénétiques en condition *in vivo* chez le rat anesthésié.

Les expérimentations ont été réalisées chez des rats Long Evans GAD-Cre et sauvages (mâles et femelles) injectés avec le virus BiPOLES dans le préBötC. Les expérimentations ont été réalisées en majorité (7/12) sur des rats âgés de 30 jours pour reproduire les conditions expérimentales du protocole *in situ*. Certaines des expérimentations (5/12) ont été réalisées sur des animaux âgés de 40 jours pour essayer de palier un problème de mortalité lié à l'affaiblissement des animaux suite à l'intervention chirurgicale pour les injections virales 10 jours auparavant. Les effets observés lors des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} n'étant pas différents entre ces deux âges, nous avons donc inclus tous les animaux dans l'analyse.

Toutes les expérimentations en condition *in vivo* anesthésiée ont été réalisées chez des rats Long-Evans GAD-Cre ou sauvages (mâles et femelles, âgés entre 30 et 40 jours). Les animaux ont été préparés comme détaillé dans la partie enregistrements *in vivo* anesthésiés du chapitre matériels et méthodes principal. Pour chaque expérimentation *in vivo*, l'activité respiratoire était mesurée par un EMG des muscles intercostaux externes et l'activité cardiaque était mesurée par ECG. Afin d'enregistrer la pression artérielle en plus des activités respiratoire et cardiaque, l'artère carotide gauche a été cathétérisée. Pour cela, les rats étaient placés sur le dos et une incision longitudinale de la peau du cou était réalisée. Les glandes salivaires et les différents plans musculaires étaient écartés pour exposer la gaine carotidienne. Le tissu conjonctif entourant la carotide et le nerf vague était précautionneusement disséqué pour libérer la carotide. Une ligature définitive était appliquée juste sous la bifurcation carotidienne et un clamp vasculaire était posé sur la partie caudale de la carotide commune. A l'aide de ciseaux vasculaires, l'artère était incisée pour permettre l'insertion d'un cathéter hépariné relié à un transducteur de pression. Après l'avoir inséré d'un centimètre dans

la carotide vers le cœur, une ligature de la carotide caudale avec le cathéter était réalisée pour le maintenir en place. Le clamp était ensuite retiré.

L'animal était par la suite replacé dans le cadre stéréotaxique en position ventrale pour procéder à l'implantation des canules de fibres optiques. Pour éviter des saignements trop importants en rouvrant les tissus cicatrisés suite aux injections virales, nous avons utilisé une approche chirurgicale différente, pour l'implantation des fibres optiques à travers le cervelet. Une incision médiane a été réalisée sur le dessus du crâne et toute les attaches musculaires ainsi que tissus conjonctifs ont été retirés. L'horizontalité de la tête était vérifiée à l'aide des coordonnées bregma et lambda et une fenêtre crânienne de 2.5 mm sur 4.5 mm était ouverte sur l'os occipital avec un foret dentaire. La dure mère était disséquée avec la pointe d'une aiguille pour exposer la surface du cervelet et les canules de fibres optiques étaient progressivement implantées ±1.75 mm en latéral, -4.55 mm en caudal et -9 mm en ventral (≃200 µm dorsalement à la coordonnée dorso-ventrale du cœur du préBötC) par rapport au lambda, utilisé comme zéro. Ces coordonnées ont été déterminées en amont grâce à la cartographie fonctionnelle du préBötC par enregistrements extracellulaires en utilisant cette même approche à travers le cervelet.

❖ PROTOCOLE D'ILLUMINATIONS OPTOGENETIQUES (*IN SITU* ET *IN VIVO*)

Les canules de fibres optiques bilatérales (200 µm de diamètre, NA 0.22, Doric Lenses Inc., Québec, Canada) étaient connectées à un laser rouge (589 nm) et à un laser bleu (473 nm). Les lasers sont commandés par un générateur d'impulsion TTL (PulserPlus, Prizmatics Ltd., Israel), configuré par ordinateur dans le logiciel Pulser, et dont les signaux sont intégrés dans le logiciel Spike2. Un puissance-mètre a été utilisé pour calibrer la densité lumineuse en sortie des canules de fibres optiques avant les expérimentations (à une distance d'environ 400 µm).
Pour les résultats présentés, les photostimulations et photoinhibitions prolongées ont consisté en des impulsions lumineuses de 10 ms à 50 Hz, à une densité lumineuse de 15 mW/mm^2 (soit 7.5 mW/mm^2 par fibre optique). Ces paramètres ont été fixés après le test de plusieurs protocoles d'illuminations (en termes de puissance, durée et fréquence des impulsions) car ils induisaient des effets maximums, sans effets négatifs artéfactuels liés à la chauffe du tissu (Shin, 2016). Ce dernier

point a été vérifié chez des rats Long Evans sauvages injectés avec le virus BiPOLES (n'exprimant donc pas les opsines), chez qui les illuminations optogénétiques n'induisaient aucun effet.

Des photomodulations à basse fréquence à 1Hz (impulsions de 15 ms) pendant 200 secondes à 15 mW/mm^2 (soit 7.5 mW/mm^2 par fibre) ont également été réalisées pour étudier l'effet unitaire des illuminations sur l'activité nerveuse sympathique et évaluer la connectivité fonctionnelle directe entre les neurones préBötC^{GABA} et l'activité nerveuse sympathique.

Pour chaque expérimentation, les illuminations étaient espacées d'au moins 1 minute pour laisser le temps aux paramètres respiratoires et cardiovasculaires de revenir à leurs valeurs basales (~5-10 s), et permettre des périodes de mesures stables post-stimulation et pré-stimulation suivante. Chaque protocole de stimulation a été répété plusieurs fois chez le même animal et aucune variabilité dans la valence de l'effet intra-préparation n'a été observée. Tous les paramètres ont été mesurés pour 2 à 4 photomodulations sur chaque animal et ont été moyennés pour obtenir la valeur individuelle de chaque paramètre.

➢ HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE – RNASCOPE

Afin de caractériser le phénotype neurochimique des neurones inhibiteurs du préBötC et de confirmer que seuls les neurones GABAergiques exprimaient le BiPOLES, nous avons utilisé l'hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope).

Ces expérimentations ont été réalisées chez des rats Long Evans GAD-Cre (âgés de 30 jours) injectés avec le virus BiPOLES dans le préBötC (à 21 jours de vie, pour reproduire les conditions des expérimentations d'optogénétique). L'hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) a été réalisée comme détaillé dans la partie hybridation *in situ* fluorescente du chapitre matériels et méthodes principal.

Pour ce projet, nous avons utilisé une première sonde qui ciblait l'ARNm codant pour un transporteur glycinergique (Rn-Slc6a5-C1) (marqueur du phénotype glycinergique), une deuxième sonde qui ciblait l'ARNm codant pour une enzyme de synthèse du GABA (Rn-Gad1-C2) (marqueur du phénotype GABAergique) et une troisième sonde qui ciblait l'ARNm codant pour l'opsine Chrimson dans BiPOLES (Chrimson-syn-C4). L'identification de la sonde glycinergique a été faite

par le fluorophore Opal-520, l'identification de la sonde GABAergique par le fluorophore Opal-690, et l'identification de la sonde pour le BiPOLES par le fluorophore Opal-620.

➢ HISTOLOGIE ET IMAGERIE

À la fin des expériences *in situ*, les cerveaux ont été extraits et directement fixés par immersion dans une solution de fixation (Antigenfix) pendant 72h à 4°C, puis cryoprotégés dans une solution de sucrose à 30 %. Pour toutes les autres expériences (optogénétique *in vivo*, traçage viral ou RNAscope), les animaux ont reçu une injection intrapéritonéale d'un mélange de Zoletil et de Domitor (zoletil 100 : tilétamine+zolazépam : 60mg/kg ; domitor : Médétomidine : 10mg/kg) avant d'être perfusés par voie transcardiaque. Avant de réaliser la perfusion transcardiaque, la profondeur du plan anesthésique était vérifiée par la perte du réflexe optico-palpébral et du retrait de la patte. Les rats étaient fixés sur le dos et une laparotomie subdiaphragmatique était réalisée. Les cotes et le diaphragme étaient ensuite découpés, et le sternum était clampé au-dessus de la tête du rat afin d'exposer la cavité thoracique. Le péricarde était enlevé et une aiguille (26G) reliée à la tubulure d'une pompe péristaltique était insérée dans le ventricule gauche. Une entaille de l'oreillette droite était réalisée pour que les liquides puissent s'écouler. 10 ml/10 g de poids de rat de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) était perfusée, suivis de 15 ml/10 g de poids de rat d'Antigenfix. Les cerveaux étaient ensuite prélevés, post-fixés pendant 24h dans de l'Antigenfix à 4°C et cryoprotégés dans une solution de sucrose à 30%. Les troncs cérébraux ont été coupés avec un cryostat (CM350S, Leica Microsystems) dans le plan coronal en sections de 50 µm pour toutes les conditions sauf pour le RNAscope, où ils étaient coupés à 30µm.

Pour certaines expérimentations nécessitant la localisation du noyau ambigu, une injection intrapéritonéale du traceur rétrograde Fluorogold (500µL à 0.2% dans une solution saline physiologique NaCL à 0.9%) a été réalisée cinq jours avant la perfusion intracardiaque (Merchenthaler, 1991). Ce composé est internalisé par les terminaisons nerveuses vagales et est transporté de manière rétrograde jusqu'aux corps cellulaires des neurones préganglionnaires parasympathiques et des motoneurones localisés dans le nA, permettant de les identifier.

Pour les immunohistochimies, les sections ont été bloquées et perméabilisées dans du PBS (1X) contenant 5 % de sérum d'âne, 2 % de BSA et 0,3 % de Triton X-100 pendant 1h à température

ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires, soit pendant 72h (cerveaux injectés avec le virus BiPOLES), soit pendant une semaine (cerveaux injectés avec le virus de traçage) à 4°C. Elles ont ensuite été rincées et laissées 2h avec des anticorps secondaires à température ambiante. Les coupes ont été montées sur des lames de microscope avec du milieu de montage Vectashield sans DAPI. Les anticorps primaires incluaient : l'anticorps chèvre anti-Choline Acétyl-Transférase (ChAT), l'anticorps lapin anti récepteur à la substance P (NK1R), l'anticorps souris ou lapin anti-Tyrosine-hydroxylase (TH), l'anticorps poulet anti-GFP, l'anticorps lapin anti-CTB et l'anticorps lapin anti-dsRed. Les anticorps secondaires étaient espèces spécifiques et conjugués à des fluorophores Alexa Fluor 647, 555 et 488. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés dans les tableaux 3 et 4 du chapitre matériels et méthodes principal.

Les marquages ont ensuite été examinés au microscope confocal Zeiss LSM-800 avec des objectifs ×10, ×20 ou ×40 pour les expériences de traçage viral et de RNAscope, ou au microscope à épi-fluorescence apotome Zeiss avec une caméra axioCam MRm et avec des objectifs ×10, ×20 pour les expériences d'optogénétique *in vivo* et *in situ*. Toutes les images ont été capturées à l'aide du logiciel d'imagerie ZEN 3.7 (blue edition). Certaines images ont été générées en empilant entre 5 et 7 acquisitions espacées de 1 µm dans le plan Z (ce qui sera précisé dans la légende de la figure correspondante) et utilisant la fonction de « projection d'intensité maximale » du logiciel Image J (NIH, USA). Les niveaux de gris des images des figures ont été optimisés (contraste et luminosité) dans le logiciel Affinity Designer (Serif Ltd., UK).

➢ VERIFICATION DES SITES D'INJECTIONS

Pour toutes les expériences incluant des injections de virus ou de traceur, les sites d'injections ont été vérifiés *a posteriori*. Il n'existe pour l'instant pas de marqueur spécifique du préBötC alors les coupes ont été co-marquées avec une combinaison d'anticorps permettant d'en déterminer les limites. La limite ventrale était estimée grâce à l'anticorps anti-Tyrosine-Hydroxylase (TH) et la limite dorsale, avec le marquage du noyau ambigu par l'anticorps anti-Choline Acétyl-Transférase (ChAT) ou par le fluorogold. La localisation du préBötC entre ces deux marqueurs était confirmée par le marquage de l'anticorps dirigé contre le récepteur à la substance P (NK1R), dense dans le préBötC (Gray, 2001 ; Furdui, 2024 ; Stornetta, 2003). Les coupes ont été imagées avec un objectif x10 et

chaque site d'injection était validé après son report sur la coupe correspondante d'un atlas stéréotaxique (Paxinos & Watson, 2013) grâce aux différents marqueurs, en utilisant le logiciel Affinity Designer (Serif Ltd., UK).
La représentation en « heat map » des sites d'injections a été réalisée sur Affinity Designer en superposant, pour chaque rat, l'intégralité des zones où le BiPOLES était exprimé pour chaque coupe de bulbe rachidien. Chaque zone exprimant le BiPOLES chez un rat était colorée en bleu. Le recouvrement de l'expression du BiPOLES pour deux rats distincts était représenté par la couleur supérieure de l'échelle graduée. L'échelle allait du bleu (pour les zones de la coupe où le moins d'expression de BiPOLES était constatée à l'échelle de tous les rats) au rouge foncé (pour les zones de la coupe où on retrouvait de l'expression de BiPOLES à l'échelle de tous les rats).

➢ ENREGISTREMENTS ET ANALYSE DU SIGNAL

❖ ANALYSE DES SIGNAUX NERVEUX ET DES PARAMETRES RESPIRATOIRES ET CARDIOVASCULAIRES

L'analyse des paramètres respiratoires et cardiovasculaires moyens ainsi que des activités nerveuses par moyennages déclenchés par la respiration a été réalisée comme décrite dans la partie Analyse du signal du chapitre matériels et méthodes principal.

Les pression systoliques, diastoliques et moyennes ont été reconstruites par un script du logiciel Spike2 à partir des tracés enregistrés de pression de perfusion (*in situ*) ou artérielle (*in vivo*).

Chaque photomodulation prolongée (30 s à 50 Hz) a fait l'objet de 3 périodes analysées : une période contrôle de 30 secondes avant illumination, la période de modulation optogénétique de 30 secondes, et une période de récupération post-illumination de 30 secondes. Chaque paramètre nerveux ou cardiovasculaire d'intérêt a été quantifié sur ces 3 périodes.

Les effets des illuminations unitaires à 1 Hz pendant 200 s ont été analysés en utilisant le signal du générateur d'impulsion TTL intégré dans Spike comme signal déclencheur du moyennage de l'activité nerveuse sympathique (200 évènements). Pour générer ces moyennages, la constante de lissage des tracés intégrés a été abaissée à 10 ms.

Les tests du baroréflexe avec ou sans photoinhibition ont été quantifiés en prenant une période contrôle de 30 s avant l'augmentation du débit de perfusion, et une période d'analyse de 10 s à partir du début de l'augmentation du débit de perfusion qui incluait toute la fenêtre temporelle où une sympathoinhibition liée au baroréflexe était observée. Pour l'analyse de ces tests, nous avons comparé la variation de l'activité nerveuse sympathique totale (obtenue en mesurant la moyenne du signal d'activité nerveuse sympathique intégrée) entre la période contrôle (avant le baroréflexe) et lors du baroréflexe avec ou sans photoinhibition, chez les rats injectés avec le virus BiPOLES dans le préBötC ou dans la CVLM. Puis nous avons comparé la variation de l'activité sympathique totale (exprimée en pourcentage par rapport à la valeur en période contrôle) pendant le baroréflexe avec photoinhibition entre les rats injectés avec le virus BiPOLES dans le PBC et ceux injectés dans la CVLM. Cela nous a permis de quantifier l'effet de la photoinhibition des neurones préBötC^{GABA} ou de la CVLM sur la réponse sympathoinhibitrice vasomotrice au baroréflexe, et d'estimer si des neurones GABAergiques de la CVLM avaient été infectés par le virus BiPOLES, exprimaient des opsines, et étaient ainsi impliqués dans les effets observés sur la pression artérielle moyenne et l'activité nerveuse sympathique tonique lors de la modulation optogénétique des neurones préBötC^{GABA}.

❖ COMPTAGE CELLULAIRE

Un comptage cellulaire a été effectué pour les expérimentations d'hybridation *in situ* fluorescente afin de caractériser le phénotype neurochimique des neurones inhibiteurs du préBötC et d'étudier celui des neurones exprimant le BiPOLES. Le comptage a été réalisé sur des coupes coronales de bulbe rachidien de 30 µm en série 1 sur 4, préalablement sélectionnées pour contenir le préBötC sur la base de critères anatomiques (forme de la coupe et ouverture du 4è ventricule), et imagées comme décrit dans la partie Histologie. Les comptages ont été faits sur des images obtenues avec un objectif x20 dans un plan optique unique (1.5 µm). Les coupes entières imagées ont été projetées sur leur coupe correspondante d'atlas stéréotaxique (Paxinos & Watson, 2013) pour délimiter la zone du préBötC. Puis le comptage a été effectué bilatéralement sur 4 coupes par animal. Le nombre de cellules comptées a été multiplié par 4, pour en extrapoler la quantité de cellules marquées dans le volume de préBötC couvert par les coupes utilisées (comptage sur coupes en série 1 sur 4).

L'intégralité des cellules exprimant de l'ARNm au sein du préBötC a été quantifiée. Les cellules étaient identifiables par des clusters de points distincts les uns des autres (un point = un ARNm).

❖ ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été faite sur les valeurs brutes individuelles, ainsi que sur les variations individuelles de chacun des paramètres pour chacun des animaux. Chaque valeur individuelle pour un paramètre chez un rat a fait l'objet du moyennage de ce paramètre obtenu à partir de la répétition des photomodulations ou des tests (entre 2 et 3 fois). La distribution normale des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et l'égalité de la variance des données a été testée. Les données brutes ayant une distribution normale et une variance égale ont été analysées à l'aide d'ANOVAs à mesures répétées, lorsqu'il n'y avait qu'un groupe, et par des ANOVAs sur mesures répétées à deux facteurs, lorsqu'il y avait plusieurs groupes. Ces tests étaient suivis, respectivement, de tests *post hoc* de comparaisons multiples de Holm-Sidak et de Sidak. Les données dont la distribution n'était pas normale ou dont la variance n'était pas égale ont été analysées à l'aide d'analyses de variance à mesures répétées sur les rangs de Friedman lorsqu'il n'y avait qu'un groupe, et à l'aide d'analyses à effets mixtes avec une correction de Geisser-Greenhouse lorsqu'il y avait plusieurs groupes. Ces tests étaient suivis, respectivement, du test *post hoc* de comparaisons multiples de Dunn et de Sidak. Pour comparer deux groupes appariés ou indépendants dont la distribution était normale et la variance égale, le test t de Student a été utilisé. Si les données étaient non paramétriques et appariées, le test non paramétrique de Wilcoxon était utilisé. Si les données étaient non paramétriques et d'échantillons indépendants, un test de Kolmogorov-Smirnov était utilisé.

Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v. 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA). Les différences ont été considérées significatives pour des valeurs de $p<0.05$. Les statistiques dans le texte sont présentées sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard par rapport à la moyenne (sem) et les statistiques détaillées sont présentées dans la description des figures. Les données groupées sont représentées en tant que moyenne ± sem par des histogrammes ou avec des diagrammes en violons tronqués avec la médiane et les quartiles. Les données individuelles sont représentées par des points sur les graphiques (reliés lorsque les

mesures étaient répétées) et correspondent à la valeur moyenne du paramètre pour le rat testé (obtenue en moyennant la valeur du paramètre mesurée sur 2 ou 3 essais indépendants chez le même rat).

Résultats

Les neurones inhibiteurs du préBötC sont majoritairement GABAergiques chez le rat juvénile.

Les neurones inhibiteurs du préBötC ont moins été étudiés que les neurones excitateurs et sont donc moins bien caractérisés. Les neurones inhibiteurs du préBötC sont classiquement divisés en deux sous-groupes, les neurones glycinergiques et les neurones GABAergiques (Koizumi, 2013 ; Kuwana, 2006 ; Morgado-Valle, 2010). Cependant, au cours du développement, les neurones inhibiteurs du préBötC co-expriment le GABA et la glycine avant de subir un processus de différenciation post-natal leur permettant d'acquérir un phénotype mature GABAergique ou glycinergique (Hirrlinger, 2019). Il a également été rapporté qu'une petite proportion des neurones inhibiteurs de ce groupe conserve un double phénotype GABA-glycine après la fin de la différenciation, à un stade mature (Hirrlinger, 2019 ; Harb, 2024 ; Koizumi, 2013). Mais ce phénotypique neurochimique n'a jamais été investigué chez le rat qui est le modèle que nous avons utilisé pour étudier le rôle des neurones GABAergiques du préBötC (préBötC^{GABA}) dans le CRCV. Nous avons alors caractérisé le phénotype des neurones inhibiteurs du préBötC chez le rat juvénile (âgé de 30 jours post-natals, P30) par hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) (Fig. 33).

Pour cela, nous avons utilisé une combinaison de sondes ciblant l'ARNm de la glutamate décarboxylase 1 (GAD1, enzyme de synthèse du GABA) et l'ARNm du transporteur de la glycine (Slc6a5) nous permettant de visualiser le phénotype GABAergique ou glycinergique des neurones inhibiteurs du préBötC (Fig. 33Ai-iii).

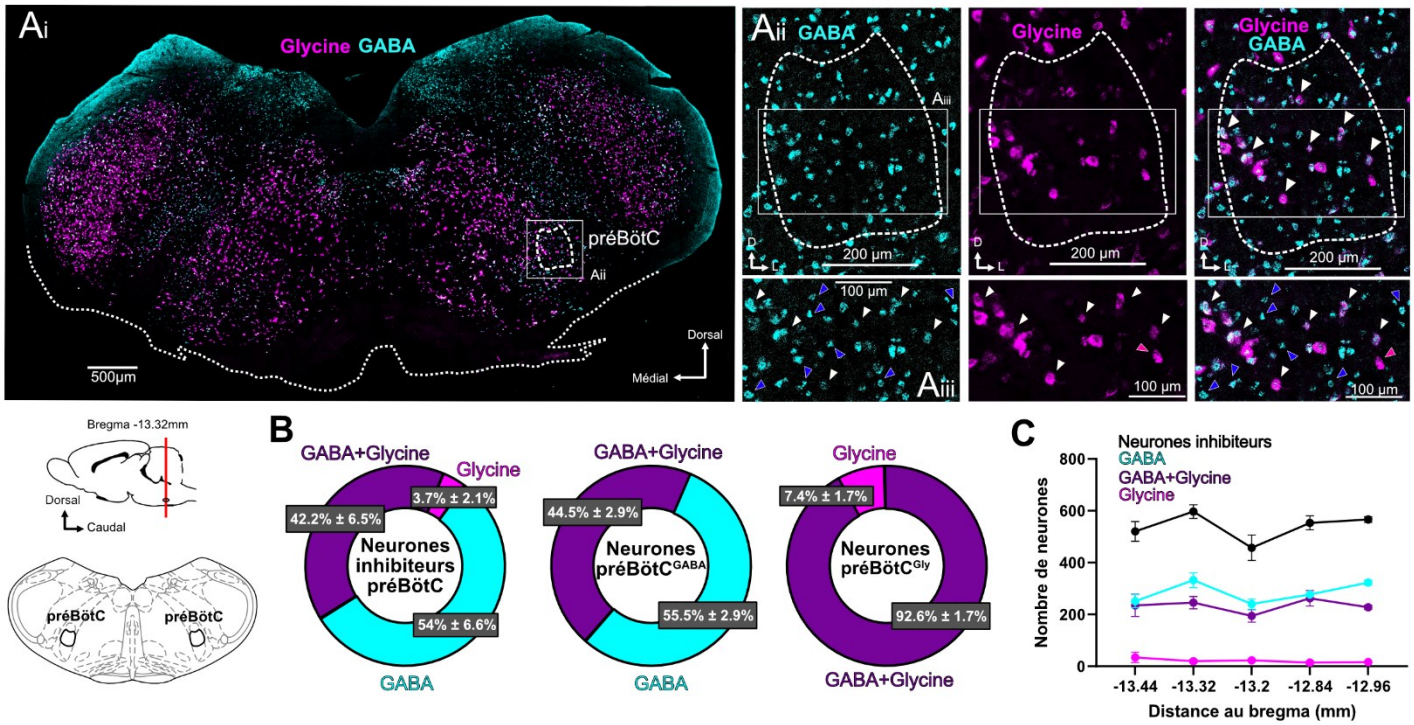


Figure 33. Caractérisation du phénotype neurochimique des neurones inhibiteurs du préBötC par hybridation *in situ* fluorescente chez le rat juvénile. Détection et quantification des transcrits d'ARNm codant pour l'expression du phénotype GABAergique (Gad1, en cyan) ou glycinergique (Slc6a5, en magenta) par hybridation *in situ* (RNAscope) chez des rats juvéniles (n = 3). (**A**) Exemples représentatifs de la détection des transcrits à l'échelle d'une coupe coronale entière de bulbe rachidien (**Ai**), à l'échelle du préBötC entier (délimité par des pointillés blancs) (**Aii**) et agrandi à l'intérieur du préBötC (carré blanc en **Aii**) (**Aiii**). Les flèches blanches indiquent des neurones qui co-expriment le GABA et la glycine, les flèches bleues indiquent des neurones uniquement GABAergiques et la flèche rose indique un neurone uniquement glycinergique. La localisation du préBötC a été estimée à partir d'indices anatomiques (incluant la forme de la coupe et l'ouverture du 4è ventricule) et à partir de la projection de l'image de la coupe entière sur sa coupe correspondante d'atlas (Paxinos & Watson, 2013), représentée en dessous. (**B et C**) Quantifications des différentes sous-populations de neurones inhibiteurs dans le préBötC (n=3). (**B**) Proportions relatives (en %) des différents phénotypes au sein des neurones inhibiteurs du préBötC (à gauche), des sous-populations uniquement GABAergiques et GABA-glycine au sein des neurones GABAergiques (au milieu), et des sous-populations uniquement glycinergiques et GABA-glycine au sein des neurones glycinergiques (à droite) du préBötC. Les valeurs sont représentées comme la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (sem) du nombre total de cellules comptées bilatéralement dans le préBötC sur 4 coupes coronales de bulbe rachidien contenant le préBötC chez chaque rat (n=3). (**C**) Représentation du nombre moyen de cellules quantifiées dans le préBötC pour chacun des phénotypes neuronaux selon la position rostro-caudale du préBötC par rapport au bregma (n=3). Les neurones inhibiteurs sont la somme de tous les neurones comptés, indépendamment de leur phénotype. Chaque point représente le nombre total moyen des cellules comptées bilatéralement dans le préBötC à différents niveaux rostro-caudaux de coupes de bulbe rachidien pour les 3 rats. Les barres d'erreurs représentent la SEM. (**Ai**) Image acquise avec un objectif x10 dans un plan optique unique (15 µm). (**Aii,iii**) Image acquise avec un objectif x20 dans un plan optique unique (1.5 µm).

La quantification de la totalité des neurones du préBötC exprimant des transcrits a montré que les neurones inhibiteurs représentent en moyenne 2148 neurones par préBötC (Fig. 33C), soit 4296 neurones à l'échelle des deux préBötC. Qualitativement, nous avons observé trois populations de neurones inhibiteurs au sein du préBötC : un premier sous-groupe dont les neurones n'exprimaient de l'ARNm que pour GAD1 et qui étaient donc uniquement GABAergiques, un deuxième sous-groupe dont les neurones n'exprimaient d'ARNm que pour Slc6a5 et qui étaient donc uniquement glycinergiques, et un troisième sous-groupe, dont les neurones co-exprimaient GAD1 et Slc6a5 indiquant qu'ils étaient GABAergiques et glycinergiques (appelés neurones GABA-glycine) (Fig. 33Ai-iii). La quantification des proportions relatives de chacun de ces trois phénotypes sur la totalité des neurones inhibiteurs du préBötC, tous phénotypes confondus, a montré que les neurones GABAergiques étaient les plus représentés (54% ± 6.6%) (Fig. 33B,C). La deuxième population inhibitrice la plus représentée était les neurones GABA-glycine qui constituaient 42.2% des neurones inhibiteurs du préBötC (Fig. 33B,C). Puisque ces neurones constituent une part conséquente des neurones inhibiteurs du préBötC, nous avons quantifié leur représentation respective au sein des neurones GABAergiques et des neurones glycinergiques. Les neurones GABA-glycine représentaient 44.5% des neurones GABAergiques et 92.6% des neurones glycinergiques, indiquant que les neurones uniquement glycinergiques n'étaient que minoritairement représentés dans le préBötC dans ces conditions (Fig. 33B,C). Par ailleurs, la quantification de leur proportion au sein de la totalité des neurones inhibiteurs du préBötC a révélé qu'ils ne représentaient que 3.7% des neurones inhibiteurs de ce groupe (Fig. 33B,C). Les neurones de ces trois sous-groupes (GABAergiques, glycinergiques et GABA-glycine) étaient repartis de manière homogène dans tout le préBötC, sans aucune logique de distribution (Fig. 33A). Aucune variation dans leurs proportions relatives n'a été constatée, quel que soit le niveau rostro-caudal du préBötC où les mesures étaient faites (Fig. 33C). Il ne semble donc pas y avoir d'organisation spatiale particulière des neurones inhibiteurs du préBötC.

Ces résultats montrent la présence de trois phénotypes inhibiteurs dans le préBötC chez le rat : les neurones GABAergiques, les neurones glycinergiques et les neurones GABA-glycine. Les proportions mesurées pour chacun de ces phénotypes diffèrent avec celles décrites chez la souris (Hirrlinger, 2019) et nos résultats montrent que chez le rat juvénile, les neurones inhibiteurs du préBötC sont majoritairement GABAergiques, incluant des neurones uniquement GABAergiques et des neurones GABA-glycine.

Les neurones GABAergiques du préBötC projettent dans les régions du CRCV et forment des contacts pré-synaptiques à proximité de neurones potentiellement autonomes cardiovasculaires.

Le connectome des neurones préBötC^{GABA} n'a encore jamais été étudié chez le rat et les quelques données de la littérature concernant les projections de ces neurones chez la souris ne permettent pas de savoir s'ils contactent les régions clés du couplage respiratoire-cardiovasculaire (Koizumi, 2013). Pour déterminer si les neurones préBötC^{GABA} possèdent le substrat anatomique nécessaire pour pouvoir directement moduler l'activité des neurones autonomes cardiovasculaires du nA et de la RVLM, nous avons réalisé des micro-injections d'un virus de traçage unilatérales et fonctionnellement guidées pour cibler le préBötC de rats GAD-Cre. Le virus utilisé a donné lieu à l'expression cre-dépendante de la TdTomato qui marque le corps cellulaire des neurones et leurs projections axonales, ainsi que de la synaptophysine-GFP qui marque leurs terminaisons pré-synaptiques, nous permettant de visualiser les régions ciblées par les projections des neurones préBötC^{GABA} (Fig. 34Ai).

L'analyse histologique par immunohistochimie des coupes coronales du bulbe rachidien contenant le préBötC a confirmé que nos injections ont bien ciblé ce groupe spécifiquement. La TdTomato marque les projections axonales mais aussi les corps cellulaires des neurones qui l'expriment, ce qui nous a permis d'identifier la localisation des neurones exprimant le virus (Fig. 34Aii,Aiii). Les corps cellulaires des neurones marqués par la TdTomato étaient bien situés ventralement au nA (dont les neurones cholinergiques sont marqués par la choline acétyltransférase, ChAT), dorsalement à la CVLM (identifiée grâce au marquage à la tyrosine hydroxylase de ses neurones catécholaminergiques), et étaient localisés sur des coupes coronales de bulbe rachidien comprises entre -13.32 mm et -12.96 mm au bregma (Fig. 34Ai-iv). Ces marqueurs anatomiques caractérisent le préBötC (Alheid & MCrimmon, 2008 ; Menuet, 2020) et ont confirmé que les neurones GABAergiques marqués étaient bien confinés dans cette région.

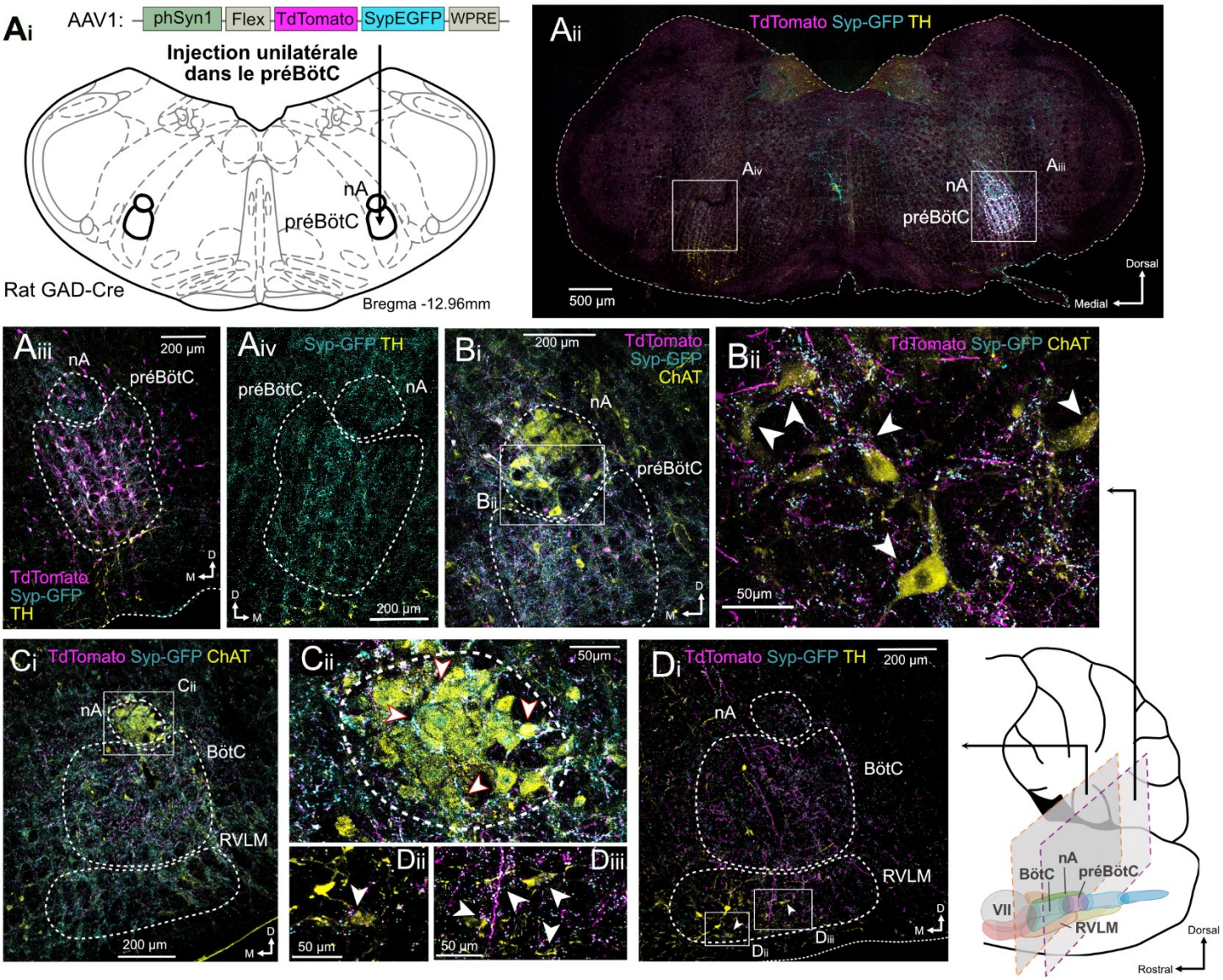


Figure 34. Caractérisation des projections des neurones préBötC^{GABA} dans les régions du couplage respiratoire-cardiovasculaire chez le rat juvénile par traçage viral antérograde. Analyse histologique par immunohistochimie (n=2). (**Ai**) Représentation schématique de l'injection dans le préBötC d'un rat GAD-Cre du virus de traçage sur une coupe coronale d'Atlas (Paxinos & Watson, 2013) du bulbe rachidien. (**Aii**) Exemple représentatif du site d'injection sur une coupe coronale de bulbe rachidien (-12.96 mm par rapport au bregma). (**Aiii et Aiv**) Agrandissements de la région du préBötC ipsilatéralement et controlatéralement à l'injection, respectivement. Les neurones préBötC^{GABA} et leurs projections sont marqués par la TdTomato (en magenta), les contacts pré-synaptiques sont marqués par la Synaptophysine-GFP (en cyan) et les neurones catécholaminergiques de la CVLM sont marqués par la tyrosine hydroxylase (en jaune). L'injection est bien restreinte au préBötC. (**Bi**) Détection de projections (en mangenta) et de contacts pré-synaptiques des neurones préBötC^{GABA} à proximité des neurones du nA semi-compact (agrandi en **Bii**) marqués par la choline acétyl-transférase (en jaune). Dans le nA semi-compact sont retrouvés des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques mais aussi des motoneurones laryngés (Bieger & Hopkins, 1987 ; Veerakumar, 2022). Les flèches indiquent les neurones du nA à proximité desquels sont observés des punctas pré-synaptiques et des projections axonales. (**C-D**) Détection des projections (en magenta) et des contacts pré-

synaptiques (en cyan) des neurones préBötC^{GABA} formés dans les régions du nA compact , du BötC et de la RVLM sur des coupes coronales de bulbes rachidiens (-12.24 mm par rapport au bregma). Les neurones du nA (**Ci**) et les neurones catécholaminergiques de la RVLM (**Di**), respectivement marqués par la choline acétyl-transférase et la tyrosine hydroxylase (en jaune), sont agrandis en (**Cii**) et (**Dii-iii**). Les flèches indiquent les neurones du nA ou de la RVLM à proximité desquels sont observés des punctas pré-synaptiques et des projections axonales. Le nA compact contient des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques mais aussi des motoneurones phrayngés (Bieger & Hopkins, 1987 ; Veerakumar, 2022). (**Aii**) Image acquise avec un objectif x10 dans un plan optique unique (15 µm). (**Aiii**) Image générée par la projection d'intensité maximale de 7 images superposées dans le plan z acquises avec un objectif x20 et un pas de 1 µm entre chaque image. (**Aiv**) Image acquise avec un objectif x10 dans un plan optique unique (15 µm). (**Bi**) Image générée par la projection d'intensité maximale de 6 images acquises avec un objectif x20 et un pas de 1 µm entre chaque image. (**Bii**) Image générée par la projection d'intensité maximale de 7 images acquises avec un objectif x40 et un pas de 1 µm entre chaque image. (**Ci et Cii**) Images acquises avec un objectif x20 dans un plan optique unique (15 µm). (**Di-Diii**) Images générées par la projection d'intensité maximale de 5 images acquises avec un objectif x20 et un pas de 1 µm entre chaque image. Syp-GFP : synaptophysine-GFP ; ChAT : choline acétyl-transférase ; TH : Tyrosine hydroxylase; nA : noyau ambigu; RVLM : bulbe rostral ventro-latéral ; BötC : complexe de Bötzinger ; préBötC : complexe de pré-Bötzinger ; VII : noyau du nerf facial ; AAV : virus adénoassocié.

Un dense marquage pour la Synaptophysine-GFP était observé dans le préBötC ipsilatéral au côté injecté (Fig. 34Aii, Aiii, Bi), indicatif de l'interconnexion des neurones au sein des micro-réseaux locaux du préBötC. Les marquages ont également révélé que les neurones préBötC^{GABA} envoient des projections commissurales pour contacter le préBötC controlatéral (Fig. 34Aiv), ce qui est important pour la synchronie bilatérale de ces groupes et pour générer un patron respiratoire physiologique (Bouvier, 2010 ; Wallén-Mackenzie, 2006). Par ailleurs, un grand nombre de puncta pré-synaptiques était observé dans la région du BötC montrant que les neurones préBötC^{GABA} y projettent densément (Fig. 34Ci, Di). Ce groupe respiratoire impliqué dans l'expiration est interconnecté avec le préBötC ce qui permet notamment l'alternance entre l'inspiration et l'expiration (Yang & Feldman, 2018, 2020 ; Smith, 2007 ; Ezure & Tanaka, 2003 ; Jiang & Lipski, 1990). Ces éléments sont caractéristiques des neurones du préBötC et apportent une confirmation supplémentaire à la spécificité de nos injections.

Concernant le rôle des neurones préBötC^{GABA} dans le CRCV, nous nous sommes intéressés au nA et à la RVLM qui contiennent des neurones autonomes cardiovasculaires impliqués dans la genèse de ce phénomène. Le nA contient des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques dont l'activité est modulée par la respiration, ce qui génère la RespVRC (Gilbey, 1984 ; Machado, 2016 ; Frank, 2009 ; Neff, 2003). Ces neurones reçoivent notamment des courants inspiratoires inhibiteurs

GABAergiques qui pourraient provenir des neurones préBötC^{GABA} (Frank, 2009 ; Neff, 2003 ; Gilbey, 1984). Les marquages ont révélé que ces neurones envoient des projections axonales vers le nA et qu'ils forment une grande densité de contacts pré-synaptiques qui entourent le corps cellulaire des neurones cholinergiques du nA (Fig. 34Bi-Cii). Les neurones préBötC^{GABA} possèdent donc les propriétés anatomiques nécessaires pour moduler l'activité des neurones du nA.

L'activité des neurones présympathiques de la RVLM est modulée par la respiration, ce qui génère la modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique vasomotrice et les ondes TH (Haselton & Guyenet, 1989 ; Guyenet, 1990 ; Moraes, 2013). La modulation inhibitrice inspiratoire reçue par certains des neurones présympathiques C1 de la RVLM pourrait provenir de neurones GABAergiques du préBötC. Les neurones présympathiques C1 de la RVLM sont catécholaminergiques et ont été identifiés comme les neurones marqués par la tyrosine hydroxylase (TH) proches de la surface ventrale du bulbe rachidien, ventraux au BötC et au nA, et caudaux au noyau facial (Fig. 34D,Ei) (Dampney, 1982 ; Schreihofer & Guyenet 1997 ; Abbott, 2009). Du marquage pour la TdTomato et pour la Synaptophysine-GFP étaient observés dans la RVLM, indiquant qu'elle est ciblée par les projections des neurones préBötC^{GABA} qui forment des contacts pré-synaptiques à proximité des neurones présympathiques de cette région (Fig. 34Ci, Di-iii).

L'ensemble de ces données révèle que les neurones préBötC^{GABA} contactent plusieurs régions respiratoires et autonomes cardiovasculaires. Notamment, ces données montrent que les neurones préBötC^{GABA} forment des contacts pré-synaptiques à proximité des neurones du nA et de la RVLM, et qu'ils possèdent ainsi les propriétés anatomiques nécessaires pour moduler leur activité et le CRCV.

Les injections virales induisent l'expression conditionnelle de BiPOLES dans les neurones préBötC^{GABA}.

Le traçage viral a révélé que les neurones préBötC^{GABA} forment des contacts pré-synaptiques à proximité des neurones présympathiques de la RVLM et des neurones du nA. Afin d'étudier fonctionnellement si les neurones préBötC^{GABA} sont impliqués dans le CRCV, nous avons modulé l'activité de ces neurones chez le rat par optogénétique. L'optogénétique est une technique basée sur l'expression de protéines exogènes, ici des canaux ioniques, activées par la lumière (les opsines), permettant de contrôler l'activité des neurones qui les expriment avec une précision spatiotemporelle élevée (Emiliani, 2022 ; Vierock, 2021). Pour cela, nous avons réalisé des

injections virales bilatérales électrophysiologiquement guidées dans le préBötC de rats GAD-Cre pour induire l'expression conditionnelle de BiPOLES dans les neurones préBötC^{GABA}. Le BiPOLES est un outil optogénétique basé sur la fusion entre une opsine inhibitrice, *Gt*ACR2, et une opsine excitatrice, Chrimson, permettant un contrôle bidirectionnel de l'activité des neurones en alternant entre un laser rouge et un laser bleu (Vierock, 2021) (Fig. 35A). Les opsines de BiPOLES sont également fusionnées à la protéine fluorescente mCerulean qui nous a permis de vérifier *a posteriori* la précision ainsi que la spécificité anatomique et phénotypique de nos injections (Fig. 35).

Après chaque expérimentation d'optogénétique, que ce soit sur le modèle *in vivo* ou *in situ*, la validation des sites d'injections et de l'expression intégrale de BiPOLES a été réalisée par immunohistochimie. L'expression de BiPOLES était concentrée ventralement au nA, sur des coupes coronales de bulbe rachidien comprises entre -13.32 mm et -12.84mm au bregma et dans une région fortement marquée par les récepteurs à la substance P (NK1R) (Fig. 35A-C). Pris ensembles, ces éléments sont caractéristiques de la région du préBötC (Stornetta, 2003 ; Alheid & McCrimmon, 2008), ce qui confirme que nos injections, réalisées à l'identique pour les expérimentations *in vivo* et *in situ*, étaient bien restreintes à cette région (Fig. 35C). Aucune expression n'a été trouvée chez les rats sauvages qui ont été injectés avec le virus BiPOLES dans les mêmes conditions, ce qui a confirmé que l'expression de BiPOLES était bien uniquement cre-dépendante.

Notre modèle rongeur est le rat GAD-Cre, chez qui la cre-recombinase est exprimée sous le contrôle du promoteur GAD1. L'expression de BiPOLES dans les neurones de ce modèle est ainsi censée être restreinte aux neurones GABAergiques. Cependant, la littérature rapporte que les neurones inhibiteurs du préBötC co-expriment le GABA et la glycine pendant le développement avant de se différencier entre P0 et P15 et d'acquérir un phénotype mature (Hirllinger, 2019). Or la demi-vie de la cre-recombinase dans les neurones est méconnue. Si elle persiste pendant plusieurs jours, une expression résiduelle de la cre-recombinase pourrait être observée dans certains neurones matures uniquement glycinergiques qui ont co-exprimés le GABA et la glycine pendant le développement. Puisque nos injections virales nécessitaient d'être réalisées à P21, peu de temps après que la majorité des neurones inhibiteurs du préBötC ai acquis leur phénotype définitif, nous avons vérifié que BiPOLES n'était exprimé que dans les neurones GABAergiques du préBötC par hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) chez des rats GAD-Cre injectés avec le virus BiPOLES (Fig. 35D-G). Pour ce faire, nous avons utilisé trois sondes : GAD1 et Slc6a5 comme pour la caractérisation phénotypique des neurones GABAergiques et glycinergiques du préBötC (Fig. 35), et

chrimson-syn, qui reconnaît l'ARNm codant pour l'opsine chrimson. Cela nous a permis de visualiser les neurones exprimant BiPOLES et de caractériser leur phénotype neurochimique (Fig. 35D-G).

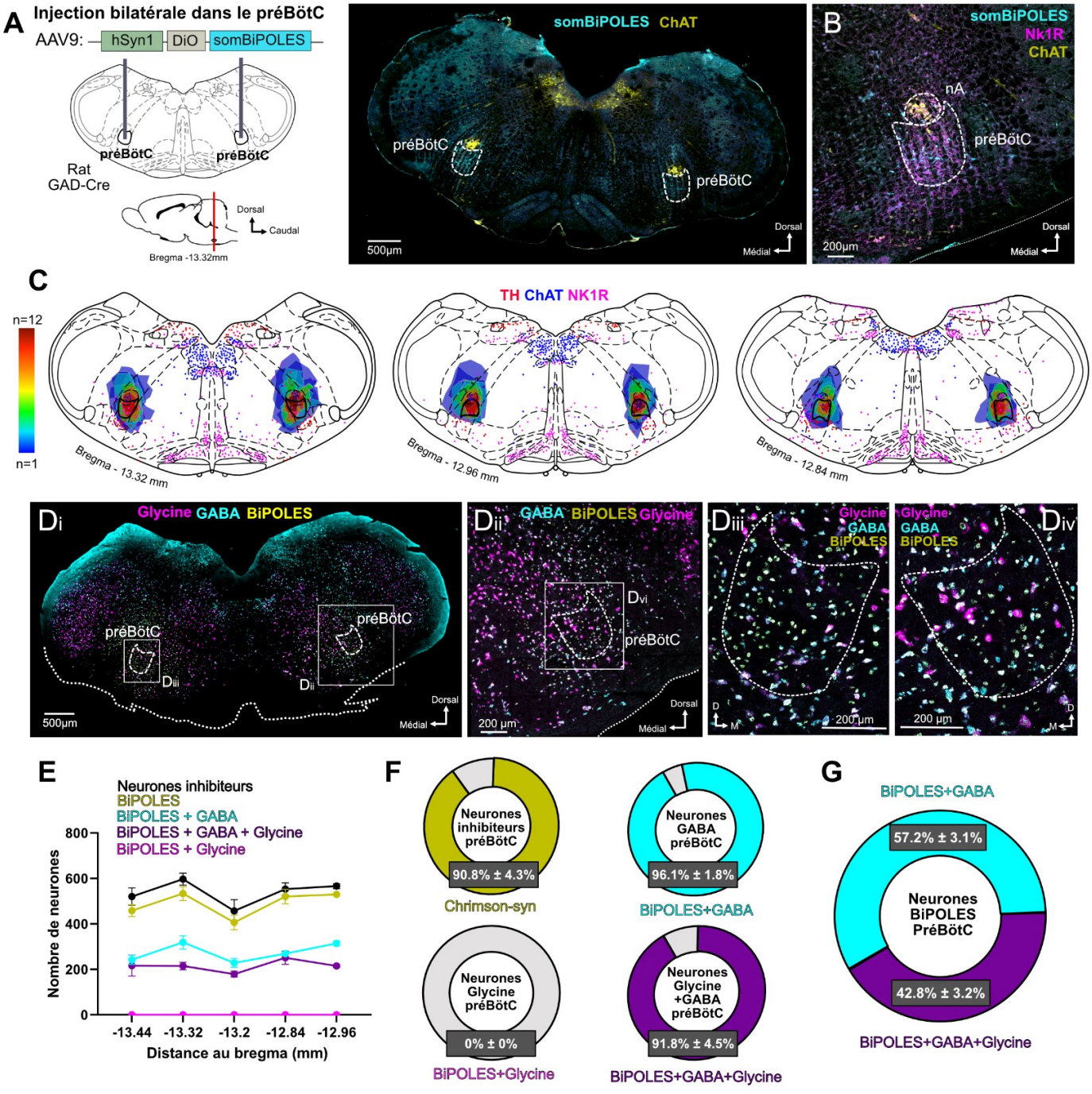


Figure 35. Caractérisation de l'expression de BiPOLES dans les neurones préBötC^{GABA}. (A-C) Détection par immunohistochimie de l'expression de BiPOLES (n = 23 *in situ* ; n = 16 *in vivo*). **(A et B)** Coupes coronales de bulbes rachidiens (-13.36 mm par rapport au bregma) montrant l'expression de BiPOLES (en cyan), de la ChAT (en jaune) et des récepteurs à la substance P (NK1R, en magenta, seulement en **B**). (**C**) Représentation en « heat map » des zones exprimant BiPOLES sur leurs coupes coronales de bulbe rachidien correspondantes d'atlas (Paxinos & Watson, 2013), reconstruite à partir de 12/19 des rats GAD-Cre+ inclus dans les expérimentations d'optogénétique sur la préparation *in situ*. Chaque zone exprimant BiPOLES à l'échelle d'un rat était colorée en bleu. Deux superpositions changeaient la couleur de la zone pour la couleur supérieure de l'échelle. Les zones en bleu étaient les zones où le moins d'expression de BiPOLES était constatée à l'échelle de tous les rats, et les zones en rouge foncé étaient les zones où l'expression de BiPOLES était observée chez tous les rats. La région où BiPOLES était toujours retrouvé chez tous les rats est le préBötC (dont les contours sur la coupe d'atlas sont représentés en gras). Les points colorés représentent les marquages classiquement observés pour la TH (en rouge), la ChAT (en bleu) et les NK1R (en magenta) lors des immunohistochimies. (**D-G**) Détection et quantification du phénotype des neurones exprimant BiPOLES par hybridation *in situ* fluorescente (n=3). (**D**) Exemples représentatifs de la détection des transcrits d'ARNm codant pour l'expression de BiPOLES (sonde Chrimson-syn, en jaune), du phénotype GABAergique (sonde Gad1, en cyan) et/ou glycinergique (sonde Slc6a5, en magenta) à l'échelle d'une coupe entière de bulbe rachidien (-13.32 mm par rapport au bregma) (**Di**), de la région du préBötC étendu (**Dii**) et du préBötC agrandi **(Diii et Div**). (**E**) Représentation du nombre moyen de neurones GABAergique, glycinergiques et GABA/glycine exprimant BiPOLES au sein du préBötC à différents niveaux rostro-caudaux où était réalisé le comptage. A l'échelle du préBötC unilatéral, sur 2148 neurones inhibiteurs comptabilisés, 1946 co-exprimaient BiPOLES (n=3). Les barres d'erreur représentent la SEM. (**F**) Quantifications des proportions relatives (en %) des neurones du préBötC exprimant BiPOLES par rapport à la totalité des neurones inhibiteurs, des neurones uniquement GABAergiques, des neurones uniquement glycinergiques et des neurones GABA-glycine (n=3). (**G**) Proportions relatives (en %) des neurones uniquement GABAergiques et GABA-glycine co-exprimant le BiPOLES au sein de l'intégralité des neurones exprimant le BiPOLES. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n=3). (**A, Di, Dii)** Images acquises avec un objectif x10 dans un plan optique (15 µm)**,** (**B, Diii et Div**) Images acquises avec un objectif x20 dans un plan optique unique (1.5 µm). ChAT : choline acétyl-transférase ; TH : Tyrosine hydroxylase; nA : noyau ambigu ; préBötC : complexe de pré-Bötzinger ; NK1R : récepteurs à la substance P ; AAV : virus adénoassocié.

La quantification de l'expression de BiPOLES au sein de la totalité des neurones inhibiteurs des prébötC bilatéraux a montré que BiPOLES était exclusivement exprimé par les neurones inhibiteurs et qu'aucune autre cellule au phénotype non-identifié ne l'exprimait (Fig. 35D,F). Par ailleurs, aucun neurone uniquement glycinergique (n'exprimant que Slc6a5 et pas GAD1) n'était co-marqué pour BiPOLES, qui n'était donc exprimé que par les neurones GABAergiques (Fig. 35F). BiPOLES est largement exprimé dans le préBötC puisque sur la totalité des neurones inhibiteurs de ce groupe qui ont été quantifiés, 90.8% d'entre eux étaient co-marqués pour BiPOLES (Fig. 35E,F). Cette valeur est restée constante quel que soit le niveau rostro-caudal des coupes coronales de bulbe rachidien contenant le préBötC où ont été effectués les comptages (entre -13.44 et -12.96 au bregma) (Fig. 35E). BIPOLES était exprimé dans la majorité des neurones GABAergiques du préBötC :

respectivement 96.1% des neurones GABAergiques et 91.8% des neurones GABA-glycine (Fig. 35F). La quantification des proportions relatives des neurones GABAergiques et GABA-glycine au sein des neurones GABAergiques qui exprimaient BiPOLES a montré que 57.2% des neurones inhibiteurs du préBötC exprimant BiPOLES étaient GABAergiques, et que les 42.8% restants étaient GABA-glycine (Fig. 35G).

L'ensemble de ces données confirme que l'expression conditionnelle de BiPOLES dans les neurones inhibiteurs du rat GAD-Cre est spécifique des neurones GABAergiques, et que nos injections étaient restreintes à la région du préBötC.

La photomodulation prolongée des neurones GABAergiques du préBötC impacte les fonctions respiratoire et cardiovasculaire *in vivo* et *in situ*.

Nous avons ensuite étudié si la modulation de l'activité des neurones préBötC^{GABA} avait un effet sur les fonctions respiratoire et cardiovasculaire, et sur leur couplage au niveau de la RespVRC et des ondes TH. Pour cela, nous avons commencé par réaliser des photostimulations prolongées (30 s à 50Hz, impulsions lasers de 10 ms à 15 mW/mm^2) des neurones préBötC^{GABA} chez le rat anesthésié tout en évaluant la fonction respiratoire par un EMG des muscles intercostaux externes, la fonction cardiaque par un ECG et la pression artérielle par la pose d'un cathéter carotidien.

Concernant les effets des photomodulations sur la fonction respiratoire, la fréquence respiratoire n'était ni affectée par les photoinhibitions, ni par les photostimulations (Fig. 36A,C, D). L'amplitude inspiratoire ne variait pas avec la photoinhibition mais était diminuée par la photostimulation (-21.7 ± 6.4%) (Fig. 36A,E,F). Concernant les paramètres cardiovasculaires, la photostimulation des neurones préBötC^{GABA} induisait une diminution de l'amplitude de la RespVRC (-45 ± 9.6% ; -0.24 ± 0.07 bpm), de la fréquence cardiaque moyenne (-5 ± 1% ; -12.5 ± 2.93 bpm), de l'amplitude des ondes TH (-31.8 ± 5.6%) et de la pression artérielle moyenne (-13.1 ± 2.9% ; -6.96 ± 1.75 mmHg) (Fig. 35B,C, D,E,F). La photoinhibition des mêmes neurones induisait également une diminution mais plus modérées de la fréquence cardiaque moyenne (-1.7 ± 0.5% ; -5.19 ± 1.51 bpm) et de la pression artérielle moyenne (-3.3 ± 1% ; -2.2 ± 0.91 mmHg), et avait fortement tendance à augmenter l'amplitude de la RespVRC (+73 ± 24.3% ; 0.23 ± 0.14 bpm ; Friedman : p=0.0458, Dunn OFF vs ON : p=0.1237, ON vs OFF : p=0.0742 ; test t student : cre+ vs cre- : p=0.0526). Aucun effet clair n'a été observé pour les ondes TH dont l'amplitude variait dans un sens ou dans l'autre selon les rats (les ondes TH étaient amplifiées chez 6 rats sur 10, et diminuées chez 4 rats sur 10) (Fig. 36B,C, D,E,F,).

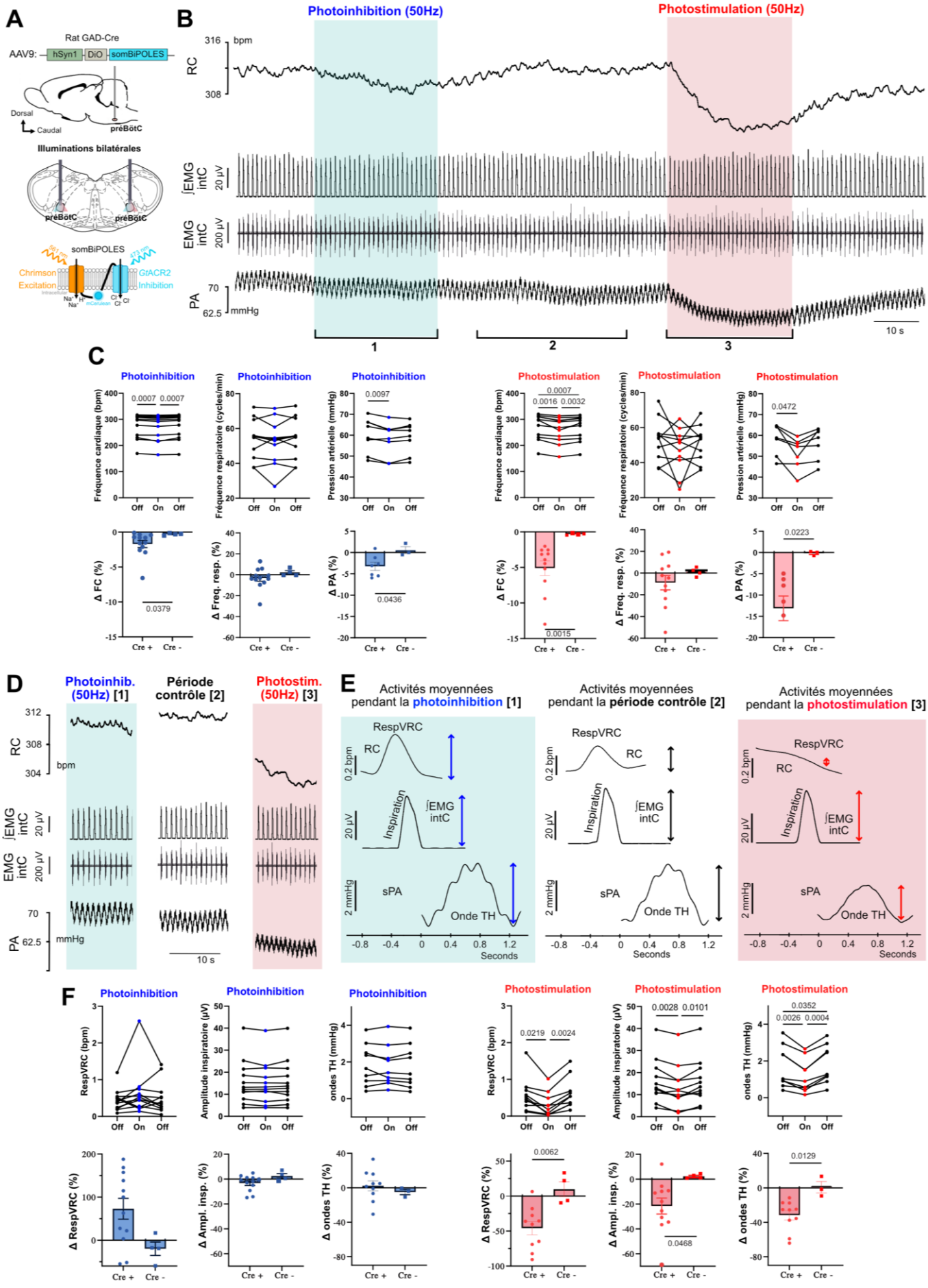

A
Rat GAD-Cre
AAV9:
hSyn1
DiO
somBiPOLES
Dorsal
Caudal
préBötC
Illuminations bilatérales
somBiPOLES
Chrimson
Excitation
GtACR2
Inhibition
B
Photoinhibition (50Hz)
Photostimulation (50Hz)
RC
316
308
bpm
∫EMG intC
20 µV
EMG intC
200 µV
PA
70
62.5
mmHg
10 s
1
2
3
C
Photoinhibition
Photostimulation
Fréquence cardiaque (bpm)
Fréquence respiratoire (cycles/min)
Pression artérielle (mmHg)
Δ FC (%)
Δ Freq. resp. (%)
Δ PA (%)
0.0007
0.0007
0.0097
0.0007
0.0016
0.0032
0.0472
0.0379
0.0436
0.0015
0.0223
Off
On
Off
Cre +
Cre -
D
Photoinhib. (50Hz) [1]
Période contrôle [2]
Photostim. (50Hz) [3]
RC
312
308
304
bpm
∫EMG intC
20 µV
EMG intC
200 µV
PA
70
62.5
mmHg
10 s
E
Activités moyennées pendant la photoinhibition [1]
Activités moyennées pendant la période contrôle [2]
Activités moyennées pendant la photostimulation [3]
RespVRC
RC
0.2 bpm
Inspiration
∫EMG intC
20 µV
sPA
Onde TH
2 mmHg
-0.8
-0.4
0
0.4
0.8
1.2
Seconds
F
Photoinhibition
Photostimulation
RespVRC (bpm)
Amplitude inspiratoire (µV)
ondes TH (mmHg)
Δ RespVRC (%)
Δ Ampl. insp. (%)
Δ ondes TH (%)
0.0219
0.0024
0.0028
0.0101
0.0352
0.0026
0.0004
0.0062
0.0468
0.0129
Off
On
Off
Cre +
Cre -

Figure 36. Les photomodulations prolongées des neurones préBötC^{GABA} impactent les fonctions respiratoire et cardiovasculaire chez le rat *in vivo*. (**A**) Représentation schématique de l'injection du virus BiPOLES dans le préBötC (en haut), des illuminations lasers bilatérales du préBötC (au milieu) et du fonctionnement de BiPOLES (en bas). (**B**) Exemple d'enregistrements du rythme cardiaque (RC) (reconstruit à partir de l'ECG, non montré), de l'EMG intercostal externe brut et intégré (∫EMGintC, chaque décharge étant une inspiration) et de la pression artérielle (PA) chez un rat anesthésié avant, pendant, et après une photoinhibition (période 1) et une photostimulation (période 3) prolongée (50 Hz – 30s, illuminations de 10ms à 7.5 mw/mm^2 en sortie de chaque fibre optique). (**C**) Quantification de la variation des paramètres respiratoires et cardiovasculaires moyens pendant les photoinhibitions (à gauche) et les photostimulations (à droite). Les valeurs individuelles brutes correspondant à un même rat sont représentées par des points reliés entre eux. La variation des paramètres pendant les photomodulations (delta en %) est représentée par la moyenne ± SEM. (Photoinhibitions : Freq. Resp : cre+ n= 12; cre- n= 4 ; Freq. Cardiaque : cre+ n= 12; cre- = 4; PA : cre+ n= 7; cre- n= 3 ; Photostimulations : Freq. Resp. : cre+ n= 11; cre- n= 4; Freq. Cardiaque : cre+ n= 12; cre- n= 4; PA : cre+ n= 7; cre- n= 3). (**D**) Agrandissements sur 10 secondes des enregistrements présentés en (**A**) obtenus pendant les périodes de photoinhibition, de photostimulation et une période contrôle (2). (**E**) Amplitude moyenne de la RespVRC et des ondes TH, et enveloppe moyenne de la décharge inspiratoire intercostale, obtenues en moyennant le RC, l'EMG intercostal intégré (∫EMGintC) et la pression artérielle systolique (sPP) sur la fin de l'inspiration, pendant la photoinhibition (1), la période contrôle (2) et la photostimulation (3) (à partir du tracé en (**B**)). Les photomodulations des neurones préBötC^{GABA} font varier l'amplitude de la RespVRC, de la décharge inspiratoire et des ondes TH. (**F**) Quantification des variations de l'amplitude de la RespVRC, de l'activité intercostale inspiratoire et des ondes TH lors des photoinhibitions (à gauche) et des photostimulations (à droite), dont les données ont été mesurées à partir des moyennages déclenchés par la respiration. (Photoinhibitions : RespVRC : cre+ n= 12 ; cre- = 4; Ampl. Inspi. : cre+ n= 12; cre- = 4; ondes TH : cre+ n= 10 ; cre- n= 3; photostimulations : cre+ n= 11 ; cre- n= 4 ; Ampl. Inspi. : cre+ n= 12; cre- n= 4; ondes TH : cre+ n= 10; cre- n= 3).

Les valeurs brutes intragroupe ont été analysées par des ANOVAs à mesure répétées pour les données avec une distribution normale (Fréquence respiratoire, amplitude inspiratoire, ondes TH, pression artérielle moyenne, fréquence cardiaque (photostimulation)), ou avec un test sur les rangs de Friedman pour les données non paramétriques (RespVRC, fréquence cardiaque moyenne (photoinhibition)). Puis les données étaient analysées avec des tests post-hoc de comparaisons multiples de Holm-Sidak ou de Dunn, respectivement (photomodulation vs période contrôle avant vs période de récupération après). Les valeurs groupées (variations en %) ont été analysées inter-groupes (rats Gad-cre (cre+) vs rats sauvages (cre-)) par un test t de student quand les données étaient paramétriques (Fréquence respiratoire, amplitude inspiratoire, ondes TH, pression artérielle moyenne, RespVRC), et par un test de Kolmogorov-Smirnov lorsque les données étaient non paramétriques (fréquence cardiaque). Les valeurs de p sont indiquées sur les graphiques lorsqu'elles étaient < à 0.05.

De manière à étudier le rôle des neurones préBötC^{GABA} dans le CRCV en l'absence d'anesthésiques qui sont connus pour altérer les fonctions respiratoire et cardiovasculaire (Bouairi, 2004 ; Massey & Richardson, 2017 ; Sano, 2016 ; Yang, 2014), nous avons réalisé des photomodulations prolongées des neurones préBötC^{GABA} sur la préparation *in situ* cœur-tronc

cérébral isolés perfusés de rats GAD-Cre injectés avec le virus BiPOLES (Fig. 37). Cette préparation perfusée, décérébrée et paralysée nous a permis d'étudier le CRCV en limitant certains paramètres confondants (incluant les anesthésiques et les influences périphériques liées aux mouvements respiratoires) tout en rendant possible l'enregistrement simultané de plusieurs sorties nerveuses respiratoires et cardiovasculaires autonomes (Paton, 1996 ; 2022).

Les effets des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} sur les paramètres respiratoires des rats *in situ* étaient similaires à ceux observés chez les rats anesthésiés. La fréquence respiratoire n'était pas affectée par les photostimulations mais avait tendance à diminuer pendant la photoinhibition (-10.23 ± 3.5% ; -2.95 ± 0.76 cycles respiratoires ; Friedman : p=0.0302 ; Dunn : OFF vs ON : p=0.1365 ; test t de student : cre+ VS cre- : p=0.1718), et l'amplitude nerveuse phrénique inspiratoire avait tendance à être réduite par la photostimulation (-7.6 ± 1.7% ; test t student : p=0.0962) mais ne variait pas lors des photoinhibitions (Fig. 37). Concernant les paramètres cardiovasculaires, la photostimulation causait la diminution de l'amplitude de la RespVRC (-44 ± 7.2% ; -1.74 ± 0.67 bpm), de l'amplitude des ondes TH (-51.3 ± 6.7% ; +0.11 ± 0.03 mmHg) et de la pression de perfusion moyenne (-2.3 ± 0.3% ; -1.6 ± 0.2 mmHg). A l'inverse, les photoinhibitions induisaient des effets opposés aux photostimulations en causant l'augmentation de l'amplitude de la RespVRC (+62.6 ± 13.9% ; +1.34 ± 0.43 bpm), des ondes TH (+54.9 ± 8.0% ; -0.3 ± 0.1 mmHg) et de la pression de perfusion moyenne (+0.8 ± 0.1% ; +0.54 ± 0.09 mmHg) (Fig. 37). Ces effets étaient très reproductibles entre les rats (Fig. 37B,E). La fréquence cardiaque moyenne avait légèrement tendance à diminuer lors des photoinhibitions (-0.8 ± 0.2% ; -2.2 ± 0.5 bpm ; test t student :cre+ vs cre- : p=0.0768) et lors des photostimulations (-0.36 ± 0.33% ; -1.1 ± 0.98 bpm ; ANOVA : p=0.0417, Holm-Sidak : OFF vs ON p=0.2603 ; cre+ vs cre- : p=0.7666) (Fig. 36B).

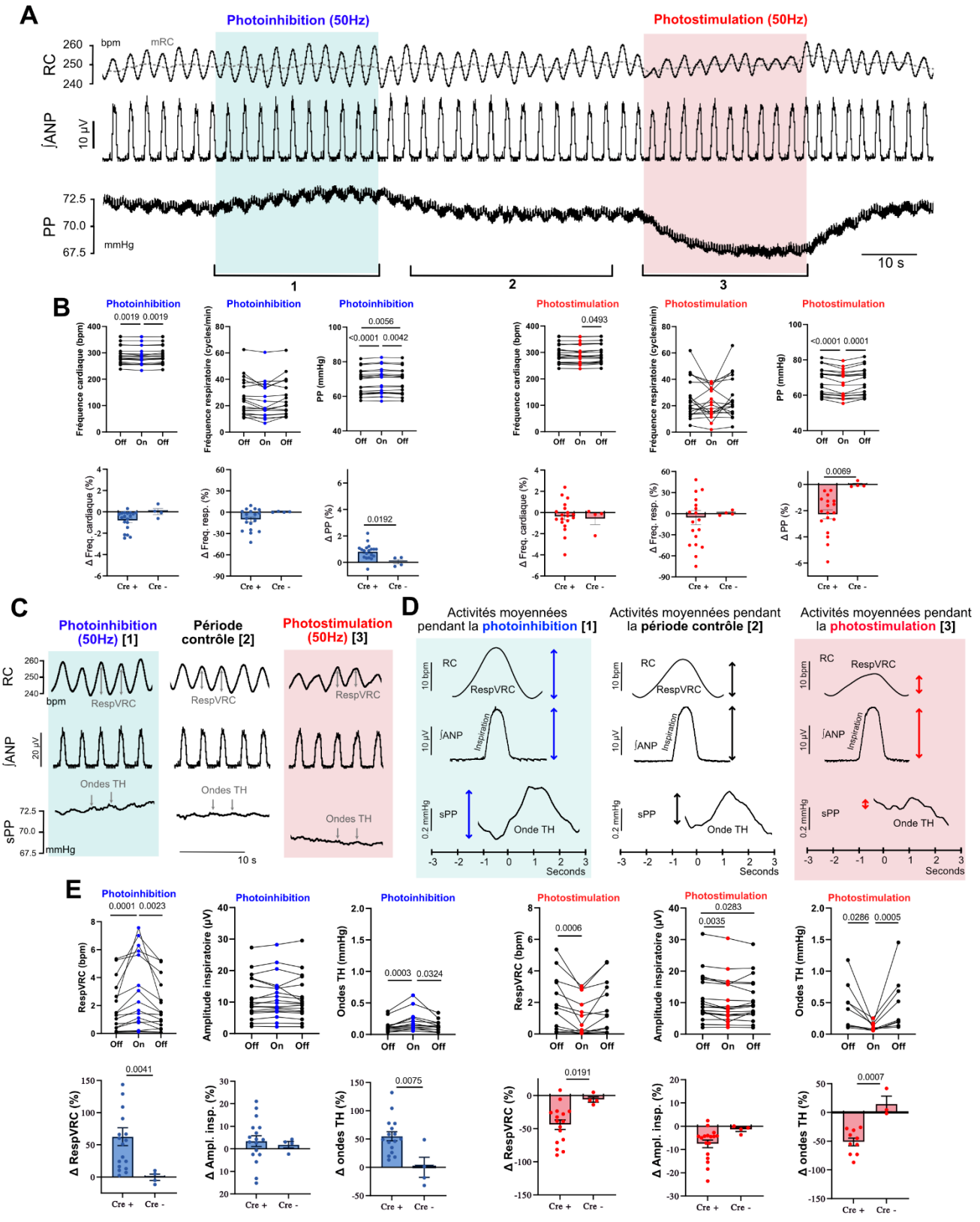

A
Photoinhibition (50Hz)
Photostimulation (50Hz)
RC
bpm
mRC
∫ANP
10 µV
PP
mmHg
10 s
1
2
3
B
Photoinhibition
Photostimulation
Fréquence cardiaque (bpm)
Fréquence respiratoire (cycles/min)
PP (mmHg)
Off On Off
Δ Freq. cardiaque (%)
Δ Freq. resp. (%)
Δ PP (%)
Cre + Cre -
C
Photoinhibition (50Hz) [1]
Période contrôle [2]
Photostimulation (50Hz) [3]
RespVRC
Ondes TH
sPP
10 s
D
Activités moyennées pendant la photoinhibition [1]
Activités moyennées pendant la période contrôle [2]
Activités moyennées pendant la photostimulation [3]
Inspiration
Onde TH
Seconds
E
RespVRC (bpm)
Amplitude inspiratoire (µV)
Ondes TH (mmHg)
Δ RespVRC (%)
Δ Ampl. insp. (%)
Δ ondes TH (%)

Figure 37. Les photomodulations prolongées des neurones préBötC^{GABA} impactent les fonctions respiratoire et cardiovasculaire chez la préparation *in situ* cœur-tronc cérébral isolés perfusés de rat.
(**A**) Exemple d'enregistrements du rythme cardiaque (RC) (reconstruit à partir de l'ECG capté par l'électrode l'enregistrement du nerf phrénique, non montré), de l'activité nerveuse phrénique intégrée (∫ANP, chaque décharge étant une inspiration) et de la pression de perfusion (PP, équivalent de la pression artérielle *in vivo*) sur la préparation *in situ* d'un rat GAD-Cre injecté avec le virus BiPOLES dans le préBötC, avant, pendant, et après une photoinhibition (période 1) et une photostimulation (période 3) prolongées (50 Hz – 30s, illuminations lasers de 10ms à 7.5 mw/mm^2 en sortie de chaque fibre optique). (**B**) Quantification de la variation des paramètres respiratoires et cardiovasculaires moyens pendant les photoinhibitions (à gauche) et les photostimulations (à droite). Les points reliés entre eux correspondent aux données brutes d'un même rat. La variation des paramètres pendant les photomodulations (delta en %) est représentée par la moyenne ± SEM. (Photoinhibitions : Freq. Resp : cre+ n=18 ; cre- = 4 ; Freq. Cardiaque : cre+ n= 19; cre- = 4; PP : cre+ n= 19; cre- n= 4 ; Photostimulations : Freq. Resp. : ANOVA cre+ n=17, t test cre+ n= 19; cre- = 4 ; Freq. Cardiaque : cre+ = 19; cre- = 4; PP : cre+ = 18; cre- = 4) (**C**) Agrandissements sur 1à secondes des enregistrements présentés en (A) obtenus pendant les périodes de photoinhibition, de photostimulation et une période contrôle (2) (**D**) Amplitude moyenne de la RespVRC et des ondes TH, et enveloppe moyenne de la décharge inspiratoire phrénique, obtenues en moyennant le RC, l'activité phrénique intégrée et la pression de perfusion systolique (sPP) sur la fin de l'inspiration, pendant la photoinhibition (1), la période contrôle (2) et la photostimulation (3) (à partir du tracé en (**B**)). (**E**) Quantification des variations de l'amplitude de la RespVRC, de la décharge phrénique inspiratoire et des ondes TH lors des photoinhibitions (à gauche) et des photostimulations (à droite). Les photomodulations *in situ* des neurones préBötC^{GABA} induisent des effets plus clairs sur le CRCV que chez le rat anesthésié. (Photoinhibitions : RespVRC : ANOVA : cre+ n= 16; t test : cre+ n=18 ; cre- n= 4; Ampl. Inspi. : ANOVA : cre+ n= 18; t test : cre+ n=17 ; cre- n= 4; ondes TH : ANOVA : cre+ n= 13; t test : cre+ n=16 ; cre- n= 4; photostimulations : RespVRC : ANOVA : cre+ n= 13; t test : cre+ n=16 ; cre- n= 4; Ampl. Inspi. : ANOVA : cre+ n= 19; t test : cre+ n=17 ; cre- n= 4; ondes TH : ANOVA : cre+ n= 9; t test : cre+ n=10 ; cre- n= 3).

Les valeurs brutes intragroupe ont été analysées par des ANOVAs à mesure répétées pour les données avec une distribution normale (Photostimulation : Fréquence respiratoire, Fréquence cardiaque, PP ; photoinhibitions : fréquence cardiaque, amplitude inspiratoire, PP), ou avec un test sur les rangs de Friedman pour les données non paramétriques (Photostimulation : RespVRC, ondes TH, amplitude inspiratoire ; photoinhibitions : Fréquence respiratoire, RespVRC, ondes TH). Puis les données étaient analysées avec des tests post-hoc de comparaisons multiples de Holm-Sidak ou de Dunn, respectivement (photomodulation vs période contrôle avant vs période de récupération après). Les valeurs groupées (variations en %) ont été analysées (rats Gad-cre (cre+) vs rats sauvages (cre-)) par un test t de student quand les données étaient paramétriques (Photostimulation : Fréquence respiratoire, RespVRC, ondes TH, amplitude inspiratoire, PP ; photoinhibitions : Fréquence respiratoire, RespVRC, ondes TH, amplitude inspiratoire, PP), et par un test de Kolmogorov-Smirnov lorsque les données étaient non paramétriques (Fréquence cardiaque). Les valeurs de p sont indiquées sur les graphiques lorsqu'elles étaient < à 0.05.

Autant *in vivo* que *in situ*, les différents paramètres qui étaient affectés par les photomodulations des neurones préBötC^{GABA} voyaient leurs valeurs varier dès que le laser était allumé, et pendant toute la durée de l'illumination. Le retour des paramètres à leurs valeurs basales débutait dès lors que le

laser s'éteignait et était achevé dans les 30 secondes suivant la fin de l'illumination. Aucun effet des photomodulations n'a été observé chez les animaux contrôles, qui étaient des rats sauvages injectés dans le préBötC avec le virus BiPOLES (Fig. 36C,F ; Fig. 37B,E).

L'ensemble des résultats obtenus chez le rat *in vivo* anesthésié ou *in situ* non anesthésié montre que les neurones préBötC^{GABA} participent à la régulation de la fonction cardiovasculaire et du CRCV puisque la modulation de leur activité affecte la fréquence cardiaque et la pression artérielle moyennes ainsi que l'amplitude de la RespVRC et des ondes TH. Ces données montrent également que les neurones préBötC^{GABA} ne jouent pas un rôle dans la genèse inspiratoire puisque leur photoinhibition ne met pas fin à la respiration contrairement à l'inactivation des neurones qui participent à la rythmogenèse au sein de ce même noyau (Tan, 2008 ; Bouvier, 2010 ; Menuet, 2020).

Les neurones GABAergiques du préBötC modulent l'amplitude de la RespVRC via l'activité parasympathique cardiaque.

La RespVRC est principalement générée par la modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque (Farmer, 2016). Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA envoient leurs axones par le nerf Vague pour aller innerver le cœur (Gourine, 2016 ; Dergacheva, 2010). De manière à étudier si la modulation de l'amplitude de la RespVRC par les neurones préBötC^{GABA} est liée à l'activité parasympathique cardiaque, nous avons commencé par enregistrer l'activité du nerf vague au niveau cervical. Par ce nerf transitent plusieurs contingents de fibres, incluant les axones des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques (Farmer, 2016 ; 2024 ; Ottaviani, 2022 ; Werhwein, 2016) mais aussi des motoneurones des voies aériennes supérieures (Bieger & Hopkins, 1987 ; Gestreau, 2000 ; Bianchi, 1995 ; Grélot, 1989 ; Furuya, 2021).

La composante inspiratoire de l'activité nerveuse vagale, qui correspond à l'information motrice pour l'abduction des voies aériennes supérieures, était réduite par la photostimulation prolongée des neurones préBötC^{GABA} (-39.9 ± 7.4%) (Fig. 38B,C). Cela est indicatif d'une diminution de la commande motrice inspiratoire, corroborée par la diminution concomitante de l'amplitude inspiratoire phrénique (Fig. 38E). L'activité vagale inspiratoire, tout comme l'amplitude inspiratoire phrénique, ne variait pas lors de la photoinhibition (Fig. 38C). La composante post-inspiratoire de l'activité nerveuse vagale inclue les informations pour l'adduction des voies aériennes supérieures (Bianchi, 1995) et l'activité parasympathique cardiaque, qui atteint un maximum pendant cette phase du cycle respiratoire (Farmer, 2016 ; Ottaviani, 2020 ; Shanks, 2023). La photomodulation des

neurones préBötC^{GABA} ne faisait pas varier cette composante post-inspiratoire de l'activité nerveuse vagale (Fig. 38C).

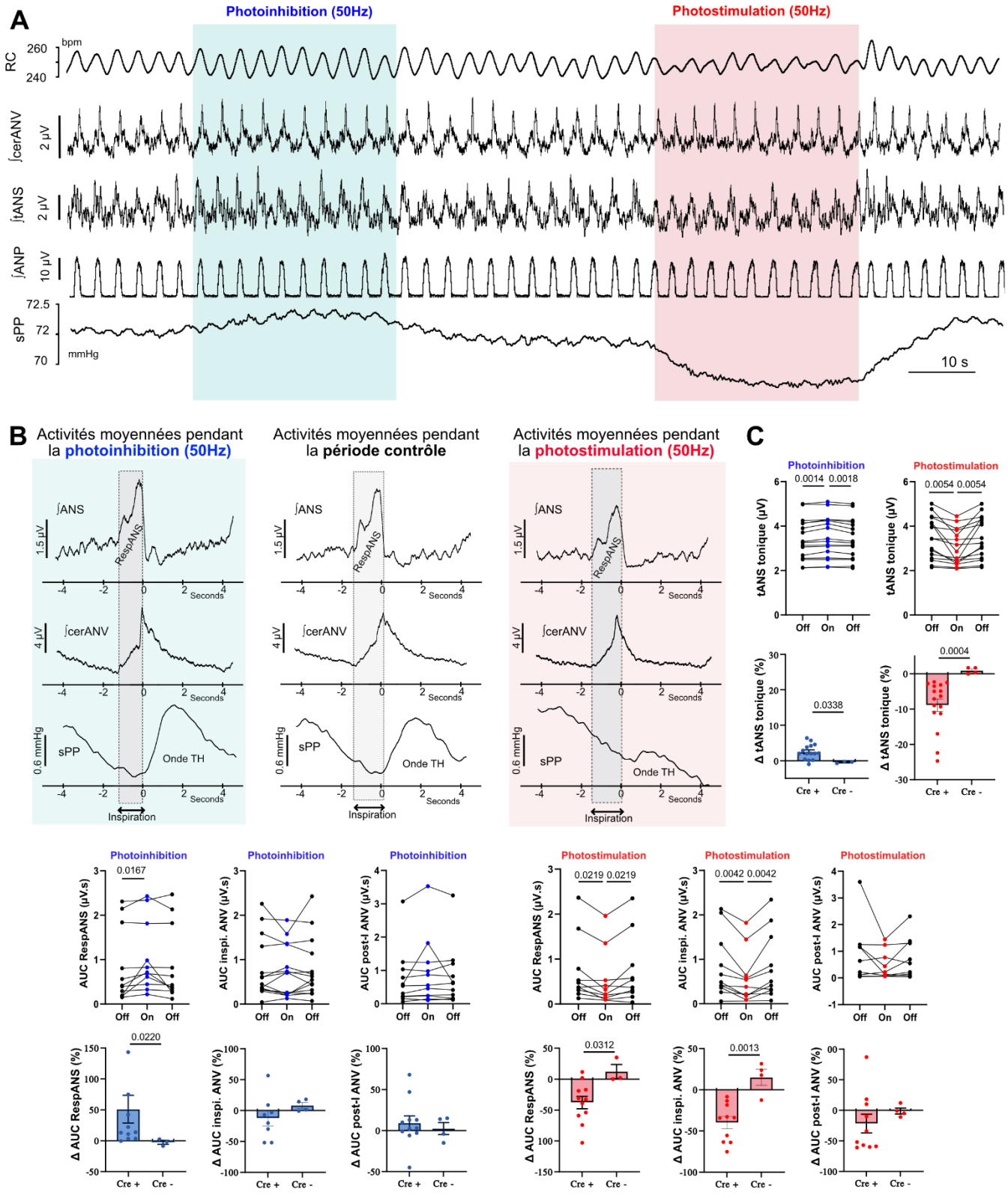


Figure 38. Les neurones préBötC^{GABA} modulent les ondes TH et la pression artérielle par un effet sur l'activité nerveuse sympathique vasomotrice. (**A**) Enregistrements du rythme cardiaque (RC), de l'activité intégrée du nerf vague cervical (∫cerANV), de l'activité nerveuse sympathique thoracique intégrée (∫tANS), de l'activité nerveuse phrénique intégrée (∫ANP, chaque décharge étant une inspiration) et de la pression de perfusion (PP) sur la préparation *in situ* d'un rat GAD-Cre injecté avec le virus BiPOLES dans le préBötC, avant, pendant, et après une photoinhibition (1) et une photostimulation (3) prolongées (50 Hz – 30s, illuminations lasers de 10 ms à 7.5 mw/mm^2 en sortie de chaque fibre optique). (**B**) Moyennages déclenchés par la respiration générés pendant la photoinhibition, la période contrôle et la photostimulation. Le moyennage de la ∫tANS, de la ∫cerANV et de la pression de perfusion systolique (sPP) permettent de quantifier la modulation respiratoire de l'activité sympathique (RespANS), l'enveloppe de la décharge vagale et les ondes TH, respectivement. Les photomodulations affectaient l'amplitude et l'aire sous la courbe (AUC) de la RespANS dans sa globalité et nous n'avons par remarqué d'effet différentiel des photomodulations sur la composante inspiratoire ou post-inspiratoire de cette activité. (**C**) Quantification de la variation des paramètres d'activité nerveuse vagale et sympathique pendant les photoinhibitions (à gauche) et les photostimulations (à droite). Les points reliés entre eux correspondent aux données brutes d'un même rat. La variation des paramètres pendant les photomodulations (delta en %) est représentée par la moyenne ± SEM. (Photoinhibitions : tANS tonique : cre+ n=16 ; cre- n= 3; AUC RespANS : cre+ n=11 ; cre- n= 3; AUC inspi. ANV: ANOVA : cre+ n= 14; t test : cre+ n=18 ; cre- n= 4; AUC post-I ANV: ANOVA : cre+ n= 11 ; t test : cre+ n=10 ; cre- n=4 ; photostimulations : tANS tonique : cre+ n=16 ; cre- n= 4; AUC RespANS : ANOVA : cre+ n= 11; t test : cre+ n=10 ; cre- n= 3; AUC inspi. ANV: ANOVA : cre+ n= 11 ; t test : cre+ n=10 ; cre- n=4 ; AUC post-I ANV: ANOVA : cre+ n= 9 ; t test : cre+ n=10 ; cre- n=4)

Les valeurs brutes intragroupe ont été analysées par des ANOVAs à mesure répétées pour les données avec une distribution normale (tANS tonique), ou avec un test sur les rangs de Friedman pour les données non paramétriques (RespANS, cerANV inspi, cerANV post-I). Puis les données étaient analysées avec des tests post-hoc de comparaisons multiples de Holm-Sidak ou de Dunn, respectivement (photomodulation vs période contrôle avant vs période de récupération après). Les valeurs groupées (variations en %) ont été analysées inter-groupes (rats Gad-cre (cre+) vs rats sauvages (cre-)) par un test t de student quand les données étaient paramétriques (Photostimulations : tANS tonique, RespANS, cerANV inspi ; photoinhibitions : cerANV post-I), et par un test de Kolmogorov-Smirnov lorsque les données étaient non paramétriques (photostimulations : cerANV post-I ; photoinhibitions : tANS tonique, RespANS, cerANV inspi.). Les valeurs de p sont indiquées sur les graphiques lorsqu'elles étaient < à 0.05. AUC inspi. ANV : aire sous la courbe de la composante inspiratoire de l'activité nerveuse vagale cervicale ; AUC post-I ANV : aire sous la courbe de la composante post-inspiratoire de l'activité nerveuse vagale cervicale.

Ces résultats montrent que la photostimulation des neurones préBötC^{GABA} réduit l'amplitude de la commande motrice inspiratoire et confirment que ces neurones ont un rôle de modulateur du patron moteur respiratoire. En revanche, ces résultats ne donnent pas d'information claire quant à l'implication supposée de l'activité parasympathique vagale dans les effets sur la RespVRC et la fréquence cardiaque moyenne liés aux photomodulations des neurones préBötC^{GABA}.

Pour étudier directement l'implication de l'activité parasympathique cardiaque dans les effets des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} sur la fonction cardiaque, nous avons réitéré notre protocole d'illuminations lasers après avoir ajouté de l'atropine (un antagoniste muscarinique) dans la circulation de perfusion, ce qui supprime l'activité parasympathique cardiaque (Fig. 39).

La suppression de l'influence parasympathique cardiaque par l'atropine était vérifiée et constatée par l'augmentation de la fréquence cardiaque moyenne (+9.6 ± 8.52% ; de 278.2 ± 27.3 bpm avant atropine à 304.1 ± 27.9 bpm après atropine) et la perte de la RespVRC (-96.2 ± 4.8% ; de 3.1 ± 0.9 bpm avant atropine à 0.07 ± 0.02 bpm après atropine) (Fig. 39C). Les effets des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} sur l'amplitude de la RespVRC observés avant atropine sont perdus après l'ajout d'atropine, montrant qu'ils passent par la modulation de l'activité parasympathique cardiaque (Fig. 39A,B,D). De façon intéressante, l'atropine a révélé chez tous les rats des oscillations du rythme cardiaque qui augmentait pendant l'expiration précoce et diminuait pendant l'expiration tardive, et qui n'étaient pas visibles lorsque l'influence parasympathique sur le cœur était présente avant atropine (Fig. 39A,B). L'amplitude de ces oscillations cardiaques expiratoires reflétait l'amplitude des ondes TH (Fig. 39A,B), générées par l'activité nerveuse sympathique (Simms, 2009 ; Adrian, 1932 ; Shantsila, 2015).

Par ailleurs, après l'ajout d'atropine, les photoinhibitions des neurones préBötC^{GABA} n'induisaient plus de légère bradycardie (qui était observée avant l'atropine (Fig. 37B, 36C)) (Fig. 39E) ce qui montre que cet effet reposait sur une augmentation du tonus parasympathique cardiaque. A l'inverse, les photostimulations après atropine induisaient une très légère bradycardie (-0.8 ± 0.2 % ; -2.4 ± 0.5 bpm) liée à la baisse d'activité nerveuse sympathique (Fig. 39E,F). En effet, l'atropine supprime la régulation du rythme cardiaque effectuée par le système parasympathique mais le système sympathique participe également au contrôle nerveux cardiaque (Boscan, 2001 ; Giannino, 2024). Or, l'activité sympathique avait fortement tendance à être diminuée lors des photostimulations (-21.6 ± 9.8% ; test t student : p=0.1250) (Fig. 39E).

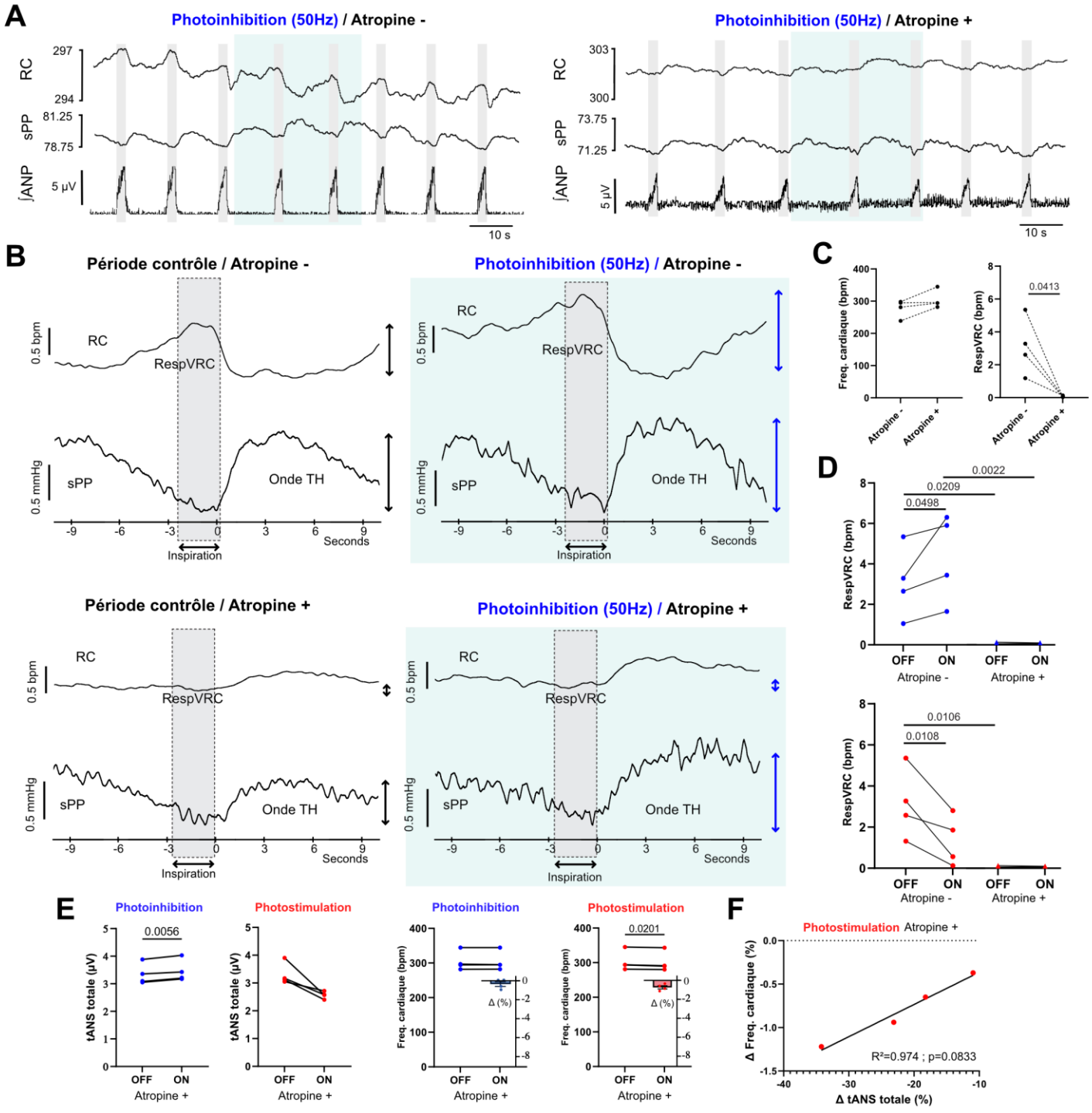


Figure 39. L'atropine supprime les effets des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} sur l'activité nerveuse parasympathique cardiaque mais pas sur l'activité nerveuse sympathique. Caractérisation des effets des photomodulations prolongées (50 Hz – 30 s, illuminations lasers de 10 ms à 7.5 mw/mm^2 en sortie de chaque fibre optique) des neurones préBötC^{GABA} sur la fréquence cardiaque moyenne et la RespVRC avant et après suppression de l'influence nerveuse parasympathique sur le cœur par un antagoniste des récepteurs muscariniques (atropine, n=4). (**A**) Enregistrements du rythme cardiaque (RC), de la pression artérielle

systolique (sPP) et de l'activité nerveuse phrénique intégrée (∫ANP) sur la préparation *in situ* d'un rat avant (à gauche) et après (à droite) injection d'atropine dans la circulation de perfusion. Notez qu'après atropine, la RespVRC générée par la modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque et caractérisée par une augmentation du RC pendant l'inspiration est perdue. Notez également les oscillations expiratoires du RC qui apparaissent après atropine et dont l'amplitude reflète celle des ondes TH (générées par la modulation respiratoire de l'activité sympathique qui n'est pas impactée par l'atropine), ce qui est notamment visible lorsque les ondes TH sont amplifiées par la photoinhibition. (**B**) Moyennages déclenchés par la respiration du RC et de la sPP en période contrôle (à gauche) et pendant la photoinhibition (à droite) avant (en haut) et après atropine (en bas). La photoinhibition des neurones n'induit plus aucune augmentation de l'amplitude de la RespVRC après atropine, montrant que cet effet passait par l'augmentation du tonus parasympathique cardiaque. (**C)** Quantification du rythme cardiaque moyen et de l'amplitude moyenne de la RespVRC avant et après atropine pour tous les rats (n=4), confirmant la suppression de l'activité parasympathique cardiaque. (**D**) Quantification des effets des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} sur l'amplitude de la RespVRC avant et après atropine (n=4). (**E**) Quantification des variations de l'activité nerveuse sympathique totale (incluant la RespANS et l'ANS tonique) et du RC moyen lors des photomodulations des neurones préBötC^{GABA} après atropine (n=4). Les effets des neurones préBötC^{GABA} sur l'activité sympathique sont intacts après atropine. (**F**) Analyse de corrélation entre la variation de RC moyen (en %) et la variation de tANS totale pendant la photostimulation des neurones préBötC^{GABA} après atropine (n=4).

Les points reliés entre eux correspondent aux données brutes d'un même rat. Les données ne suivant pas une distribution normale (photoinhibition) ont été analysées par des ANOVAs à modèle mixte suivies par un test post-hoc de Sidak (période contrôle vs photomodulation avant et après atropine ; période contrôle avant atropine vs après atropine et photomodulation avant atropine vs après atropine). Les données paramétriques (photostimulation) ont été analysées par des ANOVAs à deux facteurs sur mesures répétées suivies d'un test post-hoc de Sidak. La variation des paramètres pendant les photomodulations (en %) est représentée par la moyenne ± SEM. Les valeurs brutes ont été analysées par des tests t de student appariés (Freq. Cardiaque, RespVRC ; photoinhibition : tANS totale) ou des tests de Wilcoxon sur les rangs (photostimulation : tANS totale). L'analyse de corrélation a été faite par une corrélation de Spearman et une régression linéaire simple a été utilisée pour générer le graphique. Les valeurs de p sont indiquées sur les graphiques lorsqu'elles étaient < à 0.05.

Ces données montrent que l'implication des neurones préBötC^{GABA} dans la RespVRC repose sur la modulation de l'activité parasympathique cardiaque et pas sur celle de l'activité sympathique, puisque les photomodulations des neurones préBötC^{GABA} n'affectaient plus l'amplitude de la RespVRC après atropine. Cet effet passe très probablement par les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA, qui reçoivent des courants GABAergiques inspiratoires impliqués dans la genèse de la RespVRC, et vers qui nous avons montré que les neurones préBötC^{GABA} projettent (Fig. 34).

Les neurones préBötC^{GABA} modulent l'amplitude des ondes TH et la pression artérielle moyenne par leur action inhibitrice de l'activité sympathique vasomotrice.

La fonction vasculaire est principalement régulée par le système nerveux sympathique (Wehrwein, 2016 ; Charkoudian & Wallin, 2014) et nos résultats montrent que la photomodulation prolongée des neurones préBötC^{GABA} impacte la pression artérielle moyenne et l'amplitude des ondes TH (Fig. 36, 37). Pour déterminer si les effets vasculaires observés lors des photomodulations sont bien liés à des variations de l'activité nerveuse sympathique vasomotrice, nous avons commencé par étudier les effets de photomodulations prolongées des neurones préBötC^{GABA} sur l'activité nerveuse sympathique thoracique (Fig. 38).

Qualitativement, l'activité sympathique était diminuée lors des photostimulations et augmentée lors des photoinhibitions (Fig. 38). L'activité sympathique est constituée d'une composante tonique, régulatrice de la pression artérielle moyenne, et d'une composante phasique (la modulation respiratoire) responsable des ondes TH, que nous avons quantifiées distinctement. La modulation prolongée des neurones préBötC^{GABA} impactait la composante tonique de l'activité sympathique qui était fortement diminuée par la photostimulation (-8.9 ± 1.7%) et qui était augmentée par la photoinhibition (+2.3 ± 0.5%) (Fig. 38B,C). Ces variations du tonus sympathique vasomoteur se reflétaient sur la pression artérielle moyenne qui diminuait lors des photostimulations et augmentait lors des photoinhibitions (Fig. 38A, Fig. 37B,C). Ces effets sympathiques et vasomoteurs étaient très robustes entre les rats (Fig. 38C). Concernant la modulation respiratoire de l'activité sympathique, la photostimulation des neurones préBötC^{GABA} la diminuait (-33.8 ± 10.1%), ce qui causait la réduction de l'amplitude des ondes TH. A l'inverse, les photoinhibitions des neurones préBötC^{GABA} amplifiait la modulation respiratoire de l'activité sympathique (+ 51.4 ± 22.8%), ce qui entraînait l'augmentation de l'amplitude des ondes TH associées (Fig. 38C).

Ces résultats montrent que les neurones préBötC^{GABA} régulent la pression artérielle et les ondes TH par la modulation de l'activité sympathique tonique et de la modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique.

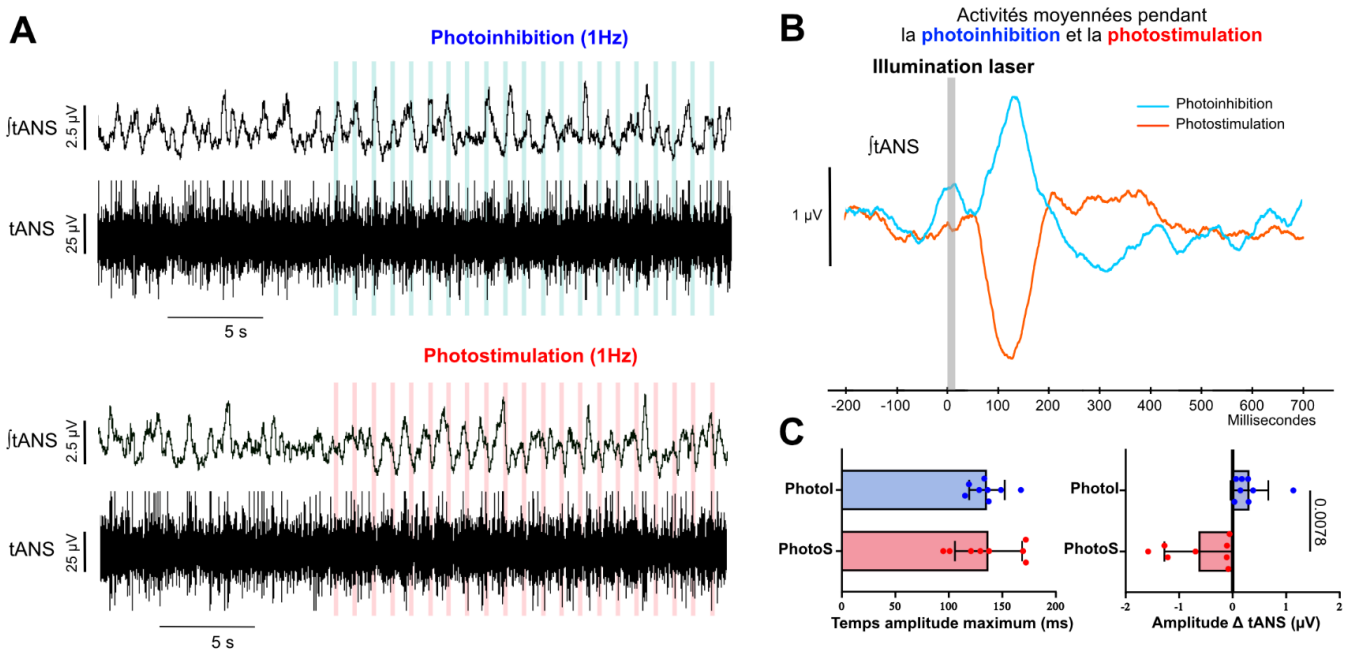


Figure 40. Les neurones GABAergiques du préBötC sont sympathoinhibiteurs. (**A**) Enregistrements *in situ* de l'activité nerveuse sympathique thoracique (tANS) pendant la photoinhibition (en haut) et la photostimulation (en bas) à basse fréquence (1 Hz – 200 s, illuminations lasers de 15 ms à 7.5 mw/mm^2 en sortie de chaque fibre optique) des neurones préBötC^{GABA}. L'échelle utilisée pour représenter les illuminations n'est pas la durée réelle des illuminations qui auraient été trop petites pour les voir (uniquement sur ce graphique). Notez l'inhibition de l'activité sympathique pour chaque photostimulation illustrant l'influence sympathoinhibitrice des neurones préBötC^{GABA}. (B) Moyennages superposés de l'activité sympathique intégrée (constante de lissage 10 ms) déclenchés par les illuminations laser pendant les photomodulations à 1Hz (200 illuminations). La photoinhibition entraîne une excitation de l'activité sympathique et la photostimulation cause une inhibition. Ces deux réponses induites sont suivies d'un léger effet compensatoire. (**C**) Quantification de l'amplitude et du temps mis pour atteindre l'effet maximum des réponses sympathiques induites par la photomodulation à 1 Hz des neurones préBötC^{GABA} (n=8). La photostimulation avait généralement un effet plus marqué sur l'activité sympathique que la photoinhibition, comme ce qui était constaté lors des photomodulations prolongées. Le décours temporel d'environ 130ms pour atteindre le maximum de l'effet est cohérent avec une connectivité directe entre les neurones préBötC^{GABA} et des neurones générant l'activité sympathique, comme précédemment démontré pour les neurones catécholaminergiques C3 et l'activité nerveuse sympathique (Menuet, 2014).

Les données groupées sont représentées par la moyenne ± SEM et ont été analysées par un test t de student pour les données paramétriques (Temps amplitude max.) et par un test sur les rangs de Wilcoxon pour les données non paramétriques (Amplitude delta tANS). Les valeurs de p sont indiquées sur les graphiques lorsqu'elles étaient < à 0.05. PhotoS : photostimulation ; photol : photoinhibition.

Afin de déterminer s'il existe une connectivité fonctionnelle entre les neurones préBötC^{GABA} et l'activité nerveuse sympathique, nous avons réalisé des photomodulations à basse fréquence

(200 s à 1Hz, impulsions lasers de 15 ms) (Fig. 40). Le moyennage de l'activité nerveuse sympathique lors des illuminations lasers isolées montre que la photostimulation et la photoinhibition des neurones préBötC^{GABA} induisaient respectivement une inhibition et une excitation de l'activité sympathique (Fig. 40B,C). La photoinhibition basse fréquence induisait comme la photoinhibition prolongée une variation moins importante de l'activité sympathique que la photostimulation. Les effets sympathiques atteignaient un maximum ≃135 ms après le début de l'illumination laser (photostimulation : 137.1 ± 11.1 ms ; photoinhibition : 135.7 ± 6 ms) (Fig. 40C).

Ces résultats confirment l'influence sympathoinhibitrice des neurones préBötC^{GABA} qui avait été observée lors des photomodulations prolongées (Fig. 38). Ils tendent également à montrer, par leur cinétique, qu'il y a une connectivité fonctionnelle directe entre les neurones préBötC^{GABA} et des neurones générant l'activité sympathique. Ces effets pourraient passer par les neurones présympathiques de la RVLM, vers qui nous avons vu que les neurones préBötC^{GABA} projettent, qui sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle moyenne et qui génèrent les ondes TH par la modulation respiratoire de leur activité (Moraes, 2013 ; Guyenet, 1990 ; Dampney, 1982 ; Ross, 1984).

Les neurones préBötC^{GABA} exercent une influence sympathoinhibitrice par leur connectivité avec les neurones présympathiques de la RVLM.

Les neurones présympathiques de la RVLM sont une des principales sources d'entrées excitatrices sur les neurones préganglionnaires sympathiques vasomoteurs. Les neurones GABAergiques de la CVLM (CVLM^{GABA}), une région ventrale au préBötC, contactent les neurones présympathiques de la RVLM et exercent un tonus inhibiteur sur l'activité de ces neurones qui varie en fonction des valeurs de pression artérielle (Guyenet & Schreihofer, 2002 ; Sved, 2000 ; Miyawaki, 1997). Puisque la CVLM a un certain recouvrement avec la partie ventrale du préBötC, nous avons vérifié que les effets sympathiques et vasculaires des photomodulations du préBötC n'étaient pas liés à des neurones CVLM^{GABA} qui auraient été infectés par le virus BiPOLES lors des injections. Les neurones CVLM^{GABA} ne possèdent pas de signature neurochimique qui permettrait de les distinguer précisément des neurones préBötC^{GABA}. En revanche, ces neurones sont impliqués dans le baroréflexe et la stimulation de leur activité lors d'une augmentation de pression artérielle a un effet sympathoinhibiteur *via* l'inhibition des neurones présympathiques de la RVLM (Guyenet &

Schreihofer, 2002 ; Sved, 2000 ; Oshima, 2012). Aussi, la suppression de l'activité des neurones CVLM^{GABA} devrait atténuer la réponse sympathoinhibitrice du baroréflexe. Nous avons alors mesuré si la photoinhibition prolongée des neurones préBötC^{GABA} ou des neurones CVLM^{GABA} pendant une augmentation de la pression de perfusion altérait la réponse sympathoinhibitrice du baroréflexe, et si nous observions une différence entre les deux populations. Pour cela, nous avons réalisé ce test chez des rats GAD-Cre injectés avec le virus BiPOLES dans le préBötC ou dans la CVLM (Fig. 41).

Les réponses nerveuses autonomes cardiovasculaires induites par le baroréflexe lors d'une augmentation de pression incluent une augmentation d'activité parasympathique cardiaque causant une bradycardie et une diminution d'activité sympathique ayant causant une diminution de la pression artérielle (Miyawaki, 1997 ; Schreihofer & Guyenet, 2002 ; Simms, 2007). Le fonctionnement physiologique du réseau du baroréflexe a été vérifié chez chaque rat par l'observation d'une bradycardie et d'une diminution d'activité nerveuse sympathique lors d'une augmentation de pression de perfusion en condition contrôle (sans photomodulation) (Fig. 41A,B).

En l'absence de photomodulations, l'augmentation de pression de perfusion entrainait une diminution de l'activité nerveuse sympathique (-19.8 ± 6.3% en moyenne chez tous les rats), caractéristique de l'effet sympathoinhibiteur des neurones CVLM^{GABA} (Fig. 41A-C). La photoinhibition prolongée des neurones préBötC^{GABA} des rats injectés dans le préBötC (Fig. 41Di,ii) pendant l'augmentation de pression de perfusion n'avait aucun effet sur les réponses au baroréflexe, et notamment la réduction de l'activité sympathique était identique à celle observée lors des baroréflexes contrôles (en l'absence de photoinhibitions) (-23.7 ± 2.8% sans photoinhibition contre -25 ± 2.8% avec photoinhibition) (Fig. 41A, C). En comparaison, la photoinhibition prolongée des neurones CVLM^{GABA} chez les rats injectés dans la CVLM (Fig. 41Fi-iii) a réduit de près de la moitié la réponse sympathoinhibitrice à l'augmentation de pression de perfusion (-16 ± 3.5% sans photoinhibition contre -8.7 ± 2% avec photoinhibition) (Fig. 41B,C).

La différence d'effet mesurée entre la photoinhibition des neurones préBötC^{GABA} et des neurones CVLM^{GABA} lors d'une augmentation de pression de perfusion est un premier élément fonctionnel indiquant que nos injections dans le préBötC sont bien spécifiques des neurones préBötC^{GABA} et que les effets sympathiques et vasculaires que nous observons lors de la photomodulation des neurones préBötC^{GABA} ne sont pas attribuables aux neurones CVLM^{GABA}.

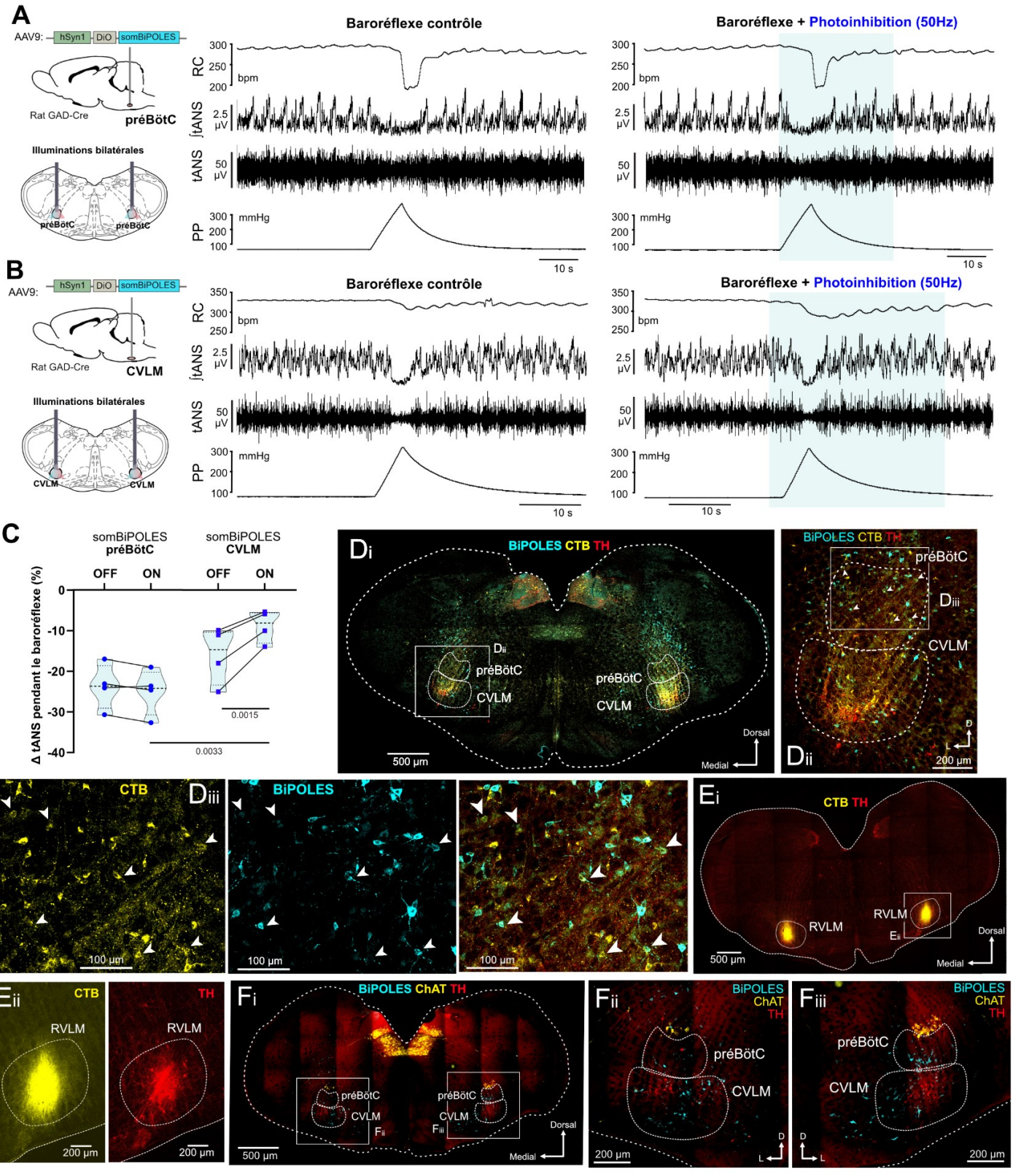

A
AAV9:
hSyn1
DiO
somBiPOLES
Rat GAD-Cre
préBötC
Illuminations bilatérales
préBötC
préBötC
Baroréflexe contrôle
Baroréflexe + Photoinhibition (50Hz)
RC
bpm
∫tANS
tANS
PP
mmHg
10 s
B
AAV9:
hSyn1
DiO
somBiPOLES
Rat GAD-Cre
CVLM
Illuminations bilatérales
CVLM
CVLM
Baroréflexe contrôle
Baroréflexe + Photoinhibition (50Hz)
C
somBiPOLES
préBötC
somBiPOLES
CVLM
OFF
ON
OFF
ON
Δ tANS pendant le baroréflexe (%)
0.0015
0.0033
Di
BiPOLES CTB TH
préBötC
CVLM
préBötC
CVLM
Dii
Dorsal
Medial
500 µm
BiPOLES CTB TH
préBötC
Diii
CVLM
D
L
200 µm
Dii
CTB
Diii
100 µm
BiPOLES
100 µm
100 µm
Ei
CTB TH
RVLM
RVLM
Eii
Dorsal
Medial
500 µm
Eii
CTB
RVLM
200 µm
TH
RVLM
200 µm
Fi
BiPOLES ChAT TH
préBötC
CVLM
Fii
préBötC
CVLM
Fiii
Dorsal
Medial
500 µm
Fii
BiPOLES
ChAT
TH
préBötC
CVLM
D
L
200 µm
Fiii
BiPOLES
ChAT
TH
préBötC
CVLM
D
L
200 µm

Figure 41. Les neurones préBötC^{GABA} modulent l'activité nerveuse sympathique par une connectivité inhibitrice avec les neurones présympathiques de la RVLM. Caractérisation anatomo-fonctionnelle des neurones CVLM^{GABA} et préBötC^{GABA} pour distinguer leur implication respective dans les effets observés lors des expérimentations de photomodulations prolongées de rats GAD-Cre injectés avec le virus BiPOLES dans le préBötC. (**A-C**) Caractérisation fonctionnelle de la réponse sympathoinhibitrice du baroréflexe avec ou sans photoinhibition prolongée (50 Hz – 30 s, illuminations lasers de 10 ms à 7.5 mw/mm^2 en sortie de chaque fibre optique) des neurones préBötC^{GABA} ou CVLM^{GABA} chez des rats GAD-Cre injectés avec BiPOLES dans le préBötC ou la CVLM, respectivement. (**A et B)** Enregistrements *in situ* du rythme cardiaque (RC), de l'activité nerveuse sympathique thoracique (tANS) et de la pression de perfusion (PP) avec ou sans photoinhibition prolongée des neurones préBötC^{GABA} (**A**) ou CVLM^{GABA} (**B**) pendant une augmentation du débit de perfusion, induisant un baroréflexe avec une chute du RC et de l'activité nerveuse sympathique. (**C**) Quantification de la réponse sympathoinhibitrice au baroréflexe (delta en %) avec ou sans photoinhibition des neurones CVLM^{GABA} (n=4) ou préBötC^{GABA} (n=4). Aucun animal injecté avec le virus BiPOLES dans le préBötC ne voyait sa réponse sympathique du baroréflexe altérée par la photoinhibition. *A contrario*, cette réponse était atténuée par les photoinhibitions chez les animaux injectés dans la CVLM. (**D-E**) Caractérisation anatomique des neurones du préBötC exprimant BiPOLES et contactant les neurones de la RVLM et (**F**) détection par immunohistochimie de l'expresison de BiPOLES dans la CVLM de rats injectés dans cette région. (**Di**) Coupe coronale de bulbe rachidien (-13.32 mm au bregma) d'un rat injecté avec le virus BiPOLES (en cyan) dans le préBötC, avec du CTB (en jaune) dans la RVLM (centre d'injection en **Ei**) et co-marquée pour la TH (en rouge). Les enregistrements *in situ* en (**A**) ont été obtenus chez ce rat. L'abondant marquage au CTB dans le bulbe rachidien ventral correspond à la CVLM, dont les neurones catécholaminergiques sont marqués par la TH. (**Dii**) Agrandissement de la région du préBötC et de la CVLM en (**Di**) montrant que les neurones exprimant BiPOLES (cyan) sont essentiellement dorsaux à la CVLM, qui est marquée par le CTB (jaune) et la TH (rouge). Certains neurones du préBötC sont également marqués par le CTB, incluant des neurones préBötC^{GABA} exprimant BiPOLES (agrandis en **Diii**). (**Diii**) Agrandissement du préBötC dorsal où sont trouvés des neurones co-exprimant le CTB et BiPOLES . Image de gauche, le marquage du CTB, image du milieu, le marquage du BiPOLES et image de droite, la superposition du marquage pour le CTB, pour BiPOLES et pour la TH. (**Ei**) Coupe coronale de bulbe rachidien (-12.24 mm par rapport au bregma) montrant les injections électrophysiologiquement guidées du CTB dans la RVLM (agrandis en **Eii**) qui sont responsables du marquage au CTB observé en (**Di**). La RVLM a été identifiée par des critères anatomiques de la forme de la coupe (ouverture du 4è ventricule et pédoncules cérébelleux) et du marquage des neurones catécholaminergiques par la TH (en rouge). (**Fi-Fiii**) Coupe coronale de bulbe rachidien (-13.32 mm au bregma) d'un rat GAD-Cre injecté avec le virus BiPOLES dans la CVLM et chez qui ont été obtenus les enregistrements *in situ* en (**B**). Le marquage du BiPOLES (cyan) était concentré dans la région ventrale du bulbe rachidien, ventrale au préBötC, marquée par la TH, caractérisant la région de la CVLM. (**Fii-Fiii)** Agrandissements des régions du bulbe rachidien ventral en (**Fi**) contenant le nA (marqué par la ChAT, en jaune), le préBötC et la CVLM. (**Di, Ei, Eii, Fi**) Image acquise avec un objectif x10 dans un plan optique unique (15 µm). (**Dii-Diii**) Images générées par la projection d'intensité maximale de 6 images acquises avec un objectif x20 et un pas de 1 µm.

Les données ont été analysées par des ANOVAs à deux facteurs sur mesures répétées suivies de tests post-hoc de Sidak (baroréflexe contrôle vs avec photoinhibition chez les rats injectés dans le préBötC ou la CVLM ; baroréflexe contrôle chez les rats injectés dans le préBötC vs les rats injectés dans la CVLM et baroréflexe avec photoinhibition chez les rats injectés dans le préBötC vs les rats injectés dans la CVLM). Les valeurs de p sont indiquées sur les graphiques lorsqu'elles étaient < à 0.05. RC : rythme cardiaque ; tANS : activité nerveuse sympathique thoracique ; PP : pression de perfusion ; préBötC : complexe de pré-Bötzinger ; CVLM :

bulbe caudal ventro-latéral ; CTB : sous-unité B de la toxine cholérique ; TH : tyrosine hydroxylase ; RVLM : bulbe rostral ventro-latéral ; ChAT : choline acétyl-transférase.

De manière à pouvoir corréler les résultats de ces tests fonctionnels avec des éléments anatomiques indiquant que les neurones exprimant BiPOLES projettent vers la RVLM, certains des rats injectés dans le préBötC avec le virus BiPOLES avaient également été injectés dans la RVLM avec du CTB, un traceur rétrograde (Fig. 40Di-Eii). Un abondant marquage pour le CTB était observé dans la région de la CVLM, définie comme la région ventrale au préBötC où étaient observés des neurones catécholaminergiques (marqués par la tyrosine hydroxylase) (Schreihofer & Guyenet, 2002 ; Sved, 2000) (Fig. 40Di,ii). Du marquage pour le CTB était également observé dans la région du préBötC, bien que relativement moins dense que dans la CVLM. Par ailleurs, des neurones préBötC^{GABA} étaient co-marqués pour le CTB et le BiPOLES, indiquant que ces neurones projettent directement vers la RVLM (Fig. 40Di-iii).

L'ensemble de ces résultats montre que les neurones préBötC^{GABA} exercent une influence inhibitrice sur l'activité nerveuse sympathique vasomotrice par leur connectivité directe avec les neurones présympathiques de la RVLM.

Discussion

La modulation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque et de l'activité sympathique vasomotrice, générant respectivement la RespVRC et les ondes TH, sont des phénomènes physiologiques dont les mécanismes restent méconnus. Par ce travail, nous avons démontré que les neurones préBötC^{GABA}, sous-population des neurones inhibiteurs du préBötC, ont un rôle de coordinateur respiratoire et cardiovasculaire majeur puisqu'ils sont impliqués dans la modulation des fonctions respiratoire et cardiovasculaire ainsi que dans leur couplage. Ces données obtenues chez le rat *in vivo* (anesthésié) et *in situ* montrent qu'en plus de la modulation du patron moteur inspiratoire, les neurones préBötC^{GABA} participent à générer la RespVRC par leur modulation inhibitrice de l'activité parasympathique cardiaque, à réguler l'amplitude des ondes TH par leur modulation inhibitrice inspiratoire de la modulation respiratoire de l'activité sympathique,

ainsi qu'à réguler la pression artérielle moyenne par leur influence inhibitrice sur l'activité sympathique tonique.

Les neurones préBötC^{GABA} modulent le patron de la décharge motrice inspiratoire

La photostimulation de l'activité des neurones préBötC^{GABA} a diminué l'amplitude de l'activité nerveuse inspiratoire phrénique et de l'aire sous la courbe de la composante inspiratoire de l'activité nerveuse vagale cervicale mais n'a pas stoppé le rythme inspiratoire, démontrant que ces neurones ne font pas partie du groupe rythmogène du préBötC mais qu'ils régulent le patron moteur inspiratoire (Fig. 36, 37, 38). Ces données sont cohérentes avec d'autres travaux ayant montré que la désinhibition du préBötC n'altère que le patron de la décharge inspiratoire et pas le rythme (Baertsch, 2018, Sherman, 2015 ; Janczewski, 2013 ; Marchenko, 2016). Les neurones préBötC^{GABA} pourraient réguler le patron moteur inspiratoire par la modulation de l'activité des neurones inspiratoires du préBötC, soit ceux qui génèrent le rythme inspiratoire, soit ceux qui transmettent l'information aux neurones prémoteurs inspiratoires. Il est également possible que les neurones préBötC^{GABA} modulent l'activité des motoneurones laryngés qui innervent les muscles adducteurs du larynx et qui régulent la résistance au flux d'air. En effet, nos données de traçage viral montrent que les neurones préBötC^{GABA} forment des contacts synaptiques dans le préBötC ipsilatéral ainsi que controlatéral, mais aussi à proximité de neurones cholinergiques du nA semi-compact, où sont trouvés les motoneurones laryngés (Bieger & Hopkins, 1987) (Fig. 34).

Les neurones préBötC^{GABA} participent à la génèse de la RespVRC par une modulation inhibitrice de l'activité parasympathique cardiaque.

La bidirectionnalité des effets sur la RespVRC des photostimulations et photoinhibitions des neurones préBötC^{GABA} indique que ces neurones influencent en permanence l'amplitude de la RespVRC et participent donc à la générer (Fig. 36, 37). Ces effets étaient perdus après l'ajout d'atropine dans la circulation de perfusion de la préparation *in situ* montrant que les neurones préBötC^{GABA} modulent directement ou indirectement l'activité parasympathique cardiaque pour générer la RespVRC (Fig. 39). Il est très probable que les neurones préBötC^{GABA} établissent une connectivité directe avec les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA dont l'activité est modulée par la respiration, ce qui génère la RespVRC (Gilbey, 1984). Ces neurones reçoivent notamment des courants inhibiteurs GABAergiques inspiratoires (Frank, 2009 ; Neff, 2003)

responsables de la diminution du tonus parasympathiques cardiaque, ce qui induit l'augmentation de la fréquence cardiaque pendant l'inspiration caractéristique de la RespVRC (Farmer, 2016 ; Shanks, 2023 ; Ottaviani, 2020), et qui pourraient provenir des neurones préBötC^{GABA}. Nos données anatomiques montrent que les neurones préBötC^{GABA} forment des contacts pré-synaptiques à proximité du corps cellulaire de neurones cholinergiques du nA qui pourraient être des neurones parasympathiques cardiaques (Fig. 34). Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il faudrait utiliser des marqueurs spécifiques des neurones parasympathiques cardiaques tels quels la calbindine ou la butyrylcholinesterase (Veerakumar, 2022). Une autre possibilité serait que les neurones préBötC^{GABA} pourraient également indirectement moduler les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA. En effet, ces neurones reçoivent des courants excitateurs pendant l'expiration qui sont responsables de l'augmentation du tonus parasympathique cardiaque et de la composante bardycarde expiratoire de la RespVRC (McAllen & Spyer, 1978a ; Farmer, 2016 ; Gilbey, 1984). Ces courants pourraient provenir notamment du noyau Kölliker-Fuse et du noyau du tractus solitaire (NTS) (Farmer, 2016 ; McAllen & Spyer, 1978b ; Gilbey ; 1984). Si les neurones préBötC^{GABA} exercent une influence inhibitrice sur ces neurones, la photoinhibition prolongée des neurones préBötC^{GABA} désinhiberait les neurones excitateurs du noyau Kölliker-Fuse et du NTS. Cela amplifierait les entrées excitatrices expiratoires des neurones parasympathiques cardiaques du nA, ce qui augmenterait la chute du rythme cardiaque pendant l'expiration et donc l'amplitude de la RespVRC.

Par ailleurs, le cœur reçoit aussi une innervation sympathique qui a une influence chronotrope positive (Boscan, 2001 ; Wagner, 1986). Or la photoinhibition des neurones préBötC^{GABA} *in situ* induit l'augmentation de la modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique (Fig. 38), qui est générée par les neurones présympathiques de la RVLM (Simms, 2009 ; Adrian, 1932 ; Shantsila, 2015), vers qui nous avons vu que les neurones préBötC^{GABA} projettent (Fig. 34, 41). L'augmentation inspiratoire de l'activité sympathique pourrait ainsi être responsable d'une augmentation de la fréquence cardiaque pendant l'inspiration et donc augmenter l'amplitude de la RespVRC (Fig. 37,38). Mais les photoinhibitions n'amplifiaient plus la RespVRC après l'ajout d'atropine dans la circulation de perfusion de la préparation *in situ* alors que les effets des photoinhibitions sur l'activité sympathique étaient intacts, confirmant que les neurones préBötC^{GABA} participent à la génèse de la RespVRC par la modulation de l'activité parasympathique cardiaque et pas par la modulation de l'activité sympathique cardiaque, qui a un effet négligeable dans la genèse de la

RespVRC *in situ* (Fig. 39). De plus, nos données montrent qu'après atropine, la diminution de l'activité sympathique lors des photostimulations (-21%) n'induit qu'une bradycardie minime (Fig. 39), ce qui illustre l'influence minoritaire de l'activité sympathique dans la régulation en condition basale du rythme cardiaque par rapport à l'activité parasympathique.

Effet de l'anesthésie sur le CRCV.

La bradycardie plus conséquente induite par les photostimulations chez le rat anesthésié pourrait être attribuée à la diminution concomitante de l'activité sympathique (illustrée par la chute de pression artérielle moyenne) (Fig. 36), qui serait susceptible d'exercer une influence plus importante pour le maintien de la fréquence cardiaque moyenne lorsque le système est déprimé par les anesthésiques. En effet, des données montrent que les neurones présympathiques de la RVLM sont plus importants pour le maintien de la pression artérielle moyenne en condition anesthésiée qu'en condition physiologique, et que leur photoinhibition chez le rat anesthésié induit une chute plus importante de pression artérielle qu'en condition non anesthésiée (Wenker, 2017). Cela est aussi cohérent avec nos observations que la pression artérielle diminue trois fois plus lors des photomostimulations des neurones préBötC^{GABA} chez le rat anesthésié (Fig. 36) que chez le rat *in situ* (Fig. 37), et pourrait expliquer pourquoi les photoinhibitions avaient des effets variables sur l'amplitude des ondes TH *in vivo* (Fig. 36) par rapport à la grande reproductibilité entre les préparations *in situ* (Fig. 37). L'ensemble des données de la littérature et nos résultats soulignent l'importance d'étudier le CRCV chez plusieurs modèles, y compris des modèles non anesthésiés comme la préparation *in situ* où les mécanismes du couplage sont préservés et peuvent être étudiés en l'absence de ce facteur confondant (Bouairi, 2004 ; Yang, 2014 ; Massey & Richardson, 2017 ; Sano, 2016 ; Paton, 2022).

Les neurones préBötC^{GABA} contribuent à générer les ondes TH et à réguler la pression artérielle moyenne par une influence inhibitrice sur l'activité nerveuse sympathique vasomotrice.

Nos données montrent que les photomodulations prolongées des neurones préBötC^{GABA} induisent des effets bidirectionnels sur l'amplitude de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et sur l'amplitude des ondes TH associées, indiquant que les neurones préBötC^{GABA} participent à générer les ondes TH par une action sur cette activité nerveuse (Fig. 38). Les effets des photomodulations sur la modulation respiratoire de l'activité sympathique reposent très

probablement sur une modulation des neurones de la RVLM qui pourrait être une connectivité inhibitrice directe des neurones préBötC^{GABA} avec les neurones présympathiques, et/ou une connectivité indirecte, *via* d'autres neurones qui eux projettent vers la RVLM. On aurait pu supposer que les neurones préBötC^{GABA} modulent l'activité de neurones CVLM^{GABA}, qui contactent monosynaptiquement les neurones présympathiques de la RVLM et dont l'activité est également modulée par la respiration (Bowman, 2013 ; Mandel, 2006 ; Guyenet & Schreihofer, 2002 ; Sved, 2000 ; Miyawaki, 1997). Mais cette hypothèse n'est pas soutenue par nos données, puisque nous aurions dû observer une diminution de la modulation respiratoire de l'activité sympathique lors des photoinhibitions des neurones préBötC^{GABA} liée à la désinhibition des neurones CVLM^{GABA}, alors que nous observons l'effet inverse, une amplification de cette activité pendant la photoinhibition (Fig. 38). Cet effet pourrait en revanche s'expliquer par une connectivité inhibitrice locale au sein du préBötC (supportée par l'observation de contacts pré-synaptiques des neurones préBötC^{GABA} dans ce groupe (Fig. 34)), qui entrainerait la désinhibition de neurones glutamatergiques inspiratoires du préBötC qui projettent vers la RVLM et qui sont probablement responsables de la modulation excitatrice inspiratoire reçue par certains neurones C1 (Dempsey, 2017 ; Yang & Feldman, 2018 ; Menuet, 2020 ; Karlen-Amarante, 2024).

Nos données supportent la possibilité d'une modulation directe des neurones présympathiques de la RVLM. En effet, certains neurones C1 reçoivent une modulation inhibitrice inspiratoire de leur activité qui semble être GABAergique (Moraes, 2013 ; Miyawaki, 2002 ; Guyenet, 1990), et nos données anatomiques de traçage viral antérograde des neurones préBötC^{GABA} (Fig. 34) et de traçage rétrograde depuis la RVLM (Fig. 41) démontrent que les neurones préBötC^{GABA} contactent la RVLM, et forment des contacts pré-synaptiques à proximité des neurones C1. De plus, le décours temporel des effets des photomodulations basses fréquences sur l'activité sympathique thoracique est compatible avec une connectivité directe avec la RVLM (Fig. 40). La latence pour atteindre le maximum de l'effet est certes plus importante que celle observée lors de la stimulation basse fréquence des neurones C1 *in vivo* (Abbott, 2009), mais cela pourrait s'expliquer par des conditions expérimentales différentes incluant 1) l'enregistrement de l'activité sympathique thoracique à un niveau plus caudal (T10 dans notre étude contre T3 dans l'étude de Abbott et al. 2009), 2) la présence d'une synapse supplémentaire entre les neurones préBötC^{GABA} et les neurones de la RVLM par rapport à la modulation directe des neurones C1, et 3) par une vitesse de conduction du signal nerveux réduite du fait de la température de la préparation *in situ* (31°C). De plus, des travaux investiguant l'effet des photomodulations basses fréquences des neurones catécholaminergiques

C3 (qui contactent directement les neurones préganglionnaires sympathiques de la moelle épinière) sur l'activité sympathique thoracique (T3-T5) chez le rat *in situ* (Menuet, 2014) rapportent un décours temporel légèrement inférieur à celui que nous observons lors des modulations des neurones préBötC^{GABA} (Fig. 40), ce qui est cohérent avec le passage d'une synapse supplémentaire putative formée entre les neurones préBötC^{GABA} et les neurones présympathiques de la RVLM.

Au niveau physiologique, la modulation inhibitrice inspiratoire des neurones C1 de la RVLM pourrait permettre de moduler finement l'amplitude des ondes TH par une régulation de la modulation respiratoire de l'activité sympathique qui reposerait sur la balance entre les entrées inhibitrices et excitatrices provenant des neurones respiratoires. Cela est cohérent avec la fonction physiologique supposée des ondes TH qui serait d'optimiser les échanges gazeux tissulaires en fonction de la demande métabolique (Simms, 2010).

Les neurones préBötC^{GABA}, en modulant à la baisse l'amplitude des ondes TH *via* une influence inhibitrice sur la modulation respiratoire de l'activité sympathique, pourraient également avoir un rôle de barrière protectrice contre un emballement du système qui a des conséquences pathologiques. En effet, l'exacerbation du couplage respiratoire-sympathique, caractérisée par une potentialisation de la modulation respiratoire sympathique et donc des ondes TH, est causale au développement d'hypertension (Menuet, 2017 ; Simms, 2009). Ce phénomène proviendrait notamment d'altérations centrales incluant des altérations des propriétés intrinsèques des neurones respiratoires, affectant de fait leur couplage avec les neurones présympathiques de la RVLM, qui reçoivent des entrées excitatrices respiratoires exacerbées (Moraes, 2014 ; 2015 ; Molkov, 2011). Les neurones préBötC^{GABA} n'ont jamais été étudiés dans le cadre de l'hypertension et pourraient également dysfonctionner. Si leur influence inhibitrice potentielle des neurones présympathiques C1 de la RVLM était réduite de manière chronique, ces neurones ne recevraient plus que des entrées respiratoires excitatrices et cela se traduirait par une exacerbation de la modulation respiratoire de l'activité sympathique et des ondes TH qui pourrait, à terme, être responsable du développement d'hypertension.

Par ailleurs, les photomodulations prolongées des neurones préBötC^{GABA} induisaient des effets bidirectionnels sur l'activité sympathique tonique qui modulaient la pression artérielle moyenne (Fig. 37, 38, 40). Ces effets auraient également pu provenir de la photomodulation de neurones

CVLM^{GABA} qui se chevauchent avec les neurones du préBötC ventral, et qui auraient été infectés par nos injections du virus BiPOLES dans le préBötC. Mais l'absence d'effet des photoinhibitions sur la réponse sympathoinhibitrice du baroréflexe des neurones préBötC^{GABA} de rats injectés dans le préBötC par rapport à la photoinhibition des neurones CVLM^{GABA} de rats injectés dans la CVLM (Fig. 41) confirme que les neurones CVLM^{GABA} ne sont pas ou très minoritairement touchés par les injections du virus BiPOLES dans le préBötC. Si certains l'étaient, ils n'étaient pas suffisants pour moduler la réponse sympathoinhibitrice du baroréflexe (Fig. 41) et donc très probablement non suffisants pour sous-tendre les effets sympathiques et vasomoteurs liés aux photomodulations du préBötC.

De manière intéressante, la bidirectionnalité des effets sur l'activité sympathique lors des photomodulations associée à la différence entre la réduction importante de l'activité sympathique tonique lors des photostimulations et son augmentation plus modeste lors des photoinhibitions (Fig. 37) semble indiquer que les neurones préBötC^{GABA} imposent un tonus sympathoinhibiteur permanent, et surtout qu'ils sont capable de réguler l'activité sympathique à la baisse et donc de diminuer la pression artérielle moyenne, indépendamment du baroréflexe.

Les neurones préBötC^{GABA} forment une population hétérogène.

Les neurones inhibiteurs du préBötC sont hétérogènes aussi bien d'un point de vue neurochimique que fonctionnelle (Koizumi, 2013 ; Kuwana, 2006 ; Morgado-Valle, 2010) et il est possible que ces différentes sous-populations sous-tendent différentes fonctions. Ces neurones ont différents patrons d'activité (Ashad, 2020 ; Gray, 2010 ; Caroll, 2013, Baertsch, 2018), incluant des neurones inhibiteurs à décharge inspiratoire qui pourraient être impliqués dans la genèse du CRCV par un effet inhibiteur inspiratoire des activités parasympathique cardiaque et sympathique vasomotrice, et des neurones inhibiteurs avec une décharge tonique qui pourraient être responsables du tonus sympathoinhibiteur impliqué dans la régulation de la pression artérielle moyenne.

Par ailleurs, notre caractérisation phénotypique des neurones inhibiteurs du préBötC a révélé que les neurones GABAergiques sont divisés en deux sous-groupes : les neurones uniquement GABAergiques et les neurones co-exprimant le GABA et la glycine (Fig. 33, 35). Ces populations pourraient aussi jouer des rôles différents, ce qui souligne à quel point ces réseaux sont intriqués. Par exemple, les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA reçoivent des

courants inhibiteurs inspiratoires GABAergiques et glycinergiques. Il est donc possible que seuls les neurones GABA-glycine du préBötC en soient responsables, et que cette sous-population soit exclusivement impliquée dans la genèse de la RespVRC, sans participer à la composante respiratoire-sympathique du CRCV. À l'inverse, la modulation inspiratoire inhibitrice des neurones C1 de la RVLM étant probablement GABAergique et non glycinergique (Miyawaki, 2002 ; Guyenet, 1990 ; Menuet, 2017), les neurones uniquement GABAergiques du préBötC pourraient en être les seuls responsables, et ne contribuer ainsi qu'à la genèse des ondes TH.

Le rôle fonctionnel de la co-transmission GABA-glycine a très peu été étudié dans les réseaux respiratoires (essentiellement chez le nouveau-né) (Harb, 2024), et jamais pour les réseaux du CRCV. L'étude de cette co-transmission GAGA-glycine par des enregistrements neuronaux et/ou par modélisations mathématiques montre qu'elle permet la régulation fine de la réponse post-synaptique et le contrôle temporel de l'inhibition neuronale en modulant la durée et l'amplitude des courants post-synaptiques glycinergiques et GABAergiques qui n'ont pas la même cinétique (Russier, 2002 ; Lu, 2008). Ce mécanisme pourrait permettre aux neurones préBötC^{GABA} de réguler précisément la réponse post-synaptique des neurones parasympathiques cardiaques et des neurones présympathiques de la RVLM en fonction des conditions métaboliques, ce qui serait cohérent avec la fonction supposée du CRCV d'optimisation fine des échanges gazeux pour le maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine en condition basale ou lors de variations métaboliques (Ben Tal, 2012 ; Elstad, 2018).

Conclusion

Pour conclure, ce travail démontre que les neurones préBötC^{GABA} sont des coordinateurs physiologiques majeurs du fait de leur implication dans la régulation de la fonction respiratoire et de la fonction cardiovasculaire. Ils occupent une place idéale pour organiser les interactions entre ces deux systèmes et participer ainsi à générer le CRCV. Nos données mettent un peu plus en lumière la complexité des réseaux impliqués mais contribuent à la compréhension des mécanismes encore mal caractérisés à l'origine de ce phénomène physiologique fondamental.

Partie 2

Acute intermittent carotid bodies stimulations induce long term facilitation of respiratory-cardiovascular coupling in rats

Authors:

Ambre Linossier[1], Christian Gestreau[1], Clément Menuet[1]*

[1] INMED, INSERM, Aix-Marseille University, Marseille, France.

* Correspondence: clement.menuet@inserm.fr

Résumé

Hypertension is the leading modifiable risk factor for mortality worldwide. Neurogenic hypertension, responsible for over 50% of cases, is linked to heightened sympathetic nervous system activity. A key feature of this condition is the exacerbation of the respiratory modulation of sympathetic nerve activity (RespSNA) and of the resulting blood pressure Traube-Hering waves (TH waves). This is observed during the pre-hypertensive period and contributes to the development of hypertension. Carotid bodies (CBs), the peripheral chemoreceptors involved in the hypoxic response, are hyperactive in hypertensive patients and animal models. Their chronic intermittent stimulation, as seen in obstructive sleep apnea, promotes hypertension characterized by exacerbated RespSNA and TH waves. However, whether CB hyperactivity plays a causal role in the initiation of these changes remains unclear. This study investigated whether acute intermittent CB stimulations can directly enhance RespSNA and TH waves from a physiological baseline and affect central respiratory and cardiovascular control. Using the *in situ* Working Heart-Brainstem Preparation in rats, we performed repeated CB stimulations with sodium cyanide, mimicking acute

intermittent hypoxia. Four stimulations were sufficient to induce a prolonged (>20 min) increase in RespSNA, TH waves, and perfusion pressure, which was prevented by carotid sinus denervation. Additionally, we observed the reconfiguration of central respiratory and cardiovascular control, characterized by an exacerbation of respiratory-cardiovascular coupling and an increase in respiratory drive particularly affecting upper airway and abdominal control. Our findings demonstrate that acute intermittent CB activation can induce sustained RespSNA and TH waves elevation, supporting a potential role in hypertension development.

Keywords: Carotid bodies ; Intermittent hypoxia ; Hypertension ; vasomotor sympathetic activity ; Respiratory control ; Respiratory heart rate variability ; Working Heart-Brainstem Preparation.

Introduction

Hypertension, a persistently high blood pressure in systemic arteries, is the leading modifiable risk factor for attributable deaths worldwide (GBD 2019 Risk Factors Collaborators, 2020). Neurogenic hypertension is responsible for more than 50% of all cases of high blood pressure, and is characterised by elevated sympathetic nerve activity (SNA) (Schlaich *et al.*, 2004; Esler, 2010; Fisher & Paton, 2012). The elevated SNA manifests during the pre-hypertensive period of hypertension, likely contributing to its development, and persists during established hypertension (Julius *et al.*, 1991; Simms *et al.*, 2010; Grassi *et al.*, 2015; Menuet *et al.*, 2017). In the spontaneously hypertensive rat, global ablation of sympathetic nerves during the pre-hypertensive period decreases adult blood pressure (Lee *et al.*, 1987).

One specific component of SNA that is elevated in hypertension is the respiratory modulation of vasomotor SNA (RespSNA) (Simms *et al.*, 2010; Paton *et al.*, 2022). RespSNA corresponds to rhythmic bursts of vasomotor SNA that occur in phase with respiratory activity, typically during the inspiratory and early post-inspiratory phases of the respiratory cycle. RespSNA leads to oscillations in blood pressure called Traube-Hering (TH) waves. RespSNA and TH waves are elevated during the pre-hypertensive period in many animal models of hypertension, including spontaneously

hypertensive rats (Simms *et al.*, 2009), chronic intermittent hypoxia rats (Zoccal *et al.*, 2008), 2 kidney 1 clip rats (Oliveira-Sales *et al.*, 2015), uteroplacental insufficiency rats (Menuet *et al.*, 2016), and chronic kidney disease rats (Saha *et al.*, 2019). TH waves are also elevated in a group of pre-hypertensive humans (Menuet *et al.*, 2017). In spontaneously hypertensive rats, specifically decreasing the elevated RespSNA and TH waves during the pre-hypertensive period decreases adult blood pressure (Menuet *et al.*, 2017). Therefore, the elevation of RespSNA and TH waves can contribute to the development of hypertension.

A causative factor for the elevated SNA leading to hypertension that has gained significant evidence is carotid body (CB) hypersensitivity and overactivity (McBryde *et al.*, 2017; Prabhakar *et al.*, 2023). In adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension, carotid sinus denervation or pharmacological blockade of purinergic receptors in CBs have been shown to restore RespSNA and TH wave amplitudes to physiological levels (McBryde *et al.*, 2013; Pijacka *et al.*, 2016), leading to persistent decreases in blood pressure (McBryde *et al.*, 2013). Carotid sinus denervation in juvenile pre-hypertensive spontaneously hypertensive rats prevents the development of hypertension (Abdala *et al.*, 2012). In an animal model of sleep apnea, the chronic intermittent hypoxia rat submitted to cyclic episodes of hypoxia usually for ~8h per day during ~10 days, the CBs become hypersensitive to hypoxia and chronically overactive, leading to elevated RespSNA and TH waves, and the development of hypertension (Lesske *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2003; Zoccal *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2017). Therefore, it is likely that CB dysfunction, inducing elevated RespSNA and TH waves, is a common cause of the development of hypertension. However, most research in this field has been conducted under conditions where the CBs have been hypersensitive and overactive for days, weeks or months, making it challenging to distinguish between a causal and a correlative relationship between CB dysfunction and elevated RespSNA / TH waves.

From a physiological baseline, an acute condition that has been widely studied for its prolonged “long-term facilitation” (LTF) effects on central respiratory control is acute intermittent hypoxia (Perim & Mitchell, 2019; Mitchell & Baker, 2022). Acute intermittent hypoxia is mostly performed as 3-10 acute hypoxic events, leading to phrenic LTF, where phrenic nerve activity is increased predominantly in amplitude for at least one hour post-stimuli (Mitchell *et al.*, 2001). CBs are implicated in mediating these effects, since acute intermittent electrical stimulation of the carotid sinus nerve produces phrenic LTF in the absence of hypoxia (Millhorn *et al.*, 1980; Hayashi *et al.*, 1993), and since carotid sinus denervation strongly decreased the development of phrenic LTF

(Bavis & Mitchell, 2003; Kim *et al.*, 2018). Acute intermittent hypoxia also induces sympathetic LTF, however whether sympathetic LTF is characterised by an increased RespSNA and/or an increased tonic SNA remains controversial (Dick *et al.*, 2007; Xing & Pilowsky, 2010; Kim *et al.*, 2018; Ostrowski *et al.*, 2023). These studies were performed in anaesthetised rats, a condition that notoriously depresses sympathetic activity (Behnia & Koushanpour, 1984; Maignan *et al.*, 2000), and alters respiratory-cardiovascular coupling (Bouairi *et al.*, 2004).

The present study aims to determine how CBs can generate a prolonged elevation of RespSNA and TH waves from a physiological baseline, potentially leading to a prolonged elevation of blood pressure, and to assess the broader alterations induced to the central control of respiratory and cardiovascular activities. We used the *in situ* Working Heart-Brainstem Preparation (WHBP) in rats, which enables the study of the CB→RespSNA→TH waves pathway in a homeostatically controlled and anesthesia-free preparation that maintains physiological brainstem control of respiratory and cardiovascular functions (Paton *et al.*, 2022). The WHBP has been widely used to study the mechanisms driving elevated RespSNA and TH waves in animal models of hypertension, and in particular in spontaneously hypertensive rats and in chronic intermittent hypoxia rats (Zoccal *et al.*, 2008; Simms *et al.*, 2009; McBryde *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2017; Menuet *et al.*, 2017; Paton *et al.*, 2022). We show that four acute stimulations of CBs, using sodium cyanide (NaCN) to simulate acute hypoxic events, are sufficient to induce a prolonged (> 20 min) elevation of RespSNA, TH waves and perfusion pressure (the equivalent of blood pressure in the WHBP). Carotid sinus denervation prevented these effects. The acute CB stimulations induced a prolonged reconfiguration of central respiratory and cardiovascular control, with the elevation of both the cardiac and the vascular components of respiratory-cardiovascular coupling, and with an increased respiratory drive particularly affecting the upper airway and abdominal nerve activities.

Matériel et méthodes

Animal experiments.

Animals were handled and cared for in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (N.R.C., 1996) and the European Communities Council Directive of September 22th 2010 (2010/63/EU,74). Experimental protocols received approval from the institutional Ethical Committee #014, authorized by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (APAFIS #12006 and #44474). Animals were group-housed with a 12h light-dark cycle, at a constant temperature (22 ± 1°C) with *ad libitum* access to standard chow and water. All efforts were made to reduce animal suffering and minimize the number of experimental animals. Experiments were performed on P25-P31 wild-type Wistar and Long Evans rats (Janvier Labs) of both sexes.

The Working Heart-Brainstem Preparation (WHBP) (Paton, 1996; Paton *et al.*, 2022).

Rats were deeply anesthetized with isoflurane (5 %, 80 % O_2, Isorane, 1000 mg/g, Axience, France), bisected below the diaphragm, exsanguinated and cooled in aCSF solution on ice (composition in mM: 125 NaCl, 24 $NaHCO_3$, 3 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.25 $MgSO_4$, 1.25 KH_2PO_4 and 10 D-glucose, pH 7.3 after saturation with carbogen gas (chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, France)). A precollicular decerebration was performed, the lungs were removed, and the descending aorta was isolated and cleaned. Preparations were transferred to a recording chamber. Retrograde perfusion of the thorax and head was achieved via a double-lumen catheter (ø1.27 mm, PowerPICC, Bard, NJ, USA) inserted into the descending aorta. The perfusion solution consisted of aCSF containing Ficoll (1.25 %, 17-0310-50, Sigma-Aldrich, France), vasopressin acetate (2 nM, V9879, Sigma-Aldrich, France) and vecuronium bromide (2–4 µg/ml, PHR1627, Sigma-Aldrich, France) warmed to 31°C and gassed with carbogen (closed loop reperfusion circuit, 25–30 ml/min). A transducer connected to the second lumen of the catheter monitored perfusion pressure (PP) in the aorta. The head of the preparation was fixed with ear and mouth bars. A peristaltic pump (520S, Watson-Marlow Bredel Pumps, UK) was used to slowly increase the flow rate of the perfusion solution to tune the preparation. For all WHBPs, simultaneous recordings of phrenic nerve activity (PNA) and thoracic sympathetic chain activity (SNA, between T8-10) were obtained using glass suction electrodes. For some WHBPs, the cervical vagus nerve activity (cVNA, left side) or the abdominal nerve activity

(AbdNA, left side) and/or the medial branch of the hypoglossal nerve activity (mHNA, right side) were also recorded using glass suction electrodes. All neurograms were amplified, filtered (300-5000 Hz band-pass, A-M system, 1700 Model, Carlsborg, USA), digitized (Power 1401, Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK), rectified and integrated using Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK). Heart Rate (HR) was derived by using a window discriminator to trigger from the R wave of the electrocardiogram simultaneously recorded through the phrenic nerve electrode.

Acute carotid bodies stimulations technique.

Boluses of sodium cyanide solution (NaCN, 200 µL at 0.0016% in aCSF, 1064371000, Sigma-aldrich, France) were injected every 30 seconds in the descending aorta via the perfusion cannula to excite peripheral chemoreceptors until we observed four chemoreflex responses, defined by an hyperpnoea, a bradycardia, and a sympathetically-mediated vasoconstriction (Fig. 1*A*-*B*). A group of rats was injected with aCSF (vehicle) boluses instead of NaCN to serve as a control group.

Carotid sinus denervation.

Carotid sinus denervation (CSD) was performed in the recording chamber. Preparations were placed supine to allow better visualization and easier access to the carotid bodies. Sternohyoid and sternocleidomastoid muscles were removed to expose the carotid bifurcation. Conjunctive tissues were carefully dissected to visualise the carotid bodies and the carotid sinus nerves which were sectioned bilaterally. To validate the efficiency of the carotid sinus denervations, the repeated NaCN injections had to be unsuccessful at triggering chemoreflex responses (Fig. 1*C*). Preparations that failed this test were excluded from the CSD analysis.

Data analysis.

All raw and integrated nerve recordings were obtained at a sampling rate of 3000 Hz and perfusion pressure (PP) was obtained at a sampling rate of 1000 Hz. Nerve activities and HR traces were smoothed before analysis (PNA: time constant 0.08s (smoothing) and 0.032 s (DC remove); SNA,

cVNA, AbdNA, mHNA: time constant 0.05 s (smoothing) and 0.032 s (DC remove); HR: time constant 0.5 s (smoothing)).

Mean, systolic and diastolic perfusion pressures were derived from PP recordings using the HR-BP8.s2s script (https://ced.co.uk/downloads/scriptspkanal). Respiratory frequency was reconstructed from integrated PNA recordings. PP, HR and respiratory frequency were quantified as the average of the mean values of these parameters over each analysed period. Total SNA was quantified as the mean amplitude of the integrated SNA recording over the analysed period. After detection of the end of the inspiratory burst as a triggering event, phrenic-triggered averaging of nervous activities and physiological outputs were used for the analysis of all parameters with a respiratory modulation of their activity. Similarly, phrenic-triggered averaging of systolic PP and HR were used to determine the amplitude of TH waves (mmHg) and respiratory heart rate variability (bpm), respectively. Phrenic-triggered averaging of SNA was used to measure the area under the curve (AUC) of the respiratory modulation of SNA (RespSNA). All respiratory-modulated components of RespSNA were included in the AUC measure (including the inspiratory and post-inspiratory components, and the late-expiratory/pre-inspiratory component if present). Tonic levels of SNA (tonic SNA) were measured using the phrenic-triggered averaging of SNA, as the average of SNA during the expiratory period, therefore outside of the respiratory modulation of SNA. Phrenic-triggered averaging of PNA, mHNA, AbdNA and cVNA were used to quantify the AUC of the inspiratory component of PNA, mHNA and cVNA, of the post-inspiratory component of cVNA, and of the late-expiratory component of AbdNA. In these analyses, the inspiratory period was defined as the duration between the rising and falling edges of the integrated PNA (identified as grey shaded areas in figures). The post-inspiratory period corresponded to the duration between the peak and the return to baseline of the integrated cVNA. The period analyzed to determine the late-expiratory component of the AbdNA corresponded to the second half of the expiratory period.

To quantify the acute respiratory and cardiovascular responses to NaCN injections, we calculated the difference between the values in total SNA, respiratory frequency, PP and HR averaged over a period of 15 seconds following each of the four NaCN injections with the parameters' control values averaged over the 15 seconds preceding each injection, in both intact and CSD rats. The variations (in %) of these parameters were then compared between intact and CSD rats.

To measure the long term respiratory and cardiovascular responses induced by NaCN (or aCSF) injections, and their kinetics, each parameter was quantified over a period of 2 minutes every 10

minutes for 50 minutes, starting at 1 minute after the last NaCN injection. A 2 minute control period was taken immediately before the first NaCN injection. Changes in nervous activity and physiological output following peripheral chemoreflex activation were determined by measuring the parameters baseline values and comparing them with the parameters' values at the different analysis time points.

Changes in activities associated with the late-expiratory/pre-inspiratory SNA burst were quantified by phrenic triggered averaging of nervous activities and physiological outputs, after detection of the onset of the inspiratory burst as the triggering event. First, we quantified the overall changes in activities by measuring the AUC of the RespSNA, PNA, mHNA, AbdNA, cVNA and the amplitude of TH waves between respiratory cycles with or without late-expiratory/pre-inspiratory SNA burst, over the entire recording after NaCN injections. For this, every cycle with a late-expiratory/pre-inspiratory SNA burst from the full recording after NaCN was included in the averaging of the "late-expiratory/pre-inspiratory +" condition. For comparison, the same number of cycles without the late-expiratory/pre-inspiratory SNA burst were used to generate the averaging of the "late-expiratory/pre-inspiratory -" condition. Next, we examined the kinetics of changes in RespSNA AUC and TH waves amplitude depending on the presence or absence of late-expiratory/pre-inspiratory SNA bursts during the different time periods analysed following NaCN injections. For this, phrenic-triggered averages were generated by including all respiratory cycles exhibiting a late-expiratory/pre-inspiratory SNA burst within each time window analysed (from 1 to 10 minutes, 10 to 20 minutes, etc., up to 50 minutes), and were then compared to averages obtained in the same manner for respiratory cycles without a late-expiratory/pre-inspiratory SNA burst. Rats in which late-expiratory/pre-inspiratory SNA bursts were seen only transiently, i.e. only during the first few minutes after peripheral chemoreceptors stimulation, were excluded from these analyses. The ratio of the number of late-expiratory/pre-inspiratory SNA bursts to the number of respiratory cycles was obtained by manually counting each of these events during the total duration of each of the periods analysed.

Statistics.

Normal distribution of data was verified with the Shapiro-Wilk test, and equal variance of data was tested. Outliers were identified and removed using the ROUT method with a Q cutoff set at 0.5%.

Absolute data with normal distribution and equal variance were analysed using one-way repeated measures ANOVA followed by pairwise multiple comparison Holm-Sidak *post-hoc* test, or paired student's t tests. Data with failed normal distribution or failed equal variance were analysed using Friedman repeated measures analysis of variance on ranks followed by Dunn's *post-hoc* test or Wilcoxon signed rank test. Independent groups data with normal distribution and equal variance were analysed using unpaired t test, and data with failed normal distribution or failed equal variance were analysed using a Mann-Whitney test.

To compare the absolute variation of the different parameters between groups, individual data were normalized as a percentage of the initial baseline activity (before NaCN injections; baseline = 100%). These data were analysed using two-way repeated-measures ANOVAs for data with normal distribution and equal variance, and with mixed-effect analyses for data with failed normal distribution or failed equal variance. Pairwise multiple comparisons were done using Sidak *post-hoc* test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (v. 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA). Group data are represented as mean ± sem. Detailed statistics are presented in the figure legends. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Résultats

Specific and repeated CB stimulations with NaCN induce acute intermittent peripheral chemoreflexes affecting respiratory and cardiovascular functions.

We used NaCN at a dose (200 µl at 0.016 %) that is similar to what was previously shown to induce an acute and selective stimulation of CBs in rat WHBPs, and in particular with no direct central effects (Paton *et al.*, 1999; McBryde *et al.*, 2013). Four NaCN injections were administered in the perfusate, with intervals of 30 seconds between injections, to induce acute intermittent stimulations of CBs (Fig. 43*A*-*B*). The NaCN injections triggered typical respiratory, sympathetic vasomotor and cardiovascular responses to a peripheral chemoreflex, with an increased respiratory frequency (+124.9 ± 27.0 %, from 12.5 ± 1.7 to 25.1 ± 1.9 cycles per minute, $P < 0.0001$), a sympathoexcitation (+35.4 ± 5.3 %, from 3.2 ± 0.22 to 4.28 ± 0.27 µV, $P < 0.0001$), an increased perfusion pressure (+5.51 ± 0.31 %, from 73.64 ± 1.25 to 77.53 ± 1.29 mmHg, $P < 0.0001$), and a bradycardia (-20.27 ± 2.28 %, from 306.3 ± 11.4 to 243.0 ± 10.0 beats per minute, $P < 0.0001$) (Fig. 42*B* and *D*). In WHBPs with

bilateral CSD, NaCN did not induce any respiratory, sympathetic vasomotor or cardiovascular effects associated with a peripheral chemoreflex, but the injections *per se* induced a small increase in perfusion pressure (+3.58 ± 0.43 %, from 62.51 ± 1.44 to 64.73 ± 1.32 mmHg, $P < 0.0001$) associated with small and classical baroreflex-induced bradycardia (-1.18 ± 0.17 %, from 296.2 ± 10.6 to 292.6 ± 10.3 beats per minute, $P = 0.0003$) and a slight decrease in sympathetic nerve activity (-2.91 ± 0.68 %, from 3.13 ± 0.30 to 3.05 ± 0.31 µV, $P = 0.0028$) (Fig. 42*C*-*D*). These data show that NaCN, with our acute intermittent injection protocol, triggers a specific CB-mediated chemoreflex.

Acute intermittent CB stimulations induce a sympathetic vasomotor LTF and a prolonged increase in perfusion pressure.

The impact of the acute intermittent CB stimulations on basal respiratory, sympathetic vasomotor and cardiovascular parameters over time (50 min) was evaluated using rat WHBPs injected with NaCN or with aCSF (Fig. 43*A*-*B*). There was a small and progressive increase in respiratory frequency over time following NaCN injections, only reaching statistical significance as absolute values of respiratory frequency (+14.4 ± 5.8 % at 50 min, Fig. 43*B*). However, a similar increase was present in aCSF-injected WHBPs, so that there were no differences in respiratory frequency between NaCN- and aCSF-injected WHBPs during the 50 min following injections. Such progressive increases in respiratory frequency over time are classical in the WHBP, as with other *ex vivo* preparations. Similarly, there was a tendency for a small increase in mean HR following NaCN injections (+2.4 ± 1.1 % at 50 min), but with no differences compared to aCSF injections.

Perfusion pressure was increased during the first 20 min following NaCN injections (+2.7 ± 0.9 % at 1 min, +4.2 ± 0.9 % at 10 min, +3.2 ± 0.8 % at 20 min ; $P = 0.0303$, 0.0004 and 0.0058, respectively). Although this increase was modest in amplitude, it was strongly consistent throughout all rat WHBPs (n = 36), while perfusion pressure was not altered following aCSF injections. This increase in perfusion pressure following NaCN injections was certainly due to the increased total SNA (+6.4 ± 1.5 % at 1 min, +6.9 ± 1.8 % at 10 min; $P = 0.0037$ and 0.0135, respectively), characterising the typical sympathetic LTF induced by acute intermittent hypoxia. Total SNA was not changed following aCSF injections.

The sympathetic vasomotor LTF induced by acute intermittent CB stimulations is specifically caused by RespSNA LTF.

Next, we assessed the respective contributions of RespSNA and tonic SNA to the sympathetic LTF measured as an overall and persistent increase in total SNA (Fig. 43*B*). While tonic SNA was not changed following NaCN or aCSF injections, RespSNA was strongly increased following NaCN injections over the entire measurement period (+82.1 ± 16.3 % at 1 min, +63.9 ± 13.3 % at 10 min, +61.4 ± 9.8 % at 20 min, +44.1 ± 8.3 % at 30 min, +39.8 ± 8.3 % at 40 min, +29.3 ± 7.8 % at 50 min ; P = 0.0003, 0.0005, < 0.0001, 0.0002, 0.0012 and 0.0189, respectively) (Fig. 44*A*-*B*). RespSNA was measured on phrenic-triggered averaging of SNA, as the total area under the curve of all bursts occurring in phase with the respiratory cycle. The predominant RespSNA burst occurred during inspiration and the beginning of post-inspiration (Fig. 43*A*, 44*A* and 45*A*).

RespSNA was not altered following aCSF injections and was decreased following NaCN injections in rat WHBPs with bilateral CSD (-19.3 ± 4.3 % at 10 min, -31.8 ± 2.4 % at 30 min ; P = 0.0263 and < 0.0001, respectively). Overall, RespSNA remained significantly increased for the entire duration of the recordings following NaCN injections in CB-intact WHBPs compared to aCSF-injected WHBPs and to NaCN-injected WHBPs with carotid sinus denervation (Fig. 44*B*). These data show that the sympathetic LTF induced by the acute intermittent CB stimulations is specifically caused by a persistent increase in RespSNA (RespSNA LTF).

Acute intermittent CB stimulations induce a prolonged increase in the amplitudes of TH waves and of the respiratory modulation of heart rate.

Consistently with the RespSNA LTF, the amplitude of TH waves was increased following NaCN injections, although this lasted over a shorter period (+105.0 ± 20.9 % at 1 min, +49.5 ± 15.7 % at 10 min; P = 0.0003 and 0.0384, respectively) (Fig. 44*A*-*B*). It is noteworthy that the time frame of the increased amplitude of TH waves is similar to that of perfusion pressure (Fig. 43*B* and 44*B*). The amplitude of TH waves slowly decreased over time following aCSF injections and following NaCN injections in WHBPs with carotid sinus denervation. The amplitude of TH waves was significantly increased following NaCN injections in CB-intact WHBPs compared to aCSF injections during the first 20 min after injections (P = 0.0002 at 1 min, 0.0074 at 10 min, and 0.0378 at 20 min post-injections).

We also measured the amplitude of the respiratory modulation of heart rate (Fig. 44*A-B*), which is primarily (but not exclusively) generated *via* respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity, and was recently named respiratory heart rate variability (RespHRV, formerly known as respiratory sinus arrhythmia) (Menuet *et al.*, 2025). RespHRV amplitude exhibited a marked increase following NaCN injections, occurring within a time frame comparable to that of TH waves (+375.4 ± 79.5 % at 1 min, +119.6 ± 31.7 % at 10 min; $P = 0.0005$ and 0.0069, respectively). RespHRV amplitude decreased over time following aCSF injections and following NaCN injections in WHBPs with carotid sinus denervation. RespHRV amplitude was significantly increased following NaCN injections in CB-intact WHBPs compared to aCSF injections during the first 30 min after injections ($P = 0.0004$ at 1 min, 0.0005 at 10 min, 0.0024 at 20 min, and 0.0099 at 30 min post-injections).

Acute intermittent CB stimulations induce upper airway control LTF.

Acute intermittent hypoxia has been mostly studied for its effects on respiratory control, and in particular in relation to the induction of phrenic LTF (Mitchell *et al.*, 2001; Mitchell & Baker, 2022). Our protocol using acute intermittent CB stimulations did not induce phrenic LTF at the level of inspiratory bursting frequency (Fig. 43*B*), but there was a tendency for an increased inspiratory phrenic burst area under the curve after NaCN injections compared to after aCSF injections ($P = 0.0802$ at 1 min) (Fig. 45*A-B*). Still, overall phrenic nerve activity (PNA) was not significantly affected by the acute intermittent CB stimulations when compared to control aCSF stimulations.

Conversely, the respiratory control of the upper airways was increased following acute intermittent CB stimulations with NaCN (Fig. 45*A-B*). Both the inspiratory and post-inspiratory components of cervical vagal nerve activity, targeting respectively abductor and adductor laryngeal muscles, were increased during the 40 min that followed NaCN injections compared to aCSF injections ($P = 0.0001$ and 0.0351 at 1 min, 0.0016 and 0.0199 at 10 min, 0.0200 and 0.0200 at 20 min, 0.0429 and 0.0148 at 30 min, 0.0429 and 0.0340 at 40 min, for the inspiratory and post-inspiratory components, respectively). Also, there was a non-significant tendency for an increased activity of the medial branch of the hypoglossal nerve (mHNA, including the inspiratory component, and the pre-inspiratory (pre-I) component if present), targeting the extrinsic and intrinsic tongue protrusors, following acute intermittent CB stimulations with NaCN (Fig. 45*C-D*). These data show that although

the acute intermittent CB stimulations did not induce the classical phrenic LTF, it induced a pronounced upper airway control LTF.

Acute intermittent CB stimulations induce an increased occurrence of late-expiratory/pre-inspiratory bursts on respiratory nerves targeting the upper airway and abdominal muscles.

Chronic intermittent hypoxia typically leads to a permanently increased respiratory drive, in particular with the presence of active expiration even at rest (Zoccal *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2017). This active expiration is generated by an increase in abdominal nerve activity (AbdNA) during the late-expiratory phase of the respiratory cycle. Following acute intermittent CB stimulations with NaCN, AbdNA presented a peak of activity during the late-expiratory phase in 6/6 WHBPs (Fig. 45*C*). This was evident qualitatively when averaging all respiratory cycles within each post-NaCN measurement period, inducing a tendency for an overall increase in AbdNA during the expiratory period in post-NaCN periods compared to the pre-NaCN control period, although this was not significant (Fig. 45*D*).

At the individual respiratory cycle level, in the 6 WHBPs that presented peaks of late-expiratory AbdNA following acute intermittent CB stimulations with NaCN, we found that only a fraction of the respiratory cycles presented those peaks of late-expiratory AbdNA (red arrows in Fig. 46*A*). During the control pre-NaCN period, 7.5 ± 2.2 % of respiratory cycles presented a peak of late-expiratory AbdNA in these WHBPs, increasing to 29.1 ± 5.2 % at 1 min following NaCN (P = 0.0033 *vs*. control) and 22.9 ± 6.1 % at 10 min following NaCN (P = 0.0144 *vs*. control) (Fig. 46*B*). Interestingly, in respiratory cycles showing the presence of a late-expiratory peak on AbdNA compared to adjacent respiratory cycles without this peak of activity, an overall increase in late-expiratory/pre-inspiratory activity was evident in all recorded respiratory nerves except the phrenic nerve (Fig. 46*A* and *C*-*E*). In particular, the late-expiratory peak on AbdNA was concomitant with a pre-I peak on mHNA, and a pre-I activity was also observed on cVNA (Fig. 46*C*-*D*). These additional late-expiratory/pre-inspiratory bursts of activity increased the overall discharge of AbdNA (2.0 ± 0.7 *vs*. 6.3 ± 1.6 µV.s, without *vs*. with late-expiratory/pre-inspiratory bursting, P = 0.0171), of mHNA (6.9 ± 1.9 *vs*. 12.1 ± 2.6 µV.s, without *vs*. with late-expiratory/pre-inspiratory bursting, P = 0.0009), and of inspiratory cVNA (0.72 ± 0.14 *vs*. 1.14 ± 0.22 µV.s, without *vs*. with late-expiratory/pre-inspiratory bursting, P = 0.0195).

RespSNA and TH waves are increased in respiratory cycles with peaks of late-expiratory/pre-inspiratory activity.

RespSNA presented an additional late-expiratory/pre-inspiratory burst in the respiratory cycles in which respiratory nerves targeting the upper airway and abdominal muscles showed similar additional activity (Fig. 46*A* and *C*-*E*). During the post-NaCN periods, this additional burst increased the overall RespSNA compared to cycles without late-expiratory/pre-inspiratory activity (1.1 ± 0.2 *vs*. 1.6 ± 0.2 µV.s, without *vs*. with late-expiratory/pre-inspiratory bursting, $P = 0.0006$) (Fig. 46*E*). The increased RespSNA with late-expiratory/pre-inspiratory bursting led to increased TH waves (0.3 ± 0.1 *vs*. 0.6 ± 0.1 mmHg, without *vs*. with late-expiratory/pre-inspiratory bursting, $P = 0.0017$) (Fig. 46*A*, *C* and *E*).

Acute intermittent CB stimulations increase RespSNA and TH waves in respiratory cycles both with and without late-expiratory/pre-inspiratory activity.

Thus, acute intermittent CB stimulations with NaCN increase the occurrence of a late-expiratory/pre-inspiratory burst of RespSNA in 21/39 WHBPs, which is additional to the classical inspiratory/post-inspiratory burst found in all WHBPs, creating a larger overall RespSNA leading to increased TH waves. Still, within the WHBPs presenting late-expiratory/pre-inspiratory bursting, analysing comparatively RespSNA with or without late-expiratory/pre-inspiratory bursting, before *vs*. after NaCN, shows that RespSNA was similarly increased for at least 40 min following NaCN in both conditions (RespSNA without late-expiratory/pre-inspiratory bursting, +104.0 ± 36.1 % at 1 min, +112.7 ± 40.5 % at 10 min, +121.4 ± 41.0 % at 20 min, +90.9 ± 44.2 % at 30 min, +127.9 ± 51.9 % at 40 min, $P = 0.0129$, 0.0055, 0.0019, 0.0237 and 0.0020, respectively ; RespSNA with late-expiratory/pre-inspiratory bursting, +206.5 ± 42.2 % at 1 min, +184.1 ± 48.3 % at 10 min, +192.0 ± 53.0 % at 20 min, +140.6 ± 53.1 % at 30 min, +165.0 ± 54.9 % at 40 min, +146.3 ± 56.1 % at 50 min, $P < 0.0001$, < 0.0001, < 0.0001, < 0.0001, < 0.0001 and $= 0.0002$, respectively) (Fig. 47*A*). This increase in RespSNA led to increased TH waves, which is significant only in cycles with late-expiratory/pre-inspiratory bursting (+410.8 ± 152.1 % at 1 min, +375.7 ± 203.5 % at 10 min, +138.6 ± 33.9 % at 20 min, $P < 0.0001$, < 0.0001 and $= 0.0305$, respectively).

Furthermore, analysing comparatively RespSNA in the WHBPs presenting only the classical inspiratory/post-inspiratory bursting and in the WHBPs presenting both the classical inspiratory/post-inspiratory bursting and the additional late-expiratory/pre-inspiratory bursting, shows that RespSNA was increased in both groups for up to 40 min following NaCN, with no differences in the relative increases between groups (RespSNA in WHBPs presenting only the classical inspiratory/post-inspiratory bursting, +94.5 ± 26.2 % at 1 min, +59.9 ± 16.2 % at 10 min, +59.7 ± 12.2 % at 20 min, +41.2 ± 7.3 % at 30 min, +40.0 ± 10.1 % at 40 min, P = 0.0838, 0.0727, 0.0099, 0.0033 and 0.0712, respectively ; RespSNA in WHBPs presenting both the classical inspiratory/post-inspiratory bursting and the additional late-expiratory/pre-inspiratory bursting, +113.2 ± 31.5 % at 1 min, P = 0.0456) (Fig. 47*B*). These RespSNA increases led to similar relative changes in the amplitude of TH waves in WHBPs with and without late-expiratory/pre-inspiratory bursting, although only the TH wave increase associated with RespSNA in WHBPs presenting only the classical inspiratory/post-inspiratory bursting reached significant values compared to the pre-NaCN period (+114.3 ± 26.7 % at 1 min, P = 0.0041). Altogether, these data show that acute intermittent CB stimulations induce LTF of the classical inspiratory/post-inspiratory component of RespSNA in all rats, and induce the increased occurrence of an additional late-expiratory/pre-inspiratory RespSNA component in a subgroup of rats that also contributes to the RespSNA LTF, all leading to enlarged TH waves.

Discussion

In this study, we used rat WHBPs and injections of NaCN in the perfusate to stimulate CBs. Four consecutive NaCN injections were performed, each inducing classical and acute respiratory and cardiovascular chemoreflex responses, which were caused by selective CB stimulations since no responses were obtained in carotid sinus denervated WHBPs. At the cardiovascular level, this acute intermittent CB stimulation protocol induced prolonged LTF effects only on the specific components generated by central respiratory-cardiovascular coupling. RespSNA was increased for 50 min following acute intermittent CB stimulations, leading to increased TH waves and perfusion pressure during the first 20 min, while tonic sympathetic nerve activity was not altered. The increase in RespSNA was caused by two phenomena: the increase of the classical inspiratory/post-inspiratory

RespSNA burst, and the increased occurrence of a late-expiratory/pre-inspiratory RespSNA burst which further enhanced RespSNA and TH waves. The respiratory heart rate variability (RespHRV) was also increased for 30 min following acute intermittent CB stimulations, while mean heart rate was not changed. At the respiratory level, while phrenic nerve activity was not altered, the inspiratory and post-inspiratory nervous control of the upper airways was increased for 40 min following NaCN injections. The acute intermittent CB stimulations also induced a prolonged increase in the occurrence of late-expiratory abdominal nerve activity and pre-inspiratory hypoglossal and vagus nerve activities.

Technical considerations and limitations.

The WHBP. In this study, we exclusively used the rat WHBP, which is a widely used experimental model to study central respiratory and cardiovascular changes in neurogenic hypertension and especially after chronic intermittent hypoxia, and the results obtained in the WHBP are frequently corroborated by *in vivo* studies in rats and humans (Zoccal *et al.*, 2008; Simms *et al.*, 2009; McBryde *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2017; Menuet *et al.*, 2017, 2020; Paton *et al.*, 2022). However, the use of a single experimental model in our study does not allow its limitations to be mitigated (some discussed below), as would be the case if different models with complementary advantages and limitations were used, thus allowing more robust validation of results through the intersection of consistent data across models. The WHBP is a decerebrated preparation, which enables the absence of anaesthesia. This represents a significant advantage, given that anaesthetics have been shown to depress respiratory and cardiovascular control. For instance, anaesthetics induce a substantial decrease in the critical upper airway post-inspiratory control (Dutschmann *et al.*, 2014), and a decrease, an abolishment or even an inversion of the pattern of respiratory-cardiovascular coupling (Bouairi *et al.*, 2004). The latter mimics the effects of anxiety in humans (Rassler *et al.*, 2022). Yet, the rat WHBP as performed here does not integrate processing and inputs from brain structures rostral to the colliculi, and in particular the potentially important hypothalamic involvement in respiratory and cardiovascular responses to acute intermittent CB stimulations is missing in our study. In the WHBP, the blood is replaced by perfusion of the descending aorta with aCSF at 31°C gassed with carbogen. This enables the continuous stability of perfusate homeostatic parameters (O_2, CO_2/pH, glucose etc.), thereby controlling important confounding variables that affect CB, respiratory and cardiovascular activities. However, the use of carbogen, and the pattern

of nerve activities usually obtained in the WHBP, are commonly interpreted as representing a condition of heightened drive. The 31°C aCSF decreases the bursting frequency of the WHBP, providing an experimental window of 2-4 hours with relative stability in the activities measured, yet some variability exists, like in the present study with the progressive increase in respiratory frequency in both control aCSF and NaCN injected WHBPs (Fig. 43*B*). It is important to note that certain other parameters, such as RespSNA, TH waves and RespHRV, decrease gradually over time in the rat WHBP (Fig. 44*B*). However, the relative magnitude of these changes is minimal when compared to the effects measured following NaCN injections. Consequently, we believe that this does not affect the comparison and interpretation of the acute intermittent CB stimulations on these parameters.

NaCN. The experimental aim of the present study was to induce selective CB stimulations that mimic the effects of hypoxaemic events, to study the specific implication of CBs in mediating the prolonged changes in respiratory and cardiovascular control after acute intermittent hypoxia. NaCN has been widely used in the WHBP for selective CB stimulation. Doses comparable to those employed in this study have been shown to induce a selective effect on CBs, exhibiting no central effects (Paton *et al.*, 1999; McBryde *et al.*, 2013). A notable advantage of NaCN over hypoxia is its ability to produce effects that are highly controllable, immediate, transient and repeatable. Unlike *in vivo*, repetitive doses of NaCN do not cause accumulative toxic effects in the WHBP, due to the relatively large volume of aCSF under recirculation (200 mL). However, NaCN acts by blocking the mitochondrial electron transport chain, through its binding to the cytochrome C oxidase (complex IV) (Lachowicz *et al.*, 2024). While this mimics some aspects of the sensitivity to O_2 of CB chemoreceptor (type I) cells (Iturriaga *et al.*, 2021), it is likely that it does not activate all intracellular molecular cascades that would be activated by hypoxaemia. Therefore, it is possible that NaCN does not induce all aspects of the endogenous hypoxic CB-mediated chemoreflex.

Acute intermittent CB stimulations induce specific increases in respiratory-cardiovascular coupling at both the vascular and cardiac levels.

At the cardiovascular level, only four acute CB stimulations with NaCN were sufficient to cause an increase in perfusion pressure (the equivalent of blood pressure in the WHBP), in the amplitude of TH waves and in RespHRV for at least 20 minutes, with no change in mean heart rate (Figs 2 and 3).

This shows that respiratory-cardiovascular coupling is specifically increased following acute CB stimulations. Indeed, at the vascular level, the prolonged increase in perfusion pressure appears to be specifically caused by the prolonged increase in RespSNA leading to increased TH waves, since tonic SNA was not changed (Fig. 43). Similarly, at the cardiac level, only RespHRV was increased in a prolonged manner following acute CB stimulations, while mean HR was not changed.

It is interesting to note the different effects that the respiratory modulation has on vascular tone compared to mean heart rate. Vascular tone is caused by the contraction of vascular smooth vessels, which, compared to striated muscles, have slow contraction and relaxation kinetics (Somlyo & Somlyo, 1994). Respiratory-related bursts of vasomotor SNA induce slow increases in blood pressure, peaking with a significant delay compared to the SNA burst that generated it (~2-3 s in the WHBP, Figs 3A, 5A and C), and then slow decreases in blood pressure, thereby forming TH waves. Because of the slow contraction-relaxation kinetics of vascular smooth vessels, TH waves can summate over time to increase blood pressure. This was elegantly shown in the spontaneously hypertensive rat following an apnea-inducing hypocapnic challenge, as return to normocapnia and resuming of respiratory activity caused the enlarged TH waves in this animal model to also resume, summating over time and leading to a larger increase in blood pressure compared to control animals with physiological TH waves (Simms *et al.*, 2009). Furthermore, phasic respiratory modulated SNA induces greater changes in vascular resistance compared to tonic SNA of the same magnitude, likely through increased noradrenergic transmission (Briant *et al.*, 2015). Therefore, TH waves have a significant impact on mean blood pressure. This is supported by the present study, which shows that the temporal profile of the prolonged increase in perfusion pressure corresponds to that of TH waves. This finding aligns with previous research, which demonstrated that chronically increased TH waves can induce the development of hypertension (Menuet *et al.*, 2017).

Inversely, cardiomyocytes are striated, and contract and relax very rapidly. It was previously shown that RespHRV can be greatly modulated in amplitude without altering mean heart rate, that RespHRV and mean heart rate are not correlated at the intra-individual and inter-individual levels, and it was recently emphasized that the respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity, the primary contributor to the generation of RespHRV, is not a marker of cardiac vagal activity (Grossman & Taylor, 2007; Buron *et al.*, 2023; Grossman, 2024; Menuet *et al.*, 2025). It is therefore not surprising that RespHRV could be increased in a prolonged manner following acute intermittent CB stimulations while mean heart rate remained unaffected. Along with the vascular changes induced

by increased TH waves, this further shows the specific nature of the increased respiratory-cardiovascular coupling induced by acute intermittent CB stimulations, compared to tonic modulation of heart rate and vascular tone that remained unchanged.

In human studies, acute intermittent hypoxia induced sympathetic LTF and a transient increase in blood pressure that persisted for ~5 min after the last hypoxic event (Cutler *et al.*, 2004; Leuenberger *et al.*, 2005). In most rat studies so far, acute intermittent hypoxia also induced sympathetic LTF, with RespSNA LTF, but TH waves were not measured, and no changes in blood pressure were found (Dick *et al.*, 2007; Xing & Pilowsky, 2010; Kim *et al.*, 2018; Ostrowski *et al.*, 2023). This difference on blood pressure results with the present study could be due to the protocol difference, as the previous rat studies used acute intermittent hypoxia, while the present study used acute intermittent CB stimulation with NaCN. It could also be caused by the difference in experimental model, as all previous rat studies used anaesthetised rats, while the present study used the non-anaesthetised rat WHBP. Anaesthesia directly depresses the activity of vascular smooth muscles, in a complex manner affecting a wide variety of cellular and molecular mechanisms, resulting in alterations in hemodynamics and blood flow (Akata, 2007). It is therefore possible that anaesthesia in previous studies altered the vascular response to the RespSNA LTF, and measuring TH waves in these experimental conditions would provide future understanding on this issue. Also, it would be important to further investigate this matter *in vivo* in freely moving condition, given that human studies actually show a persistence of increased blood pressure after acute intermittent hypoxia, and since results obtained in the rat WHBP are frequently corroborated by *in vivo* studies in freely moving non-anaesthetised rats (McBryde *et al.*, 2013; Menuet *et al.*, 2017; Paton *et al.*, 2022).

Acute intermittent CB stimulations induce RespSNA LTF with patterns relative to the respiratory cycle that are similar to animal models of hypertension.

In the present study, we found that acute intermittent CB stimulations induce RespSNA LTF, and no change in tonic SNA. These differences in RespSNA *versus* tonic SNA plasticity were previously studied in anaesthetised rats following acute intermittent hypoxia, with diverging results (Dick *et al.*, 2007; Xing & Pilowsky, 2010; Kim *et al.*, 2018; Ostrowski *et al.*, 2023). All previous studies identified an overall sympathetic LTF following acute intermittent hypoxia, most studies showing a RespSNA LTF, and few measuring the specific tonic SNA contribution independently of RespSNA. Importantly,

there were several differences in the measurement of RespSNA among studies, some measuring the area under the curve of RespSNA, while others measured the peak amplitude of RespSNA (absolute or relative to the tonic level of SNA). Also, the studies that measured the area under the curve of RespSNA used different methods of fractionation of subparts of RespSNA relative to the different phases of the respiratory cycle, that mostly involved dividing in half the inspiratory and/or expiratory periods. In the present study, we chose to measure the overall area under the curve of the whole RespSNA burst. Indeed, we believe that this is the most physiologically meaningful measurement of vasomotor SNA, to determine the physiological effect RespSNA induces on vascular smooth muscle contraction and blood pressure. Measuring the area under the curve of RespSNA determines the total drive that vascular smooth muscles receive, which is especially important given the slow temporal dynamics of these muscles. Measuring only the peak RespSNA activity provides information at a single time point, not reflecting the full influence SNA has on vascular smooth muscles. The area under the curve of RespSNA could be increased with no changes in peak amplitude, only with changes in burst duration (like with the addition of a late-expiratory/pre-inspiratory discharge). Furthermore, using fractionations of RespSNA relative to the respiratory cycle also prevents the full assessment of the physiological drive vascular smooth muscles receive. Still, it can provide meaningful information relative to the generation of RespSNA by brainstem respiratory and pre-sympathetic neurons, and its alteration following acute intermittent hypoxia. The interaction between respiratory and pre-sympathetic neurons is highly complex and temporally precise relative to the respiratory cycle (Moraes *et al.*, 2013; Stalbovskiy *et al.*, 2014), meaning that fractionation of RespSNA, to provide meaningful information, should be made relative to concurrent electrophysiological recordings of neuronal and/or nervous respiratory activities that represent all phases and subphases of the respiratory cycle. For instance, the post-inspiratory activity is severely depressed by anaesthesia (Dutschmann *et al.*, 2014). Since the post-inspiratory component of RespSNA is essential, to assess it accurately, it is necessary to measure nervous post-inspiratory activity.

Simultaneously with SNA recordings, we recorded the activities of the hypoglossal nerve, the phrenic nerve, the cervical vagus nerve and the abdominal nerve, which control, respectively, the tongue pre-inspiratory/inspiratory protrusors, the diaphragm inspiratory activity, the laryngeal inspiratory abductor and post-inspiratory adductor muscles, and the abdominal late-expiratory muscles. These recordings enabled the precise temporal investigation of RespSNA changes relative to the respiratory cycle after acute intermittent CB stimulations. The RespSNA LTF was induced by

both the increase of the classical inspiratory/post-inspiratory RespSNA burst, and the increased occurrence of an additional RespSNA burst during the late-expiratory/pre-inspiratory phase, as it was concomitant with late-expiratory abdominal nerve activity and pre-inspiratory hypoglossal nerve activity (Fig. 47), and which further increased the overall RespSNA (Fig. 46 and 47). These patterns of RespSNA increase relative to the respiratory cycle have been studied in animal models of hypertension. In particular, the spontaneously hypertensive rat presents a chronically increased RespSNA predominantly during the inspiratory phase, with RespSNA starting earlier during inspiration and with a shift of the RespSNA peak into inspiration (Czyzyk-Krzeska & Trzebski, 1990; Simms *et al.*, 2009; Menuet *et al.*, 2017). The same pattern of increased RespSNA during inspiration has been found in other animal models of hypertension, including female chronic intermittent hypoxia rats (Souza *et al.*, 2016), 2 kidney 1 clip rats (Oliveira-Sales *et al.*, 2015), uteroplacental insufficiency rats (Menuet *et al.*, 2016), as well as acutely in rats with increased intracranial pressure (Wittenberg *et al.*, 2025), a mechanism believed to be fundamental for the development of essential hypertension. The presence of the additional RespSNA peak during late-expiration is also a classical feature of male chronic intermittent hypoxia rats, causing the chronically increased RespSNA in this model (Zoccal *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2017). It is therefore interesting to note that acute intermittent CB stimulations induce a RespSNA LTF that presents the same patterns of activities as the predominant models of hypertension. Also, like most previous studies using acute intermittent hypoxia, the present study identifies RespSNA LTF as a major driver of the sympathetic LTF following acute intermittent CB stimulations, and therefore a major driver for a persistent increase in blood pressure due to increased TH waves, similarly to during hypertension.

Acute intermittent CB stimulations induce late-expiratory/pre-inspiratory upper airway and abdominal control LTF that could underlie the RespSNA LTF.

At the cardiovascular level, acute intermittent CB stimulations induce a specific increase in respiratory-cardiovascular coupling, measured as increases in RespHRV, in TH waves and in RespSNA. This indicates that the source of these cardiovascular changes are modifications in the inputs received by autonomic cardiovascular neurons from brainstem respiratory neurons. We found that acute intermittent CB stimulations increased specific aspects of the central respiratory control, targeting the upper airways and the abdominal muscles. Our protocol did not induce a marked phrenic LTF, with only a tendency for increased inspiratory phrenic bursts compared to

control animals (Fig. 45). Phrenic LTF is often, but not always present after chronic intermittent hypoxia, and when present it is mostly as an increased inspiratory burst amplitude (Mitchell *et al.*, 2001; Xing & Pilowsky, 2010; Ostrowski *et al.*, 2023). Interestingly, sympathetic LTF is always present after chronic intermittent hypoxia, even in animals without phrenic LTF (Xing & Pilowsky, 2010).

We found that the most striking changes in respiratory control following acute intermittent CB stimulations were the increased pre-inspiratory, inspiratory and post-inspiratory control of the upper airways (tongue protrusors and laryngeal abductor and adductor muscles, respectively), and the increased late-expiratory control of abdominal muscles. These changes characterise a strongly increased respiratory drive, which would facilitate the airflow to the lungs and induce active expiration to enhance the total tidal volume, as has been shown *in vivo* in freely moving rats after acute intermittent hypoxia (Mendonça-Junior *et al.*, 2021). It is interesting to note that the inspiratory and post-inspiratory laryngeal control were increased in all animals and across all respiratory cycles (Fig. 45), while the increased pre-inspiratory hypoglossal activity was only present on respiratory cycles presenting late-expiratory abdominal nerve activity (Fig. 46). These changes are therefore coherent with the changes in RespSNA, which predominant inspiratory/post-inspiratory component was always found to be increased, while the addition of a late-expiratory/pre-inspiratory RespSNA burst was only found when late-expiratory abdominal nerve activity and increased pre-inspiratory hypoglossal nerve activity were present.

When assessing the sequences of nerve discharges along the respiratory cycle (Fig. 46), it is evident that the late-expiratory abdominal nerve activity, the pre-inspiratory hypoglossal nerve activity, and the late-expiratory/pre-inspiratory RespSNA burst, are concomitant. The classification of the activity of the respiratory nerves here as late-expiratory or pre-inspiratory is based on their respective physiological role in the respiratory system, relative to the airflow dynamics during the different phases of the respiratory cycle. However, their concomitance provides information regarding the types of respiratory neurons that could induce the late-expiratory/pre-inspiratory RespSNA burst. In the male chronic intermittent hypoxia rat, it has been suggested that the appearance of a permanent late-expiratory activity would be due to an increased activity of neurons in the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG), where silent late-expiratory neurons become permanently active (Molkov *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2012, 2014). However, to our knowledge the upper airway pre-inspiratory activity has not been assessed in similar conditions so far, and given the concomitance of this activity with the late-expiratory abdominal activity in the present study, it

could also be possible that pre-inspiratory neurons of the respiratory central pattern generator participate in generating the late-expiratory/pre-inspiratory RespSNA burst following acute intermittent CB stimulations. Further studies based on single-cell recordings of pre-inspiratory neurons, such as those present in the pre-Bötzinger complex, should be performed to test this hypothesis.

CBs as the source of the respiratory and cardiovascular plasticities measured, providing indications for the development of future therapies for hypertension.

All the prolonged respiratory and cardiovascular effects identified in the present study were caused by only four consecutive NaCN injections. These NaCN injections most certainly stimulated only the CBs, since carotid sinus denervated WHBPs showed no prolonged changes in respiratory and cardiovascular activities (Fig. 44), and only minimal baroreflex-induced effects acutely during the NaCN injections (Fig. 42). Also, we used NaCN at a dose that is similar to what was previously shown to induce a selective stimulation of CBs in rat WHBPs, with no direct central effects (Paton *et al.*, 1999; McBryde *et al.*, 2013). Still, since the WHBP is a perfused preparation with a disrupted blood-brain barrier, we cannot exclude the possibility that NaCN also acted centrally.

It has been shown that CBs are hypersensitive and hyperactive in several animal models of hypertension, and that these alterations are implicated in the development of hypertension in these animals (Lesske *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2003; Zoccal *et al.*, 2008; McBryde *et al.*, 2013; Pijacka *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2017; Prabhakar *et al.*, 2023). Intermittent hypoxia induces CB hypersensitivity and hyperactivity (Peng *et al.*, 2003; Prabhakar *et al.*, 2023), which is involved in generating an increased vasomotor RespSNA, leading to increased TH waves, which causes the development of hypertension (McBryde *et al.*, 2013; Pijacka *et al.*, 2016; Menuet *et al.*, 2017). In the present study, NaCN was used to induce acute and specific CB stimulations, which triggered RespSNA and vascular changes that are very similar to those observed in animal models in which CBs are implicated in the development of hypertension. CBs are currently the focus of new therapeutic developments to treat multi-drug resistant hypertension (McBryde *et al.*, 2017; Żera *et al.*, 2025). The present study could therefore provide new avenues for the development of molecularly targeted treatments, since the NaCN effects on CBs are identified at the cellular and molecular levels. Furthermore, the mechanisms maintaining the prolonged respiratory and

cardiovascular effects induced by intermittent hypoxia might not be solely involving CB hyperactivity and hypersensitivity, as central plasticity was also shown to be involved in the maintenance of the respiratory and sympathetic LTF after acute intermittent hypoxia (Ostrowski *et al.*, 2023). This might represent a significant challenge that could be necessary to address in the future development of anti-hypertensive therapies.

Conclusion.

Acute intermittent CB stimulations induce a prolonged increase in respiratory control and respiratory-cardiovascular coupling, which together would serve to facilitate oxygen delivery from the air to the tissues and optimise metabolic oxygen consumption by the cardiovascular system. This is enabled by a complex remodelling and plasticity of the central respiratory and autonomic control. At the vascular and sympathetic vasomotor levels, the effects identified present the same activity patterns as the chronic alterations found in several animal models of hypertension. This shows that a short-term physiological plasticity to increase oxygen supply can likely become a pathological condition if maintained chronically. Future studies would be required to investigate the mechanisms leading to this transition from physiology to pathology, where RespHRV switches from amplified after acute intermittent CB stimulations to severely decreased in hypertension, while RespSNA and TH waves remain elevated in both conditions

Bibliographie

Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, Sobotka PA, Gourine AV & Paton JFR (2012). Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol (Lond)* **590,** 4269–4277.

Akata T (2007). General anesthetics and vascular smooth muscle: direct actions of general anesthetics on cellular mechanisms regulating vascular tone. *Anesthesiology* **106,** 365–391.

Bavis RW & Mitchell GS (2003). Intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation in carotid-denervated rats. *J Appl Physiol (1985)* **94,** 399–409.

Behnia R & Koushanpour E (1984). Local versus central effect of halothane on carotid sinus baroreceptor function. *Anesthesiology* **61,** 161–168.

Bouairi E, Neff R, Evans C, Gold A, Andresen MC & Mendelowitz D (2004). Respiratory sinus arrhythmia in freely moving and anesthetized rats. *J Appl Physiol (1985)* **97,** 1431–1436.

Briant LJB, O'Callaghan EL, Champneys AR & Paton JFR (2015). Respiratory modulated sympathetic activity: A putative mechanism for developing vascular resistance? *J Physiol (Lond)*; DOI: 10.1113/JP271253.

Buron J, Linossier A, Gestreau C, Schaller F, Tyzio R, Felix M-S, Matarazzo V, Thoby-Brisson M, Muscatelli F & Menuet C (2023). The oxytocin-modulated brain circuit that synchronizes heart rate with breathing. 2023.09.26.559512. Available at: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.09.26.559512v1 [Accessed October 30, 2023].

Cutler MJ, Swift NM, Keller DM, Wasmund WL & Smith ML (2004). Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *J Appl Physiol (1985)* **96,** 754–761.

Czyzyk-Krzeska MF & Trzebski A (1990). Respiratory-related discharge pattern of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol (Lond)* **426,** 355–368.

Dick TE, Hsieh Y-H, Wang N & Prabhakar N (2007). Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp Physiol* **92,** 87–97.

Dutschmann M, Jones SE, Subramanian HH, Stanic D & Bautista TG (2014). The physiological significance of postinspiration in respiratory control. *Prog Brain Res* **212,** 113–130.

Esler M (2010). The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *J Appl Physiol (1985)* **108,** 227–237.

Fisher JP & Paton JFR (2012). The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *J Hum Hypertens* **26,** 463–475.

GBD 2019 Risk Factors Collaborators (2020). Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **396,** 1223–1249.

Grassi G, Mark A & Esler M (2015). The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. *Circ Res* **116,** 976–990.

Grossman P (2024). Respiratory sinus arrhythmia (RSA), vagal tone and biobehavioral integration: Beyond parasympathetic function. *Biol Psychol* **186,** 108739.

Grossman P & Taylor EW (2007). Toward understanding respiratory sinus arrhythmia: relations to cardiac vagal tone, evolution and biobehavioral functions. *Biol Psychol* **74,** 263–285.

Hayashi F, Coles SK, Bach KB, Mitchell GS & McCrimmon DR (1993). Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. *Am J Physiol* **265,** R811-819.

Iturriaga R, Alcayaga J, Chapleau MW & Somers VK (2021). Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev* **101,** 1177–1235.

Julius S, Krause L, Schork NJ, Mejia AD, Jones KA, van de Ven C, Johnson EH, Sekkarie MA, Kjeldsen SE & Petrin J (1991). Hyperkinetic borderline hypertension in Tecumseh, Michigan. *J Hypertens* **9,** 77–84.

Kim SJ, Fong AY, Pilowsky PM & Abbott SBG (2018). Sympathoexcitation following intermittent hypoxia in rat is mediated by circulating angiotensin II acting at the carotid body and subfornical organ. *J Physiol* **596,** 3217–3232.

Lachowicz JI, Alexander J & Aaseth JO (2024). Cyanide and Cyanogenic Compounds-Toxicity, Molecular Targets, and Therapeutic Agents. *Biomolecules* **14,** 1420.

Lee RM, Triggle CR, Cheung DW & Coughlin MD (1987). Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **10,** 328–338.

Lesske J, Fletcher EC, Bao G & Unger T (1997). Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens* **15,** 1593–1603.

Leuenberger UA, Brubaker D, Quraishi SA, Hogeman CS, Imadojemu VA & Gray KS (2005). Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans. *Auton Neurosci* **121,** 87–93.

Machado BH, Zoccal DB & Moraes DJA (2017). Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **312,** R864–R872.

Maignan E, Dong WX, Legrand M, Safar M & Cuche JL (2000). Sympathetic activity in the rat: effects of anaesthesia on noradrenaline kinetics. *J Auton Nerv Syst* **80,** 46–51.

McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJA, Sobotka PA & Paton JFR (2013). The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun* **4,** 2395.

McBryde FD, Hart EC, Ramchandra R & Paton JFR (2017). Evaluating the carotid bodies and renal nerves as therapeutic targets for hypertension. *Auton Neurosci* **204,** 126–130.

Mendonça-Junior BA, V Fernandes M & Zoccal DB (2021). Acute intermittent hypoxia evokes ventilatory long-term facilitation and active expiration in unanesthetized rats. *Respir Physiol Neurobiol* **294,** 103768.

Menuet C et al. (2025). Redefining respiratory sinus arrhythmia as respiratory heart rate variability: an international Expert Recommendation for terminological clarity. *Nat Rev Cardiol*; DOI: 10.1038/s41569-025-01160-z.

Menuet C, Connelly AA, Bassi JK, Melo MR, Le S, Kamar J, Kumar NN, McDougall SJ, McMullan S & Allen AM (2020). PreBötzinger complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. *eLife*; DOI: 10.7554/eLife.57288.

Menuet C, Le S, Dempsey B, Connelly AA, Kamar JL, Jancovski N, Bassi JK, Walters K, Simms AE, Hammond A, Fong AY, Goodchild AK, McMullan S & Allen AM (2017). Excessive Respiratory Modulation of Blood Pressure Triggers Hypertension. *Cell Metab* **25,** 739–748.

Menuet C, Wlodek ME, Fong AY & Allen AM (2016). Respiratory modulation of sympathetic nerve activity is enhanced in male rat offspring following uteroplacental insufficiency. *Respir Physiol Neurobiol* **226,** 147–151.

Millhorn DE, Eldridge FL & Waldrop TG (1980). Prolonged stimulation of respiration by a new central neural mechanism. *Respir Physiol* **41,** 87–103.

Mitchell GS & Baker TL (2022). Respiratory neuroplasticity: Mechanisms and translational implications of phrenic motor plasticity. *Handb Clin Neurol* **188,** 409–432.

Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA, Bavis RW, Mack KJ & Olson EB (2001). Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol (1985)* **90,** 2466–2475.

Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJA, Paton JFR, Machado BH & Rybak IA (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol* **105,** 3080–3091.

Moraes DJA, Bonagamba LGH, Costa KM, Costa-Silva JH, Zoccal DB & Machado BH (2014). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol (Lond)* **592,** 2013–2033.

Moraes DJA, Dias MB, Cavalcanti-Kwiatkoski R, Machado BH & Zoccal DB (2012). Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J Neurophysiol* **108,** 882–890.

Moraes DJA, da Silva MP, Bonagamba LGH, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* **33,** 19223–19237.

Oliveira-Sales EB, Colombari E, Abdala AP, Campos RR & Paton JFR (2015). Sympathetic over activity occurs before hypertension in the two-kidney one clip model. *Exp Physiol*; DOI: 10.1113/EP085390.

Ostrowski D, Heesch CM, Kline DD & Hasser EM (2023). Nucleus tractus solitarii is required for the development and maintenance of phrenic and sympathetic long-term facilitation after acute intermittent hypoxia. *Front Physiol* **14,** 1120341.

Paton JF (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65,** 63–68.

Paton JF, Li YW & Kasparov S (1999). Reflex response and convergence of pharyngoesophageal and peripheral chemoreceptors in the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* **93,** 143–154.

Paton JFR et al. (2022). Advancing respiratory-cardiovascular physiology with the working heart-brainstem preparation over 25 years. *J Physiol* **600,** 2049–2075.

Peng Y-J, Overholt JL, Kline D, Kumar GK & Prabhakar NR (2003). Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100,** 10073–10078.

Perim RR & Mitchell GS (2019). Circulatory control of phrenic motor plasticity. *Respir Physiol Neurobiol* **265,** 19–23.

Pijacka W, Moraes DJA, Ratcliffe LEK, Nightingale AK, Hart EC, da Silva MP, Machado BH, McBryde FD, Abdala AP, Ford AP & Paton JFR (2016). Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* **22,** 1151–1159.

Prabhakar NR, Peng Y-J & Nanduri J (2023). Carotid body hypersensitivity in intermittent hypoxia and obtructive sleep apnoea. *J Physiol* **601,** 5481–5494.

Rassler B, Schwerdtfeger AR, Schwarz G & Pfurtscheller G (2022). Negative respiratory sinus arrhythmia (nRSA) in the MRI-scanner - a physiologic phenomenon observed during elevated anxiety in healthy persons. *Physiol Behav* **245,** 113676.

Saha M, Menuet C, Sun Q-J, Burke PGR, Hildreth CM, Allen AM & Phillips JK (2019). Respiratory sympathetic modulation is augmented in chronic kidney disease. *Respir Physiol Neurobiol* **262,** 57–66.

Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, Hastings J, Aggarwal A & Esler MD (2004). Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. *Hypertension* **43,** 169–175.

Simms AE, Paton JFR, Allen AM & Pickering AE (2010). Is augmented central respiratory-sympathetic coupling involved in the generation of hypertension? *Respir Physiol Neurobiol* **174,** 89–97.

Simms AE, Paton JFR, Pickering AE & Allen AM (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol (Lond)* **587,** 597–610.

Somlyo AP & Somlyo AV (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372,** 231–236.

Souza GMPR, Bonagamba LGH, Amorim MR, Moraes DJA & Machado BH (2016). Inspiratory modulation of sympathetic activity is increased in female rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* **101,** 1345–1358.

Stalbovskiy AO, Briant LJB, Paton JFR & Pickering AE (2014). Mapping the cellular electrophysiology of rat sympathetic preganglionic neurones to their roles in cardiorespiratory reflex integration: a whole cell recording study in situ. *J Physiol* **592,** 2215–2236.

Wittenberg P, McBryde FD, Korsak A, Rodrigues KL, Paton JFR, Marina N & Gourine AV (2025). On the regulation of arterial blood pressure by an intracranial baroreceptor mechanism. *J Physiol*; DOI: 10.1113/JP285082.

Xing T & Pilowsky PM (2010). Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory drive. *J Physiol* **588,** 3075–3088.

Żera T, Paleczny B, Siński M, Conde SV, Narkiewicz K, Ponikowski P, Paton JFR & Niewiński P (2025). Translating physiology of the arterial chemoreflex into novel therapeutic interventions targeting carotid bodies in cardiometabolic disorders. *J Physiol*; DOI: 10.1113/JP285081.

Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LGH, Braga VA, Pickering AE, Paton JFR & Machado BH (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol (Lond)* **586,** 3253–3265.

Author contributions

C.M., C.G. and A.L. designed the research project. A.L. performed all experiments. A.L., C.M. and C.G. analyzed and/or interpreted the data. C.M. drafted the paper, C.G. and A.L. revised it critically for important intellectual content.

Acknowledgements

We thank Dr Gilles Fortin for providing experimental equipment, and members of the Inmagic, PBMC and Animal core facilities at Inmed. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE14-0009-01 to C.M.), from the French government under the Programme « Investissements d'Avenir » (Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université *via* A*Midex funding (AMX-19-IET-004), and ANR (ANR-17-EURE-0029), to C.M.), and from Marseille Institute for Rare Diseases (Marmara, Master's Fellowship and end-of-PhD Fellowship to A.L.).

Competing interest declaration

The authors declare no competing interests.

Figures and legends

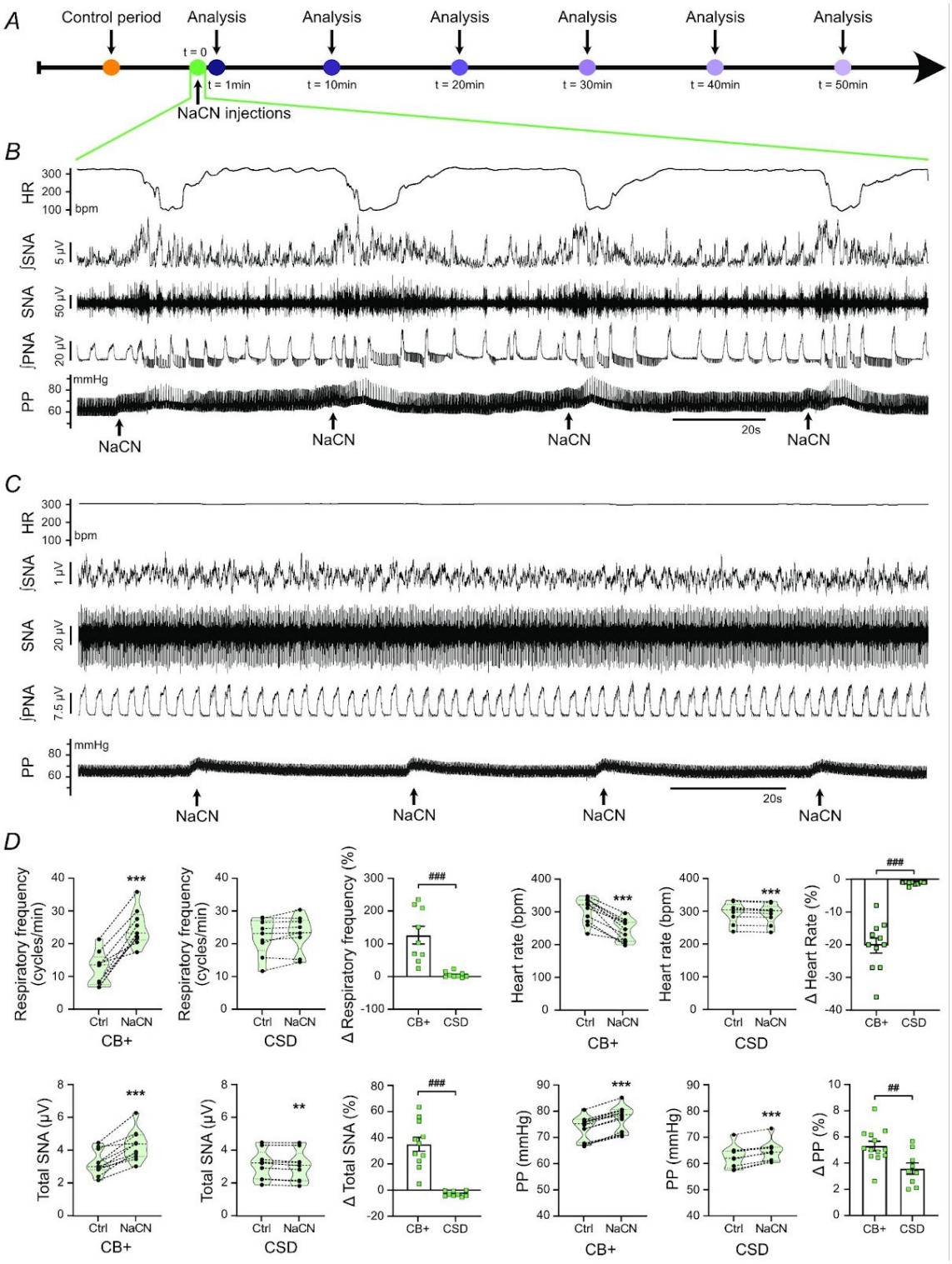


Figure 42. Four consecutive NaCN perfusate injections in rat WHBPs induce specific CB-mediated chemoreflexes

A, Experimental timeline, showing the measurement periods analysed relative to the four consecutive NaCN injections in the intra-aortic perfusate of WHBPs of rats (~30 s between each injection). *B-C*, Representative traces showing the effects of the four consecutive NaCN injections on heart rate (HR), thoracic sympathetic nerve activity (Total SNA), phrenic nerve activity (PNA) and perfusion pressure (PP), in an intact rat WHBP (CB+) (*B*) and in a rat WHBP with bilateral carotid sinus denervation (CSD) (*C*). *D*, Individual and group data showing the averaged peak effects of the 4 NaCN injections on respiratory frequency, SNA, PP and HR, in intact (CB+, paired *t* test Ctrl vs NaCN CB+: respiratory frequency: n = 9, SNA, HR: n = 11, PP: n = 13) and carotid sinus denervated (CSD, paired *t* test Ctrl vs NaCN CSD: n = 9) WHBPs. The relative changes (Δ) are compared between CB+ and CSD WHBPs (unpaired *t* test: Respiratory frequency, PP, SNA; Mann-Whitney test: HR). * or #, $P < 0.05$; ** or ##, $P < 0.01$; *** or ###, $P < 0.001$.

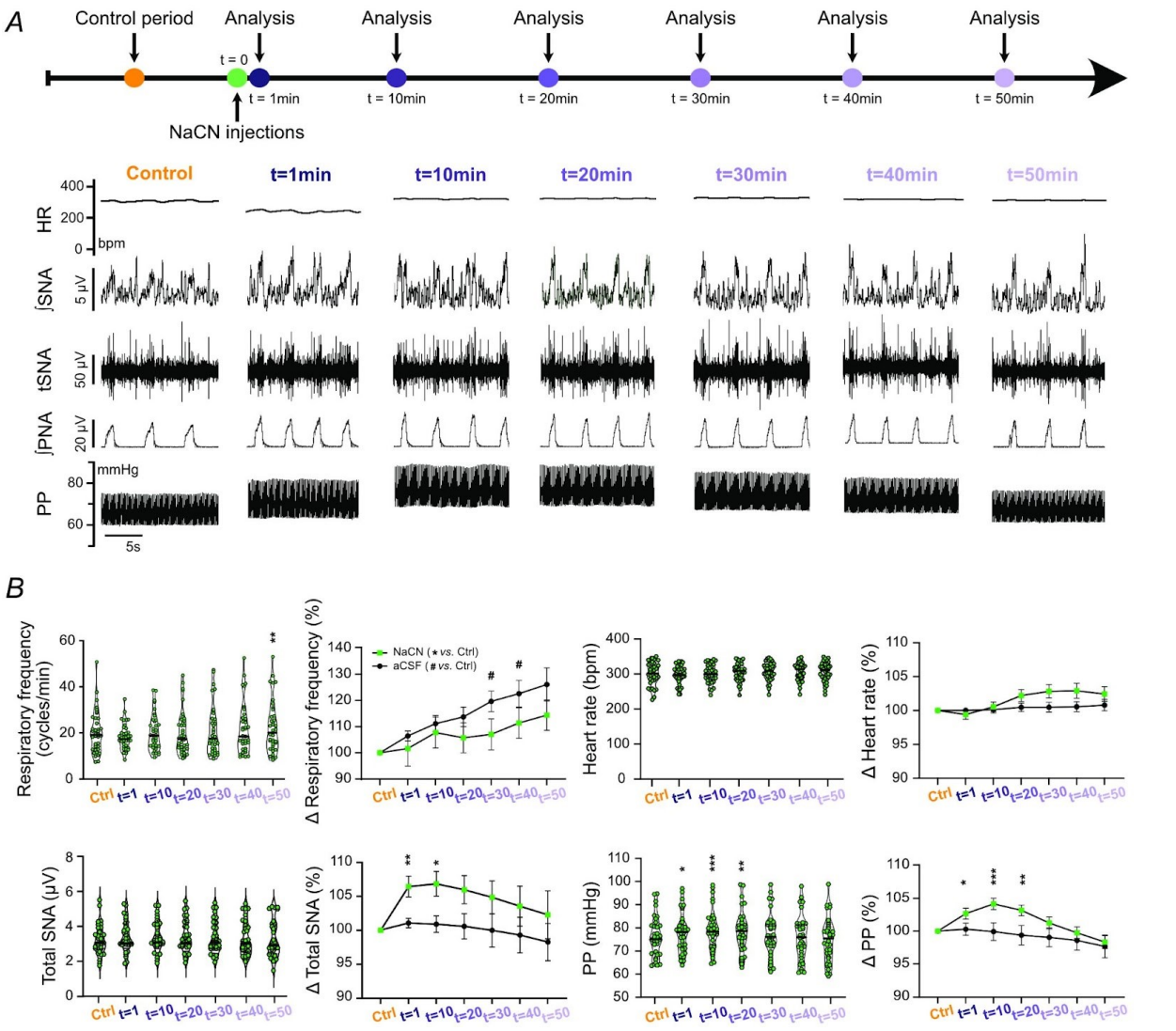


Figure 43. Acute intermittent CB stimulations induce no effect on respiratory frequency and heart rate, but induce a sympathetic LTF and a prolonged increase in perfusion pressure.

A, Experimental timeline, with representative heart rate (HR), thoracic sympathetic nerve activity (SNA), phrenic nerve activity (PNA) and perfusion pressure (PP) recordings at the measurement periods analysed. *B*, Individual and group data showing the absolute (NaCN) and relative (Δ, NaCN *vs*. aCSF) changes in respiratory frequency (n = 38), HR (n = 36), PP (n = 36) and total SNA (absolute values: n = 33; relative changes (Δ): n = 34) following repeated NaCN or aCSF (vehicle, n =10) perfusate injections (absolute values: PP, HR: one-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post-hoc* test, Respiratory frequency, SNA: Friedman followed by Dunn's *post-hoc* test; relative changes (Δ): PP: two-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post-hoc* test, Respiratory frequency, HR, SNA: mixed-effect analyses followed by Sidak *post-hoc* test). * or #, $P < 0.05$; ** or ##, $P < 0.01$; *** or ###, $P < 0.001$.

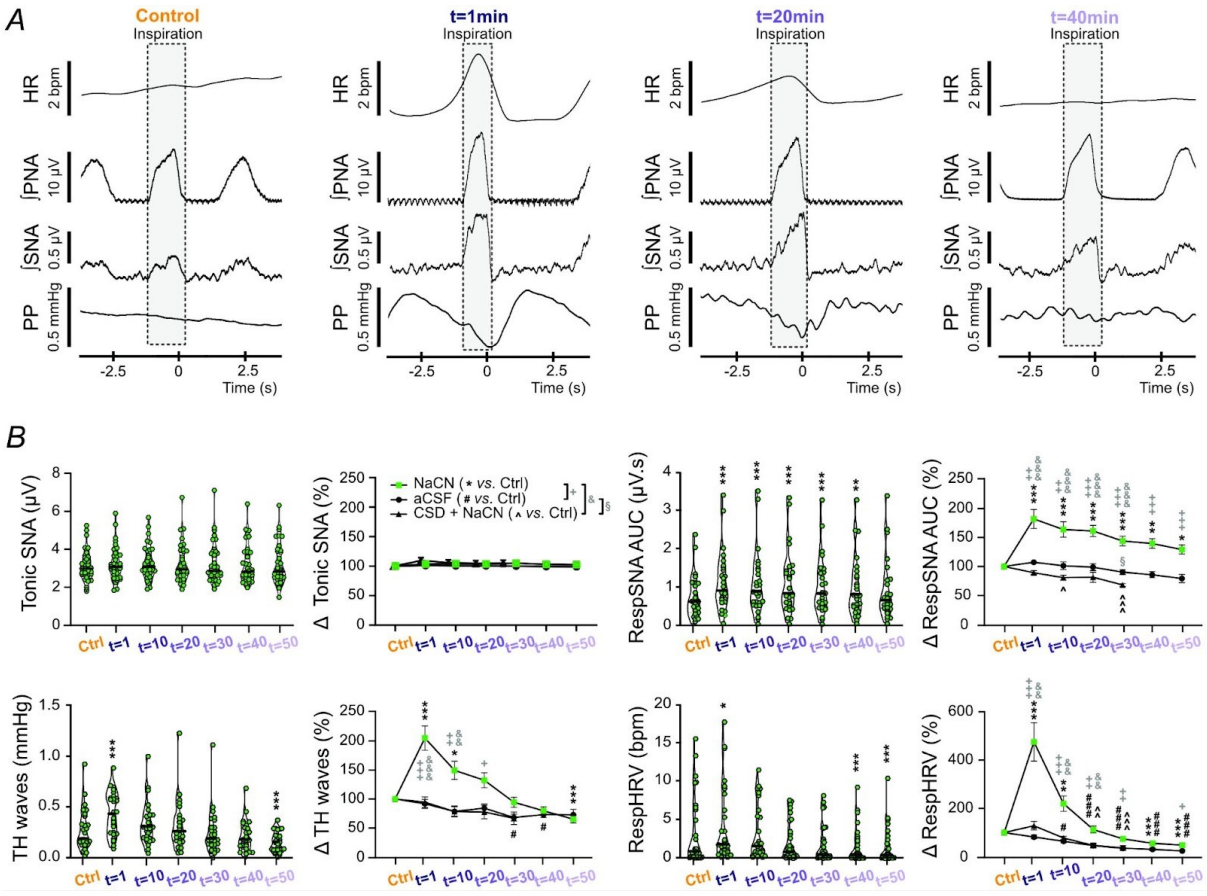


Figure 44. Acute intermittent CB stimulations do not change tonic sympathetic activity but induce a RespSNA LTF, as well as a prolonged increase in the amplitudes of TH waves and of the respiratory modulation of heart rate

A, Representative phrenic-triggered averages at four time points of heart rate (HR), phrenic nerve activity (PNA), thoracic sympathetic nerve activity (SNA) and perfusion pressure (PP). *B*, Individual and group data showing the absolute (NaCN) and relative (Δ, NaCN *vs*. aCSF *vs*. NaCN in carotid sinus denervated WHBPs (CSD + NaCN)) changes in tonic SNA (NaCN: n = 36; aCSF: n = 10; CSD + NaCN: n = 12), in the area under the curve of the respiratory modulation of SNA (RespSNA AUC, NaCN: n = 27; aCSF: n = 10; CSD + NaCN: n = 8), in Traube-Hering waves (TH waves, NaCN: n = 28; aCSF: n = 7; CSD + NaCN: n = 8) and in respiratory heart rate variability (RespHRV, NaCN: absolute values: n = 31; relative changes (Δ): n = 32; aCSF: n = 10; CSD + NaCN: n = 11) following repeated NaCN or aCSF perfusate injections (absolute values: Friedman followed by Dunn's *post-hoc* test; relative changes (Δ): mixed-effect analyses followed by Sidak *post-hoc* test). *, #, ^, +, & or §, $P < 0.05$; **, ##, ^^, ++, && or §§, $P < 0.01$; ***, ###, ^^^, +++, &&& or §§§, $P < 0.001$.

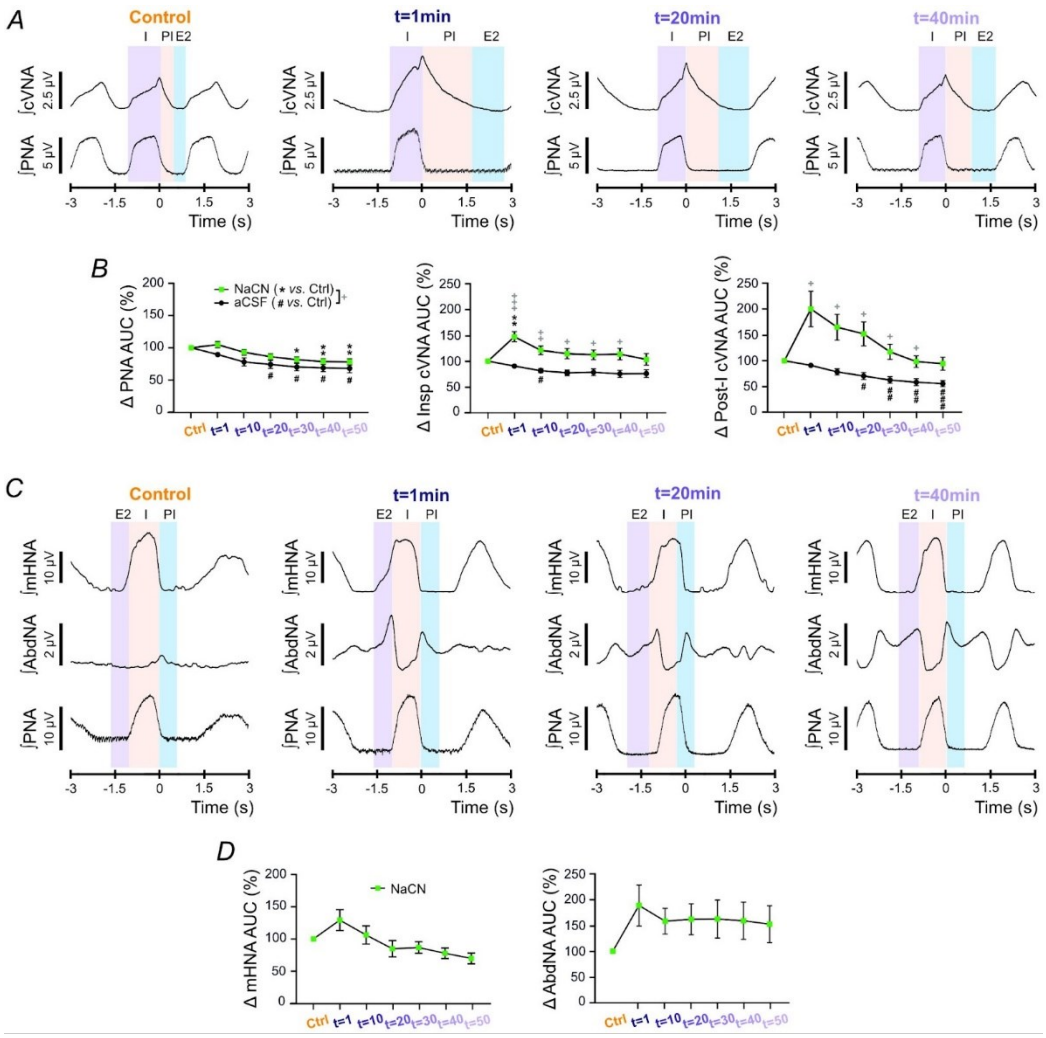


Figure 45. Acute intermittent CB stimulations induce upper airway and abdominal nerve activities' LTF

A, Representative phrenic-triggered averages at four time points of cervical vagus nerve activity (cVNA) and phrenic nerve activity (PNA). *B*, Group data showing the relative changes (Δ) in the area under the curve of phrenic nerve inspiratory bursts (PNA AUC, n = 19), in the area under the curve of the inspiratory component of cervical vagus nerve activity (Insp cVNA AUC, n = 20), and in the area under the curve of the post-inspiratory component of cervical vagus nerve activity (Post-I cVNA AUC, n = 20) following repeated NaCN or aCSF (n = 10) perfusate injections (mixed-effect analyses followed by Sidak *post-hoc* test). *C*, Representative phrenic-triggered averages at four time points of the activity of the medial branch of the hypoglossal nerve (mHNA), of abdominal nerve activity (AbdNA) and of phrenic nerve activity (PNA). *D*, Group data showing the relative changes (Δ) in the area under the curve of the inspiratory / pre-inspiratory activity of the medial branch of the hypoglossal nerve (mHNA AUC, n = 10; Friedman followed by Dunn's *post-hoc* test) and in the area under the curve of the expiratory abdominal nerve activity (AbdNA AUC, n = 6; one-way ANOVA followed by Holm-Sidak *post-hoc* test) following repeated NaCN perfusate injections. *, # or +, $P < 0.05$; **, ## or ++, $P < 0.01$; ***, ### or +++, $P < 0.001$.

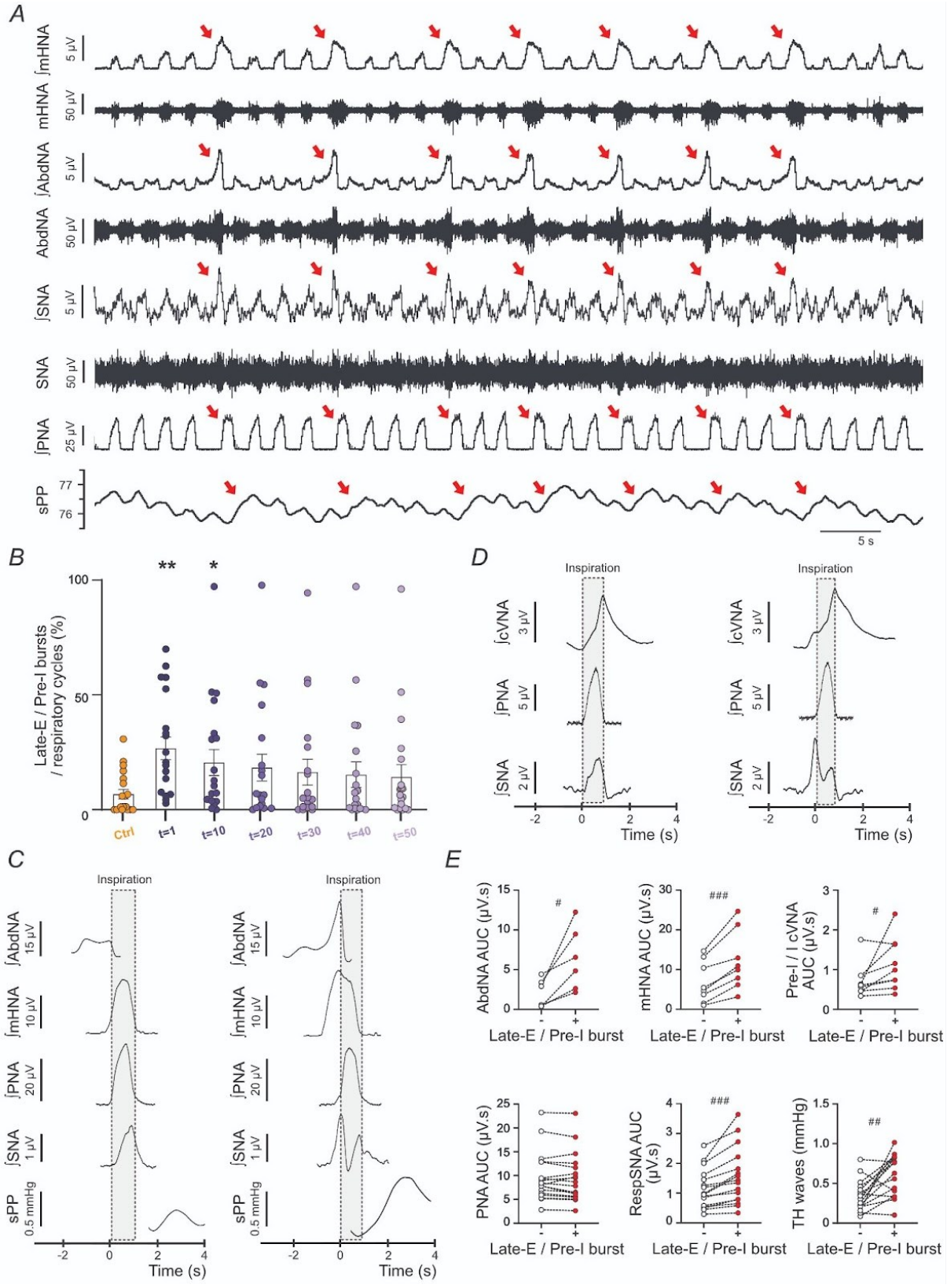

A
∫mHNA
5 µV
mHNA
50 µV
∫AbdNA
5 µV
AbdNA
50 µV
∫SNA
5 µV
SNA
50 µV
∫PNA
25 µV
sPP
77
76
5 s
B
Late-E / Pre-I bursts / respiratory cycles (%)
100
50
0
**
*
Ctrl
t=1
t=10
t=20
t=30
t=40
t=50
C
Inspiration
∫AbdNA
15 µV
∫mHNA
10 µV
∫PNA
20 µV
∫SNA
1 µV
sPP
0.5 mmHg
-2
0
2
4
Time (s)
D
Inspiration
∫cVNA
3 µV
∫PNA
5 µV
∫SNA
2 µV
Time (s)
E
AbdNA AUC (µV.s)
mHNA AUC (µV.s)
Pre-I / I cVNA AUC (µV.s)
PNA AUC (µV.s)
RespSNA AUC (µV.s)
TH waves (mmHg)
Late-E / Pre-I burst
#
###
##

Figure 46. Acute intermittent CB stimulations induce an increased occurrence of late-expiratory / pre-inspiratory bursts on respiratory nerves targeting the upper airway and abdominal muscles, increasing RespSNA and TH waves compared to cycles without late-expiratory / pre-inspiratory bursts.

A, Representative traces showing late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities (red arrows) on the medial branch of the hypoglossal nerve (mHNA), on abdominal nerve activity (AbdNA) and on thoracic sympathetic nerve activity (SNA), the latter leading to increased Traube-Hering (TH) waves on systolic perfusion pressure (sPP), 40 min after acute intermittent CB stimulations with NaCN. In respiratory cycles where late-expiratory/pre-inspiratory peaks of activities are present (red arrows), the pattern of the inspiratory bursts of phrenic nerve activity (PNA) present a more abrupt initial increase, resulting in an overall square-shaped bursting pattern, compared to the classical progressive "ramp-like" pattern in respiratory cycles without late-expiratory/pre-inspiratory peaks of activities. *B*, Individual and group data showing the relative proportion of respiratory cycles presenting late-expiratory (Late-E) / pre-inspiratory (Pre-I) peaks of activities at each measurement period analysed (n = 18, Friedman followed by Dunn's *post-hoc* test). *C*, Representative phrenic-triggered averages of AbdNA, mHNA, PNA, SNA and sPP for respiratory cycles without (left) or with (right) late-expiratory/pre-inspiratory peaks of activities. *D*, Representative phrenic-triggered averages of cervical vagus nerve activity (cVNA), PNA and SNA for respiratory cycles without (left) or with (right) late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities. *E*, Within-individual comparison of the area under the curve of the late-expiratory AbdNA (AbdNA AUC, n = 6), of the area under the curve of the pre-inspiratory/inspiratory activity of mHNA (mHNA AUC, n = 8), of the area under the curve of the pre-inspiratory/inspiratory component of cVNA (pre-I/Insp cVNA AUC, n = 9), of the area under the curve of PNA inspiratory bursts (PNA AUC, n = 18), of the area under the curve of the respiratory modulation of SNA (RespSNA AUC, n = 16) and of the amplitude of TH waves (TH waves, n=16) (TH waves, RespSNA, mHNA, AbdNA: Paired t test; PNA, pre-I/Insp cVNA: Wilcoxon test). * or #, $P < 0.05$; ** or ##, $P < 0.01$; *** or ###, $P < 0.001$.

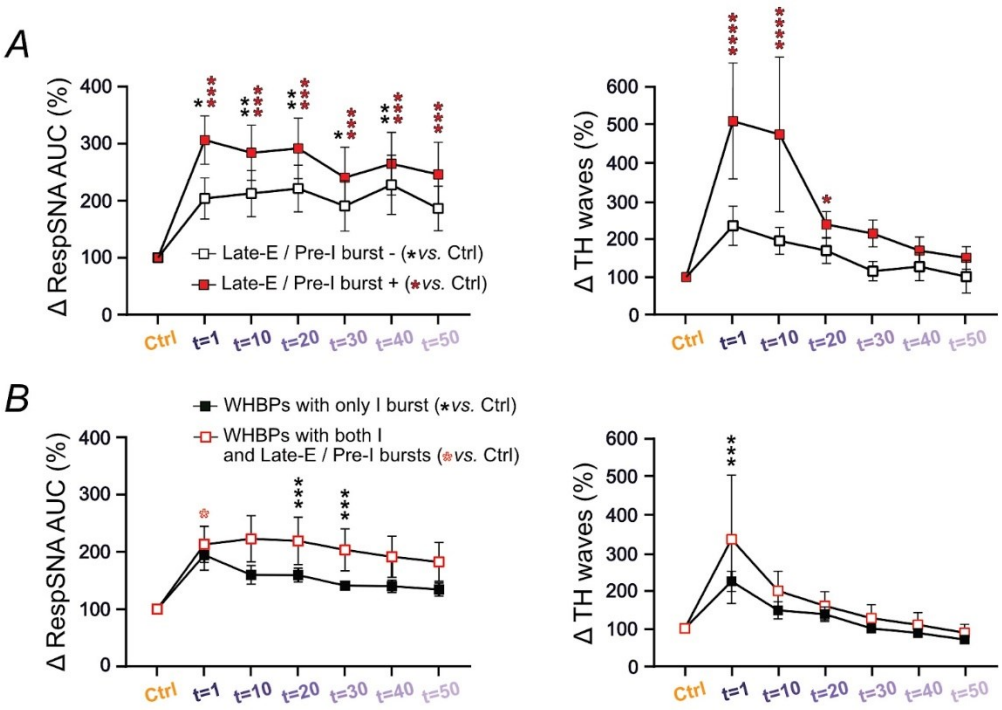


Figure 47. Acute intermittent CB stimulations increase RespSNA and TH waves in respiratory cycles both with and without late-expiratory / pre-inspiratory activity.

A, Group data showing the relative changes (Δ) in RespSNA AUC and TH waves following repeated NaCN perfusate injections within WHBPs that presented an occurrence of respiratory cycles with additional late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities, comparing data from the respiratory cycles that did not present late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities ("Late-E / Pre-I burst - ", RespSNA: n = 17 , TH waves: n = 16) with data from the respiratory cycles that presented late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities ("Late-E / Pre-I burst +", RespSNA: n = 18, TH waves: n = 18) (mixed-effect analyses followed by Sidak *post-hoc* test). *B*, Group data showing the relative changes (Δ) in RespSNA AUC and TH waves following repeated NaCN perfusate injections from WHBPs with respiratory cycles that never presented late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities and therefore presented RespSNA only with inspiratory / post-inspiratory bursting ("WHBPs with only I burst", RespSNA: n=12, TH waves: n = 19), compared to WHBPs that presented an occurrence of respiratory cycles with late-expiratory / pre-inspiratory peaks of activities and therefore presented RespSNA with both inspiratory / post-inspiratory and late-expiratory / pre-inspiratory bursting ("WHBPs with both I and Late-E / Pre-I bursts", RespSNA, TH waves: n = 18) (mixed-effect analyses followed by Sidak *post-hoc* test). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Partie 3

L'ocytocine amplifie la variabilité respiratoire du rythme cardiaque *via* les neurones glycinergiques du Complexe de pré-Bötzinger

Résumé

La variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC) est un phénomène clé du couplage respiratoire-cardiovasculaire, caractérisé par des oscillations du rythme cardiaque en phase avec la respiration. Ce phénomène, qui repose essentiellement sur le couplage fonctionnel entre des neurones respiratoires et des neurones parasympathiques cardiaques, est amplifié chez les athlètes et lors d'interactions sociales positives, mais est réduit en cas d'hypertension, d'insuffisance cardiaque chronique et de stress psychologique. Des études montrent qu'une administration intranasale d'ocytocine, un neuropeptide impliqué dans les comportements sociaux et la relaxation, amplifie la RespVRC chez l'humain, mais les mécanismes restent inconnus. Des travaux récents, auxquels j'ai contribué, ont identifié une voie neuronale reliant l'hypothalamus au tronc cérébral, par laquelle l'ocytocine amplifie la RespVRC. Mes expérimentations ont contribué à montrer fonctionnellement, par l'injection d'un agoniste ocytocinergique dans le Complexe de pré-Bötzinger chez le rat anesthésié, que l'ocytocine amplifie la RespVRC par une action centrale sur le Complexe de pré-Bötzinger. Au niveau anatomique, en utilisant l'hybridation *in situ* fluorescente, nous montrons que les neurones qui expriment le récepteur à l'ocytocine constituent un sous-groupe des neurones glycinergiques du Complexe de pré-Bötzinger. Ce travail a permis la compréhension des mécanismes centraux qui sous-tendent l'amplification de la RespVRC par l'ocytocine et ouvre ainsi la porte à de futures études visant à moduler sélectivement l'amplitude de la RespVRC dans un contexte potentiellement thérapeutique.

Introduction

La fonction cardiaque est essentielle à la survie des organismes et est très finement régulée par plusieurs paramètres hémodynamiques, humoraux et neuraux pour l'adapter aux variations de la demande métabolique, rendant le rythme cardiaque très variable. Le cœur est innervé par le système nerveux autonome dont l'équilibre entre l'influence du système parasympathique et du système sympathique permet les variations rapides du rythme cardiaque pour maintenir l'homéostasie des gaz sanguins (Giannino, 2024 ; Zandstra, 2021 ; Elstad, 2018). Une source prédominante de variabilité du rythme cardiaque provient du couplage entre la fonction cardiovasculaire et la fonction respiratoire, qui entraîne l'augmentation de la fréquence cardiaque pendant l'inspiration et sa diminution pendant l'expiration, ce que l'on appelle variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC) (Elstad, 2018 ; Fisher, 2022). La fonction supposée de la RespVRC serait qu'elle optimise l'efficacité cardiaque en augmentant/concentrant le travail cardiaque lors de l'inspiration, lorsque le myocarde est oxygéné. Cela permettrait de réduire le coût énergétique cardiaque tout en maintenant les concentrations sanguines en dioxyde de carbone à un niveau compatible avec la vie (Ben-Tal, 2012).

La RespVRC est un phénomène physiologique très étudié qui a été observé pour la première fois il y a deux cents ans et qui est relativement bien caractérisé malgré la méconnaissance de ses mécanismes. L'amplitude de la RespVRC varie en fonction du contexte psychologique et physiopathologique. Elle est augmentée chez les jeunes et les athlètes (De Meersman, 1992 ; 1993) et est très fortement réduite en cas d'hypertension et d'insuffisance cardiaque chronique (Porter, 1990 ; La Rovere, 1998 ; Haigney, 2014 ; Narkiewicz 1998), deux pathologies cardiovasculaires qui représentent la première cause de mortalité dans le monde (NCD Risk Factor Collaboration, 2021 ; McDonagh, 2021). Fait intéressant, la restauration de la RespVRC chez des modèles animaux d'insuffisance cardiaque chronique grâce à un pacemaker cardiaque régulé par la respiration améliore grandement la fonction cardiaque, et ce de façon persistante (O'Callaghan, 2020 ; Shanks, 2022). Par ailleurs, la RespVRC varie également avec l'état émotionnel. Elle est réduite en cas de stress psychologique et est amplifiée pendant la relaxation ou lors de situations émotionnelles positives, comme lors d'interactions parent-enfant (Feldman, 2010 ; Balzarotti, 2017 ; Giuliano, 2015 ; Van Puyvelde, 2015).

L'ocytocine, neuropeptide aux multiples rôles physiologiques et psychologiques, est grandement étudiée pour ses effets relaxants et pro-sociaux. Or, il a été observé que l'administration intranasale d'ocytocine chez des sujets amplifie la RespVRC (Kemp, 2012 ; Cosme, 2023 ; Norman, 2011 ; Jain, 2017). Toutefois, les mécanismes impliqués n'ont pas été investigués.

La RespVRC est principalement générée par la modulation respiratoire de l'activité de neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques, induisant des variations de l'activité parasympathique cardiaque en phase avec le cycle respiratoire (Gilbey, 1984 ; Farmer, 2016 ; 2024 ; Ottaviani, 2020). Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques sont présents dans deux noyaux du tronc cérébral : le noyau Ambigu (nA) et le noyau moteur dorsal du Vague. Les axones de ces neurones transitent par le nerf Vague et innervent les ganglions cardiaques, où sont présents les neurones post-ganglionnaires parasympathiques (Takanaga, 2003 ; Nosaka,1982 ; Mendelowitz & Kunze, 1991). Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du noyau moteur dorsal du vague ont une activité tonique non modulée par la respiration, qui serait impliquée dans la régulation de la fréquence cardiaque moyenne (Nosaka, 1982 ; Korsak, 2023). A l'inverse, les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA sont modulés par la respiration. Ils sont inhibés pendant l'inspiration et stimulés pendant l'expiration, ce qui induit la variation respiratoire de l'activité parasympathique cardiaque et génère la RespVRC (McAllen & Spyer, 1978a ; Mendelowitz, 1996 ; Gilbey, 1984 ; Frank, 2009 ; Neff, 2003). Les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA reçoivent des courants inhibiteurs inspiratoires (Frank, 2009 ; Neff, 2003), qui proviennent très certainement de neurones du Complexe de pré-Bötzinger (préBötC), le groupe respiratoire qui génère le rythme inspiratoire et qui est apposé ventralement au nA (Menuet, 2020).

Les neurones ocytocinergiques de l'hypothalamus projettent dans le tronc cérébral, et ces fibres sont particulièrement denses dans la région du préBötC/nA (Son, 2022 ; Li, 2024). De plus, des études pharmacologiques montrent que l'ocytocine module l'activité respiratoire et cardiovasculaire, un effet qui pourrait passer par la modulation ocytocinergique de l'activité des neurones du préBötC et/ou du nA (Yeh, 1997 ; Mack, 2002 ; Mack, 2007).

L'objectif de ce travail a été de tester, par un ensemble d'approches expérimentales, l'hypothèse selon laquelle l'ocytocine pourrait amplifier la RespVRC par une action centrale *via* les neurones du préBötC et/ou du nA, et à préciser le circuit ainsi que les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Ma contribution à ce travail a consisté en deux séries expérimentales. Tout d'abord, en

injectant un agoniste ocytocinergique dans la région du préBötC/nA chez le rat anesthésié, j'ai contribué à montrer fonctionnellement que l'ocytocine amplifie la RespVRC par une action sur cette région. Puis, en utilisant l'hybridation *in situ* fluorescente, j'ai démontré anatomiquement que les récepteurs à l'ocytocine présents dans la région du préBötC/nA sont principalement exprimés par un sous-groupe des neurones inhibiteurs glycinergiques du préBötC.

L'ensemble des travaux de cette étude, présentés en partie 2 de l'Annexe, a permis de disséquer un réseau neuronal impliqué dans l'amplification centrale de la RespVRC par l'ocytocine, et d'identifier une situation comportementale dans laquelle ce réseau est mis en jeu.

Matériels et méthodes

Le principe général des différentes techniques utilisées ainsi que les références et compositions des produits sont détaillés dans le chapitre matériels et méthodes principal.

➢ ENREGISTREMENTS *IN VIVO* ANESTHESIES

Dans l'étude présentée en partie 2 de l'annexe, afin de déterminer si l'ocytocine amplifie la RespVRC par une action dans la région du préBötC/nA, un agoniste spécifique des récepteurs ocytocinergiques (le [Thr4,Gly7]OT, appelé TGOT) avait été injecté dans la région du préBötC/nA de préparations *in situ* cœur-tronc cérébral isolés-perfusés de rats. Comme toutes les autres expérimentations de cette étude avaient été réalisées chez la souris (*in vitro* et *in vivo*), il était important de confirmer ces résultats sur un modèle de rat *in vivo*, pour ainsi permettre une meilleure transposition des résultats inter-espèces. Nous avons alors utilisé le même protocole expérimental d'injection du TGOT dans la région du préBötC/nA tout en enregistrant l'activité cardiaque et respiratoire pour en mesurer les effets sur la RespVRC.

Pour cela, nous avons utilisé des rats Wistar sauvages juvéniles (mâles et femelles, âgés entre 25 et 30 jours comme ce qui avait été fait pour la préparation *in situ*). Les animaux ont été préparés comme détaillé dans la partie enregistrements *in vivo* anesthésiés du chapitre matériels et méthodes

principal. De manière à accéder au tronc cérébral, une incision médiane des plans cutanés et musculaires a été pratiquée au niveau occipital. Une fenêtre crânienne a été ouverte à l'aide d'un foret dentaire au niveau caudal de l'os occipital. La membrane atlanto-occipitale et la dure mère ont été disséquées pour exposer la surface du tronc cérébral. Une micropipette en verre (diamètre à l'extrémité ≈ 35 µm) a été remplie de la solution à injecter et connectée par un fil d'argent à un amplificateur électrophysiologique pour permettre l'enregistrement de l'activité neuronale. Le bras tenant la pipette a été incliné de 20° dans l'axe rostro-caudal, pointe de la pipette vers l'avant de l'animal. La cartographie fonctionnelle du préBötC par enregistrements extracellulaires (cf. Cartographie fonctionnelle du préBötC par enregistrements extracellulaires) a été effectuée pour déterminer les coordonnées du cœur du préBötC et de ses limites. Le cœur du préBötC était généralement identifié 1.8 ± 0.1 mm latéralement, 0.7 ± 2 mm rostralement et 1.7 ± 0.3 mm ventralement au *calamus scriptorius*.

Le TGOT (0.5 µM, 50nl) a été dilué dans de l'aCSF (dont la composition est décrite dans la partie préparation *in situ* du chapitre matériels et méthodes principal) puis a été injecté bilatéralement dans le préBötC à l'aide d'une seringue et d'une monoculaire graduée pour contrôler le volume injecté (Manning, 2012). Pour les expériences contrôles, la même solution d'aCSF mais sans le TGOT a été injectée (50nl). Des microsphères fluorescentes ont été ajoutées dans toutes les solutions injectées, permettant une vérification *a posteriori* des sites d'injection.

L'activité respiratoire était mesurée par un EMG des muscles intercostaux externes (inspiratoires) et l'activité cardiaque était mesurée par ECG. Le rythme cardiaque instantané était reconstruit dans Spike2 à partir de la détection de l'onde P sur l'ECG.

➢ HYBRIDATION *IN SITU* FLUORESCENTE – RNASCOPE

Pour ce projet, nous avons étudié le phénotype des neurones exprimant le récepteur à l'ocytocine. Les anticorps dirigés contre les récepteurs à l'ocytocine ne fonctionnent pas ou peu, nous avons alors utilisé l'hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope).

Ces expérimentations ont été réalisées chez des souris C57Bl6J sauvages (âgées de 2 mois). L'hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) a été réalisée comme détaillé dans la partie hybridation *in situ* fluorescente du chapitre matériels et méthodes principal.

Pour déterminer si les neurones exprimant le récepteur à l'ocytocine étaient glutamatergiques ou glycinergiques, trois sondes ont été utilisées. Ces sondes ciblaient les ARNm codant pour : le récepteur à l'ocytocine (Mm-Oxtr-C1), un transporteur glycinergique (Mm-Slc6a5-C3) (marqueur du phénotype glycinergique), et un transporteur glutamatergique (Mm-Slc17a6-C4) (marqueur du phénotype glutamatergique). La révélation des sondes a été faite à l'aide des fluorophores Opal 690, Opal 520 et Opal 570, respectivement.

➢ HISTOLOGIE ET IMAGERIE

A la fin des expérimentations fonctionnelles *in vivo*, les cerveaux de la moitié des rats ont été prélevés puis directement fixés par immersion dans de l'Antigenfix pendant 5 jours à 4°C. L'autre moitié des rats a été perfusée par voie transcardiaque afin de réaliser des co-marquages immunohistochimiques sur les sections des bulbes rachidiens. Avant le début de la perfusion transcardiaque, les rats recevaient une injection intrapéritonéale d'un mélange de Zoletil et de Domitor et la profondeur du plan anesthésique était vérifiée par la perte du réflexe occulo-palpébral et du retrait de la patte. Puis les rats étaient fixés sur le dos et une laparotomie subdiaphragmatique était réalisée. Les cotes et le diaphragme étaient découpés, et le sternum était clampé au-dessus de la tête du rat afin d'exposer la cavité thoracique. Le péricarde était enlevé et une aiguille (26G) reliée à la tubulure d'une pompe péristaltique était insérée dans le ventricule gauche. Une entaille de l'oreillette droite était réalisée pour que les liquides puissent s'écouler. 20ml/10g de rat de PBS étaient perfusés, suivis de 15 ml/10g d'Antigenfix. Tous les troncs cérébraux ont été inclus dans de l'Agar et coupés dans le plan coronal à 50 µm au vibratome.

Des immunohistochimies ont été réalisées sur les coupes des animaux perfusés. Pour cela, les coupes ont été bloquées et perméabilisées dans du PBS (1X) contenant 5 % de sérum d'âne, 2 % de BSA et 0,3 % de Triton X-100 pendant 1h à température ambiante. Les sections ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires pendant 72 heures à 4°C, rincées, puis laissées 2h avec des anticorps secondaires à température ambiante. Les coupes ont été montées sur des lames de

microscope avec du milieu de montage Vectashield avec ou sans DAPI. Les anticorps primaires utilisés incluaient l'anticorps chèvre anti-Choline Acétyl-Transférase (ChAT) pour localiser le nA et l'anticorps lapin anti NK1R, dont le marquage est dense dans le préBötC. Les anticorps secondaires étaient espèces spécifiques et conjugués à des fluorophores Alexa Fluor 647 et 488. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés dans les tableaux 3 et 4 du chapitre matériels et méthodes principal.

Les marquages immunohistochimiques et les billes fluorescentes ont ensuite été examinés au microscope à épi-fluorescence apotome Zeiss avec une caméra axioCam MRm et avec des objectifs ×10 et ×20. Les images ont été capturées à l'aide du logiciel d'imagerie ZEN 2.6 (blue edition). Les marquages issus de l'hybridation *in situ* fluorescente ont été examinés au microscope confocal Zeiss LSM-800 avec des objectifs x10, x20 et x40.

❖ VERIFICATION DES SITES D'INJECTIONS

Chaque site d'injection a été vérifié *a posteriori* grâce à la localisation des microbilles fluorescentes (excitation 580 nm, émission 605 nm, 0.5 % dans de l'aCSF). Chaque coupe a été imagée comme décrit ci-dessus et reportée grâce au logiciel Affinity Designer sur la coupe correspondante d'un Atlas stéréotaxique (Paxinos & Watson, 2013). La localisation des sites d'injections a été validée pour tous les rats sur la base de l'anatomie de la coupe (ouverture du 4è ventricule, forme générale de la coupe et des pyramides) et de la position des marqueurs (microbilles fluorescentes et marquages immunohistochimiques).

➢ ENREGISTREMENTS ET ANALYSE DU SIGNAL

❖ ANALYSE DES PARAMETRES RESPIRATOIRES ET CARDIOVASCULAIRES

L'analyse des paramètres respiratoires et cardiovasculaires moyens ainsi que des activités nerveuses par moyennages déclenchés par la respiration a été réalisée comme décrite dans la partie Analyse du signal du chapitre matériels et méthodes principal. La RespVRC et l'amplitude inspiratoire ont été analysées par des moyennages du rythme cardiaque et de l'activité intercostale

externe déclenchés par la respiration. La fréquence respiratoire et le rythme cardiaque moyen ont été obtenus en mesurant le nombre d'évènements moyens pendant les périodes analysées. Chaque paramètre (RespVRC, fréquence cardiaque moyenne, fréquence respiratoire et amplitude inspiratoire) a été analysé pendant une période contrôle et pendant plusieurs périodes après les injections de TGOT. La période contrôle était de 120 secondes avant les injections de TGOT. La période d'analyse de 0 à 120 secondes après les injections de TGOT a été divisée en quatre blocs de 30 secondes de manière à évaluer la cinétique de l'effet du TGOT sur les paramètres quantifiés. Une fenêtre temporelle supplémentaire a été analysée 5 minutes après la seconde injection de TGOT, de manière à évaluer la persistance des effets à plus long terme ou un retour à l'état basal. Les effets du TGOT étaient maximaux sur la période de 30 à 90 secondes après la fin de l'injection bilatérale et sont les résultats présentés ici. Aucune différence n'a été observée entre les mâles et femelles et les résultats obtenus ont donc été regroupés pour ces analyses.

❖ COMPTAGE CELLULAIRE

Un comptage cellulaire a été effectué pour les expérimentations d'hybridation *in situ* fluorescente afin de caractériser le phénotype neurochimique des neurones du préBötC et/ou du nA qui expriment le récepteur à l'ocytocine. Le comptage a été réalisé sur des coupes coronales de bulbe rachidien de 30 µm en série 1 sur 4, préalablement sélectionnées pour contenir le préBötC sur la base de critères anatomiques (forme de la coupe et ouverture du 4è ventricule). Les images à partir desquelles étaient effectués les comptages étaient générées en empilant 3 à 5 acquisitions espacées de 0.5 µm dans le plan Z et en utilisant la fonction « projection d'intensité maximale » du logiciel Image J (NIH, USA). La région du préBötC/nA où était effectuée le comptage était délimitée sur la base de critères anatomiques (forme de la coupe, ouverture du 4è ventricule et anatomie des pyramides). La proportion respective de chaque phénotype cellulaire exprimant les récepteurs à l'ocytocine dans la région du préBötC/nA a été quantifiée à partir de la totalité des cellules positives aux récepteurs à l'ocytocine. Les cellules étaient identifiables par des clusters de points distincts les uns des autres (un point = un ARNm). Le nombre total de cellule a été obtenu en multipliant par 4 le nombre de cellules comptées puisque les coupes étaient sélectionnées en série 1 sur 4.

❖ ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été faite sur les valeurs brutes, ainsi que sur les variations individuelles de chacun des animaux pour chacun des paramètres. La distribution normale des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et l'égalité de la variance des données a été testée. Les données brutes ayant une distribution normale et une variance égale ont été analysées par un test t de student, et par un test de Wilcoxon sur les rangs lorsque les données étaient non paramétriques. Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v. 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA). Les différences ont été considérées significatives pour des valeurs de $p<0.05$. Les statistiques dans le texte sont présentées sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard par rapport à la moyenne (sem) et les statistiques détaillées sont présentées dans la description des figures. Les données groupées sont représentées en tant que moyenne ± sem par des histogrammes ou avec des diagrammes en violons tronqués avec la médiane et les quartiles.

Résultats

L'injection d'un agoniste ocytocinergique dans la région préBötC/nA amplifie l'amplitude de la RespVRC chez le rat anesthésié.

L'amplification de la RespVRC par l'ocytocine pourrait passer par un mécanisme central, *via* des neurones présents dans la région du préBötC/nA qui sont impliqués dans la genèse de ce phénomène. De manière à tester cette hypothèse, nous avons utilisé une approche expérimentale pharmacologique basée sur l'injection d'un agoniste ocytocinergique (le TGOT) dans la région du préBötC/nA. Les résultats obtenus précédemment dans cette étude ont montré que l'injection de TGOT dans la région du préBötC/nA amplifie la RespVRC sur la préparation *in situ* de rat (cf. partie 2 de l'annexe). Afin de confirmer ces résultats sur un modèle plus intégré, et pour permettre une meilleure transposition des résultats entre les différents modèles expérimentaux utilisés dans cette étude, nous avons réalisé le même protocole expérimental d'injections bilatérales de TGOT (ou de solution contrôle) électrophysiologiquement guidées dans la région du préBötC/nA *in vivo*, chez des

rats juvéniles anesthésiés (P25-P30), dont les activités respiratoires et cardiaques étaient enregistrées par EMG et ECG.

Les solutions injectées contenaient des microbilles fluorescentes nous permettant de vérifier *a posteriori* la spécificité de la localisation de nos injections après chaque expérimentation (Fig. 48). Une analyse histologique *post-hoc* par immunohistochimie des sections du bulbe rachidien des rats injectés nous a permis de localiser le centre de chaque injection grâce aux microbilles fluorescentes et aux différents marqueurs (Fig. 48).

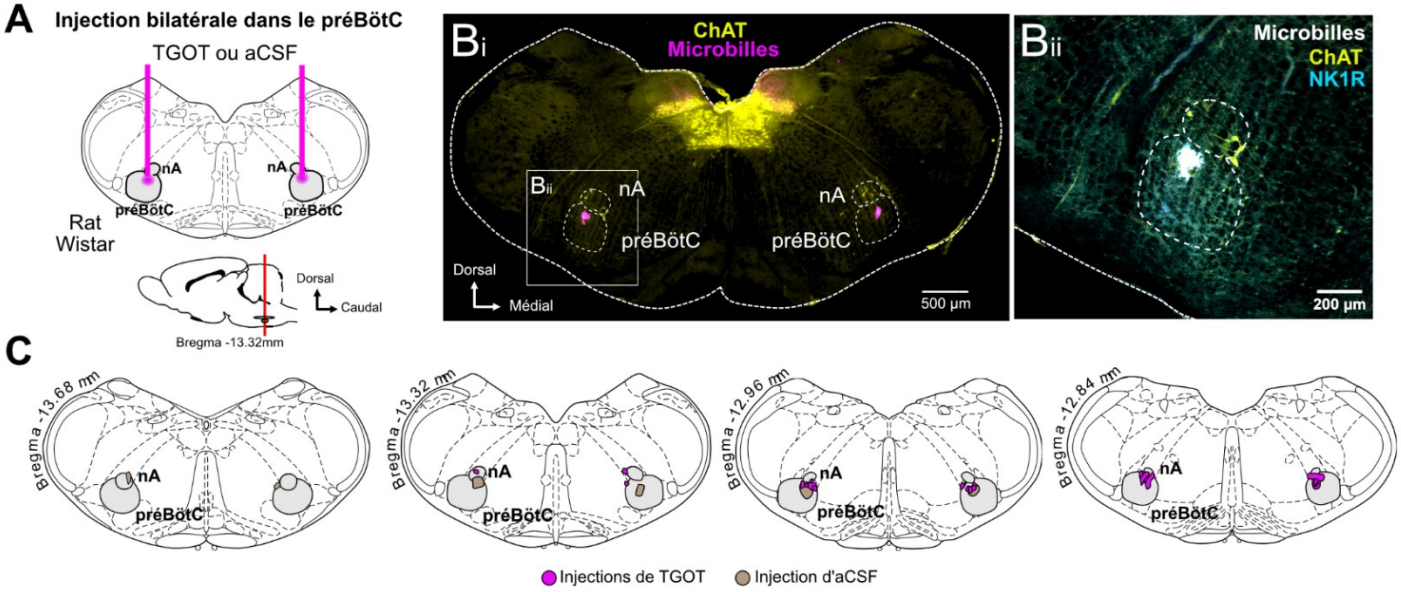


Figure 48. Caractérisation histologique *a posteriori* des sites d'injections dans la région du préBötC/nA. (**A**) Représentation schématique des injections de TGOT (50 nl à 0.5 µM) ou de solution véhicule (aCSF, 50 nl) dans la région du préBötC/nA de rats Wistar anesthésiés sur une coupe coronale de bulbe rachidien (Paxinos & Watson, 2013). (**Bi**) Coupe coronale de bulbe rachidien (-13.32mm au bregma) d'un rat injecté bilatéralement dans la région du préBötC/nA avec du TGOT, agrandie en (**Bii**). Les microbilles fluorescentes (magenta en **Bi** et blanches en **Bii**) ont permis la confirmation histologique que les injections étaient bien réalisées dans la région du préBötC/nA et ont permis la reconstruction de la représentation en (**C**) à partir de tous les rats. Les neurones du nA ont été identifiés par la choline acétyltransférase (ChAT, en jaune) et la région du préBötC présente un dense marquage aux récepteurs à la substance P (NK1R, en cyan, **Bii**). (**Bi**) Images acquises avec un objectif x10 ou (**Bii**) x20 dans un plan optique unique (x10 : 15 µm, x20 : 1.5 µm). (**C**) Représentation des sites d'injections du TGOT (magenta) et de l'aCSF (beige) sur des coupes coronales de bulbe rachidien (Paxinos & Watson, 2013), reconstruite après analyse histologique à partir des marqueurs fluorescents (exemple en (**B**)) et de l'anatomie des coupes des rats injectés. Les sites d'injections sont concentrés dans la région du préBötC/nA (n=15 TGOT, n=10 aCSF). Les rats pour qui ce n'était pas le cas ont été retirés de l'étude. nA : Noyau Ambigu ; préBötC : complexe de pré-Bötzinger ; aCSF : liquide céphalo rachidien artificiel ; TGOT : agoniste ocytocinergique.

Les sites d'injections étaient concentrés ventralement au nA (Fig. 48Bi,ii), sur des coupes coronales de bulbe rachidien comprises entre -13.32 et -12.84 mm au bregma (Fig. 48C), et dans une région fortement marquée pour les récepteurs à la substance P (NK1R) (Fig. 48Bii). Pris ensemble, ces éléments sont caractéristiques de la région du préBötC, et confirment la spécificité de la localisation de nos injections.

Nous avons ensuite quantifié les effets des injections bilatérales de TGOT dans la région du préBötC/nA sur la fonction cardiaque et respiratoire des rats anesthésiés (Fig. 49).

La quantification de la RespVRC sur les moyennages du rythme cardiaque déclenchés par la respiration a montré que les injections bilatérales de TGOT augmentaient l'amplitude de la RespVRC de moitié (+52.7% ± 15.8). La RespVRC était amplifiée dès la première injection (dans 1/2 préBötC, non montré) suggérant un effet additif des injections. Les injections de solution contrôle (aCSF) dans la région du préBötC/nA n'avaient, elles, aucun effet sur la RespVRC. La fréquence cardiaque moyenne était très légèrement diminuée après l'injection bilatérale de TGOT (-3,1 ± 1,3 bpm), ce qui était également le cas chez les rats injectés avec de l'aCSF.

Concernant les paramètres respiratoires, l'injection bilatérale de TGOT dans la région du préBötC/nA entrainait une augmentation de l'amplitude inspiratoire (+7,0 ± 4,1 %) et n'avait aucun effet sur la fréquence respiratoire. Les injections contrôles n'avaient aucun effet sur la fonction respiratoire. Cette légère augmentation de l'amplitude inspiratoire sans variation du rythme respiratoire suggère que les neurones modulés ne font pas partie des neurones rythmogènes du préBötC, et diffèrent des résultats précédemment obtenus lors d'injection d'ocytocine dans la même région (Mack, 2002). La quantification des différents paramètres respiratoires et cardiaques 5 minutes après la fin de la seconde injection a montré que la RespVRC et l'amplitude inspiratoire étaient revenues à leur valeur basale.

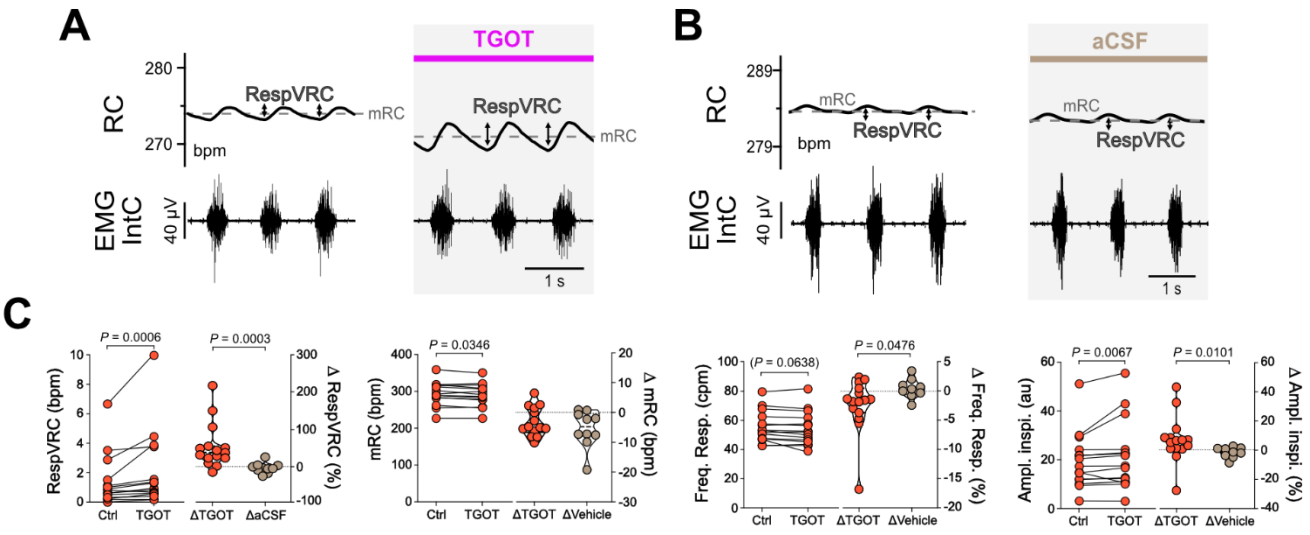


Figure 51. L'injection de TGOT dans le préBötC amplifie la RespVRC *in vivo* chez le rat juvénile anesthésié. (**A et B**) Enregistrements chez le rat anesthésié du rythme cardiaque instantané (reconstruit à partir de l'ECG, non montré) et de l'activité électromyographique intercostale externe (chaque décharge est une inspiration) avant (à gauche) et après (à droite) injection de TGOT (**A**) ou d'aCSF (**B**). (**C**) Quantification des paramètres cardio-respiratoires des rats avant et après injection bilatérale de TGOT (gauche des graphiques ; n=15) et quantification de la variation des paramètres (en % ou bpm) après injection bilatérale de TGOT (n=15) ou d'aCSF (n=10) (droite des graphiques). L'injection bilatérale de TGOT dans le preBötC induit une amplification de la RespVRC, une diminution du rythme cardiaque moyen et une augmentation de l'amplitude inspiratoire. La fréquence respiratoire n'est pas affectée. Les valeurs brutes intragroupe (avant vs après TGOT) ont été analysées par un test t de student apparié quand les données étaient paramétriques (Freq. Resp.) et par un test sur les rangs de Wilcoxon quand les données étaient non paramétriques (RespVRC, mRC, ampl. Inspi.). Les variations (% ou bpm) intergroupes (TGOT vs aCSF) ont été analysées par un test t de student pour les valeurs paramétriques (mRC) ou par un test de Mann-whitney pour les données non paramétriques (RespVRC ; ampl. Inspi. ; Freq. Resp.). RC : rythme cardiaque ; mRC : rythme cardiaque moyen ; TGOT : agoniste ocytocinergique ; RespVRC : variabilité respiratoire du rythme cardiaque ; Freq. Resp. : fréquence respiratoire ; Ampl. Inspi. : amplitude inspiratoire ; cpm : cycles par minutes ; bpm : battements par minute.

L'ensemble de ces résultats montre que l'injection bilatérale d'un agoniste ocytocinergique spécifique dans la région du préBötC/nA cause l'amplification de la RespVRC chez le rat juvénile anesthésié. Cela suggère que cette région pourrait faire partie du réseau impliqué dans l'amplification de la RespVRC par l'ocytocine.

Un sous-groupe de neurones inhibiteurs de la région du préBötC/nA exprime le récepteur à l'ocytocine.

Le préBötC est un noyau hétérogène composé de neurones excitateurs glutamatergiques et de neurones inhibiteurs glycinergiques et GABAergiques (Koizumi, 2013 ; Kuwana, 2006 ; Morgado-Valle, 2010 ; Bouvier, 2010 ; Ashad, 2020). Un ensemble d'études suggère que les neurones inhibiteurs de ce noyau pourraient être impliqués dans la genèse de la composante inspiratoire de la RespVRC en étant responsables des courants inhibiteurs inspiratoires reçus par les neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA qui induisent l'augmentation inspiratoire de la fréquence cardiaque (Menuet, 2020 ; Gilbey, 1984 ; Neff, 2003 ; Frank, 2009). De plus, des données montrent que dans l'amygdale et l'hippocampe, l'ocytocine module sélectivement les neurones inhibiteurs pour réguler le gain de la connectivité synaptique inhibitrice (Owen, 2013 ; Huber, 2005). Les neurones inhibiteurs du préBötC pourraient donc être impliqués dans la modulation de l'amplitude de la RespVRC que nous observons après l'injection de TGOT. De manière à tester cette hypothèse, nous avons caractérisé le phénotype neurochimique des neurones qui expriment le récepteur à l'ocytocine dans le préBötC par hybridation *in situ* fluorescente (RNAscope) chez la souris sauvage adulte. Pour cela, nous avons utilisé une combinaison de trois sondes ciblant l'ARNm d'un transporteur glutamatergique (Slc17a6), d'un transporteur de la glycine (Slc6a5) ainsi que l'ARNm du récepteur à l'ocytocine (OT-R). Ceci nous a permis de déterminer si le récepteur à l'ocytocine est exprimé par des neurones glutamatergiques, glycinergiques, ou d'autres cellules, dans le préBötC (Fig. 50).

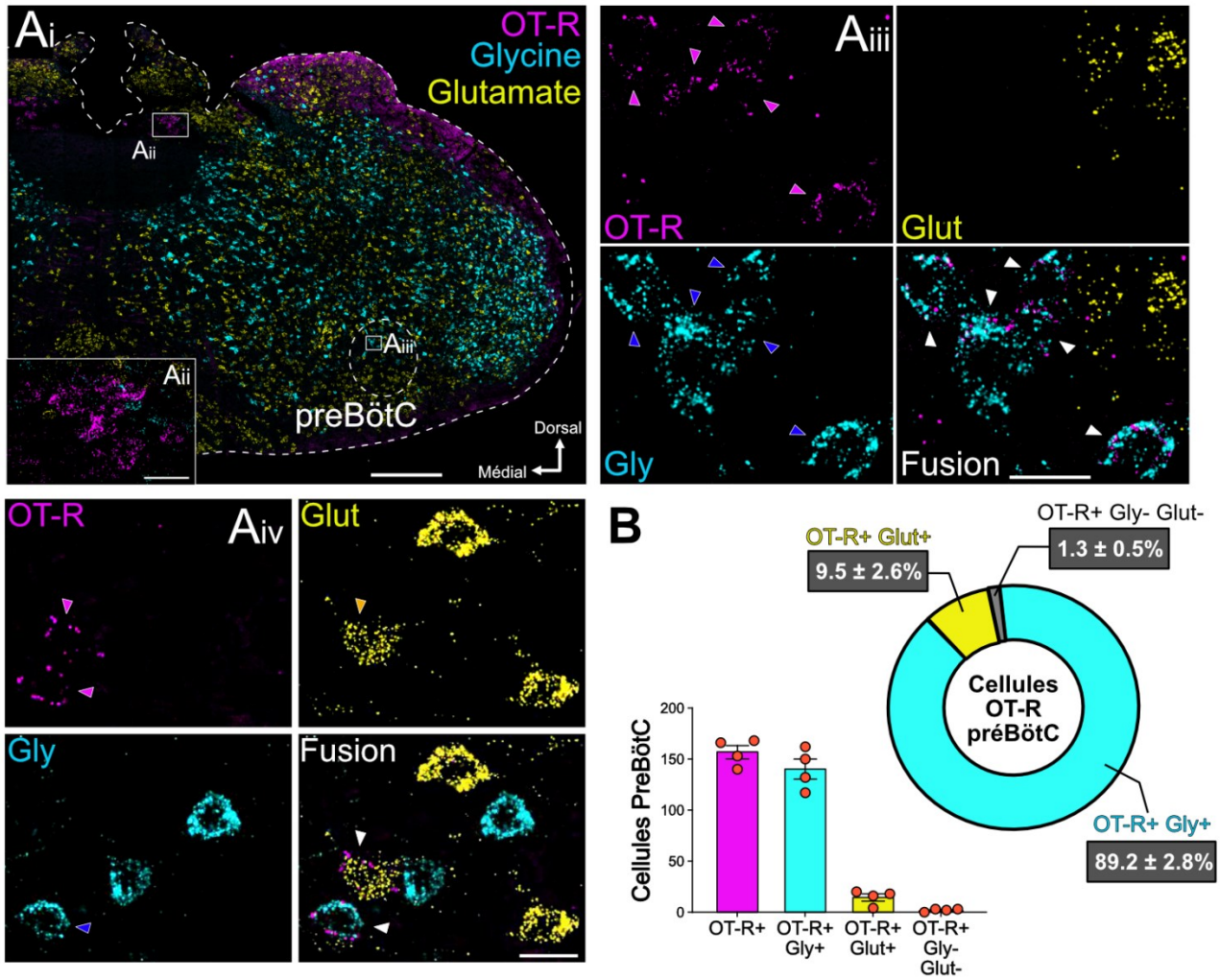


Figure 54. Caractérisation du phénotype neurochimique des neurones exprimant le récepteur à l'ocytocine dans le préBötC par hybridation *in situ* fluorescente chez la souris adulte. Détection (**A**) et quantification (**B**) des transcrits d'ARNm codant pour l'expression du récepteur à l'ocytocine (OT-R, en magenta), et des phénotypes glycinergique (Slc6a5, en cyan) et glutamatergique (Slc17a6, en jaune). (**A**) Exemples représentatifs de la détection des transcrits à l'échelle d'une hémi coupe coronale de bulbe rachidien (**Ai**), et dans la région du noyau moteur dorsal du vague (**Aii**) et du préBötC dorsal (**Aiii, Aiv,** deux souris différentes). Les flèches bleues indiquent les neurones glycinergiques, les flèches magenta les cellules exprimant l'OT-R, les flèches jaunes les neurones glutamatergiques et les flèches blanches les cellules co-exprimant l'OT-R et le marqueur glycinergique (cyan) ou glutamatergique (jaune). (**B**) Quantification individuelle du nombre de cellules exprimant chaque trancrit dans le préBötC (histogramme) et de la proportion relative (en %) de chaque sous-population co-exprimant l'OT-R dans le préBötC (diagramme en camembert) (n=4). Chaque point représente le nombre total de cellules compté bilatéralement dans le préBötC de 3 coupes coronales de bulbe rachidien contenant le préBötC pour chacune des 4 souris. Les cellules du préBötC exprimant l'OT-R chez la souris adulte sont essentiellement des neurones glycinergiques. Les barres d'erreurs représentent la SEM. (**Ai**) Image acquise avec un objectif x20 dans un plan optique unique (1.5 µm). Barre d'échelle = 200 µm. (**Aii**) Barre d'échelle = 50 µm. (**Aiii-iv**) Images générées par la projection d'intensité maximale de 5 à 7 images acquises avec un objectif x40 et un pas de 0.5 µm. Barre d'échelle = 20 µm.

Qualitativement, nous avons observé que les neurones exprimant le récepteur à l'ocytocine dans la région du préBötC sont essentiellement glycinergiques, et qu'ils ne représentent qu'une petite fraction de tous les neurones glycinergiques de ce groupe. Nous avons également remarqué que les neurones OT-R positifs du préBötC exprimaient moins de transcrits pour le récepteur à l'ocytocine que les neurones de la région du noyau moteur dorsal du Vague (Fig. 50Aii), qui contient des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques (Nosaka, 1982 ; Korsak, 2023). La quantification de la totalité des neurones du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine révèle que 89% d'entre eux sont glycinergiques (Fig. 50Ai,iii,iv, B), et nous avons remarqué qu'ils sont principalement localisés dans la région du préBötC dorsal. 10% des cellules du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine sont glutamatergiques, et les 1% restants des cellules OT-R positives n'étaient co-marquées pour aucun des deux transcrits, indiquant qu'elles ont un autre phénotype neurochimique neuronal ou cellulaire (Fig. 50Aiii,iv, B).

Ces résultats démontrent que dans la région du préBötC, le récepteur à l'ocytocine est principalement exprimé par des neurones glycinergiques. Ces neurones glycinergiques OT-R positifs forment une sous-population au sein des neurones glycinergiques du préBötC, et ils pourraient être responsables des effets sur la RespVRC que nous observons après l'injection de TGOT dans cette région.

Discussion

La variabilité respiratoire du rythme cardiaque (RespVRC) est un phénomène physiologiquement important qui permettrait l'optimisation de la dépense énergétique cardiaque tout en maintenant l'homéostasie gazeuse sanguine (Elstad, 2018 ; Ben-Tal, 2012). L'amplitude de la RespVRC est très labile et varie avec le contexte physiopathologique. Une RespVRC augmentée est un indicateur de bonne santé cardiovasculaire et *a contrario*, une RespVRC diminuée est associée à des comorbidités psychologiques et cardiovasculaires (De Meersman, 1992 ; Van Puyvelde, 2015 ; Balzarotti, 2017 ; La Rovere, 1998 ; Haigney, 2014). Les mécanismes à l'origine de ces variations d'amplitude sont méconnus mais un ensemble de données tend à montrer que l'ocytocine pourrait en faire partie, en amplifiant la RespVRC par une action centrale (Kemp, 2012 ; Cosme, 2023 ; Norman, 2011 ; Yee, 2016 ; Yeh, 1997 ; Mack, 2007 ; Son, 2022). L'objectif de cette

étude a notamment été d'identifier le réseau à l'origine de cet effet, et ma contribution a permis 1) de confirmer que chez le rat en condition *in vivo*, comme en condition *in situ*, le TGOT amplifie la RespVRC par une action sur les neurones du préBötC, et 2) de montrer que les neurones du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine constituent une sous-population des neurones glycinergiques de ce groupe.

Le TGOT amplifie la RespVRC par la modulation des neurones du préBötC.

Nous avons montré que l'injection bilatérale d'un agoniste sélectif des récepteurs ocytocinergiques (le TGOT) dans le préBötC entraine une augmentation rapide et transitoire de l'amplitude de la RespVRC (Fig. 49). Cet effet aurait pu s'interpréter comme la conséquence de la légère diminution du rythme cardiaque concomitante, puisqu'un rythme cardiaque bas est synonyme de tonus parasympathique cardiaque élevé et est donc généralement associé à une RespVRC ample (Korsak, 2023 ; De Meersman, 1992 ; 1993). Cependant, les injections de solution contrôle n'avaient aucun effet sur la RespVRC alors qu'elles induisaient également une légère diminution du rythme cardiaque moyen. Cela indique que la RespVRC était amplifiée par une action spécifique du TGOT dans le préBötC, et que ça n'était pas la conséquence de la diminution du rythme cardiaque moyen, qui est très probablement sous-tendue par un effet mécanique de l'injection sur le tissu. En plus de cet effet mécanique transitoire, le rythme cardiaque moyen avait tendance à diminuer tout au long de l'expérimentation chez tous les rats, ce qui est très probablement une conséquence de l'effet dépresseur des anesthésiques sur la fonction cardiaque (Bouairi, 2004 ; Yang, 2014) puisqu'elle n'était pas observée *in situ*. C'est d'ailleurs le seul paramètre qui ne revenait pas à sa valeur basale 5 minutes après les injections.

La RespVRC est générée par le couplage fonctionnel entre des neurones respiratoires et des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA. Il a été montré que le préBötC contient des neurones qui sont impliqués dans la genèse de la RespVRC, très probablement des neurones inhibiteurs, qui sous-tendraient l'inhibition inspiratoire des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du nA (Menuet, 2020). Le TGOT aurait donc pu amplifier la RespVRC par une action post-synaptique, en modulant directement les neurones parasympathiques cardiaques du nA, ou par une action présynaptique, en modulant les neurones du préBötC. Les données d'hybridation *in situ* montrent que les récepteurs à l'ocytocine exprimés dans la région preBötC/nA ne sont pas retrouvés dans les neurones parasympathiques cardiaques du nA mais

dans les neurones du préBötC (Fig. 50). D'autres données anatomiques obtenues dans notre étude montrent que les neurones du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine forment des contacts présynaptiques à proximité des putatifs neurones parasympathiques cardiaques du nA (Cf. Annexe partie 2). De plus, l'enregistrement *in vitro* de l'activité des neurones du préBötC en tranche rythmique (Smith, 1991 ; Ashhad & Feldman, 2020) montre que le TGOT augmente l'excitabilité du préBötC (Cf. Annexe partie 2). Ceci suggère que le TGOT amplifie la RespVRC en modulant spécifiquement les neurones du préBötC, qui expriment le récepteur à l'ocytocine.

A notre connaissance, une seule autre étude s'était intéressée aux effets d'une injection d'ocytocine dans la région du bulbe ventral chez le rat (Mack, 2002). Cette étude mettait en évidence un effet de l'ocytocine qui induisait une augmentation de fréquence respiratoire, de fréquence cardiaque moyenne, et de pression artérielle, ce qui diffère des effets des injections de TGOT dans le préBötC *in vivo* et *in situ*. Cependant, l'ocytocine peut se fixer sur les récepteurs ocytocinergiques mais également vasopressinergiques, qui sont eux responsables d'effets presseurs similaires à ceux observés dans cette étude, et qui sont présents dans la région du bulbe ventral (notamment dans la RVLM) (Kc, 2002 ; Griffiths, 2017 ; Japundžić-Žigon, 2020). Nos travaux ont été réalisés en utilisant un agoniste sélectif des récepteurs ocytocinergiques qui a été injecté de manière plus précise dans la région du préBötC avec un plus petit volume (200 nl contre 50 nl), limitant ainsi la diffusion, ce qui explique très probablement la différence des effets respiratoires et cardiovasculaires que nous observons.

Les neurones du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine sont glycinergiques.

Les données d'hybridation *in situ* montrent que les neurones du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine constituent une sous-population des neurones glycinergiques de ce groupe. Les données de la littérature rapportent que les neurones inhbiteurs ont plutôt un rôle fonctionnel de modulateur du patron de la décharge inspiratoire (Baertsch, 2018, Sherman, 2015 ; Janczewski, 2013 ; Marchenko, 2016), ce qui est cohérent avec les effets des injections du TGOT dans le préBötC qui amplifiaient l'amplitude inspiratoire mais n'impactaient pas le rythme respiratoire (Fig. 49).

Dans une autre de nos études (cf. Résultats Partie 1), nous avons montré qu'au sein du préBötC du rat juvénile, une part non négligeable des neurones inhibiteurs co-exprimait le GABA et la glycine (42%), et qu'ils constituaient ≃90% des neurones glycinergiques. Or, nous n'avons pas utilisé de

sonde reconnaissant le phénotype GABAergique pour la caractérisation des neurones du préBötC exprimant le récepteur à l'ocytocine dans cette étude. Les neurones glycinergiques du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine pourraient donc être GABA-glycine et pourraient ainsi plutôt constituer une sous population des neurones GABA-glycine du préBötC que nous avons précédemment démontrés être impliqués dans la genèse de la RespVRC (Cf. Résultats Partie 1). Au cours de la présente étude, des enregistrements simultanés de l'activité populationnelle du préBötC et de neurones cardiaques du nA sur des tranches rythmiques de bulbe rachidien ont montré que le TGOT amplifie la connectivité inhibitrice glycinergique, et non GABAergique, entre les neurones du préBötC et les neurones cardiaques du nA (Cf. Annexe partie 2). Mais ces expérimentations ont été réalisées chez la souris nouveau-née, alors que les résultats de notre autre étude ont été obtenus chez le rat juvénile. Des différences existent entre ces deux espèces, notamment par rapport au phénotype des neurones inhibiteurs du préBötC entre la souris et le rat juvénile (Cf. Résultats Partie 1 ; Hirrlinger, 2019). Le profil d'expression du récepteur à l'ocytocine est très dynamique, notamment en fonction de l'âge, il est donc difficile de comparer les résultats entre nos études et de conclure sur cette hypothèse. Cela nécessiterait des données supplémentaires, incluant une détection couplée des phénotypes GABAergiques et glycinergiques ainsi que du récepteur à l'ocytocine chez ces deux modèles, aux différents âges testés.

L'ocytocine comme modulateur de la RespVRC : perspective thérapeutique ?

Bien que les mécanismes impliqués puissent potentiellement légèrement différer, l'injection de TGOT dans le préBötC chez le rat induisait le même effet d'amplification de la RespVRC que la stimulation optogénétique des fibres ocytocinergiques dans le préBötC chez la souris, soulignant la conservation évolutive et inter-espèces de ce phénomène et illustrant son rôle physiologique important. Un autre exemple illustrant l'importance physiologique de la RespVRC pour l'intégrité cardiovasculaire est que la RespVRC est très fortement réduite chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires et est même utilisée en tant qu'indicateur pronostique de mortalité chez ces patients (Porter, 1990 ; La Rovere, 1998 ; Haigney, 2014 ; Narkiewicz 1998 ; Thayer, 2010). Par ailleurs, il a été montré que la restauration de la RespVRC par un pacemaker modulé par la respiration chez des modèles d'insuffisance cardiaque chronique améliore la fonction cardiaque des animaux et leur survie (O'Callaghan, 2020 ; Shanks, 2022). Puisque nos données montrent que l'ocytocine amplifie sélectivement la RespVRC, il serait intéressant de voir si

l'administration chronique de TGOT chez un modèle d'insuffisance cardiaque chronique améliore la fonction cardiaque et la survie de ces animaux.

Conclusion

Pour conclure, l'ensemble des données de cette étude (cf. annexe partie 2), incluant des travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse, montrent que l'ocytocine, par son action régulatrice de l'activité des neurones glycinergiques du préBötC qui expriment le récepteur à l'ocytocine, vient moduler le gain synaptique de la connexion inspiratoire inhibitrice glycinergique entre les neurones du préBötC et les neurones parasympathiques cardiaques du nA, ce qui amplifie la modulation respiratoire de l'activité parasympathiques cardiaque et l'amplitude de la RespVRC. Puisque nos données montrent que l'ocytocine amplifie sélectivement la RespVRC, et que la restauration de la RespVRC chez un modèle insuffisant cardiaque chronique permet l'amélioration de la fonction cardiaque, notre travail ouvre la porte à de potentielles thérapies innovantes pour le traitement de pathologies cardiovasculaires qui constituent une cause majeure de mortalité dans le monde.

Discussion

Les systèmes respiratoires et cardiovasculaires servent une fonction commune fondamentale de maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine, essentielle au bon fonctionnement cellulaire et ainsi à la survie des organismes. L'efficacité physiologique de cette régulation est optimisée par le couplage fonctionnel entre le système respiratoire et le système cardiovasculaire (le CRCV) qui se manifeste par des oscillations de la pression artérielle (ondes TH) et de la fréquence cardiaque (RespVRC) en phase avec la respiration (Elstad, 2018 ; Fisher, 2022). Le CRCV est un phénomène physiologique reconnu dans le monde de la santé, notamment pour ses modulations à la hausse ou à la baisse qui sont utilisées en tant qu'indicateurs de la santé cardiovasculaire et qui sont révélatrices de l'état psychologique (La Rovere, 1998 ; Narkiewicz 1998 ; Tomasi, 2024 ; Hartmann, 2019). Malgré cela, les mécanismes qui génèrent le CRCV restent mal caractérisés notamment du fait de leur complexité et de la multiplicité de leurs origines, ce qui complique la compréhension des modulations du CRCV en condition physiologique et pathologique. Les travaux de cette thèse avaient pour objectif d'investiguer les mécanismes centraux à l'origine du CRCV et se sont articulés autour de trois axes distincts mais complémentaires :

- **La caractérisation d'une sous population neuronale inhibitrice respiratoire impliquée dans la genèse du CRCV en condition basale (Partie 1 des Résultats)**

Cette étude visait à démontrer que les neurones GABAergiques du préBötC (préBötC^{GABA}) contribuent à générer le CRCV. Pour commencer, nous avons montré par hybridation *in situ* que les neurones préBötC^{GABA} forment une population hétérogène constituée de neurones uniquement GABAergiques et de neurones co-exprimant le GABA et la glycine. Puis en utilisant le traçage viral, nous avons montré que les neurones préBötC^{GABA} contactent des régions clés pour la régulation respiratoire et cardiovasculaire ainsi que pour le CRCV, incluant le nA et la RVLM. Enfin, la modulation optogénétique de l'activité des neurones préBötC^{GABA} en condition *in vivo* anesthésiée et *in situ* a démontré que ces neurones, en plus de moduler le patron moteur inspiratoire, contribuent à générer la RespVRC et les ondes TH par une modulation inhibitrice de l'activité parasympathique cardiaque et de l'activité sympathique vasomotrice. Nous montrons également qu'ils contribuent à réguler la pression artérielle moyenne par une influence inhibitrice sur l'activité sympathique vasomotrice tonique. L'ensemble de ces travaux a démontré que les neurones préBötC^{GABA} forment une population hétérogène jouant un rôle clé de coordinateurs physiologiques majeurs *via* la régulation des fonctions respiratoires et cardiovasculaires ainsi que de leur couplage.

❖ L'identification d'un mecanisme peripherique de potentialisation du CRCV aux consequences potentiellement pathologiques (Partie 2 des Resultats)

Par cette étude, nous avons visé à déterminer si les CC peuvent induire une exacerbation du CRCV à partir d'un état physiologique basal. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole de stimulations aigües, répétées et spécifiques des corps carotidiens (CC) par des injections de cyanure, sur la préparation *in situ* de rat. Nous avons montré que quatre stimulations des CC par le cyanure suffisent pour induire une élévation immédiate et persistante de la modulation respiratoire de l'activité sympathique, des ondes TH, de la RespVRC et de la pression de perfusion. Nous avons également remarqué une amplification de la commande centrale respiratoire affectant particulièrement les voies aériennes supérieures et le contrôle abdominal. Ces effets étaient absents chez les rats dont les CC étaient déafférentés, ce qui a démontré qu'ils dépendent des corps carotidiens et de l'activation du chémoréflexe périphérique. Ce travail a démontré que l'activation aiguë et intermittente des CC induit une plasticité fonctionnelle responsable d'une élévation prolongée du CRCV, supportant un rôle potentiel de ces organes dans le développement d'hypertension.

❖ L'identification d'un mecanisme central amplificateur de la composante cardiaque du CRCV au potentiel therapeutique (Partie 3 des Resultats)

Cette étude, à laquelle j'ai contribué, visait à identifier les mécanismes centraux à l'origine de l'amplification de la RespVRC par l'ocytocine. Mes travaux ont contribué à montrer de manière fonctionnelle, par l'injection d'un agoniste ocytocinergique sélectif (le TGOT) dans le préBötC de rats anesthésiés, que l'ocytocine amplifie la RespVRC par une action sur le préBötC. Puis, par hybridation *in situ* chez la souris que les neurones du préBötC qui expriment le récepteur de l'ocytocine et qui sous-tendent cet effet forment un sous-groupe des neurones glycinergiques. L'ensemble des travaux de cette étude, incluant les miens, a permis de disséquer le réseau neuronal impliqué dans l'amplification de la RespVRC par l'ocytocine et a révélé son implication dans une situation comportementale physiologique.

Une discussion des résultats propre à chacun de ces projets peut être trouvée dans la partie résultat correspondante. Nous tâcherons ici de reprendre certains aspects importants, pour les intégrer

dans un contexte plus large, à l'échelle des résultats de ces trois études ainsi que des connaissances générales des mécanismes du CRCV. Certains des résultats de l'étude concernant l'amplification de la RespVRC par l'ocytocine (Cf. Annexe partie 2) que je n'ai pas obtenus moi-même seront inclus. Lorsque tel sera le cas, la référence de l'étude (Buron, 2023) sera ajoutée.

1. Ce que nos résultats apportent à la compréhension des mécanismes fondamentaux du CRCV

1.1. La RespVRC

La RespVRC résulte de plusieurs mécanismes mais est principalement générée de la modulation par la respiration de l'activité parasympathique cardiaque, qui exerce une influence cardioinhibitrice sur le cœur. A chaque cycle respiratoire, l'activité parasympathique cardiaque est réduite pendant l'expiration tardive et l'inspiration, avant de réaugmenter et atteindre un pic pendant la post-inspiration (Farmer, 2016 ; Ottaviani, 2020 ; Shanks, 2023). Cet effet repose sur la modulation respiratoire de l'activité des neurones préganglionnaires parasympathiques cardiaques du noyau Ambigu (nA) (McAllen & Spyer, 1978a ; Gilbey, 1984). Ces neurones reçoivent des courants excitateurs post-inspiratoires qui viendraient du noyau Kolliker-Fuse (Farmer, 2016), et des courants inhibiteurs inspiratoires GABAergiques et glycinergiques dont la source n'avait pas été identifiée mais qui pouvaient provenir du préBötC (Gilbey, 1984 ; Neff, 2003 ; Frank, 2009 ; Menuet, 2020).

Par un ensemble d'approches anatomiques et fonctionnelles, nous avons caractérisé deux sous-populations de neurones inhibiteurs du préBötC qui contribuent à générer la RespVRC : les neurones glycinergiques qui expriment le récepteur à l'ocytocine (préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$) (Buron, 2023) et les neurones préBötC^{GABA}.

Les neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$, avec leur patron d'activité phasique inspiratoire, sont responsables des courants inhibiteurs inspiratoires glycinergiques reçus par les neurones cardiaques du nA (Buron, 2023). Ils participent à réduire le tonus parasympathique cardiaque au cours de l'inspiration, et sont donc impliqués dans la tachycardie inspiratoire caractéristique de la RespVRC (Fig. 51).

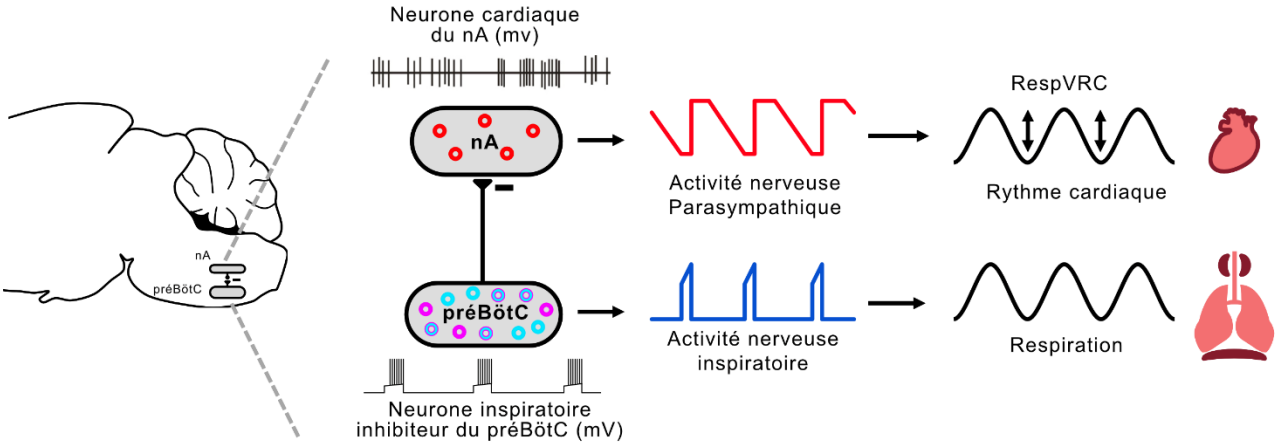


Figure 57. Représentation schématique du modèle proposé de la modulation des neurones cardiaques du nA par les neurones préBötC^{GABA} et préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ pour la genèse de la RespVRC en condition basale. Les neurones inspiratoires inhibiteurs du préBötC sont responsables de l'inhibition inspiratoire des neurones cardiaques du nA (tracé adapté de Gourine, 2016) *via* des projections monosynaptiques. Il en résulte une diminution de l'activité parasympathique cardiaque (en rouge) pour chaque décharge inspiratoire (en bleu) ce qui induit une augmentation de la fréquence cardiaque pendant l'inspiration. Les neurones cardiaques du nA sont représentés par des cercles rouges. Les neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ sont représentés en magenta. Les neurones préBötC^{GABA} sont représentés en cyan (neurones uniquement GABAergiques) et en cyan cerclé de magenta (neurones GABA-glycine).

Nous n'avons pas démontré la connectivité fonctionnelle directe entre les neurones préBötC^{GABA} et les neurones parasympathiques cardiaques du nA par des enregistrements électrophysiologiques couplés comme cela a été le cas pour les neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ (Buron, 2023). Mais l'ensemble de nos résultats suggère très fortement qu'ils sont responsables des courants inhibiteurs GABAergiques inspiratoires reçus par les neurones parasympathiques cardiaques du nA (Fig. 50). En effet, nous avons démontré que la photomodulation *in vivo* et *in situ* de l'activité des neurones préBötC^{GABA} module l'amplitude de la RespVRC, que cet effet repose sur l'activité parasympathique cardiaque et qu'ils forment une grande densité de terminaisons présynaptiques à proximité du corps cellulaire des neurones cholinergiques du nA. Un élément anatomique qui soutiendrait cette très probable hypothèse serait la démonstration que les contacts synaptiques établis par les neurones préBötC^{GABA} dans le nA sont à proximité des neurones parasymapthiques cardiaques. Pour cela, il faudrait réitérer nos expérimentations de traçage viral des neurones préBötC^{GABA} en utilisant des marqueurs spécifiques des neurones cardiaques du nA tels que la calbindine ou la butyrylcholinesterase (Veerakumar, 2022).

Par ailleurs, en plus d'être spécifiques des neurones cardiaques du nA, ces marqueurs permettent d'identifier les deux sous-types de neurones cardiaques dans le nA : les neurones dits « cardiovasculaires » et les neurones dits « cardiopulmonaires » (Jalil, 2023 ; Veerakumar, 2022 ; Coverdell, 2024). Bien que leurs contributions respectives à la fonction cardiovasculaire et au CRCV soient encore méconnues du fait de leur caractérisation récente, identifier de potentielles projections préférentielles des neurones préBötC^{GABA} vers l'une ou l'autre de ces populations grâce à ces marqueurs serait informative. A noter qu'aucune distribution préférentielle relative à ces sous populations neuronales n'a été observée pour les projections des neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ (Buron, 2023).

1.2. Les ondes TH

Les mécanismes à l'origine des ondes TH sont encore moins caractérisés que ceux de la RespVRC mais nous savons qu'elles sont produites par la modulation respiratoire du tonus sympathique vasomoteur qui augmente pendant l'inspiration et atteint un pic en post-inspiration avant de rapidement diminuer (Simms, 2009 ; Menuet, 2017 ; Adrian, 1932 ; Shantsila, 2015). Ce phénomène provient de la modulation de l'activité de neurones présympathiques de la RVLM par des neurones respiratoires. Les neurones présympathiques de la RVLM reçoivent différentes entrées respiratoires. Parmi les neurones non-C1, certains sont excités pendant la post-inspiration et parmi les neurones C1, certains sont excités pendant l'inspiration tandis que d'autres sont inhibés pendant l'inspiration (Miyawaki, 1995 ; Moraes, 2013) (Fig. 52). Les courants post-inspiratoires excitateurs des neurones non-C1 proviendraient de neurones excitateurs avec un patron de décharge post-inspiratoire localisés dans le noyau Kölliker-Fuse et/ou dans le Complexe post-inspiratoire (Dempsey, 2017 ; Oliveira, 2024 ; Karlen-Amarante, 2024 ; Toor, 2019 ; 2024). Les courants inspiratoires excitateurs des neurones C1 proviendraient de neurones inspiratoires glutamatergiques du préBötC (Menuet, 2020 ; Karlen-Amarante, 2024 ; Dempsey, 2017). Les courants inhibiteurs inspiratoire reçus par les neurones C1 n'ont pas été étudiés jusqu'à présent mais il semblerait qu'ils soient GABAergiques et pourraient provenir du préBötC (Miyawaki, 2002 ; Guyenet, 1990 ; Menuet, 2017).

L'ensemble de nos données suggère très fortement que les neurones préBötC^{GABA} soient responsables des courants inhibiteurs GABAergiques inspiratoires reçus par les neurones C1 de la RVLM (Fig. 52). Nous avons démontré que la photomodulation *in vivo* et *in situ* de l'activité des neurones préBötC^{GABA} module l'amplitude des ondes TH *via* la modulation respiratoire de l'activité sympathique et que cet effet repose sur une connectivité directe des neurones préBötC^{GABA} avec l'activité nerveuse sympathique. Nos données anatomiques ont par la suite démontré que ces neurones projettent vers la RVLM et forment des terminaisons présynaptiques à proximité des neurones présympathiques C1. Cette étude est, à notre connaissance, la première à identifier expérimentalement une population neuronale qui semble impliquée dans la modulation inspiratoire inhibitrice des neurones C1. Les neurones GABAergiques de la CVLM, qui contactent monosynaptiquement les neurones présympathiques de la RVLM et dont l'activité est modulée par la respiration, pourraient aussi y contribuer (Mandel, 2006 ; Guyenet & Schreihofer, 2002 ; Sved, 2000 ; Miyawaki, 1997).

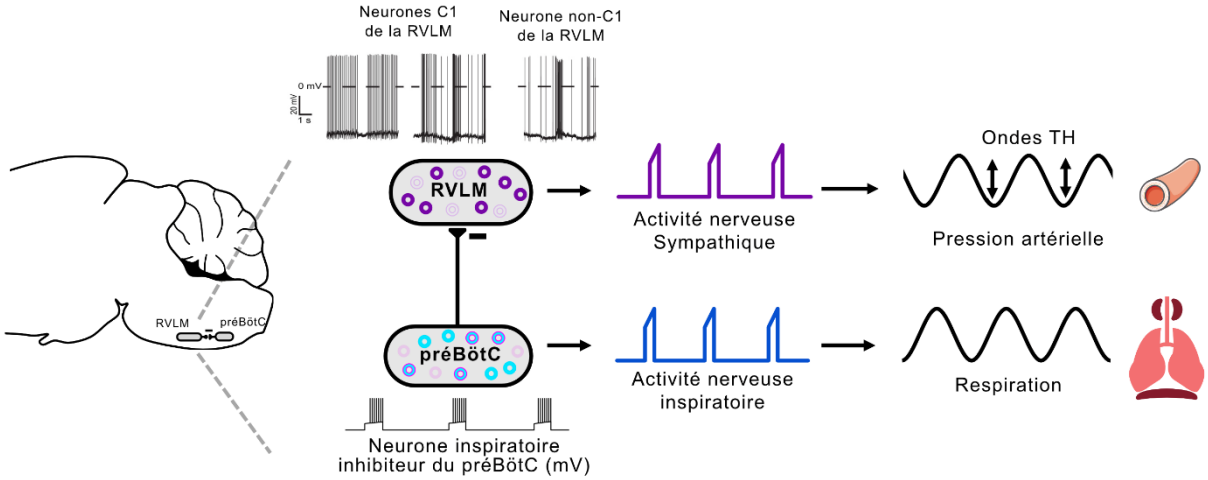


Figure 60. Représentation schématique du modèle proposé de la modulation des neurones présympathiques C1 de la RVLM par les neurones préBötC^{GABA} qui contribue à générer les ondes TH en condition basale. La modulation respiratoire de l'activité nerveuse sympathique résulte de la somme des différentes modulations respiratoires des neurones présympathiques de la RVLM (représentées sur les tracés du dessus, adaptés de Moraes, 2013). La balance entre les entrées inhibitrices inspiratoires (neurone C1 à gauche) et excitatrices inspiratoires (neurone C1 à droite) et post inspiratoires (neurone non-C1 à gauche) contribue à réguler l'amplitude des ondes TH. Les neurones préBötC^{GABA} seraient responsables de l'inhibition inspiratoire de certains neurones C1 de la RVLM *via* des projections monosynaptiques et contribuent ainsi à générer les ondes TH. Les neurones C1 de la RVLM sont représentés en violet plein. Les neurones non-C1 sont cerclés en violet et sont estompés puisqu'ils participent à générer la modulation respiratoire de l'activité sympathique mais pas *via* le couplage avec les neurones préBötC^{GABA}. Les neurones préBötC^{GABA} sont représentés en cyan (uniquement GABAergiques) et en cyan cerclé de magenta (GABA-glycine). Les neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ sont représentés en magenta estompé puisque nous ne savons pas s'ils contribuent à ce mécanisme.

Le fait que la modulation des neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ par le TGOT n'ait eu aucun effet sur l'activité sympathique et les ondes TH est intéressant (Buron, 2023). Cela semble indiquer que ces neurones ne sont pas impliqués dans la genèse ou la régulation de la composante sympathique-vasomotrice du CRCV. Ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse fondée sur la littérature que la modulation inspiratoire inhibitrice des neurones C1 est GABAergique, et renforce l'hypothèse soutenue par nos données que les neurones préBötC^{GABA} sont eux impliqués. Il serait donc intéressant de vérifier si la photomodulation des neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ a un effet sur la l'activité sympathique vasomotrice et sur la pression artérielle comme les neurones préBötC^{GABA} ou non.

Toutefois, cette dichotomie est intéressante car elle semble indiquer une régulation différentielle du CRCV en fonction des populations neuronales.

1.2.1. Rôle physiologique potentiel de la modulation inhibitrice inspiratoire des neurones C1

A notre connaissance, aucune étude n'a discuté du rôle potentiel de la modulation inhibitrice inspiratoire, préférant s'intéresser aux modulations excitatrices qui sont mises en cause dans l'hypertension. D'un point de vue physiologique, la modulation inhibitrice inspiratoire des neurones C1 de la RVLM pourrait permettre de réguler finement la modulation respiratoire de l'activité sympathique pour moduler l'amplitude des onde TH en fonction des besoins métaboliques. Cette hypothèse est cohérente avec la fonction supposée des ondes TH qui permettraient d'optimiser les échanges gazeux et la perfusion tissulaire avec les besoins métaboliques (Simms, 2010). Un exemple dans la même région illustrant cette hypothèse mécanistique est le tonus inhibiteur imposé par les neurones GABAergiques de la CVLM aux neurones présympathiques de la RVLM. La modulation à la hausse ou à la baisse du tonus inhibiteur de la CVLM permet la régulation fine de l'activité des neurones présympathiques de la RVLM ce qui permet par la suite la régulation de l'activité sympathique et de la pression artérielle (Ross, 1984 ; Terui, 1986 ; Schreihofer & Guyenet, 2002 ; Miyawaki, 1997). Ainsi, la régulation fine de la modulation respiratoire de l'activité sympathique vasomotrice par la balance entre les entrées excitatrices et inhibitrices liées à la respiration des neurones de la RVLM reçues par les neurones préganglionnaires

sympathiques de la moelle épinière permettrait de moduler l'amplitude des ondes TH avec les besoins métaboliques et d'optimiser les échanges gazeux.

1.3. Régulation de la pression artérielle moyenne par des neurones respiratoires

À ce jour, les mécanismes impliqués dans le maintien de la pression artérielle moyenne à long terme restent mal compris et reposent sur des hypothèses. Il est reconnu que la RVLM est responsable d'une partie conséquente du tonus nerveux sympathique vasomoteur et de sa modulation (Guertzenstein & Silver, 1974 ; Dampney, 1982 ; Ross, 1984 ; Guyenet, 2006). Comme mentionné ci-dessus, une source importante de modulation de l'influence sympathoexcitatrice de la RVLM et de régulation de la pression artérielle moyenne provient des neurones GABAergiques de la CVLM qui exercent un tonus inhibiteur sur les neurones présympathiques.

Nos résultats mettent en évidence que les neurones préBötC^{GABA} sont également impliqués dans la modulation du tonus sympathique vasomoteur par une influence sympathoinhibitrice tonique des neurones de la RVLM (Fig. 53). Leur influence est indépendante du baroréflexe et ne servirait donc pas une fonction protectrice par la régulation de l'activité sympathique tonique à la baisse lors de variations de pression. Nous pourrions donc plutôt supposer que des neurones toniques préBötC^{GABA} modulent constamment l'activité des neurones présympathiques de la RVLM afin de réguler les niveaux de pression artérielle moyenne et ainsi adapter la perfusion tissulaire ainsi que les échanges gazeux en fonction des besoins de l'organisme.

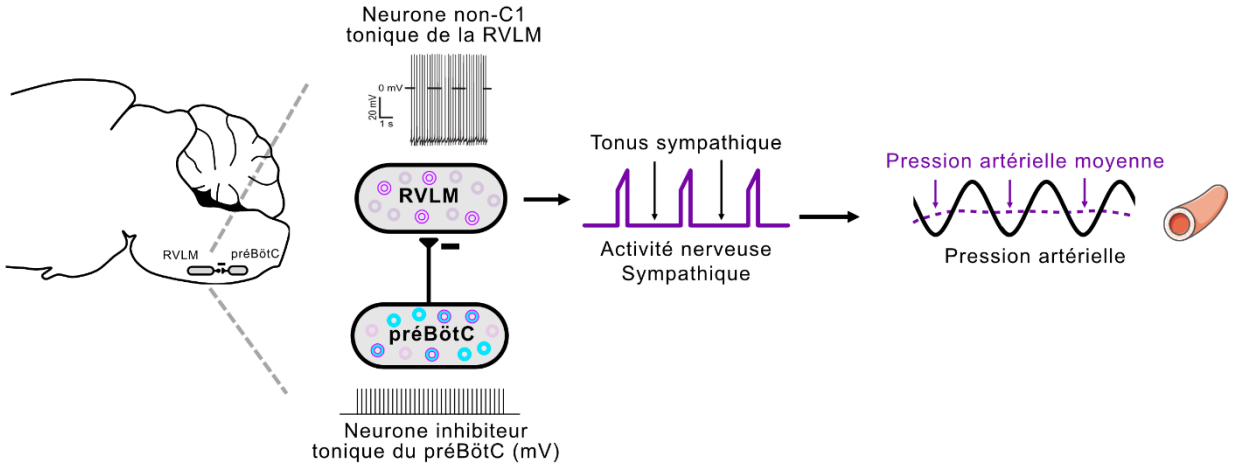


Figure 61. Représentation schématique du modèle proposé de la modulation des neurones présympathiques de la RVLM par les neurones préBötC^{GABA} qui contribue à réguler la pression artérielle moyenne. Les neurones toniques préBötC^{GABA} exercent un tonus inhibiteur sur les neurones présympathiques de la RVLM, potentiellement les neurones non-C1 non modulés par la respiration (tracé adapté de Moraes, 2013) *via* des projections monosynaptiques. Cela contribuerait à moduler le tonus nerveux sympathique vasomoteur et à réguler la pression artérielle moyenne (en pointillés violet). Les neurones non-C1 de la RVLM sont représentés en cerclés violet plein. Les neurones C1 sont en violet plein et sont estompés puisque nous ne pouvons pas exclure qu'ils soient impliqués. Les neurones préBötC^{GABA} sont représentés en cyan (uniquement GABAergiques) et en cyan cerclé de magenta (GABA-glycine). Les neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ sont représentés en magenta estompé puisque nous ne savons pas s'ils contribuent à ce mécanisme.

Bien qu'il soit accepté que les neurones C1 et non-C1 sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle moyenne, leurs contributions respectives restent incertaines. Sur la base d'un ensemble d'expérimentations, il semblerait que les neurones C1 soient plutôt impliqués dans la stabilisation de la pression artérielle à court terme en étant nécessaires aux réflexes de régulation cardiovasculaire comme le baroréflexe (Wenker, 2017 ; Souza, 2022 ; Madden & Sved, 2003, 2006 ; Schreihofer, 2000 ; Marina, 2011). La fonction des neurones non-C1 est méconnue mais ils seraient potentiellement responsables de la régulation de la pression artérielle à long terme (cf. Chapitre 2.2.3.1.1 de l'introduction, Madden & Sved, 2003 ; Schreihofer, 2000 ; Guyenet, 2013). Aussi, bien qu'il semble que les neurones préBötC^{GABA} participent à générer les ondes TH en modulant de manière phasique l'activité des neurones C1, leur modulation tonique de l'activité sympathique tonique vasomotrice pourrait plutôt passer par la modulation des neurones non-C1. Certains de ces neurones ont un patron de décharge tonique (Miyawaki, 1995 ; Moraes, 2013) qui pourrait participer à définir la valeur de référence de la pression artérielle. La modulation tonique de l'activité sympathique tonique ainsi que de la pression artérielle moyenne par les neurones préBötC^{GABA} pourrait donc passer par ces neurones non-C1 plutôt que les C1 (Fig. 53).

1.4. Différents phénotypes neurochimiques, différents rôles ?

Le préBötC est un groupe hétérogène constitué de neurones excitateurs glutamatergiques et de neurones inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques (Koizumi, 2013 ; Kuwana, 2006 ; Morgado-Valle, 2010 ; Bouvier, 2010 ; Ashad, 2020). Une étude ayant caractérisé le profil développemental phénotypique neurochimique des neurones inhibiteurs du préBötC chez la souris

montre qu'à P30 - un âge où le processus de différenciation maturationnelle est considéré comme achevé - 50% de ces neurones sont glycinergiques, 40% sont GABAergiques et 10% co-exprimeraient le GABA et la glycine (Hirrlinger, 2019) (Fig. 54a). Or nous montrons par hybridation *in situ* que chez le rat au même âge, 54% des neurones inhibiteurs du préBötC sont GABAergiques, 42% co-expriment le GABA et la glycine et 4% sont glycinergiques. Nos résultats contrastent de fait énormément avec les données obtenues chez la souris, notamment par rapport à la grande proportion de neurones GABA-glycine qui est généralement associée à un état immature des réseaux neuronaux du tronc cérébral (Hirrlinger, 2019 ; Russier, 2002). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces différences et interpréter le rôle fonctionnel potentiel de la co-transmission GABA-glycine dans le CRCV.

L'enzyme de synthèse du GABA est encodée par deux gènes différents : GAD1 et GAD2. Or, la cre-recombinase de notre modèle transgénique est exprimée sous le contrôle du promoteur de GAD1 (Sharpe, 2017) alors que celui utilisé dans cette étude cible GAD2 (Hirrlinger, 2019). Un autre point important est la différence de méthode utilisée. Nous utilisons une détection des ARNm des différents marqueurs phénotypiques tandis qu'eux utilisent une détection des protéines. Relatif à cela, nous pouvons envisager trois possibilités. Premièrement, les ARNm du GABA et de la glycine pourraient être produits mais non traduits en protéines du fait de mécanismes post-transcriptionnels. Cela voudrait dire que certains des neurones GABA-glycine que l'on observe ne sont en réalité que glycinergiques. Toutefois, du fait de la demi-vie courte des ARNm (Sharova, 2009) et du coût énergétique que cela représenterait de constamment les produire pour ensuite les réprimer, cela est très peu probable.

Une autre possibilité serait que tous les ARNm sont traduits et que la différence entre les résultats de nos deux études repose sur des différences inhérentes à chacune de ces espèces. Il serait intéressant de réitérer la caractérisation des neurones inhibiteurs du préBötC par hybridation *in situ* chez la souris pour vérifier cet aspect.

Une troisième possibilité intermédiaire qui semble intéressante pour la fonction du CRCV, est que les ARNm du GABA de certain des neurones GABA/glycine pourraient être stockés dans des granules d'ARN et ne seraient traduits que par un événement déclencheur qui nécessiterait une modulation des activités neuronales, permise par l'augmentation de la co-transmission du GABA et de la glycine (Anderson & Kedersha, 2009). En effet, la co-transmission GABA-glycine permet la régulation fine de la réponse post-synaptique en modulant la durée des courants post-synaptiques (Russier, 2002 ;

Lu, 2008 ; Aubrey & Supplisson, 2018) (Fig. 54b). Pour les neurones GABA-glycine du préBötC, l'évènement déclencheur pourrait être une variation métabolique qui nécessite la modulation des fonctions respiratoire et cardiovasculaire. Ces mécanismes de régulation fine de l'activité des neurones respiratoires et cardiovasculaires semblent cohérents avec la fonction physiologique du CRCV de maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine et d'optimisation des échanges gazeux en fonction des besoins métaboliques (Simms, 2010 ; Ben-Tal, 2012 ; Elstad, 2018).

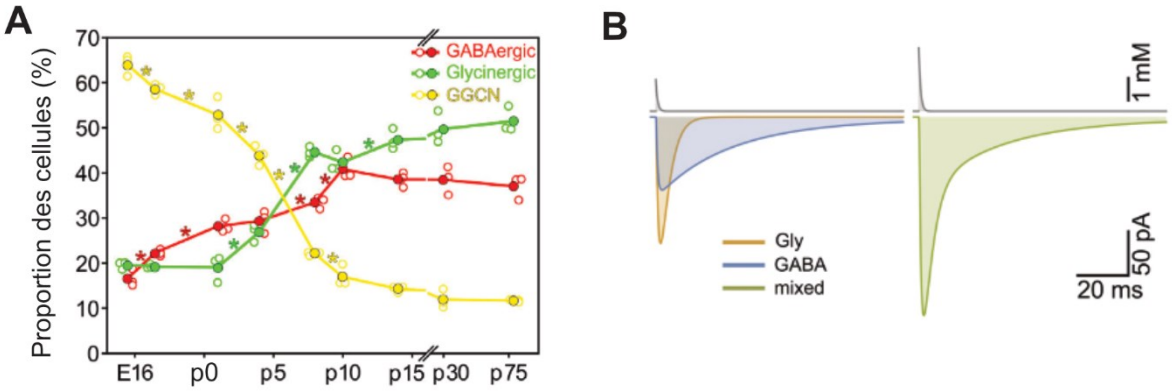


Figure 62. Profil développemental du phénotype des neurones inhibiteurs du préBötC et co-transmission GABA-glycine (adapté de Hirrlinger, 2019 et Aubrey & Supplisson, 2018). (**A**) Proportion en pourcentage des cellules ayant un phénotype GABAergique, glycinergique ou GABA-glycine (GGCN) entre l'âge embryonnaire (E) 16 et 2 mois et demi de vie post-natale (P75) chez la souris. (**B**) Simulations mathématiques des courants miniatures posts-synaptiques inhibiteurs évoqués par l'application isolée de GABA (bleu) ou de glycine (orange) (à gauche) ou les deux ensemble (vert, à droite). La barre d'échelle représente la concentration totale en neurotransmetteur.

Fait intéressant, une étude a démontré que chez un modèle murin de dépression, la composante GABAergique de la co-transmission GABGA-glycine est diminuée et que l'utilisation d'antidépresseurs qui améliorent le phénotype dépressif restaure également la co-transmission GABA-glycine (Shabel, 2014). Si la-transmission GABA-glycine des neurones du préBötC est un mécanisme important pour le CRCV y compris en condition basale, alors son dysfonctionnement pourrait altérer la modulation fine de l'activité des neurones cardiovasculaires. Cela pourrait sous-tendre certains des dysfonctionnements du CRCV observés en contexte pathologique (Menuet, 2010 ; Xie, 2019 ; Thayer, 2010 ; La Rovere, 1998).

Plus généralement, la présence de plusieurs sous-populations inhibitrices dans le préBötC (GABAergiques, GABAergiques-glycinergiques et glycinergiques) pourrait laisser penser qu'elles

remplissent des fonctions distinctes et participent à générer différents aspects du CRCV. Cet aspect est d'ailleurs en train d'être démontré concernant la fonction respiratoire. Des neurones du préBötC qui expriment diverses combinaisons de marqueurs moléculaires forment des sous-groupes impliqués de manières différentes dans le contrôle central respiratoire (Yackle, 2023).

Pour tester cela d'un point de vue anatomique, il pourrait être envisagé de combiner du traçage viral avec de l'hybridation *in situ* robuste aux erreurs multiplexées (le MERFISH, une technique de profilage spatial transcriptomique qui permet de marquer simultanément plusieurs centaines d'ARNm différents). Cela nous permettrait de reconstruire précisément les projections des quelques neurones préBötC^{GABA} ayant été infectés et ensuite de vérifier leur phénotype neurochimique, ainsi que celui des neurones du nA et de la RVLM qu'ils contactent.

L'ensemble de ces résultats illustre la complexité des mécanismes centraux du CRCV qui sont finement régulés et rappelle par la même occasion l'importance de confirmer les résultats chez plusieurs espèces.

2. Ce que nos résultats apportent à la compréhension de la fonction physiologique du CRCV

Le rôle physiologique supposé du CRCV est d'optimiser la coordination entre les systèmes respiratoire et cardiovasculaire afin de maintenir l'homéostasie gazeuse sanguine, notamment lors des variations des besoins métaboliques (Simms, 2010 ; Ben-Tal, 2012 ; Elstad, 2018). Nos travaux supportent cette hypothèse et illustrent cette fonction physiologique de plusieurs manières.

Les corps carotidiens (CC) sont les principaux organes périphériques impliqués dans la régulation des pressions partielles en O_2 et en CO_2. Situés à la bifurcation carotidienne, ils sont les organes les plus vascularisés de tout le corps. Ils sont essentiels à la boucle régulatrice du chémoréflexe périphérique qui induit plusieurs réponses respiratoires et cardiovasculaires pour compenser les variations des gaz du sang (Iturriaga, 2021 ; Prabhakar & Peng, 2004 ; Bisgard, 1980). Les CC ont une position stratégique pour 1) informer en continu le réseau du CRCV sur l'état périphérique des concentrations des gaz du sang, et 2) de permettre au CRCV de s'adapter en fonction des besoins

métaboliques afin d'optimiser les échanges gazeux et de maintenir l'homéostasie gazeuse sanguine.

Notre protocole de stimulations aiguës et répétées des corps carotidiens nous a permis de tester le rôle du CRCV dans le maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine lors d'une variation des besoins métaboliques, en simulant une réduction en O_2. Cela a entrainé l'exacerbation immédiate et persistante des deux composantes du CRCV (la RespVRC et les ondes TH) ainsi que de la commande centrale respiratoire. L'augmentation de la commande nerveuse respiratoire pourrait traduire une tentative de faciliter l'apport d'O_2, là où l'exacerbation du CRCV permettrait d'optimiser les échanges gazeux et d'augmenter la disponibilité en O_2 tissulaire en concentrant le travail cardiovasculaire quand les niveaux en O_2 circulant sont au plus haut. Par ailleurs, la modulation à la hausse du CRCV n'était pas la conséquence d'une augmentation globale des activités nerveuses puisque la composante tonique de l'activité nerveuse sympathique reste inchangée. Cette réponse plastique illustre bien la fonction physiologique du CRCV puisqu'il est sélectivement modulé à la hausse dans un contexte hypoxique, où l'organisme met en place des mécanismes pour compenser la réduction en O_2. Cette réponse physiologique protectrice compensatoire en réponse à une variation transitoire des besoins métaboliques (comme cela peut être le cas en altitude ou lors d'un exercice physique) est à distinguer de l'exacerbation pathologique de la composante sympathique et vasculaire du CRCV lors d'hypoxies intermittentes chroniques ou d'apnées du sommeil (Zoccal, 2008 ; Fatouleh, 2014 ; Moraes, 2014b).

Par ailleurs, l'optimisation de l'efficience des systèmes respiratoire et cardiovasculaire pour réguler les échanges gazeux et maintenir l'homéostasie gazeuse sanguine en condition basale ou lors de variations métaboliques suppose une régulation fine des mécanismes qui en sont responsables, ce que l'ensemble de nos résultats tend à montrer.

Nous montrons que deux sous populations de neurones respiratoires, stratégiquement placées pour pouvoir moduler l'activité des neurones cardiovasculaires avec la respiration, contribuent différentiellement au CRCV. Les neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ génèrent la RespVRC et font partie du réseau neuronal capable à l'origine de l'amplification de cette composante, et les neurones préBötC^{GABA} génèrent à la fois la RespVRC ainsi que les ondes TH et régulent la pression artérielle moyenne. De plus, certains de ces neurones co-transmettent le GABA et la glycine, ce qui pourrait

leur donner la possibilité de finement moduler la réponse des neurones cardiovasculaires qu'ils contactent ainsi que le CRCV en fonction des besoins métaboliques.

L'exacerbation persistante du CRCV après la stimulation des CC est aussi un exemple de régulation fine de ce réseau. Il est possible que cet effet soit médié par la modulation du gain synaptique au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS). Ce centre intégrateur du tronc cérébral contacte les centres respiratoires et cardiovasculaires du tronc cérébral et est nécessaire aux réponses ventilatoires et cardiovasculaires du chémoréflexe périphérique (Paton, 1999 ; Shao, 2024 ; Zera, 2019 ; Kline, 2010). En effet, il a été montré que le NTS est grandement impliqué dans le maintien à long terme de la facilitation de la réponse ventilatoire induite par un protocole d'hypoxies intermittentes aiguës chez le rat anesthésié (Ostrowski, 2023). Cet aspect pourrait être vérifié en réalisant des enregistrements de l'activité des neurones du NTS par de l'imagerie calcique tout en réalisant notre protocole de stimulation des CC sur la préparation *in situ*.

Enfin, un dernier aspect de régulation fine du CRCV que nous avons démontré concerne la réorganisation fonctionnelle des réseaux respiratoires et cardiovasculaires pour augmenter le CRCV lors d'un challenge hypoxique. La stimulation des CC n'induisait pas uniquement une augmentation globale du CRCV. Le patron de la modulation respiratoire de l'activité sympathique était également modifié, avec l'apparition d'une décharge supplémentaire à la transition entre l'expiration et l'inspiration. Les mécanismes qui sous-tendent cette activité ne sont pas élucidés mais l'ensemble de nos données et de celles de la littérature suggèrent que des neurones expiratoires et/ou pré-inspiratoires pourraient être impliqués (Moraes, 2012 ; 2012b ; Moraes, 2015 ; Da Silva, 2022 ; Molkov, 2011). Somme toute, cette décharge sympathique supplémentaire résulte du couplage entre des neurones respiratoires et des neurones présympathiques. Par ailleurs, chaque fois que cette composante sympathique supplémentaire du CRCV était présente, l'onde TH associée était amplifiée. Ce phénomène n'avait pour l'instant été décrit qu'en contexte pathologique, chez les rats HIC (Zoccal, 2008 ; Molkov, 2011 ; Machado, 2016 ; Zoccal, 2009). Mais le fait qu'il soit également présent après les hypoxies intermittentes, dans un contexte où le CRCV est modulé pour compenser la réduction en O_2 semble indiquer qu'en condition physiologique, ce mécanisme fait partie des réponses plastiques du CRCV mises en place afin d'optimiser les échanges gazeux lors d'une variation métabolique.

L'ensemble de nos résultats confirme que le CRCV joue un rôle central pour le maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine. La modulation fine de ses mécanismes centraux, leur plasticité et

la capacité du CRCV à intégrer les signaux des variations métaboliques grâce aux corps carotidiens permettent une adaptation précise de la coordination entre les systèmes respiratoires et cardiovasculaires et des échanges gazeux en fonction des besoins métaboliques.

3. Réflexions plus larges

3.1. Le complexe de pré-Bötzinger, plus qu'un générateur de rythme inspiratoire

Historiquement, le préBötC a été décrit comme la région qui génère le rythme inspiratoire (Smith, 1991). La compréhension des mécanismes de la rythmogenèse inspiratoire a donné, et donne toujours lieu à un grand nombre d'études (Ruangkittisakul, 2018 ; Smith, 2007 ; Tan, 2008 ; Menuet, 2020 ; Ausborn, 2018 ; Phillips & Baertsch, 2024 ; Ashhad, 2020). Les propriétés rythmogènes du préBötC sont généralement attribuées aux neurones excitateurs glutamatergiques plutôt qu'aux neurones inhibiteurs (Wang, 2014 ; Wallén-Mackenzie, 2006 ; Bouvier, 2010 ; Tan, 2008 ; Cui, 2016). La littérature est d'ailleurs moins fournie concernant les neurones inhibiteurs par rapport aux neurones excitateurs. Les études sur ces neurones, ainsi que nos résultats des modulations optogénétiques des neurones préBötC$^{OT\text{-}R;Glycine}$ et préBötC^{GABA}, montrent qu'ils ont un rôle dans la modulation du patron moteur respiratoire et dans la stabilisation du rythme (Baertsch, 2018 ; Sherman, 2015 ; Janczewski, 2013 ; Marchenko, 2016 ; Hirrlinger, 2019 ; Cheng, 2023). Toutefois, de plus en plus de travaux, incluant les nôtres, tendent à montrer que ces neurones ne modulent pas uniquement le patron respiratoire et qu'ils coordonneraient plusieurs comportements avec la respiration (Yackle & Do, 2025). Il a été démontré qu'ils sont impliqués dans la synchronisation de comportements naso-faciaux essentiels aux rongeurs pour l'exploration de leur environnement (Melo, 2023 ; Kurnikova, 2017 ; Deschênes, 2016), dans la vocalisation (Park, 2024), et nous démontrons qu'ils contribuent à générer le CRCV ainsi qu'à réguler la pression artérielle moyenne. Ces points soulèvent d'ailleurs la question de savoir si ces fonctions sont assurées par des sous-populations neuronales distinctes, ou si une même population de neurones inhibiteurs est capable de moduler simultanément plusieurs activités. Les neurones excitateurs du préBötC aussi pourraient avoir d'autres fonctions comme suggéré dans une étude récente postulant

que ces neurones seraient responsables des variations du diamètre de la pupille avec la respiration (Schaeffer, 2025).

Le préBötC, bien qu'il abrite les neurones responsables de la génération du rythme inspiratoire, semble remplir des fonctions plus larges que la seule rythmogenèse respiratoire. Il contient aussi des neurones inhibiteurs qui ne sont pas uniquement accessoires à la respiration mais qui sont plutôt des coordinateurs physiologiques majeurs. Le préBötC apparait donc davantage comme un nœud central respiratoire et de coordination multisystémique, orchestrant le rythme inspiratoire tout en modulant d'autres fonctions autonomes et motrices avec à la respiration.

3.2. Le CRCV, la poule ou l'œuf ?

Il est reconnu que les pathologies cardiovasculaires sont généralement associées à des altérations du CRCV (Thayer, 2010 ; Porter, 1990 ; Stevens, 2016). Parmi ces dysfonctionnements, on retrouve une forte réduction, voire une perte de la RespVRC et une exacerbation des ondes TH (La Rovere, 1998 ; Haigney, 2014 ; Narkiewicz, 1998 ; Xie, 2019 ; Simms, 2009 ; Menuet, 2017). La perte de la RespVRC est généralement associée aux dysfonctionnements du système nerveux autonome, en particulier l'hypoactivité parasympathique (Porter, 1990 ; La Rovere, 1998), et est plutôt considérée comme une conséquence secondaire de la pathologie. Cependant, il a été montré que la RespVRC est diminuée chez certains patients non atteints de pathologies. Puisque la fonction supposée de la RespVRC est d'optimiser l'efficacité de la fonction cardiaque en réduisant l'effort nécessaire au maintien de l'homéostasie gazeuse sanguine (Ben-Tal, 2012 ; Elstad, 2018), et que sa restauration chez un modèle animal d'insuffisance cardiaque chronique améliore la fonction cardiaque (O'Callaghan, 2020 ; Shanks, 2022), on pourrait envisager que sa disparition en condition basale entraîne une augmentation de la charge de travail du cœur. Cela pourrait à terme favoriser l'apparition de dysfonctionnements cardiaques, voire contribuer au développement d'une pathologie comme les insuffisances cardiaques. Cet aspect n'a jamais été testé mais l'inverse a été montré pour la composante vasculaire du CRCV. En effet, l'amplification des ondes TH a été montrée comme impliquée dans la mise en place d'une résistance vasculaire périphérique et de la mise en place d'hypertension (Menuet, 2017 ; Briant, 2015).

3.3. L'ocytocine, une perspective de traitement ?

Comme mentionné ci-dessus, les pathologies cardiovasculaires sont associées à la perte de la RespVRC et sa restauration améliore la condition cardiaque ainsi que la survie des modèles animaux d'insuffisance cardiaque. Cette réduction de la RespVRC semble liée à des altérations centrales du système parasympathique dont les mécanismes sont encore inconnus (Porter, 1990).

Nos travaux ont identifié un réseau neuronal central sur lequel l'ocytocine agit pour amplifier sélectivement la RespVRC en condition physiologique. Il serait intéressant de voir si l'ocytocine amplifie également la RespVRC chez le modèle rongeur d'insuffisance cardiaque chronique et si un traitement chronique à l'ocytocine améliore leur fonction cardiaque. En effet, l'ocytocine représente une piste thérapeutique potentielle intéressante pour plusieurs raisons. Premièrement, elle pourrait être administrée facilement aux patients et de manière non invasive par voie intranasale, qui est la voie couramment employée dans les études impliquant cette molécule et qui ont montré qu'elle amplifiait la RespVRC (Kemp, 2012 ; Cosme, 2023 ; Norman, 2011). D'ailleurs, l'administration intranasale d'ocytocine à des patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil diminuait le nombre d'apnées et augmentait la RespVRC, généralement réduite chez ces patients (Jain, 2017 ; Urbanik, 2019 ; Sequeira ; 2019). Ensuite, outre l'action centrale de l'ocytocine pour amplifier la RespVRC, elle a également des effets périphériques qui sont cardioprotecteurs (Kobayashi, 2009 ; Japundžić-Žigon, 2020 ; Bernatova, 2004 ; Wsol, 2008). Ainsi, même les effets périphériques des injections intranasales pourraient être bénéfiques. Enfin, des études cliniques utilisant les injections intranasales d'ocytocine dans un autre contexte ne rapportent aucun effet secondaire négatif à cette molécule (Tauber, 2017). L'ocytocine pourrait de fait représenter une thérapie envisageable pour essayer d'amplifier la RespVRC des patients cardiovasculaires et leur fonction cardiaque.

4. Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse contribuent à améliorer la compréhension des mécanismes centraux du couplage respiratoire et cardiovasculaire (CRCV), mettant un peu plus en lumière la complexité, la plasticité et le rôle physiologique de ce phénomène essentiel à

l'homéostasie gazeuse sanguine. Nous avons identifié une population de neurones respiratoires GABAergiques qui joue un rôle central dans la génération du CRCV *via* la modulation de l'activité parasympathique cardiaque et de l'activité sympathique vasomotrice, révélant leur fonction clé de coordinateurs physiologiques. Nous avons démontré une forme de plasticité physiologique du CRCV en condition de défi métabolique par la stimulation aiguë des corps carotidiens qui pourrait être impliquée dans certains mécanismes pathologiques. Enfin, nous avons identifié un mécanisme central d'amplification de la composante cardiaque du CRCV au sein du préBötC qui pourrait ouvrir la porte à des perspectives thérapeutiques. Bien que de nombreuses questions persistent, ces travaux posent les bases pour de futures recherches visant à améliorer les connaissances des mécanismes du CRCV en condition physiologique et pathologique, avec l'espoir que cela soit un jour au bénéfice de la santé cardiovasculaire.

Au XVIIIe siècle, le duc de Lévis affirmait : « *Rien n'assure mieux le repos du cœur que le travail de l'esprit* » et il était très certainement loin de se douter de la justesse de sa maxime.

Bibliographie

A

Abbott, S B G et al. “Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats.” *The Journal of physiology* vol. 587,Pt 23 (2009): 5613-31.

Abdala, A P L et al. “Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation.” *The Journal of physiology* vol. 587,Pt 14 (2009): 3539-59.

Abraham, W T et al. “Cardiac resynchronization in chronic heart failure.” *The New England journal of medicine* vol. 346,24 (2002): 1845-53.

Adrian, E D et al. “Discharges in mammalian sympathetic nerves.” *The Journal of physiology* vol. 74,2 (1932): 115-33.

Alberts, B, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4e éd., Garland Science, 2002.

AlGhatrif, M and J Lindsay. “A brief review: history to understand fundamentals of electrocardiography.” *Journal of community hospital internal medicine perspectives* vol. 2,1 10.3402/jchimp.v2i1.14383. 30 Apr. 2012

Alheid, George F, and Donald R McCrimmon. “The chemical neuroanatomy of breathing.” *Respiratory physiology & neurobiology* vol. 164,1-2 (2008): 3-11

Allen, A M et al. “Expression of constitutively active angiotensin receptors in the rostral ventrolateral medulla increases blood pressure.” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* vol. 47,6 (2006): 1054-61.

Amorim, M R et al. “Changes in the inspiratory pattern contribute to modulate the sympathetic activity in sino-aortic denervated rats.” *Experimental physiology* vol. 102,9 (2017): 1100-1117.

Anderson, P, and N Kedersha. “RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression.” *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 10,6 (2009): 430-6.

Anderson, T M et al. “A novel excitatory network for the control of breathing.” *Nature* vol. 536,7614 (2016): 76-80

Angell-James, J E, and M D Daly. “The effects of artificial lung inflation on reflexly induced bradycardia associated with apnoea in the dog.” *The Journal of physiology* vol. 274 (1978): 349-66.

Ashhad, S, and J L Feldman. “Emergent Elements of Inspiratory Rhythmogenesis: Network Synchronization and Synchrony Propagation.” *Neuron* vol. 106,3 (2020): 482-497.e4.

Aubrey, K R, and S Supplisson. “Heterogeneous Signaling at GABA and Glycine Co-releasing Terminals.” *Frontiers in synaptic neuroscience* vol. 10 40. 6 Nov. 2018,

Ausborn, J et al. “Organization of the core respiratory network: Insights from optogenetic and modeling studies.” *PLoS computational biology* vol. 14,4 e1006148. 26 Apr. 2018

B

Bachoo, M, and C Polosa. “Properties of a sympatho-inhibitory and vasodilator reflex evoked by superior laryngeal nerve afferents in the cat.” *The Journal of physiology* vol. 364 (1985): 183-98.

Baekey, D M et al. “Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions.” *Respiratory*

physiology & neurobiology vol. 174,1-2 (2010): 135-45.

Baekey, D M et al. “Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation.” *Experimental physiology* vol. 93,7 (2008): 803-16.

Baekey, D M et al. “Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation.” *Experimental physiology* vol. 93,7 (2008): 803-16.

Baertsch, N A et al. “The interdependence of excitation and inhibition for the control of dynamic breathing rhythms.” *Nature communications* vol. 9,1 843. 26 Feb. 2018

Balzarotti, S et al. “Cardiac vagal control as a marker of emotion regulation in healthy adults: A review.” *Biological psychology* vol. 130 (2017): 54-66.

Barnett, W H et al. “Traube-Hering waves are formed by interaction of respiratory sinus arrhythmia and pulse pressure modulation in healthy men.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 129,5 (2020): 1193-1202.

Bautista, T G et al. "The Brainstem Respiratory Network." *Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics*, Academic Press, 2014, pp. 235-245.

Bellosta-Batalla, M et al. “Brief mindfulness session improves mood and increases salivary oxytocin in psychology students.” *Stress and health : journal of the International Society for the Investigation of Stress* vol. 36,4 (2020): 469-477.

Ben-Tal, A et al. “Evaluating the physiological significance of respiratory sinus arrhythmia: looking beyond ventilation-perfusion efficiency.” *The Journal of physiology* vol. 590,8 (2012): 1989-2008.

Bernatova, I et al. “Stress-induced pressor and corticosterone responses in oxytocin-deficient mice.” *Experimental physiology* vol. 89,5 (2004): 549-57.

Biancardi, Vivian et al. “Mapping of the excitatory, inhibitory, and modulatory afferent projections to the anatomically defined active expiratory oscillator in adult male rats.” *The Journal of comparative neurology* vol. 529,4 (2021): 853-884.

Bianchi, A L et al. “Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters.” *Physiological reviews* vol. 75,1 (1995): 1-45

Bianchi, A L, and C Gestreau. “The brainstem respiratory network: an overview of a half century of research.” *Respiratory physiology & neurobiology* vol. 168,1-2 (2009): 4-12.

Bieger, D, and D A Hopkins. “Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus.” *The Journal of comparative neurology* vol. 262,4 (1987): 546-62.

Billman, G E. “Heart rate variability - a historical perspective.” *Frontiers in physiology* vol. 2 86. 29 Nov. 2011,

Bisgard, G E et al. “Recovery of peripheral chemoreceptor function after denervation in ponies.” *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* vol. 49,6 (1980): 964-70.

Blinks, J R. “Positive chronotropic effect of increasing right atrial pressure in the isolated mammalian heart.” *The American journal of physiology* vol. 186,2 (1956): 299-303.

Boscan, P et al. “Baroreflex inhibition of cardiac sympathetic outflow is attenuated by angiotensin II in the nucleus of the solitary tract.”

Neuroscience vol. 103,1 (2001): 153-60. doi:10.1016/s0306-4522(00)00559-5

Bouairi, E et al. “Respiratory sinus arrhythmia in freely moving and anesthetized rats.” Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) vol. 97,4 (2004): 1431-6.

Bouvier, J et al. “Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing.” *Nature neuroscience* vol. 13,9 (2010): 1066-74.

Bowman, B R et al. “Brain sources of inhibitory input to the rat rostral ventrolateral medulla.” *The Journal of comparative neurology* vol. 521,1 (2013): 213-32.

Braga, D C et al. “Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia.” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* vol. 278,6 (2000): R1474-82.

Braga, V A et al. “Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation.” *The Journal of physiology* vol. 581,Pt 3 (2007): 1129-45.

Braga, V A, and Benedito H Machado. “Chemoreflex sympathoexcitation was not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural nucleus tractus solitarii in the working heart-brainstem preparation of rats.” *Experimental physiology* vol. 91,3 (2006): 551-9.

Briant, L J B et al. “Modelling the vascular response to sympathetic postganglionic nerve activity.” *Journal of theoretical biology* vol. 371 (2015b): 102-16.

Briant, L J B et al. “Respiratory modulated sympathetic activity: a putative mechanism for developing vascular resistance?” *The Journal of physiology* vol. 593,24 (2015): 5341-60.

Brouwers, S et al. “Arterial hypertension.” *Lancet (London, England)* vol. 398,10296 (2021): 249-261.

Brown, D L, and P G Guyenet. “Cardiovascular neurons of brain stem with projections to spinal cord.” *The American journal of physiology* vol. 247,6 Pt 2 (1984): R1009-16.

Brown, D L, and P G Guyenet. “Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats.” *Circulation research* vol. 56,3 (1985): 359-69.

Brunner, M J et al. “Carotid sinus baroreceptor reflex control of respiration.” *Circulation research* vol. 51,5 (1982): 624-36.

Bui, T V et al. “Accuracy of cuff blood pressure and systolic blood pressure amplification.” *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* vol. 46,8 (2023): 1961-1969.

Buron, J, et al**.** "The Oxytocin-Modulated Brain Circuit That Synchronizes Heart Rate with Breathing." *Accepted in Nature Neuroscience*, 26 Sept. 2023

Bush, N E, and JM Ramirez. “Latent neural population dynamics underlying breathing, opioid-induced respiratory depression and gasping.” *Nature neuroscience* vol. 27,2 (2024): 259-271.

C

Carlson, J T., et al. "Augmented Resting Sympathetic Activity in Awake Patients with Obstructive Sleep Apnea." *Chest*, vol. 103, no. 6, 1993, pp. 1763-1768.

Carroll, M S et al. “Patterns of inspiratory phase-dependent activity in the in vitro respiratory

network.” *Journal of neurophysiology* vol. 109,2 (2013): 285-95.

Carvalho, O and Gonçalves, C A. "Comparative Physiology of the Respiratory System in the Animal Kingdom." *The Open Biology Journal*, vol. 4, no. 1, Mar. 2011, p. 35

Chang, Z et al. “Inhibitory subpopulations in preBötzinger Complex play distinct roles in modulating inspiratory rhythm and pattern.” *bioRxiv : the preprint server for biology* 2023.08.07.552303. 1 Sep. 2023

Charkoudian, N, and B G Wallin. “Sympathetic neural activity to the cardiovascular system: integrator of systemic physiology and interindividual characteristics.” *Comprehensive Physiology* vol. 4,2 (2014): 825-50.

Charpak, S et al. “Stimulatory action of oxytocin on neurones of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve.” *Brain research* vol. 300,1 (1984): 83-9.

Chauhan, R A et al. “Functional selectivity of cardiac preganglionic sympathetic neurones in the rabbit heart.” *International journal of cardiology* vol. 264 (2018): 70-78.

Cheng, Z et al. “Attenuation of baroreflex sensitivity after domoic acid lesion of the nucleus ambiguus of rats.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 96,3 (2004): 1137-45.

Conci, F et al. “Blood pressure and heart rate variability and baroreflex sensitivity before and after brain death.” *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* vol. 71,5 (2001): 621-31.

Coote, J H. “A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney.” *Experimental physiology* vol. 90,2 (2005): 169-73.

Cosme, G et al. “Temporal profile of intranasal oxytocin in the human autonomic nervous system at rest: An electrocardiography and pupillometry study.” *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* vol. 37,6 (2023): 566-576.

Costa, K M et al. “Evolution and physiology of neural oxygen sensing.” *Frontiers in physiology* vol. 5 302. 12 Aug. 2014,

Coverdell, T C et al. “Molecular cell types as functional units of the efferent vagus nerve.” *Seminars in cell & developmental biology* vol. 156 (2024): 210-218.

Cravo, S L, and S F Morrison. “The caudal ventrolateral medulla is a source of tonic sympathoinhibition.” *Brain research* vol. 621,1 (1993): 133-6. doi:10.1016/0006-8993(93)90308-a

Crystal, G J, and M R Salem. “The Bainbridge and the "reverse" Bainbridge reflexes: history, physiology, and clinical relevance.” Anesthesia and analgesia vol. 114,3 (2012): 520-32.

Cui, Y et al. “Defining preBötzinger Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits In Vivo.” *Neuron* vol. 91,3 (2016): 602-14.

Czyzyk-Krzeska, M F, and A Trzebski. “Respiratory-related discharge pattern of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat.” *The Journal of physiology* vol. 426 (1990): 355-68.

D

Da Silva, M P et al. “Peripheral chemoreflex activation induces expiratory but not inspiratory excitation of C1 pre-sympathetic neurones of rats.” *Acta physiologica (Oxford, England)* vol. 235,4 (2022): e13853.

Daly, M B, and E Kirkman. “Differential modulation by pulmonary stretch afferents of some reflex

cardioinhibitory responses in the cat." *The Journal of physiology* vol. 417 (1989): 323-41.

Dampney, R A et al. "Role of ventrolateral medulla in vasomotor regulation: a correlative anatomical and physiological study." *Brain research* vol. 249,2 (1982): 223-35.

Dampney, R A. "Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system." *Physiological reviews* vol. 74,2 (1994): 323-64.

Darnall, R A, and P Guyenet. "Respiratory modulation of pre- and postganglionic lumbar vasomotor sympathetic neurons in the rat." Neuroscience letters vol. 119,2 (1990): 148-52

Davies, C T, and J M Neilson. "Sinus arrhythmia in man at rest." *Journal of applied physiology* vol. 22,5 (1967): 947-55.

De Meersman, R E. "Respiratory sinus arrhythmia alteration following training in endurance athletes." *European journal of applied physiology and occupational physiology* vol. 64,5 (1992): 434-6

De Meersman, R E. "Heart rate variability and aerobic fitness." *American heart journal* vol. 125,3 (1993): 726-31.

Del Negro, C A et al. "Breathing matters." *Nature reviews. Neuroscience* vol. 19,6 (2018): 351-367.

Del Rio, R et al. "Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* vol. 68,2 (2016): 436-45.

Del Rio, R et al. "Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link." *The European respiratory journal* vol. 36,1 (2010): 143-50.

Del Rio, R et al. "Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function." *Journal of the American College of Cardiology* vol. 62,25 (2013): 2422-2430.

Dempsey, J A et al. "Respiratory influences on sympathetic vasomotor outflow in humans." *Respiratory physiology & neurobiology* vol. 130,1 (2002): 3-20.

Dempsey, B et al. "Mapping and Analysis of the Connectome of Sympathetic Premotor Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla of the Rat Using a Volumetric Brain Atlas." *Frontiers in neural circuits* vol. 11 9. 1 Mar. 2017

Dempsey, J A. "Central sleep apnea: misunderstood and mistreated!." *F1000Research* vol. 8 F1000 Faculty Rev-981. 28 Jun. 2019

Dergacheva, O et al. "Respiratory modulation of premotor cardiac vagal neurons in the brainstem." *Respiratory physiology & neurobiology* vol. 174,1-2 (2010): 102-10.

Deschênes, M et al. "Inhibition, Not Excitation, Drives Rhythmic Whisking." *Neuron* vol. 90,2 (2016): 374-87.

Di Rienzo, M et al. "Role of sinoaortic afferents in modulating BP and pulse-interval spectral characteristics in unanesthetized cats." *The American journal of physiology* vol. 261,6 Pt 2 (1991): H1811-8.

Dick, T E et al. "Increased cardio-respiratory coupling evoked by slow deep breathing can persist in normal humans." Respiratory physiology & neurobiology vol. 204 (2014): 99-111

Dornhorst, A C et al. "Respiratory variations in blood pressure." *Circulation* vol. 6,4 (1952): 553-8.

Dutschmann, M, and H Herbert. "The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat." *The European journal of neuroscience* vol. 24,4 (2006): 1071-84.

Dutschmann, M, and T E Dick. "Pontine mechanisms of respiratory control."

Comprehensive Physiology vol. 2,4 (2012): 2443-69.

E

Eckberg, D L et al. “Respiratory modulation of muscle sympathetic and vagal cardiac outflow in man.” *The Journal of physiology* vol. 365 (1985): 181-96.

Edwards, C. *"The Carotid Body in Emphysema and Left Ventricular Hypertrophy." The Journal of Pathology*, vol. 104, no. 1, May 1971, pp. 1-13.

Elstad, M et al. “Cardiorespiratory interactions in humans and animals: rhythms for life.” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* vol. 315,1 (2018): H6-H17.

Elstad, M et al. “Respiratory sinus arrhythmia stabilizes mean arterial blood pressure at high-frequency interval in healthy humans.” *European journal of applied physiology* vol. 115,3 (2015): 521-30.

Emiliani, V et al. “Optogenetics for light control of biological systems.” *Nature reviews. Methods primers* vol. 2 (2022): 55.

Ezure, K et al. “Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat.” *Neuroscience research* vol. 45,1 (2003): 41-51.

Ezure, K, and I Tanaka. “Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat.” *Neuroscience* vol. 141,2 (2006): 1011-1023.

F

Farmer, D G S et al. “Brainstem sources of cardiac vagal tone and respiratory sinus arrhythmia.” *The Journal of physiology* vol. 594,24 (2016): 7249-7265.

Fatouleh, R, et al. "Respiratory Modulation of Muscle Sympathetic Nerve Activity in Obstructive Sleep Apnoea." *Experimental Physiology*, vol. 99, no. 10, 2014, pp. 1288-1298.

Fazan, R Jr et al. “Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice.” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* vol. 289,5 (2005): H1968-75.

Feldberg, W, and P G Guertzenstein. “A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium.” *The Journal of physiology* vol. 224,1 (1972): 83-103.

Feldman, R et al. “Natural variations in maternal and paternal care are associated with systematic changes in oxytocin following parent-infant contact.” *Psychoneuroendocrinology* vol. 35,8 (2010): 1133-41.

Ferreira, C B et al. “Brainstem areas activated by intermittent apnea in awake unrestrained rats.” Neuroscience vol. 297 (2015): 262-71.

Finley, J C et al. “Transmitter diversity in carotid body afferent neurons: dopaminergic and peptidergic phenotypes.” *Neuroscience* vol. 51,4 (1992): 973-87

Finley, J C, and D M Katz. “The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat.” *Brain research* vol. 572,1-2 (1992): 108-16.

Fisher, J P et al. “Respiratory-cardiovascular interactions.” *Handbook of clinical neurology* vol. 188 (2022): 279-308.

Fletcher, E C et al. “Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 72,5 (1992b): 1978-84.

Fletcher, E. C., et al. "Repetitive, Episodic Hypoxia Causes Diurnal Elevation of Blood Pressure in Rats." *Hypertension*, vol. 19, no. 6, 1992a, pp. 555-561.

Flor, K C et al. “Inhibitory control of active expiration by the Bötzinger complex in rats.” *The Journal of physiology* vol. 598,21 (2020): 4969-4994.

Frank, J G et al. “Mapping and identification of GABAergic neurons in transgenic mice projecting to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus using photo-uncaging.” *Journal of neurophysiology* vol. 101,4 (2009): 1755-60.

Furdui, A et al. “Anatomical distribution of μ-opioid receptors, neurokinin-1 receptors, and vesicular glutamate transporter 2 in the mouse brainstem respiratory network.” *Journal of neurophysiology* vol. 132,1 (2024): 108-129.

Furuya, W I et al. “Differential modulation of sympathetic and respiratory activities by cholinergic mechanisms in the nucleus of the solitary tract in rats.” *Experimental physiology* vol. 99,5 (2014): 743-58.

G

Gaye, B et al. “Association between change in heart rate over years and life span in the Paris Prospective 1, the Whitehall 1, and Framingham studies.” *Scientific reports* vol. 14,1 20052. 29 Aug. 2024

GBD Risk Factors Collaborators "Global Burden of 87 Risk Factors in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019." *The Lancet*, vol. 396, no. 10258, 2020, pp. 1223–1249.

Geis, G S, and R D Wurster. “Cardiac responses during stimulation of the dorsal motor nucleus and nucleus ambiguus in the cat.” *Circulation research* vol. 46,5 (1980): 606-11

Gestreau, C et al. “Activity of respiratory laryngeal motoneurons during fictive coughing and swallowing.” *Experimental brain research* vol. 130,1 (2000): 27-34.

Giannino, G et al. “The Intrinsic Cardiac Nervous System: From Pathophysiology to Therapeutic Implications.” *Biology* vol. 13,2 105. 7 Feb. 2024,

Giardino, N D et al. “Respiratory sinus arrhythmia is associated with efficiency of pulmonary gas exchange in healthy humans.” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* vol. 284,5 (2003): H1585-91.

Gilbey, M P et al. “Synaptic mechanisms involved in the inspiratory modulation of vagal cardio-inhibitory neurones in the cat.” *The Journal of physiology* vol. 356 (1984): 65-78

Giuliano, R J et al. “Growth models of dyadic synchrony and mother-child vagal tone in the context of parenting at-risk.” *Biological psychology* vol. 105 (2015): 29-36.

Gonzalez ER et al. Central resetting of baroreflex in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension. 1983 May-Jun;5(3):346-52.

Gordan, R et al. “Autonomic and endocrine control of cardiovascular function.” *World journal of cardiology* vol. 7,4 (2015): 204-14.

Gordon, F J. “Aortic baroreceptor reflexes are mediated by NMDA receptors in caudal ventrolateral medulla.” *The American journal of physiology* vol. 252,3 Pt 2 (1987): R628-33

Gourine, A V et al. “Cardiac vagal preganglionic neurones: An update.” *Autonomic neuroscience : basic & clinical* vol. 199 (2016): 24-8.

Grassi, G et al. “Sympathetic and baroreflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular dysfunction.” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* vol. 53,2 (2009): 205-9.

Grassi, G et al. “The sympathetic nervous system alterations in human hypertension.” *Circulation research* vol. 116,6 (2015): 976-90.

Gray, P A et al. “Developmental origin of preBötzinger complex respiratory neurons.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 30,44 (2010): 14883-95.

Gray, P A et al. “Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons.” *Nature neuroscience* vol. 4,9 (2001): 927-30

Grélot, L et al. “Pharyngeal motoneurones: respiratory-related activity and responses to laryngeal afferents in the decerebrate cat.” *Experimental brain research* vol. 78,2 (1989): 336-44.

Griffiths, P R et al. “Vasopressin V1a receptors mediate the hypertensive effects of [Pyr^{1}]apelin-13 in the rat rostral ventrolateral medulla.” *The Journal of physiology* vol. 595,11 (2017): 3303-3318.

Grimaud, J, and V N Murthy. “How to monitor breathing in laboratory rodents: a review of the current methods.” *Journal of neurophysiology* vol. 120,2 (2018): 624-632

Grippo, A J et al. “Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression.” *Physiology & behavior* vol. 78,4-5 (2003): 703-10.

Grkovic, I et al. “Misidentification of cardiac vagal pre-ganglionic neurons after injections of retrograde tracer into the pericardial space in the rat.” *Cell and tissue research* vol. 321,3 (2005): 335-40.

Guertzenstein, P G, and A Silver. “Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions.” *The Journal of physiology* vol. 242,2 (1974): 489-503.

Guyenet, P G et al. “C1 neurons: the body's EMTs.” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* vol. 305,3 (2013): R187-204.

Guyenet, P G et al. “Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats.” *The American journal of physiology* vol. 259,5 Pt 2 (1990): R1063-74.

Guyenet, P G. “The sympathetic control of blood pressure.” *Nature reviews. Neuroscience* vol. 7,5 (2006): 335-46.

H

Häbler, H J et al. “Respiratory modulation in the activity of sympathetic neurones.” *Progress in neurobiology* vol. 43,6 (1994): 567-606.

Haigney, M et al. “Assessing the interaction of respiration and heart rate in heart failure and controls using ambulatory Holter recordings.” *Journal of electrocardiology* vol. 47,6 (2014): 831-5.

Harb, A et al. “The Relative Contribution of Glycine-GABA Cotransmission in the Core of the Respiratory Network.” *International journal of molecular sciences* vol. 25,6 3128. 8 Mar. 2024,

Hartmann, R et al. “Heart Rate Variability as Indicator of Clinical State in

Depression." *Frontiers in psychiatry* vol. 9 735. 17 Jan. 2019,

Haselton, J R, and P G Guyenet. "Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat." *The American journal of physiology* vol. 256,3 Pt 2 (1989): R739-50.

Hayano, J et al. "Respiratory sinus arrhythmia. A phenomenon improving pulmonary gas exchange and circulatory efficiency." *Circulation* vol. 94,4 (1996): 842-7.

Heidenreich, P A et al. "2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines." *Circulation* vol. 145,18 (2022): e895-e1032.

Hew-Butler, T et al. "Acute changes in endocrine and fluid balance markers during high-intensity, steady-state, and prolonged endurance running: unexpected increases in oxytocin and brain natriuretic peptide during exercise." European journal of endocrinology vol. 159,6 (2008): 729-37.

Higa, K T et al. "Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* vol. 282,2 (2002): R537-45.

Hirrlinger, J et al. "GABA-Glycine Cotransmitting Neurons in the Ventrolateral Medulla: Development and Functional Relevance for Breathing." *Frontiers in cellular neuroscience* vol. 13 517. 19 Nov. 2019,

Hochleitner, M et al. "Usefulness of physiologic dual-chamber pacing in drug-resistant idiopathic dilated cardiomyopathy." *The American journal of cardiology* vol. 66,2 (1990): 198-202.

Hou, H et al. "Association of obstructive sleep apnea with hypertension: A systematic review and meta-analysis." *Journal of global health* vol. 8,1 (2018): 010405.

Huber, D et al. "Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala." *Science (New York, N.Y.)* vol. 308,5719 (2005): 245-8.

I

Iturriaga, R et al. "Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease." *Physiological reviews* vol. 101,3 (2021): 1177-1235.

J

Jalil, M et al. "Molecular Disambiguation of Heart Rate Control by the Nucleus Ambiguus." *bioRxiv : the preprint server for biology* 2023.12.16.571991. 17 Dec. 2023,

Janczewski, W A et al. "Role of inhibition in respiratory pattern generation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 33,13 (2013): 5454-65.

Jankowski, M et al. "Rat heart: a site of oxytocin production and action." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95,24 (1998): 14558-63.

Japundžić-Žigon, N et al. "Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review." *Current neuropharmacology* vol. 18,1 (2020): 14-33.

Jayaram, N et al. "Effect of yoga therapy on plasma oxytocin and facial emotion recognition deficits in patients of schizophrenia." *Indian journal of*

psychiatry vol. 55, Suppl 3 (2013): S409-13. doi:10.4103/0019-5545.

Jerath, R et al. “Self-regulation of breathing as a primary treatment for anxiety.” *Applied psychophysiology and biofeedback* vol. 40,2 (2015): 107-15.

Jiang, C, and J Lipski. “Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Bötzinger complex in the cat.” *Experimental brain research* vol. 81,3 (1990): 639-48.

Jong, T R de et al. “Salivary oxytocin concentrations in response to running, sexual self-stimulation, breastfeeding and the TSST: The Regensburg Oxytocin Challenge (ROC) study.” *Psychoneuroendocrinology* vol. 62 (2015): 381-8.

Julius, S. “Autonomic nervous system dysregulation in human hypertension.” *The American journal of cardiology* vol. 67,10 (1991): 3B-7B.

K

Kim, D, et al. "Recent Developments in Wearable Breath Sensors for Healthcare Monitoring." *Communications Materials*, vol. 5, no. 41, 2024,

Karlen-Amarante, M et al. “Postinspiratory and preBötzinger complexes contribute to respiratory-sympathetic coupling in mice before and after chronic intermittent hypoxia.” *Frontiers in neuroscience* vol. 18 1386737. 6 May. 2024

Kc, P et al. “Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites.” *Respiratory physiology & neurobiology* vol. 133,1-2 (2002): 75-88.

Kemp, A H et al. “Oxytocin increases heart rate variability in humans at rest: implications for social approach-related motivation and capacity for social engagement.” *PloS one* vol. 7,8 (2012): e44014.

Klabunde, R E. *Cardiovascular Physiology Concepts*. 3rd ed., Wolters Kluwer Health, 2020.

Kline, DD et al. “Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 99,2 (2002): 821-6.

Kobayashi, H et al. “Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis.” *Journal of cardiovascular pharmacology* vol. 54,6 (2009): 510-9.

Koizumi, K, and M de. “Control of reciprocal and non-reciprocal action of vagal and sympathetic efferents: study of centrally induced reactions.” *Journal of the autonomic nervous system* vol. 3,2-4 (1981): 483-501.

Koizumi, H et al. “Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Botzinger complex respiratory microcircuits.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 33,7 (2013): 2994-3009.

Korsak, A et al. “Immediate and sustained increases in the activity of vagal preganglionic neurons during exercise and after exercise training.” *Cardiovascular research* vol. 119,13 (2023): 2329-2341.

Kubin, L et al. “Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 101,2 (2006): 618-27.

Kurnikova, A et al. “Coordination of Orofacial Motor Actions into Exploratory Behavior by

Rat." *Current biology : CB* vol. 27,5 (2017): 688-696.

Kuwana, S et al. "Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Bötzinger complex." *The European journal of neuroscience* vol. 23,3 (2006): 667-74.

L

La Rovere, M T et al. "Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators." *Lancet (London, England)* vol. 351,9101 (1998): 478-84.

La Rovere, M T, and D D Pinna. "Beneficial effects of physical activity on baroreflex control in the elderly." *Annals of noninvasive electrocardiology : the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc* vol. 19,4 (2014): 303-10.

Laske, T G et al. "Extreme respiratory sinus arrhythmia enables overwintering black bear survival--physiological insights and applications to human medicine." *Journal of cardiovascular translational research* vol. 3,5 (2010): 559-69.

Lau, E O-C et al. "Aortic Baroreceptors Display Higher Mechanosensitivity than Carotid Baroreceptors." *Frontiers in physiology* vol. 7 384. 31 Aug. 2016,

Lee, R M et al. "Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* vol. 10,3 (1987): 328-38.

Levine, H J. "Rest heart rate and life expectancy." *Journal of the American College of Cardiology* vol. 30,4 (1997): 1104-6

Li, H et al. "Single-neuron projectomes of mouse paraventricular hypothalamic nucleus oxytocin neurons reveal mutually exclusive projection patterns." *Neuron* vol. 112,7 (2024): 1081-1099.e7.

Li, Z et al. "Responses of simultaneously recorded respiratory-related medullary neurons to stimulation of multiple sensory modalities." *Journal of neurophysiology* vol. 82,1 (1999): 176-87.

Lipski, J et al. "Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study "in vivo"." *The Journal of physiology* vol. 490 (Pt 3),Pt 3 (1996): 729-44.

Lloyd-Jones, D M et al. "Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study." *Circulation* vol. 106,24 (2002): 3068-72.

Long, A.A. (2021). Pneumatic Episodes from Homer to Galen. In: Fuller, D., Saunders, C., Macnaughton, J. (eds) The Life of Breath in Literature, Culture and Medicine. Palgrave Studies in Literature, Science and Medicine. Palgrave Macmillan, Cham

López-Barneo, J et al. "Chemotransduction in the carotid body: K+ current modulated by PO2 in type I chemoreceptor cells." *Science (New York, N.Y.)* vol. 241,4865 (1988): 580-2.

Lu, T et al. "Glycinergic transmission shaped by the corelease of GABA in a mammalian auditory synapse." *Neuron* vol. 57,4 (2008): 524-35.

M

Machado, B H., et al. "Neurogenic Hypertension and the Secrets of Respiration." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 312, no. 6, 2017, pp. R864-R872, 2016

Machhada, A et al. “Origins of the vagal drive controlling left ventricular contractility.” *The Journal of physiology* vol. 594,14 (2016): 4017-30.

Mack, S. O., et al. "Paraventricular Oxytocin Neurons Are Involved in Neural Modulation of Breathing." *Journal of Applied Physiology*, vol. 92, no. 2, 2002, pp. 826-834.

Mack, S O et al. “Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 102,1 (2007): 189-99.

Madden, C J, and A F Sved. “Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats.” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* vol. 285,6 (2003): H2734-48.

Madden, C J et al. “Attenuation of homeostatic responses to hypotension and glucoprivation after destruction of catecholaminergic rostral ventrolateral medulla neurons.” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* vol. 291,3 (2006): R751-9.

Mandel, D A, and Ann M Schreihofer. “Central respiratory modulation of barosensitive neurones in rat caudal ventrolateral medulla.” *The Journal of physiology* vol. 572,Pt 3 (2006): 881-96.

Manning, M et al. “Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics.” *Journal of neuroendocrinology* vol. 24,4 (2012): 609-28.

Marchenko, V et al. “Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Bötzinger and Bötzinger Complexes.” *eNeuro* vol. 3,2 ENEURO.0011-16.2016. 13 May. 2016,

Marina, N et al. “Control of sympathetic vasomotor tone by catecholaminergic C1 neurones of the rostral ventrolateral medulla oblongata.” *Cardiovascular research* vol. 91,4 (2011): 703-10.

Massey, C A, and G B Richerson. “Isoflurane, ketamine-xylazine, and urethane markedly alter breathing even at subtherapeutic doses.” *Journal of neurophysiology* vol. 118,4 (2017): 2389-2401.

McAllen, R M, and K M Spyer. “The location of cardiac vagal preganglionic motoneurones in the medulla of the cat.” *The Journal of physiology* vol. 258,1 (1976): 187-204.

McAllen, R M, and K M Spyer. “Two types of vagal preganglionic motoneurones projecting to the heart and lungs.” *The Journal of physiology* vol. 282 (1978a): 353-64.

McAllen, R M, and K M Spyer. “The baroreceptor input to cardiac vagal motoneurones.” *The Journal of physiology* vol. 282 (1978b): 365-74.

McDonagh, T A et al. “2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.” *European heart journal* vol. 42,36 (2021): 3599-3726.

McMullan, S et al. “Effects of baroreceptor activation on respiratory variability in rat.” *Respiratory physiology & neurobiology* vol. 166,2 (2009): 80-6.

McMullan, S. "Identification of Spinally Projecting Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla In Vivo." *Stimulation and Inhibition of Neurons*, edited by Paul M. Pilowsky et al., vol. 78, Humana Press, 2013, pp. 123-140.

Melo, M R et al. “Selective transduction and photoinhibition of pre-Bötzinger complex neurons that project to the facial nucleus in rats affects nasofacial activity.” *eLife* vol. 12 e85398. 29 Sep. 2023,

Mendelowitz, D, and D L Kunze. “Identification and dissociation of cardiovascular neurons from the medulla for patch clamp analysis.” *Neuroscience letters* vol. 132,2 (1991): 217-21.

Mendelowitz, D. “Firing properties of identified parasympathetic cardiac neurons in nucleus ambiguus.” *The American journal of physiology* vol. 271,6 Pt 2 (1996): H2609-14.

Menuet, C et al. “Catecholaminergic C3 neurons are sympathoexcitatory and involved in glucose homeostasis.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 34,45 (2014): 15110-22.

Menuet, C et al. “Excessive Respiratory Modulation of Blood Pressure Triggers Hypertension.” *Cell metabolism* vol. 25,3 (2017): 739-748.

Menuet, C et al. “PreBötzinger complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate.” *eLife* vol. 9 e57288. 15 Jun. 2020

Merchenthaler, I. “Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: a retrograde tracing study with fluoro-gold.” *Neuroscience* vol. 44,3 (1991): 655-62.

Miyawaki, T et al. “Central inspiration increases barosensitivity of neurons in rat rostral ventrolateral medulla.” *The American journal of physiology* vol. 268,4 Pt 2 (1995): R909-18.

Miyawaki, T et al. “Role of AMPA/kainate receptors in transmission of the sympathetic baroreflex in rat CVLM.” *The American journal of physiology* vol. 272,3 Pt 2 (1997): R800-12.

Molkov, Y I et al. “Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats.” *Journal of neurophysiology* vol. 105,6 (2011): 3080-91.

Monahan-Earley, R et al. “Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium.” *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* vol. 11 Suppl 1,Suppl 1 (2013): 46-66.

Montano, N et al. “Effects of spinal section and of positive-feedback excitatory reflex on sympathetic and heart rate variability.” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* vol. 36,6 (2000): 1029-34.

Moraes, D J A et al. “Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats.” *Journal of neurophysiology* vol. 108,3 (2012): 882-90.

Moraes, D J A et al. “Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Bötzinger complex of rats.” *Journal of neurophysiology* vol. 108,2 (2012): 610-23.

Moraes, D J A et al. “Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 33,49 (2013): 19223-37.

Moraes, D J A et al. "Specific Respiratory Neuron Types Have Increased Excitability That Drive Presympathetic Neurones in Neurogenic Hypertension." *Hypertension*, vol. 63, no 6, (2014), pp. 1309-1318. American Heart Association,

Moraes, D J A et al. “Coupling of respiratory and sympathetic activities in rats submitted to chronic intermittent hypoxia.” *Progress in brain research* vol. 212 (2014b): 25-38.

Moraes, D J A et al. “Carotid body overactivity induces respiratory neurone channelopathy

contributing to neurogenic hypertension." *The Journal of physiology* vol. 593,14 (2015): 3055-63.

Morgado-Valle, C et al. "Glycinergic pacemaker neurons in preBötzinger complex of neonatal mouse." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 30,10 (2010): 3634-9.

Morrison SF. Glutamate transmission in the rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor pathway. Cell Mol Neurobiol. 2003 Oct;23(4-5):761-72.

N

Narita, K, et al. "Short- to Long-Term Blood Pressure Variability: Current Evidence and New Evaluations." *Hypertension Research*, vol. 46, no. 5, 2023, pp. 950–958.

Narkiewicz, K et al. "Unilateral Carotid Body Resection in Resistant Hypertension: A Safety and Feasibility Trial." *JACC. Basic to translational science* vol. 1,5 313-324. 29 Aug. 2016,

Narkiewicz, K, et al. "Contribution of Tonic Chemoreflex Activation to Sympathetic Activity and Blood Pressure in Patients with Obstructive Sleep Apnea." *Circulation*, vol. 97, no. 10, 1998, pp. 943-945.

Narkiewicz, K, et al. "Selective Potentiation of Peripheral Chemoreflex Sensitivity in Obstructive Sleep Apnea." *Circulation*, vol. 99, no. 9, 1999, pp. 1183-1189.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). "Worldwide Trends in Hypertension Prevalence, Detection, Treatment, and Control from 1990 to 2019: A Pooled Analysis of 1201 Population-Representative Studies with 104 Million Participants." *The Lancet*, vol. 398, no. 10304, 2021, pp. 957-980.

Nederend, Idampney et al. "Postnatal Cardiac Autonomic Nervous Control in Pediatric Congenital Heart Disease." *Journal of cardiovascular development and disease* vol. 3,2 16. 15 Apr. 2016,

Neff, R A et al. "Respiratory sinus arrhythmia: endogenous activation of nicotinic receptors mediates respiratory modulation of brainstem cardioinhibitory parasympathetic neurons." *Circulation research* vol. 93,6 (2003): 565-72.

Ng, G A et al. "Effects of direct sympathetic and vagus nerve stimulation on the physiology of the whole heart--a novel model of isolated Langendorff perfused rabbit heart with intact dual autonomic innervation." *Experimental physiology* vol. 86,3 (2001): 319-29.

Nosaka, S et al. "Vagal cardiac preganglionic neurons: distribution, cell types, and reflex discharges." *The American journal of physiology* vol. 243,1 (1982): R92-8.

Norman, G J et al. "Oxytocin increases autonomic cardiac control: moderation by loneliness." *Biological psychology* vol. 86,3 (2011): 174-80.

Numao, Y et al. "Central respiratory drive-related activity in sympathetic nerves of the rat: the regional differences." *Neuroscience letters* vol. 81,3 (1987): 279-84.

Nurse, C A. "Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors." *The Journal of physiology* vol. 592,16 (2014): 3419-26.

O

O'Callaghan, E L et al. "Enhancing respiratory sinus arrhythmia increases cardiac output in rats with left ventricular dysfunction." *The Journal of physiology* vol. 598,3 (2020): 455-471

Oh, S W et al. “A mesoscale connectome of the mouse brain.” *Nature* vol. 508,7495 (2014): 207-14.

Okada, H, and I J Fox. “Respiratory grouping of abdominal sympathetic activity in the dog.” *The American journal of physiology* vol. 213,1 (1967): 48-56.

Oliveira, L M et al. “Afferent and Efferent Connections of the Postinspiratory Complex (PiCo) Revealed by AAV and Monosynaptic Rabies Viral Tracing.” *The Journal of comparative neurology* vol. 532,11 (2024): e25683.

Onimaru, H, and I Homma. “A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 23,4 (2003): 1478-86.

Oshima, N et al. “Baro-excited neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) recorded using the whole-cell patch-clamp technique.” *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* vol. 35,5 (2012): 500-6.

Ostrowski, D et al. “Nucleus tractus solitarii is required for the development and maintenance of phrenic and sympathetic long-term facilitation after acute intermittent hypoxia.” *Frontiers in physiology* vol. 14 1120341. 9 Feb. 2023,

Ottaviani, M M et al. “In vivo recordings from the human vagus nerve using ultrasound-guided microneurography.” *The Journal of physiology* vol. 598,17 (2020): 3569-3576.

Owen, S F et al. “Oxytocin enhances hippocampal spike transmission by modulating fast-spiking interneurons.” *Nature* vol. 500,7463 (2013): 458-62.

P

Parati, G, et al. "Assessment and Management of Blood-Pressure Variability." *Nature Reviews Cardiology*, vol. 10, no. 3, 2013, pp. 143–155

Parati, G et al. “Blood pressure variability: its relevance for cardiovascular homeostasis and cardiovascular diseases.” *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* vol. 43,7 (2020): 609-620

Pardal, R et al. “Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body.” *Cell* vol. 131,2 (2007): 364-77.

Park, J et al. “Brainstem control of vocalization and its coordination with respiration.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 383,6687 (2024): eadi8081.

Paton, J F et al. “Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptors.” *Neuroscience* vol. 105,1 (2001): 231-48.

Paton, J F et al. “Reflex response and convergence of pharyngoesophageal and peripheral chemoreceptors in the nucleus of the solitary tract.” *Neuroscience* vol. 93,1 (1999): 143-54.

Paton, J F et al. “Response properties of baroreceptive NTS neurons.” Annals of the New York Academy of Sciences vol. 940 (2001): 157-68. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03674.x

Paton, J F R et al. “Advancing respiratory-cardiovascular physiology with the working heart-brainstem preparation over 25 years.” *The Journal of physiology* vol. 600,9 (2022): 2049-2075.

Paton, J F, and J W Butcher. “Cardiorespiratory reflexes in mice.” *Journal of the autonomic nervous system* vol. 68,1-2 (1998): 115-24.

Paton, J F. “A working heart-brainstem preparation of the mouse.” *Journal of neuroscience methods* vol. 65,1 (1996b): 63-8.

Paton, J F. “The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation.” *The Journal of physiology* vol. 493 (Pt 3),Pt 3 (1996): 819-31.

Paxinos, G, and C Watson**.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 2013

Peng, Y, et al. "Induction of Sensory Long-Term Facilitation in the Carotid Body by Intermittent Hypoxia: Implications for Recurrent Apneas." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 17, 2003, pp. 10073-10078.

Peppard, P. E., et al. "Prospective Study of the Association Between Sleep-Disordered Breathing and Hypertension." *The New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 19, 2000, pp. 1378-1384.

Perry, S F et al. “Which came first, the lung or the breath?.” *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* vol. 129,1 (2001): 37-47.

Petersson, M et al. “Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats.” *Physiology & behavior* vol. 60,5 (1996): 1311-5.

Phillips, J K et al. “Differential expression of catecholamine biosynthetic enzymes in the rat ventrolateral medulla.” *The Journal of comparative neurology* vol. 432,1 (2001): 20-34.

Phillips, R S, and N A Baertsch. “Interdependence of cellular and network properties in respiratory rhythm generation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 121,19 (2024): e2318757121.

Pickering, Anthony E et al. “Dominant role of aortic baroreceptors in the cardiac baroreflex of the rat in situ.” *Autonomic neuroscience : basic & clinical* vol. 142,1-2 (2008): 32-9.

Pickering, T G et al. “Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research.” *Circulation* vol. 111,5 (2005): 697-716.

Pilowsky, P M, and A K Goodchild. “Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on.” *Journal of hypertension* vol. 20,9 (2002): 1675-88

Piñol, R A et al. “Visualization of oxytocin release that mediates paired pulse facilitation in hypothalamic pathways to brainstem autonomic neurons.” *PloS one* vol. 9,11 e112138. 7 Nov. 2014,

Pitzalis, M V et al. “Beta-blocker effects on respiratory sinus arrhythmia and baroreflex gain in normal subjects.” *Chest* vol. 114,1 (1998): 185-91.

Plumier, L. “Etude sur les courbes de Traube-Hering ” *Mémoires couronnés et autres mémoires publiés par l'Académie royale des sciences, des lettres et des beaux-arts de Belgique. Collection in-8°*. Tome 60, 1900. pp. 1-40.

Porter, T R et al. “Autonomic pathophysiology in heart failure patients. Sympathetic-cholinergic interrelations.” *The Journal of clinical investigation* vol. 85,5 (1990): 1362-71.

Prabhakar, N R, and G L Semenza. “Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2.” *Physiological reviews* vol. 92,3 (2012): 967-1003.

Prabhakar, N R, and Y Peng. “Peripheral chemoreceptors in health and disease.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 96,1 (2004): 359-66.

Q

Quinn, T A, and P Kohl. “Cardiac Mechano-Electric Coupling: Acute Effects of Mechanical Stimulation on Heart Rate and Rhythm.” *Physiological reviews* vol. 101,1 (2021): 37-92.

Quintana, D S et al. “A role for autonomic cardiac control in the effects of oxytocin on social behavior and psychiatric illness.” *Frontiers in neuroscience* vol. 7 48. 2 Apr. 2013,

R

Ramirez, JM et al. “Microcircuits in respiratory rhythm generation: commonalities with other rhythm generating networks and evolutionary perspectives.” *Current opinion in neurobiology* vol. 41 (2016): 53-61.

Ranson, R N et al. “The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion.” *Experimental brain research* vol. 120,2 (1998): 164-72.

Richter, D W, and J C Smith. “Respiratory rhythm generation in vivo.” *Physiology (Bethesda, Md.)* vol. 29,1 (2014): 58-71.

Richter, D W. “Generation and maintenance of the respiratory rhythm.” *The Journal of experimental biology* vol. 100 (1982): 93-107.

Rocha-Santos, C et al. “Activity-Dependent Neuroplastic Changes in Autonomic Circuitry Modulating Cardiovascular Control: The Essential Role of Baroreceptors and Chemoreceptors Signaling.” *Frontiers in physiology* vol. 11 309. 9 Apr. 2020,

Rogers, R C, and G E Hermann. “Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation-induced gastric acid secretion and bradycardia suppressed by oxytocin antagonist.” *Peptides* vol. 7,4 (1986): 695-700.

Ross, C A et al. “Adrenaline neurons in the rostral ventrolateral medulla innervate thoracic spinal cord: a combined immunocytochemical and retrograde transport demonstration.” *Neuroscience letters* vol. 25,3 (1981): 257-62.

Ross, C A et al. “Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 4,2 (1984): 474-94.

Rothwell, P M et al. “Prognostic significance of visit-to-visit variability, maximum systolic blood pressure, and episodic hypertension.” *Lancet (London, England)* vol. 375,9718 (2010): 895-905.

Russier, M et al. “GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons in vitro.” *The Journal of physiology* vol. 541,Pt 1 (2002): 123-37.

S

Sampaio, K N et al. “Chronotropic and dromotropic responses to localized glutamate microinjections in the rat nucleus ambiguus.” *Brain research* vol. 1542 (2014): 93-103.

Schaefer, M, et al. "The Pupillary Respiratory-Phase Response: Pupil Size Is Smallest Around Inhalation Onset and Largest During Exhalation." *The Journal of Physiology*, vol. 602, no. 6, 2024, pp. 1235–1258. Wiley Online Library,

Schreihofer, A M et al. “Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat.” *The Journal of physiology* vol. 529 Pt 1,Pt 1 (2000): 221-36.

Schreihofer, A M, and P G Guyenet. “Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo.” The Journal of comparative neurology vol. 387,4 (1997): 524-36.

Schreihofer, A M, and P G Guyenet. “The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla.” *Clinical and experimental pharmacology & physiology* vol. 29,5-6 (2002): 514-21.

Schwarzacher, S W et al. “Neuroanatomical characteristics of the human pre-Bötzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases.” *Brain : a journal of neurology* vol. 134,Pt 1 (2011): 24-35.

Sequeira, V C C et al. “Heart rate variability in adults with obstructive sleep apnea: a systematic review.” *Sleep science (Sao Paulo, Brazil)* vol. 12,3 (2019): 214-221.

Shabel, S J et al. “Mood regulation. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 345,6203 (2014): 1494-8.

Shaffer, F et al. “A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability.” *Frontiers in psychology* vol. 5 1040. 30 Sep. 2014,

Shanks, J et al. “Cardiac Vagal Nerve Activity Increases During Exercise to Enhance Coronary Blood Flow.” Circulation research vol. 133,7 (2023): 559-571.

Shanks, J et al. “Reverse re-modelling chronic heart failure by reinstating heart rate variability.” *Basic research in cardiology* vol. 117,1 4. 1 Feb. 2022

Shantsila, A et al. “Influence of age on respiratory modulation of muscle sympathetic nerve activity, blood pressure and baroreflex function in humans.” *Experimental physiology* vol. 100,9 (2015): 1039-51.

Shao, L et al. “Whole-brain inputs and outputs of Phox2b and GABAergic neurons in the nucleus tractus solitarii.” *Frontiers in neuroscience* vol. 18 1427384. 14 Jun. 2024,

Shao, X M, and J L Feldman. “Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Bötzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission.” *Journal of neurophysiology* vol. 77,4 (1997): 1853-60.

Sharova, L V et al. “Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells.” *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* vol. 16,1 (2009): 45-58.

Sharpe, M J et al. “Lateral Hypothalamic GABAergic Neurons Encode Reward Predictions that Are Relayed to the Ventral Tegmental Area to Regulate Learning.” *Current biology : CB* vol. 27,14 (2017): 2089-2100.e5

Sherman, D et al. “Optogenetic perturbation of preBötzinger complex inhibitory neurons modulates respiratory pattern.” *Nature neuroscience* vol. 18,3 (2015): 408-14.

Shin, Y et al. “Characterization of fiber-optic light delivery and light-induced temperature changes in a rodent brain for precise optogenetic neuromodulation.” *Biomedical optics express* vol. 7,11 4450-4471. 6 Oct. 2016

Simms, A E et al. “Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously

hypertensive rat: does it contribute to hypertension?." *The Journal of physiology* vol. 587,3 (2009): 597-610.

Simms, A E et al. "Hierarchical recruitment of the sympathetic and parasympathetic limbs of the baroreflex in normotensive and spontaneously hypertensive rats." *The Journal of physiology* vol. 579,Pt 2 (2007): 473-86.

Sin, P Y W et al. "Interactions between heart rate variability and pulmonary gas exchange efficiency in humans." *Experimental physiology* vol. 95,7 (2010): 788-97.

Smith, J C et al. "Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits." *Trends in neurosciences* vol. 36,3 (2013): 152-62.

Smith, J C et al. "Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals." *Science (New York, N.Y.)* vol. 254,5032 (1991): 726-9.

Smith, J C et al. "Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms." *Journal of neurophysiology* vol. 98,6 (2007): 3370-87.

Somers, V. K., et al. "Sympathetic Neural Mechanisms in Obstructive Sleep Apnea." *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, no. 4, 1995, pp. 1897-1904.

Son, S et al. "Whole-Brain Wiring Diagram of Oxytocin System in Adult Mice." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 42,25 (2022): 5021-5033.

Song, G et al. "Kölliker–Fuse neurons send collateral projections to multiple hypoxia-activated and nonactivated structures in rat brainstem and spinal cord." *Brain structure & function* vol. 217,4 (2012): 835-58.

Souza, G M P R et al. "Adrenergic C1 neurons monitor arterial blood pressure and determine the sympathetic response to hemorrhage." *Cell reports* vol. 38,10 (2022): 110480

Souza, G M P R et al. "Pre- and post-inspiratory neurons change their firing properties in female rats exposed to chronic intermittent hypoxia." *Neuroscience* vol. 406 (2019): 467-486.

Spyer, K M, and A V Gourine. "Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* vol. 364,1529 (2009): 2603-10.

Spyer, K M. "To breathe or not to breathe? That is the question." *Experimental physiology* vol. 94,1 (2009): 1-10.

Stalbovskiy, A O et al. "Mapping the cellular electrophysiology of rat sympathetic preganglionic neurones to their roles in cardiorespiratory reflex integration: a whole cell recording study in situ." *The Journal of physiology* vol. 592,10 (2014): 2215-36.

Stevens, S L et al. "Blood pressure variability and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis." *BMJ (Clinical research ed.)* vol. 354 i4098. 9 Aug. 2016

St-John, W M et al. "Location and properties of respiratory neurones with putative intrinsic bursting properties in the rat in situ." *The Journal of physiology* vol. 587,Pt 13 (2009): 3175-88.

Stornetta, R L et al. "A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex." *The Journal of comparative neurology* vol. 455,4 (2003): 499-512.

Stornetta, R L. "Neurochemistry of bulbospinal presympathetic neurons of the medulla oblongata." Journal of chemical neuroanatomy vol. 38,3 (2009): 222-30.

Suarez-Roca, H et al. “Baroreceptor Modulation of the Cardiovascular System, Pain, Consciousness, and Cognition.” *Comprehensive Physiology* vol. 11,2 1373-1423. 12 Feb. 2021,

Sun, M K et al. “Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro.” *Brain research* vol. 442,2 (1988): 229-39.

Sved, A F et al. “Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation.” *Brain research bulletin* vol. 51,2 (2000): 129-33.

T

Tafil-Klawe M, et al. « Peripheral chemoreceptor reflex in obstructive sleep apnea patients; a relationship between ventilatory response to hypoxia and nocturnal bradycardia during apnea events.” Pneumologie. 1991 May;45 Suppl 1:309-11.

Taha, B H et al. “Respiratory sinus arrhythmia in humans: an obligatory role for vagal feedback from the lungs.” *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* vol. 78,2 (1995): 638-45.

Takakura, A C T et al. “Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO2-sensitive neurons in rats.” *The Journal of physiology* vol. 572,Pt 2 (2006): 503-23.

Takanaga, A et al. “Immunohistochemical characterization of cardiac vagal preganglionic neurons in the rat.” *Autonomic neuroscience : basic & clinical* vol. 106,2 (2003): 132-7.

Tan, W et al. “Projections of preBötzinger complex neurons in adult rats.” *The Journal of comparative neurology* vol. 518,10 (2010): 1862-78.

Tan, W et al. “Silencing preBötzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat.” *Nature neuroscience* vol. 11,5 (2008): 538-40.

Tatasciore, A et al. “Awake systolic blood pressure variability correlates with target-organ damage in hypertensive subjects.” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* vol. 50,2 (2007): 325-32.

Terui, N et al. “Barosensory neurons in the ventrolateral medulla in rabbits and their responses to various afferent inputs from peripheral and central sources.” *The Japanese journal of physiology* vol. 36,6 (1986): 1141-64.

Thayer, J F et al. “The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors.” *International journal of cardiology* vol. 141,2 (2010): 122-31.

Thibonnier, M et al. “Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors.” *Endocrinology* vol. 140,3 (1999): 1301-9.

Thoby-Brisson, M et al. “Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzinger complex.” *Nature neuroscience* vol. 12,8 (2009): 1028-35.

Thomas, J S et al. “Haemodynamic effects of oxytocin given as i.v. bolus or infusion on women undergoing Caesarean section.” *British journal of anaesthesia* vol. 98,1 (2007): 116-9.

Tian, G F et al. “Bötzinger-complex, bulbospinal expiratory neurones monosynaptically inhibit ventral-group respiratory neurones in the decerebrate rat.” *Experimental brain research* vol. 124,2 (1999): 173-80.

Tomasi, J et al. “Investigating the association of anxiety disorders with heart rate variability measured using a wearable device.” *Journal of affective disorders* vol. 351 (2024): 569-578.

Toor, R et al. “Neurons in the Intermediate Reticular Nucleus Coordinate Postinspiratory

Activity, Swallowing, and Respiratory-Sympathetic Coupling in the Rat." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 39,49 (2019): 9757-9766.

Toor, R et al. "Role of the Kölliker-Fuse/parabrachial complex in the generation of postinspiratory vagal and sympathetic nerve activities and their recruitment by hypoxemic stimuli in the rat." *Journal of neurophysiology* vol. 132,5 (2024): 1496-1506.

Trippodo, N C, and E D Frohlich. "Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat." *Circulation research* vol. 48,3 (1981): 309-19.

Trzebski, A et al. "Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension." *Cardiovascular research* vol. 16,3 (1982): 163-72.

Tufik, S et al. "Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study." *Sleep medicine* vol. 11,5 (2010): 441-6.

U

Urbanik, D et al. "Obstructive sleep apnea as a predictor of reduced heart rate variability." *Sleep medicine* vol. 54 (2019): 8-15.

V

Valipour, A et al. "Respiratory Sinus Arrhythmia Attenuation via Targeted Lung Denervation in Sheep and Humans." *Respiration; international review of thoracic diseases* vol. 98,5 (2019): 434-439.

Van Puyvelde, M et al. "Whose clock makes yours tick? How maternal cardiorespiratory physiology influences newborns' heart rate variability." *Biological psychology* vol. 108 (2015): 132-41.

Vann, N C et al. "Dbx1 Pre-Bötzinger Complex Interneurons Comprise the Core Inspiratory Oscillator for Breathing in Unanesthetized Adult Mice." *eNeuro* vol. 5,3 ENEURO.0130-18.2018. 28 May. 2018

Veerakumar, A et al. "Molecularly defined circuits for cardiovascular and cardiopulmonary control." *Nature* vol. 606,7915 (2022): 739-746.

Venkataraman, S et al. "Sleep Apnea, Hypertension and the Sympathetic Nervous System in the Adult Population." *Journal of clinical medicine* vol. 9,2 591. 21 Feb. 2020,

Vierock, J et al. "BiPOLES is an optogenetic tool developed for bidirectional dual-color control of neurons." *Nature communications* vol. 12,1 4527. 26 Jul. 2021,

W

Wallén-Mackenzie, A et al. "Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 26,47 (2006): 12294-307.

Wang, F et al. "RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." *The Journal of molecular diagnostics : JMD* vol. 14,1 (2012): 22-9.

Wang, X et al. "Laser ablation of Dbx1 neurons in the pre-Bötzinger complex stops inspiratory rhythm and impairs output in neonatal mice." *eLife* vol. 3 e03427

Wehrwein, E A et al. "Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic

Nervous System." *Comprehensive Physiology* vol. 6,3 1239-78. 13 Jun. 2016

Wenker, I C et al. "Blood Pressure Regulation by the Rostral Ventrolateral Medulla in Conscious Rats: Effects of Hypoxia, Hypercapnia, Baroreceptor Denervation, and Anesthesia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 37,17 (2017): 4565-4583.

Will, C. *et al*. "Radar-Based Heart Sound Detection." *Scientific Reports, vol. 8, article no. 11551, 2018*

Wilson, D F et al. "The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome a3 of the mitochondrial respiratory chain." *FEBS letters* vol. 351,3 (1994): 370-4.

Winter, S M et al. "Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices." *Pflugers Archiv : European journal of physiology* vol. 458,3 (2009): 459-69.

Wsol, A et al. "Oxytocin in the cardiovascular responses to stress." *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* vol. 59 Suppl 8 (2008): 123-7.

Wu, J et al. "A V0 core neuronal circuit for inspiration." *Nature communications* vol. 8,1 544. 15 Sep. 2017

Wyatt, C N, and K J Buckler. "The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells." *The Journal of physiology* vol. 556,Pt 1 (2004): 175-91.

X

Xie, L et al. "Increased Respiratory Modulation of Blood Pressure in Hypertensive Patients." *Frontiers in physiology* vol. 10 1111. 27 Aug. 2019

Y

Yackle, K. "Transformation of Our Understanding of Breathing Control by Molecular Tools." *Annual review of physiology* vol. 85 (2023): 93-113

Yackle, K, and J Do. "The multifunctionality of the brainstem breathing control circuit." *Current opinion in neurobiology* vol. 90 (2025): 102974.

Yamori, Y. "Pathogenesis of spontaneous hypertension as a model for essential hypertension." *Japanese circulation journal* vol. 41,3 (1977): 259-66.

Yang, C F et al. "Monosynaptic Projections to Excitatory and Inhibitory preBötzinger Complex Neurons." *Frontiers in neuroanatomy* vol. 14 58. 4 Sep. 2020

Yang, C F, and J L Feldman. "Efferent projections of excitatory and inhibitory preBötzinger Complex neurons." *The Journal of comparative neurology* vol. 526,8 (2018): 1389-1402.

Yang, C-F, et al. "Dose-dependent effects of isoflurane on cardiovascular function in rats." *Tzu Chi Medical Journal*, vol. 26, no. 3, 2014, pp. 119-123.

Yee, J R et al. "Oxytocin promotes functional coupling between paraventricular nucleus and both sympathetic and parasympathetic cardioregulatory nuclei." *Hormones and behavior* vol. 80 (2016): 82-91.

Yeh, E R et al. “The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat.” *Neuroscience letters* vol. 232,2 (1997): 63-6.

Z

Zaccaro, A et al. “How Breath-Control Can Change Your Life: A Systematic Review on Psycho-Physiological Correlates of Slow Breathing.” *Frontiers in human neuroscience* vol. 12 353. 7 Sep. 2018,

Zandstra, T E et al. “Asymmetry and Heterogeneity: Part and Parcel in Cardiac Autonomic Innervation and Function.” *Frontiers in physiology* vol. 12 665298. 16 Sep. 2021,

Zera, T et al. “The Logic of Carotid Body Connectivity to the Brain.” *Physiology (Bethesda, Md.)* vol. 34,4 (2019): 264-282.

Zhang, B et al. “Monitoring long-term cardiac activity with contactless radio frequency signals.” *Nature communications* vol. 15,1 10598. 5 Dec. 2024

Zoccal, D B et al. “Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia.” *Experimental physiology* vol. 92,1 (2007): 79-85.

Zoccal, D B et al. “Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity.” *The Journal of physiology* vol. 586,13 (2008): 3253-65.

Zoccal, D B et al. “Interaction between the retrotrapezoid nucleus and the parafacial respiratory group to regulate active expiration and sympathetic activity in rats.” *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* vol. 315,5 (2018): L891-L909.

Zoccal, D B et al. “Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction.” *Experimental physiology* vol. 94,9 (2009): 972-83

Annexe

Partie 1

Revue publiée dans Nature Reviews Cardiology. Reproduite avec l'autorisation de Springer Nature.

nature reviews cardiology

https://doi.org/10.1038/s41569-025-01160-z

Expert recommendation

Check for updates

Redefining respiratory sinus arrhythmia as respiratory heart rate variability: an international Expert Recommendation for terminological clarity

A list of authors and their affiliations appears at the end of the paper

Abstract

The variation of heart rate in phase with breathing, known as 'respiratory sinus arrhythmia' (RSA), is a physiological phenomenon present in all air-breathing vertebrates. RSA arises from the interaction of several physiological mechanisms but is primarily mediated by rhythmic changes in cardiac parasympathetic (vagal) activity, increasing heart rate during inspiration and decreasing heart rate during expiration. RSA amplitude is an indicator of autonomic and cardiac health; RSA is diminished or absent in common pathological conditions such as chronic heart failure and hypertension. In this Expert Recommendation, we argue that the term 'RSA', although historically important, is semantically inaccurate and carries misleading pathological connotations, contributing to misunderstanding and misinterpretation of the origin and the physiological importance of the phenomenon. We propose replacing 'RSA' with the term 'respiratory heart rate variability' (RespHRV), which avoids pathological connotations and emphasizes the specific respiratory contribution to heart rate variability. We clarify that RespHRV encompasses respiratory-related heart rate variations in both the low-frequency and high-frequency bands traditionally defined in heart rate variability analysis, and that its amplitude should not be misconstrued as a measure of vagal tone. Adopting the proposed term 'RespHRV' is expected to unify understanding and stimulate further experimental and clinical research into the physiological mechanisms and functional importance of this phenomenon.

Sections

Introduction

Incorrect and misleading terminology

RSA metrics and (mis) interpretations

The proposed new name: RespHRV

Conclusions

e-mail: clement.menuet@inserm.fr

Introduction

We often refer to a person's heart rate (HR) as a certain number of beats per minute, but recordings show substantial variability in HR under most physiological conditions, even at rest. Multiple factors contribute to and influence HR variability, including emotional state[1], cardiorespiratory fitness[2] and breathing[3]. The focus of this Expert Recommendation is the physiological variation of HR in phase with breathing, first observed in 1733 by Stephen Hales, reported in 1847 by Carl Ludwig[4–6], and subsequently named 'respiratory sinus arrhythmia' (RSA). The primary mechanism underlying RSA involves rhythmic changes in the parasympathetic (vagal) cardioinhibitory influence that increases during expiration, resulting in a decrease in HR, and decreases during inspiration, leading to an increase in HR[7–18] (Fig. 1). Changes in the frequency and depth of breathing strongly influence the amplitude (the absolute difference in HR between inspiration and expiration) of RSA[19,20] (Fig. 2a). RSA is evolutionarily conserved and has been observed across all species of air-breathing vertebrates studied so far, including mammals, reptiles, birds, amphibians and also lungfish (one of the earliest obligate air-breathers in the vertebrate evolutionary record), which increase their HR at each surface air breath[21,22]. The physiological function of RSA has been debated, with suggestions that, in mammals, RSA improves pulmonary gas exchange, reduces cardiac energy expenditure while helping to maintain homeostasis of the arterial partial pressure of CO_2, and/or stabilizes arterial blood pressure and systemic blood flow[2,3,17,23,24]. In humans, the amplitude of RSA is larger in young and healthy individuals and gradually decreases with ageing[25]. RSA is greatly reduced or absent in common pathological conditions, such as chronic heart failure and hypertension[2,26,27] (Fig. 2). Reinstating RSA by rhythmic pacing of the heart in patients with heart failure is a promising therapeutic strategy that is being tested in clinical trials, after showing benefit in preclinical studies[26,27]. Slow, deep breathing practices aimed at amplifying RSA to promote relaxation and meditation are ancestral and common, spanning from yogic pranayama to 'cardiac coherence' and 'boxed' breathing[3,28–30]. However, when the physiological mechanisms and potential health benefits underlying these practices are explained, RSA is rarely mentioned. Here we argue that the term 'RSA' is semantically incorrect and intuitively conveys a pathological connotation, often leading to confusion and aberrant interpretations. Attempts to circumvent this problem by substituting the term 'RSA' with the term 'high-frequency heart rate variability' overlook a vital aspect of this physiological phenomenon: its inherent dependence on respiratory activity[17,31–33].

In this Expert Recommendation, we propose adopting the term 'respiratory heart rate variability', abbreviated to 'RespHRV', which overcomes these shortcomings. This name change represents more than a semantic improvement; we propose a fundamental reorientation that is expected to have major implications for basic and clinical research involving analysis of HR variability (HRV), which has often neglected the crucial role of respiratory modulation. We argue that this oversight has contributed to common misunderstanding of the importance of the respiratory influence on HR. One consequence of this misunderstanding is the frequent use of imperfect proxies for RSA, such as high-frequency HRV, and ambiguous terms such as 'cardiac coherence', which have begun to enter the public domain, further perpetuating confusion. We contend that the inadequacies of the term 'RSA' as a descriptor lie at the core of these issues and should be addressed. Adopting the proposed term 'RespHRV' by the clinical and the basic research communities is expected to promote accurate

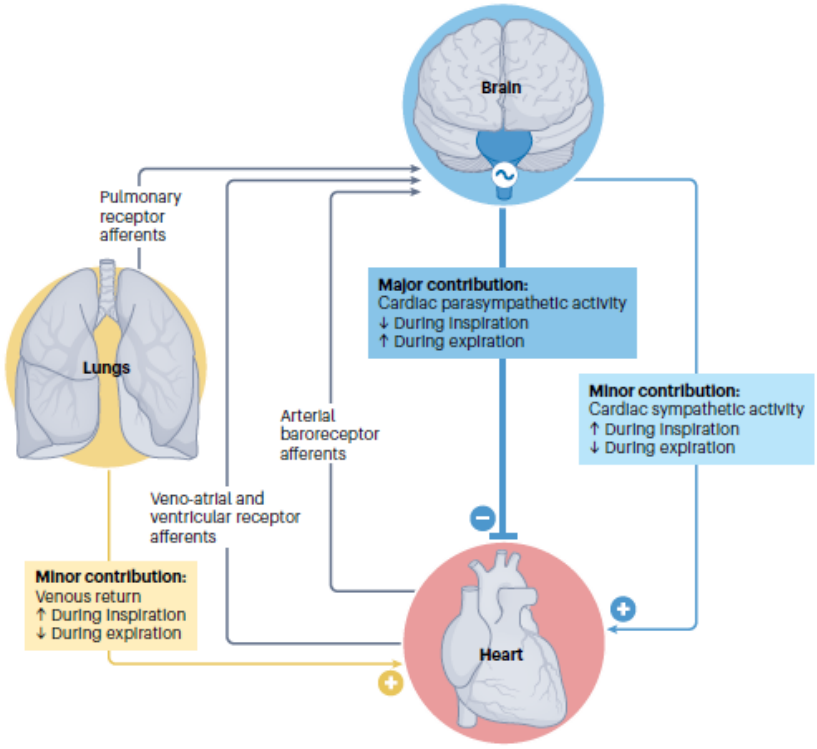


Fig. 1 | Physiological mechanisms underlying respiratory heart rate variability. The brain controls the heart via branches of the autonomic nervous system, with cardiac parasympathetic and sympathetic activities being modulated by respiration[9,12,16–18,44]. Respiratory heart rate variability (RespHRV) emerges from rhythmic modulation of the activities of cardiac vagal preganglionic neurons and presympathetic neurons in the brainstem by inputs from the respiratory central pattern generator (neural circuit oscillator (∿) that generates the respiratory command), as well as from cardiorespiratory afferents, including pulmonary stretch receptors, arterial baroreceptors and veno-atrial stretch receptors. These interactions result in opposing rhythmic patterns of cardiac parasympathetic and sympathetic activities[9,12,16,18,44], which converge at the cardiac pacemaker to increase heart rate during inspiration and decrease heart rate during expiration. Respiratory-related changes in venous return further contribute to RespHRV and arise from changes in intrathoracic pressure affecting the pulmonary circulation, and variations in systemic arterial blood pressure in phase with respiration (Traube–Hering waves). These mechanical effects contribute to RespHRV via the Bainbridge effect, which is an increase in heart rate during inspiration mediated by veno-atrial stretch receptor feedback and direct stretch of the sinoatrial node[45,61–63]. Among all the mechanisms, rhythmic changes in cardiac parasympathetic activity are of primary importance, as evidenced by near-complete loss of RespHRV following muscarinic receptor blockade, vagotomy, heart transplantation or brainstem death[2,3,12,14,21,22,64,65].

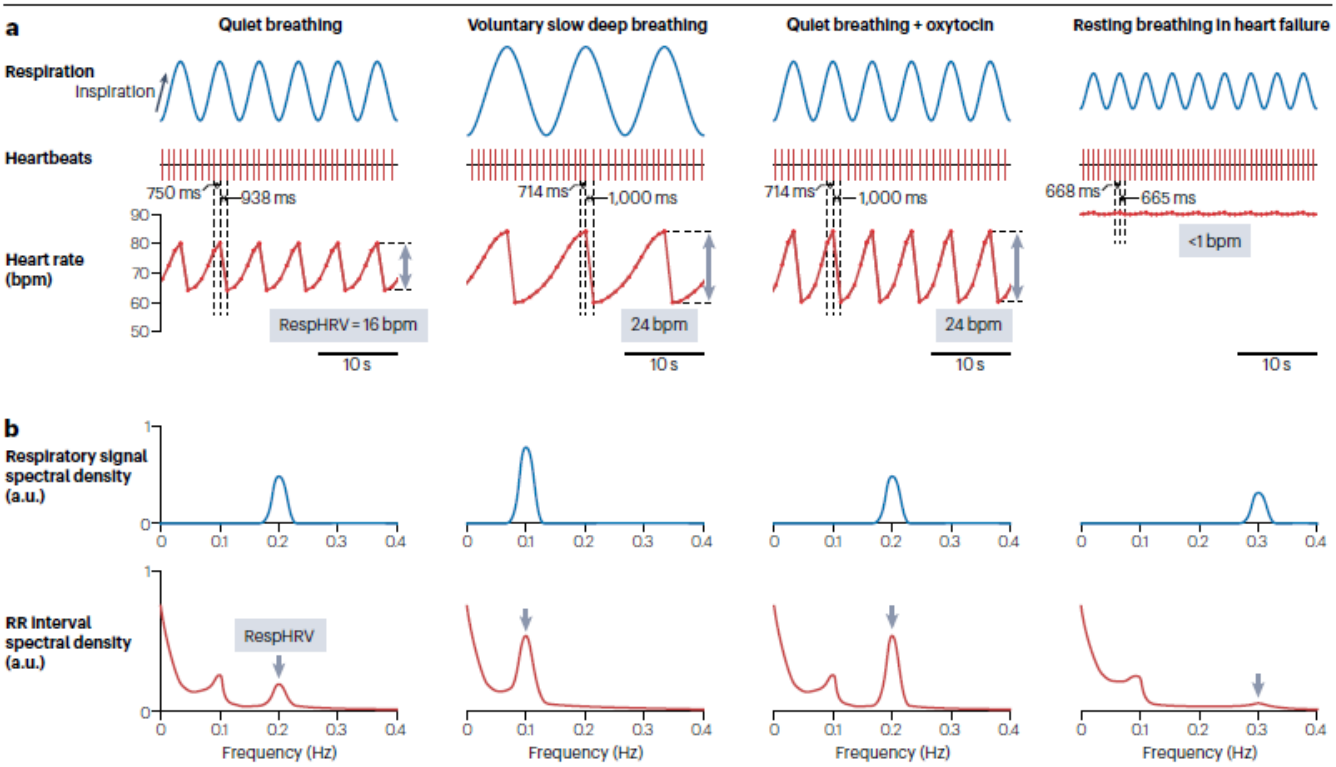


Fig. 2 | Assessment and quantification of respiratory heart rate variability applied to representative physiological and pathological conditions. **a**, Quantification of respiratory heart rate variability (RespHRV), measured in beats per minute (bpm), across four schematized human conditions: quiet breathing at 12 breaths per minute; voluntary slow, deep breathing at six breaths per minute; quiet breathing plus oxytocin to represent a condition in which RespHRV is amplified independently of changes in respiratory activity, as shown in humans (such as during parent–infant bonding)[66,67] and in animals (such as during recovery from stress)[15]; and heart failure, where RespHRV is largely absent. The quantification of RespHRV as a variation of heart rate (in bpm) in phase with breathing enables the assessment of RespHRV within a single respiratory cycle and its averaging across cycles. This method of RespHRV quantification requires simultaneous measurements of respiratory activity and heart rate, and is available as an open-source Python toolbox[68]. **b**, Quantification of RespHRV in the frequency domain, using heart rate variability (HRV) spectral analysis from the same conditions shown in panel **a**. This type of analysis measures RespHRV as a spectral density. At low frequencies of breathing around 0.1 Hz (six breaths per minute), as shown for the voluntary slow, deep breathing condition, the RespHRV spectral density merges with other low-frequency oscillatory components of HRV. Spectral analysis of RespHRV involves segmenting the heart rate signal over several minutes (typically 5-min windows in humans), during which RespHRV is averaged. This type of analysis is routinely performed in clinical studies, often using heart rate measurements alone. However, without the simultaneous recording of respiratory activity, it is not possible to accurately identify the RespHRV spectral density, especially if the participant is breathing at a low rate. In the assessment of RespHRV using HRV spectral analysis, it is recommended to also record respiratory activity (respiratory rate and tidal volume) to determine the frequency (or frequencies) of the RespHRV spectral density (or densities). a.u., arbitrary units.

interpretations of HRV metrics and improve our understanding of this physiological phenomenon (Box 1).

Incorrect and misleading terminology

Scientific terms and definitions evolve to reflect the development of ideas and advances in understanding. The term 'RSA' probably emerged in the early twentieth century as knowledge of autonomic control expanded, particularly with the advent of electrocardiography and more precise physiological measurements. However, the first explicit use of the term 'RSA' in published research is uncertain. Semantically, 'arrhythmia' is derived from the Greek *a* (without) and *rhythmia* (rhythm), implying a complete lack of rhythm. However, 'arrhythmia' has come to mean any abnormal heart rhythm, whether too fast, too slow or irregular and, therefore, the word carries a negative, pathological connotation. Any search for the definition of the term 'arrhythmia' leads to descriptions of abnormal, pathological rhythms of the heart, from specialist sources such as the US National Institutes of Health[34] or the American Heart Association[35], to popular sites such as Wikipedia[36]. Therefore, the term 'RSA' does not immediately point to an important physiological phenomenon but instead suggests a pathological condition. Moreover, the word 'sinus' in 'RSA' refers to the sinoatrial node that generates the heartbeat (therefore the term 'sinus rhythm'), but even this meaning is often misunderstood. A common misconception is that 'sinus' in 'RSA' refers to the sinusoidal shape of the HR profile, representing its variations with respiration. A clear understanding of the term 'RSA' has never reached the public and, in our experience, the term is often confusing even to clinical scientists and medical practitioners. When teaching students or engaging in community outreach and public events, use of the term 'RSA' requires careful and detailed explanation, which is counterproductive.

Box 1 | Expert recommendations

- Avoid using the term 'arrhythmia' when referring to an evolutionarily conserved physiological phenomenon that reflects functional coupling between central nervous mechanisms of autonomic cardiovascular and respiratory control.
- Adopt and use the term 'respiratory heart rate variability' (RespHRV) instead of 'respiratory sinus arrhythmia' (RSA) to describe the respiratory modulation of cardiac pacemaker activity by autonomic mechanisms, manifested as rhythmic changes in heart rate in phase with breathing.
- Use the term 'RespHRV' when referring to respiratory-related variations in heart rate in both the low-frequency and high-frequency bands traditionally defined in heart rate variability analysis, to prevent misinterpretation of these metrics.
- Clarify that RespHRV is not a measure of total cardiac vagal activity or overall vagal tone.
- Promote clinical translation of basic research findings into the mechanisms and functional importance of RespHRV.

RSA metrics and (mis)interpretations

The idea that variation in HR is a sign of cardiac and general health is now widespread[37]. The term 'HRV' has gained popularity across a wide range of applications, from clinics to smartwatch and smartphone devices[31,33,38]. HRV can be assessed from simple recordings of cardiovascular activity, such as an electrocardiogram or blood pressure, followed by time domain and/or frequency domain analyses[33,39]. The widespread accessibility of HRV assessments, together with the tantalizing promise of a non-invasive and ready-to-use solution to measure autonomic balance and health status, have led to oversimplifications and overinterpretations of HRV metrics. The prominent respiratory modulation component in HRV (which is RSA) is often oversimplified as the high-frequency HRV band, overinterpreted as a measure of parasympathetic influence on the heart and, by extension, as a measure of vagal tone, autonomic balance and general health[12,17,19,31,32]. These aspects are discussed below.

When HRV analysis is performed in the frequency domain, the power spectral density at the respiratory frequency provides a measure of the respiratory variation in HR (Fig. 2b). In adult humans, respiratory frequency is usually between 0.15 Hz and 0.4 Hz. In this frequency range, the respiratory variation in HR is, indeed, the main component of the HRV power spectrum, usually appearing as a distinct peak. This understanding led to the segmentation of the 0.15–0.4 Hz range as the high-frequency band of HRV. However, efficient lung ventilation can be achieved at lower respiratory rates, with a substantial percentage of breaths in healthy humans under resting conditions occurring below 0.15 Hz[40]. Additionally, voluntary slow, deep breathing is typically practised at approximately 0.1 Hz (six breaths per minute). At these breathing rates, the respiratory-related HRV merges with other HRV components in the low-frequency band (0.04–0.15 Hz), complicating its accurate measurement. Nevertheless, because the high-frequency band is the most selectively quantifiable HRV band and covers predominant respiratory frequencies, this band is now commonly used as a measure of the respiratory modulation of HR[32,33]. The term 'high-frequency HRV' is frequently used as a synonym for 'RSA', which is erroneous because it conflates the physiological phenomenon with the method used to capture it. The use of the term 'high-frequency HRV' further introduces an important analytical and interpretative issue, primarily because it fails to acknowledge the inherent respiratory origin of the phenomenon it is intended to describe. This oversight has led to major misinterpretations, a problem that has been discussed in detail in the field of psychophysiology[32,41].

Given that the respiratory variation in HR is primarily generated via parasympathetic modulation, it has been used as a marker of cardiac vagal activity[17,42,43]. This interpretation is often extended to the high-frequency band of HRV. It is important to understand that cardiac vagal parasympathetic activity comprises two components: rhythmic and tonic[12,18]. The parasympathetic activity that contributes to the respiratory variation in HR includes only the rhythmic, respiratory-related component. RSA, or, more appropriately RespHRV, approximates the amplitude of variations in cardiac vagal activity about its mean value, rather than its tonic or total level, across a measurement period. This variation probably serves a highly specific and evolutionarily conserved function of coordinating ventilation and blood circulation, which is particularly important in non-mammalian vertebrates with undivided circulation[17,21]. Furthermore, the respiratory variation in HR is predominantly, but not exclusively, generated by rhythmic changes in cardiac vagal activity; additional contributing factors include the respiratory modulation of cardiac sympathetic activity[17,44] and respiratory-related changes in venous return to the heart[17,45] (Fig. 1). Within-individual variations in respiratory parameters have been shown to exert profound effects on the amplitude of the respiratory variation in HR, independently of overall changes in cardiac vagal activity[17,19]. Therefore, the respiratory variation in HR results from several concurrent mechanisms and is neither a selective nor an absolute marker of cardiac vagal activity[17].

When RSA or the high-frequency band of HRV are interpreted as markers of cardiac vagal activity, they are then often generalized as measures of overall vagal tone, autonomic balance and general health[17,19,42,43]. Similar generalizations are frequently applied to the interpretation of common time domain metrics of HRV, such as the RMSSD (root mean square of successive RR interval differences) and, to a lesser extent, the SDNN (standard deviation of NN intervals). These generalizations are at odds with the organization and functioning of the autonomic nervous system, which controls physiological functions in an organ-specific, tissue-specific and context-dependent manner[46–48]. We are not aware of any experimental evidence suggesting that the amplitude of respiratory variation in HR reflects the activity of parasympathetic efferent innervation of any organ other than the heart. However, strong evidence does indicate that physiological variability in HR is associated with improved outcomes[37], and a growing number of commercial companies offer solutions that claim to increase vagal tone and improve health by amplifying respiratory variations in HR. These providers do not use the term 'RSA' and have developed alternative terms, such as 'cardiac coherence'. The term 'coherence' is used in its signal processing sense, denoting the relationship between respiration and HRV in the frequency domain. Similarly to 'high-frequency HRV', the term 'cardiac coherence' is largely based on a methodology rather than the physiological phenomenon it is intended to describe. Claims are made that one can be either in a state of cardiac coherence or not (creating a sense of dichotomy) and that the state of cardiac coherence can be achieved by practising slow, deep breathing, typically at six breaths per minute (0.1 Hz). In reality, the state of cardiac coherence represents an amplified respiratory variation in HR, in which the respiratory-related band merges with other low-frequency HRV

components, including one that is probably related to the operation of the baroreflex and potentially induced by blood pressure oscillations at about 0.1 Hz (Mayer waves)[49–51]. The concept of cardiac coherence does not account for the basal level of respiratory variation in HR at higher (and much more common) respiratory rates in what would then be considered 'incoherent' states, nor does it consider that the respiratory variation in HR can also be amplified in a state-dependent manner at these higher breathing frequencies (Fig. 2). It is concerning that the concept of 'cardiac coherence' is now used by some practitioners, with health benefits claimed that are far-reaching and based on misunderstanding and misinterpretation of the underlying physiology and recorded measures.

Therefore, in our opinion, there is a clear need for a more appropriate and scientifically accurate term than 'RSA' to describe the respiratory variation in HR that would accurately reflect the underlying physiological mechanisms and help to prevent inaccurate interpretations. The new term must be easily understandable and usable by researchers, medical practitioners and the general public.

The proposed new name: RespHRV

The term 'HRV' is already widely recognized and used, from scientific and medical literature to consumer applications. We propose to use the three-letter abbreviation 'HRV' as the core of the new name. As discussed, although the high-frequency component of HRV is commonly used as a measure of RSA, it is not an accurate measure because it does not take into account the respiratory-related modulation of HR at lower breathing rates. In addition, interpretation of RSA and of the high-frequency component of HRV as markers of cardiac vagal activity and, by extension, of overall vagal tone is problematic, particularly in the psychobiological literature, in which the amplitude of RSA is almost exclusively used as a vagal index[17,21,43,46]. The explicit inclusion of the term 'respiratory' in the new name could help to prevent these issues and would also be entirely appropriate from a physiological perspective, given that the respiratory variation in HR is the only component of HRV with a well-defined origin (that is, respiratory activity), emerging predominantly from the rhythmic modulation of cardiac vagal preganglionic neuron activity by the neighbouring respiratory network and afferent feedback[7–18] (Fig. 1).

Therefore, we propose the term 'respiratory HRV' to replace the term 'RSA'. The term 'RespHRV' is characterized by its explicit, intuitive and unambiguous nature, which should serve to circumvent the issues with the current terminology discussed above. Some publications[52] have already used this term and, in our opinion, its broader adoption and use by researchers, clinicians and the community could help to unify our understanding and stimulate further experimental and clinical studies of the physiological mechanisms and functional importance of this phenomenon (Box 1).

Conclusions

Brain–body interactions are in the spotlight, with research in this field garnering substantial funding and heightened media attention. The specific topic of brain–heart interactions occupies a particularly prominent position in this focus[53,54], with recent breakthroughs in our understanding of autonomic cardiac regulation and cardiac interoception[55–60]. In this context, where research on the autonomic control of the heart is gaining increased exposure but remains entangled in ambiguous and inaccurate terminology that can be challenging for non-specialists, we recommend replacing the historically important, but inaccurate and misleading, term 'RSA' with the term 'RespHRV'. We are confident that adopting the term 'RespHRV' to describe the respiratory modulation of HR will benefit both the research community and the general public (such as users of smartwatch applications that estimate HRV), by providing a clear and accurate term that reflects the underlying physiological phenomenon, thereby facilitating basic and clinical research in this area and promoting broader public understanding of human physiology.

Published online: 06 May 2025

References

1. Balzarotti, S., Biassoni, F., Colombo, B. & Ciceri, M. R. Cardiac vagal control as a marker of emotion regulation in healthy adults: a review. *Biol. Psychol.* **130**, 54–66 (2017).
2. Elstad, M., O'Callaghan, E. L., Smith, A. J., Ben-Tal, A. & Ramchandra, R. Cardiorespiratory interactions in humans and animals: rhythms for life. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **315**, H6–H17 (2018).
3. Fisher, J. P., Zera, T. & Paton, J. F. R. Respiratory–cardiovascular interactions. *Handb. Clin. Neurol.* **188**, 279–308 (2022).
4. Hales, S. *Statical Essays: Containing Haemastaticks* Vol. II (W. Innys, R. Manby, and T. Woodward, London, 1733).
5. Ludwig, C. Beiträge zur Kenntniss des Einflusses der Respirationsbewegungen auf den Blutlauf im Aortensysteme [in German]. *Arch. Anat. Physiol.* **13**, 241–302 (1847).
6. Billman, G. E. Heart rate variability – a historical perspective. *Front. Physiol.* **2**, 86 (2011).
7. Anrep, G., Pascual, W. & Rössler, R. Respiratory variations of the heart rate – II—The central mechanism of the respiratory arrhythmia and the inter-relations between the central and the reflex mechanisms. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **119**, 218–230 (1936).
8. Potter, E. K. Inspiratory inhibition of vagal responses to baroreceptor and chemoreceptor stimuli in the dog. *J. Physiol.* **316**, 177–190 (1981).
9. Gilbey, M. P., Jordan, D., Richter, D. W. & Spyer, K. M. Synaptic mechanisms involved in the inspiratory modulation of vagal cardio-inhibitory neurones in the cat. *J. Physiol.* **356**, 65–78 (1984).
10. Wang, Y. & Ramage, A. G. The role of central 5-HT_{1A} receptors in the control of B-fibre cardiac and bronchoconstrictor vagal preganglionic neurones in anaesthetized cats. *J. Physiol.* **536**, 753–767 (2001).
11. Neff, R. A., Wang, J., Baxi, S., Evans, C. & Mendelowitz, D. Respiratory sinus arrhythmia: endogenous activation of nicotinic receptors mediates respiratory modulation of brainstem cardioinhibitory parasympathetic neurons. *Circ. Res.* **93**, 565–572 (2003).
12. Farmer, D. G. S., Dutschmann, M., Paton, J. F. R., Pickering, A. E. & McAllen, R. M. Brainstem sources of cardiac vagal tone and respiratory sinus arrhythmia. *J. Physiol.* **594**, 7249–7265 (2016).
13. Gourine, A. V., Machhada, A., Trapp, S. & Spyer, K. M. Cardiac vagal preganglionic neurones: an update. *Auton. Neurosci.* **199**, 24–28 (2016).
14. Menuet, C. et al. PreBötzinger complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. *eLife* **9**, e57288 (2020).
15. Buron, J. et al. The oxytocin-modulated brain circuit that synchronizes heart rate with breathing. Preprint at *bioRxiv* https://doi.org/10.1101/2023.09.26.559512 (2023).
16. McAllen, R. M., Salo, L. M., Paton, J. F. R. & Pickering, A. E. Processing of central and reflex vagal drives by rat cardiac ganglion neurones: an intracellular analysis. *J. Physiol.* **589**, 5801–5818 (2011).
17. Grossman, P. Respiratory sinus arrhythmia (RSA), vagal tone and biobehavioral integration: beyond parasympathetic function. *Biol. Psychol.* **186**, 108739 (2024).
18. Farmer, D. G. S. et al. Firing properties of single axons with cardiac rhythmicity in the human cervical vagus nerve. *J. Physiol.* **603**, 1941–1958 (2024).
19. Grossman, P. & Taylor, E. W. Toward understanding respiratory sinus arrhythmia: relations to cardiac vagal tone, evolution and biobehavioral functions. *Biol. Psychol.* **74**, 263–285 (2007).
20. Hirsch, J. A. & Bishop, B. Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate. *Am. J. Physiol.* **241**, H620–H629 (1981).
21. Taylor, E. W., Wang, T. & Leite, C. A. C. An overview of the phylogeny of cardiorespiratory control in vertebrates with some reflections on the 'polyvagal theory'. *Biol. Psychol.* **172**, 108382 (2022).
22. Monteiro, D. A. et al. Cardiorespiratory interactions previously identified as mammalian are present in the primitive lungfish. *Sci. Adv.* **4**, eaaq0800 (2018).
23. Hayano, J., Yasuma, F., Okada, A., Mukai, S. & Fujinami, T. Respiratory sinus arrhythmia. A phenomenon improving pulmonary gas exchange and circulatory efficiency. *Circulation* **94**, 842–847 (1996).
24. Ben-Tal, A., Shamailov, S. S. & Paton, J. F. R. Evaluating the physiological significance of respiratory sinus arrhythmia: looking beyond ventilation–perfusion efficiency. *J. Physiol.* **590**, 1989–2008 (2012).
25. Davies, H. E. Respiratory change in heart rate, sinus arrhythmia in the elderly. *Gerontol. Clin.* **17**, 96–100 (1975).
26. Shanks, J. et al. Reverse re-modelling chronic heart failure by reinstating heart rate variability. *Basic. Res. Cardiol.* **117**, 4 (2022).
27. O'Callaghan, E. L. et al. Enhancing respiratory sinus arrhythmia increases cardiac output in rats with left ventricular dysfunction. *J. Physiol.* **598**, 455–471 (2020).
28. Bernardi, L. et al. Effect of rosary prayer and yoga mantras on autonomic cardiovascular rhythms: comparative study. *BMJ* **323**, 1446–1449 (2001).

29. Kromenacker, B. W., Sanova, A. A., Marcus, F. I., Allen, J. J. B. & Lane, R. D. Vagal mediation of low-frequency heart rate variability during slow yogic breathing. *Psychosom. Med.* **80**, 581–587 (2018).
30. Dick, T. E., Mims, J. R., Hsieh, Y.-H., Morris, K. F. & Wehrwein, E. A. Increased cardio-respiratory coupling evoked by slow deep breathing can persist in normal humans. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **204**, 99–111 (2014).
31. Malik, M. et al. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J.* **17**, 354–381 (1996).
32. Ritz, T. Putting back respiration into respiratory sinus arrhythmia or high-frequency heart rate variability: implications for interpretation, respiratory rhythmicity, and health. *Biol. Psychol.* **185**, 108728 (2024).
33. Shaffer, F. & Ginsberg, J. P. An overview of heart rate variability metrics and norms. *Front. Public. Health* **5**, 258 (2017).
34. National Heart, Lung, and Blood Institute. Arrhythmias: What Is an Arrhythmia? *NIH* www.nhlbi.nih.gov/health/arrhythmias (2022).
35. American Heart Association. What is an Arrhythmia? *American Heart Association* www.heart.org/en/health-topics/arrhythmia/about-arrhythmia (2024).
36. Wikipedia. Arrhythmia. *Wikipedia* en.wikipedia.org/wiki/Arrhythmia (2025).
37. Singh, N. et al. Heart rate variability: an old metric with new meaning in the era of using mHealth technologies for health and exercise training guidance. Part two: prognosis and training. *Arrhythm. Electrophysiol. Rev.* **7**, 247–255 (2018).
38. Singh, N. et al. Heart rate variability: an old metric with new meaning in the era of using mHealth technologies for health and exercise training guidance. Part one: physiology and methods. *Arrhythm. Electrophysiol. Rev.* **7**, 193–198 (2018).
39. Berntson, G. G. et al. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology* **34**, 623–648 (1997).
40. Grossman, P. Respiratory and cardiac rhythms as windows to central and autonomic biobehavioral regulation: selection of window frames, keeping the panes clean and viewing the neural topography. *Biol. Psychol.* **34**, 131–161 (1992).
41. Ritz, T. How to account for respiration in respiratory sinus arrhythmia: publication standards for heart rate variability studies in *Biological Psychology*. *Biol. Psychol.* **190**, 108806 (2024).
42. Porges, S. W. *The Polyvagal Theory: Neurophysiological Foundations of Emotions, Attachment, Communication, and Self-Regulation*. (W. W. Norton, 2011).
43. Grossman, P. Fundamental challenges and likely refutations of the five basic premises of the polyvagal theory. *Biol. Psychol.* **180**, 108589 (2023).
44. Boscan, P., Allen, A. M. & Paton, J. F. Baroreflex inhibition of cardiac sympathetic outflow is attenuated by angiotensin II in the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* **103**, 153–160 (2001).
45. Perlini, S. et al. Determinants of respiratory sinus arrhythmia in the vagotomized rabbit. *Am. J. Physiol.* **269**, H909–H915 (1995).
46. Karemaker, J. M. The multibranched nerve: vagal function beyond heart rate variability. *Biol. Psychol.* **172**, 108378 (2022).
47. Jänig, W. *The Integrative Action of the Autonomic Nervous System: Neurobiology of Homeostasis* 2nd edn (Cambridge Univ. Press, 2022).
48. Biaggioni, I. et al. (eds) *Primer on the Autonomic Nervous System* 4th edn (Elsevier, 2022).
49. Grasso, R., Schena, F., Gulli, G. & Cevese, A. Does low-frequency variability of heart period reflect a specific parasympathetic mechanism? *J. Auton. Nerv. Syst.* **63**, 30–38 (1997).
50. Goldstein, D. S., Bentho, O., Park, M.-Y. & Sharabi, Y. Low-frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes. *Exp. Physiol.* **96**, 1255–1261 (2011).
51. Cooke, W. H. et al. Human responses to upright tilt: a window on central autonomic integration. *J. Physiol.* **517**, 617–628 (1999).
52. Kralemann, B. et al. In vivo cardiac phase response curve elucidates human respiratory heart rate variability. *Nat. Commun.* **4**, 2418 (2013).
53. Paterson, D. J. & Shivkumar, K. Bioelectronics for neurocardiology: diagnosis and therapeutics. *Eur. Heart J.* **44**, 4822–4825 (2023).
54. Herring, N., Kalla, M. & Paterson, D. J. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 707–726 (2019).
55. Hsueh, B. et al. Cardiogenic control of affective behavioural state. *Nature* **615**, 292–299 (2023).
56. Jammal Salameh, L., Bitzenhofer, S. H., Hanganu-Opatz, I. L., Dutschmann, M. & Egger, V. Blood pressure pulsations modulate central neuronal activity via mechanosensitive ion channels. *Science* **383**, eadk8511 (2024).
57. Korsak, A. et al. Immediate and sustained increases in the activity of vagal preganglionic neurons during exercise and after exercise training. *Cardiovasc. Res.* **119**, 2329–2341 (2023).
58. Shanks, J., Pachen, M., Chang, J. W.-H., George, B. & Ramchandra, R. Cardiac vagal nerve activity increases during exercise to enhance coronary blood flow. *Circ. Res.* **133**, 559–571 (2023).
59. Veerakumar, A., Yung, A. R., Liu, Y. & Krasnow, M. A. Molecularly defined circuits for cardiovascular and cardiopulmonary control. *Nature* **606**, 739–746 (2022).
60. Yoshimoto, A., Morikawa, S., Kato, E., Takeuchi, H. & Ikegaya, Y. Top-down brain circuits for operant bradycardia. *Science* **384**, 1361–1368 (2024).
61. Bainbridge, F. A. The influence of venous filling upon the rate of the heart. *J. Physiol.* **50**, 65–84 (1915).
62. Crystal, G. J. & Salem, M. R. The Bainbridge and the 'reverse' Bainbridge reflexes: history, physiology, and clinical relevance. *Anesth. Analg.* **114**, 520–532 (2012).
63. Quinn, T. A. & Kohl, P. The Bainbridge effect: stretching our understanding of cardiac pacemaking for more than a century. *J. Physiol.* **600**, 4377–4379 (2022).
64. Conci, F., Di Rienzo, M. & Castiglioni, P. Blood pressure and heart rate variability and baroreflex sensitivity before and after brain death. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **71**, 621–631 (2001).
65. Taha, B. H., Simon, P. M., Dempsey, J. A., Skatrud, J. B. & Iber, C. Respiratory sinus arrhythmia in humans: an obligatory role for vagal feedback from the lungs. *J. Appl. Physiol.* **78**, 638–645 (1995).
66. Norman, G. J. et al. Oxytocin increases autonomic cardiac control: moderation by loneliness. *Biol. Psychol.* **86**, 174–180 (2011).
67. Weisman, O., Zagoory-Sharon, O. & Feldman, R. Oxytocin administration to parent enhances infant physiological and behavioral readiness for social engagement. *Biol. Psychiatry* **72**, 982–989 (2012).
68. Ghibaudo, V., Granget, J., Dereli, M., Buonviso, N. & Garcia, S. A unifying method to study respiratory sinus arrhythmia dynamics implemented in a new toolbox. *eNeuro* https://doi.org/10.1523/ENEURO.0197-23.2023 (2023).

Acknowledgements
D.J.P., K.S. and N.H. acknowledge support from a Leducq International Network of Excellence Award on Bioelectronics for Neurocardiology. N.H. is supported by a British Heart Foundation Senior Clinical Research Fellowship. E.G.L. is supported by the Intramural Research Program of the NIH, National Institute on Aging. I.H.Z. is supported in part by the Theodore F. Hubbard Family Foundation.

Author contributions
C.M. researched data for the article. C.M., A.B.-T., A.M.A., D.G.S.F., E.W.T., J.F.R.P., J.B., P.G., T.R. and A.V.G. discussed the content of the article. C.M. and A.V.G. wrote the manuscript. All the authors discussed and edited the article before submission. Apart from C.M. and A.V.G., the authors are listed in alphabetical order of their first name.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Peer review information *Nature Reviews Cardiology* thanks Alberto Porta, Frank Wilhelm and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

© Springer Nature Limited 2025

Clément Menuet[1] ✉, Alona Ben-Tal[2,3], Ambre Linossier[1], Andrew M. Allen[4], Benedito H. Machado[5], Davi J. A. Moraes[6], David G. S. Farmer[7], David J. Paterson[8], David Mendelowitz[9], Edward G. Lakatta[10], Edwin W. Taylor[11], Gareth L. Ackland[12], Irving H. Zucker[13], James P. Fisher[3], James S. Schwaber[14], Julia Shanks[3], Julian F. R. Paton[3], Julie Buron[15], K. Michael Spyer[16], Kalyanam Shivkumar[17], Mathias Dutschmann[18,19], Michael J. Joyner[20], Neil Herring[8], Paul Grossman[21], Robin M. McAllen[22], Rohit Ramchandra[3], Song T. Yao[4], Thomas Ritz[23] & Alexander V. Gourine[16]

[1]INMED, INSERM, Aix-Marseille University, Marseille, France. [2]Insightful Modelling, Auckland, New Zealand. [3]Manaaki Manawa - The Centre for Heart Research, Department of Physiology, Faculty of Medical & Health Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand. [4]Department of Anatomy & Physiology, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia. [5]Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. [6]Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. [7]Department of Neuroscience, School of Translational Medicine, Monash University, Melbourne, Victoria, Australia. [8]Burdon Sanderson Cardiac Science Centre and BHF Centre of Research Excellence, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford, UK. [9]Department of Pharmacology and Physiology, George Washington University, Washington, DC, USA. [10]Laboratory of Cardiovascular Science, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MA, USA. [11]School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham, UK. [12]Translational Medicine and Therapeutics, William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London, UK. [13]Department of Cellular and Integrative Physiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA. [14]Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Daniel Baugh Institute for Functional Genomics and Computational Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA. [15]Department of Fundamental Neurosciences, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. [16]Centre for Cardiovascular and Metabolic Neuroscience, Neuroscience, Physiology & Pharmacology, University College London, London, UK. [17]University of California Los Angeles (UCLA) Cardiac Arrhythmia Center, Los Angeles, CA, USA. [18]Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep Medicine, Department of Medicine, University Hospitals Cleveland Medical Center and Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA. [19]Center for Sleep Disorders Research, Louis Stokes Cleveland VA Medical Center and Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA. [20]Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA. [21]Department of Psychosomatic Medicine, University Hospital Basel, Basel, Switzerland. [22]The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia. [23]Department of Psychology, Southern Methodist University, Dallas, TX, USA.

Partie 2

Article accepté dans Nature Neuroscience. Version finalisée, avant échanges avec l'éditeur.

The oxytocin-modulated brain circuit that synchronizes heart rate with breathing

Julie Buron[1], Ambre Linossier[1], Christian Gestreau[1], Fabienne Schaller[1], Roman Tyzio[1], Marie-Solenne Felix[1], Valéry Matarazzo[1], Muriel Thoby-Brisson[2], Françoise Muscatelli[1], Clément Menuet[1]*

Affiliations:

[1] INMED, INSERM, Aix-Marseille University, Marseille, France.

[2] INCIA, CNRS, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

* Correspondence: clement.menuet@inserm.fr

Abstract

The variation in heart rate in phase with breathing, called respiratory sinus arrhythmia (RSA), is cardio-protective[1,2]. RSA amplitude provides an index of health and physical fitness used both clinically, and by the broader population using "smart" watches. Relaxation and positive socio-emotional states can amplify RSA[3], yet the underlying mechanism remains largely unknown. Here, we identify a hypothalamus-brainstem neuronal network through which the neuromodulator oxytocin (OT), known for its relaxing and prosocial effects[4], amplifies RSA during calming behavior. OT neurons from the caudal paraventricular nucleus in the hypothalamus were found to regulate the activity of a subgroup of inhibitory neurons in the pre-Bötzinger complex, the brainstem neuronal group that generates the inspiratory rhythm. Specifically, OT amplifies the inspiratory glycinergic input from pre-Bötzinger complex neurons to cardiac-innervating parasympathetic neurons in the nucleus ambiguus. This leads to amplified respiratory modulation of parasympathetic activity to the heart, thereby amplifying RSA. Behaviorally, OT neurons participate in the restoration of RSA amplitude during recovery from stress. This work shows how a central action of OT induces a physiologically beneficial regulation of cardiac activity during a calming behavior, providing a foundation for therapeutic strategies for anxiety disorders and coping with stress. Furthermore, it identifies a phenotypic signature of a subpopulation of neurons controlling RSA, namely pre-Bötzinger complex neurons expressing the OT-receptor, enabling the specific modulation of RSA amplitude to resolve its physiological and psychological functions.

Main text

Heart rate (HR) is highly variable. It is continuously regulated by the autonomic nervous system to maintain blood gas homeostasis, and to produce physiological manifestations of emotional states such as increased HR during stress and decreased HR during relaxation. A predominant

source of HR variability originates from its coupling with respiratory activity, called respiratory sinus arrhythmia (RSA), where HR increases during inspiration and decreases during expiration. Physiologically, RSA optimizes cardiac efficiency, with increased cardiac activity occurring during inspiration when the myocardium receives oxygenated blood and *vice versa* during expiration, while maintaining physiological levels of arterial CO_2[1]. Yet RSA has broader impact. The amplitude of RSA - i.e. the difference between maximal HR during inspiration and minimal HR during expiration - is larger in young individuals and in well-trained athletes, decreases with age, and is dramatically reduced in hypertension and chronic heart failure[1]. Restoration of RSA amplitude in animal models of chronic heart failure, using a biofeedback heart pacemaker, induces large and persistent improvements in cardiac function[2,5]. RSA amplitude is also strongly modulated by emotional states. RSA is amplified during relaxation and positive socio-emotional states like parental bonding, while it is strongly decreased or even becomes negative in anxious or depressive people, and in autism spectrum disorder[3,6,7]. Interestingly, the neuropeptide oxytocin (OT), widely studied for its relaxing, anxiolytic and pro-social effects[4], has been found to amplify RSA after intranasal administration in humans[8].

RSA is mainly generated *via* parasympathetic activity to the heart, mediated by the vagus nerve, which originates from two brainstem nuclei: the nucleus ambiguus (nA) and the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMV)[9]. Cardiac-innervating nA ($nA^{Cardiac}$) neurons, whose activity decreases HR, are inhibited during inspiration and activated during expiration, thereby generating RSA[9–11]. $DMV^{Cardiac}$ neurons are tonically active, and can regulate mean HR (mHR)[9]. The inhibition of $nA^{Cardiac}$ neuronal activity during inspiration most likely arises from the adjacent pre-Bötzinger Complex (preBötC), the neuronal group that generates the inspiratory rhythm[12–14]. Also, pharmacological studies and the presence of a high density of OT fibers in the preBötC/nA area at the macroscopic level suggest that endogenous OT, which is primarily synthesized by neurons in the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei of the hypothalamus, could modulate the activity of preBötC and/or nA neurons[15–17]. Here, by employing a variety of experimental approaches, we tested whether OT could amplify RSA *via* a central action on preBötC/nA neurons, with the dual aim of specifying the neuronal circuitry that generates RSA, and identifying a mechanism for central RSA amplification with its behavioral relevance.

PVN^{OT}→preBötC/nA neurons induce an amplification of RSA and a decrease in mHR. To determine if preBötC and/or nA neurons receive OT projections, we immunolabelled OT fibers and labelled preBötC or nA neurons in adult WT mice (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1a, b). The preBötC is defined by its anatomical location in the ventrolateral medulla oblongata, and its function generating the inspiratory rhythm[18–20]. It contains a network of heterogeneous neurons, with subgroups that are distinguishable by their developmental origin (e.g. $Dbx1^{+}$), neurochemistry (e.g. glutamatergic, glycinergic, GABAergic), receptor expression (e.g. μopioid receptor (μO-R), neurokinin 1 receptor (NK1-R)), or projection profile (e.g. projection to the contralateral preBötC to synchronize the generation of the inspiratory rhythm[21]). To locate the preBötC, we used the addition of three identifying criteria: the generation of the inspiratory rhythm, the axonal projections to the contralateral preBötC, and the classical anatomical landmarks for the preBötC (in particular the shape of the inferior olives[22] and the rostro-caudal position relative to the 4th ventricle). We made extracellular recordings to precisely localize the

characteristic pre-inspiratory/inspiratory neurons of the preBötC[12] (all preBötC injections in this study were guided this way, Extended Data Fig. 1b), and we injected the retrograde neuronal tracer, FluoroGold, unilaterally at this coordinate. The contralateral preBötC was then defined by boundaries surrounding FluoroGold$^+$ neurons at the classical preBötC anatomical landmarks (Extended Data Fig. 1b, c). On the other hand, nA neurons, including nA^{Cardiac} neurons, form a nucleus of parasympathetic preganglionic neurons, predominantly sending their axons into the vagus nerve. nA neurons were labeled by intraperitoneal FluoroGold injection (Extended Data Fig. 1a, c). We found dense OT fibers throughout the rostro-caudal extent of the preBötC, some in close apposition to contralaterallyprojecting preBötC neurons, but fewer OT fibers near nA neurons (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1c, d). To identify which OT neurons project to preBötC/nA neurons, we injected the retrograde neuronal tracer, cholera toxin B, bilaterally into the preBötC/nA (Fig. 1b, Extended Data Fig. 1e-g). OT→preBötC/nA neurons were restricted to the caudal dorso-lateral PVN, forming a dense and specific cluster of PVN^{OT} neurons that project onto preBötC/nA neurons.

Next we examined whether these PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA can modulate cardiorespiratory function, and in particular RSA. We used OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2) adult female mice to optogenetically stimulate PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA bilaterally, *in vivo* in freely moving condition (Fig. 1c-d, Extended Data Fig. 2a, b). Cardiorespiratory functions were assessed with telemetry ECG and whole-body plethysmography. Prolonged photoexcitation (1 min, 50 Hz, 10 ms pulses, 10 mW) in animals during rest induced a strong and sustained amplification of RSA (+56 %, from 13.2 ± 3.2 to 19.5 ± 4.3 bpm) and a sustained decrease in mHR (-7 %, from 532 ± 18 to 497 ± 19 bpm). However, it had only a moderate respiratory effect, inducing a small increase in respiratory frequency (+5 %, from 125 ± 9 to 130 ± 9 cpm) with no change in respiratory amplitude (Fig. 1e-g). There was no effect of photostimulation in control mice. These data show that PVN^{OT}→preBötC/nA neurons can amplify RSA and decrease mHR in mice at rest.

OT release in the preBötC/nA by PVN^{OT}→preBötC/nA neurons induces the amplification of RSA.

OT fibers can release OT, but also other neurotransmitters such as glutamate[23,24]. To determine if the cardiorespiratory effects evoked by photoexcitation of PVN^{OT} fibers are due specifically to a release of OT in the preBötC/nA, we used anesthetized OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2) adult mice and recorded ECG and inspiratory EMG. Unilateral photoexcitation of PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA induced a RSA amplification (+53 %, from 3.8 ± 0.5 to 5.8 ± 0.8 bpm in females; +50 %, from 6.1 ± 0.9 to 9.0 ± 1.3 bpm in males) and a mHR decrease (-2 %, from 269.5 ± 11.9 to 264.5 ± 12.04 bpm in females; -3 %, from 214.1 ± 6.6 to 207.8 ± 6.6 bpm in males) (Fig. 2a-c), of slightly reduced magnitudes compared to bilateral photoexcitation in conscious mice (Fig. 1e-g). There was no change in respiratory frequency, but a tendency for an increase in inspiratory amplitude. As female and male mice had responses of similar profiles and magnitudes (Fig. 2c, Extended Data Fig. 3a), mixed sexes were used in all cohorts throughout the rest of this study (unless specified). A selective OT receptor (OT-R) antagonist ((d(CH_2)$_5^1$,Tyr(Me)^2,Thr^4,Orn^8,des-Gly-NH_2^9)-Vasotocin)[23,25] was then injected unilaterally in the preBötC/nA (Fig. 2i), which upon

photoexcitation at the same site almost abolished the RSA amplification, while the decrease in mHR persisted (Fig. 2e-g, Extended Data Fig. 3b-d). Photoexcitation following injection of vehicle (Fig. 2e, g, Extended Data Fig. 3c-d and 4a-b), or photoexcitation of the preBötC/nA contralateral to the OT-R antagonist injection site (Fig. 2e-g, Extended Data Fig. 3b-d), induced similar cardiorespiratory effects as in the control preinjection condition. These data show that PVN^{OT} neurons can induce RSA amplification by releasing OT in the preBötC/nA, whereas the mHR effect is dependent on a different mechanism.

Interestingly, the larger the RSA amplitude was prior to the photoexcitation of PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA, the larger the delta in RSA amplification was during photoexcitation, with a strong correlation between the two parameters occurring in both the freely moving and anesthetized conditions (Fig. 1h and 2d). This suggests that OT likely acts in the preBötC/nA as a RSA gain amplifier. By contrast, the photoexcitation-induced decrease in mHR was not correlated with the pre-photoexcitation mHR level, further pointing towards a different underlying mechanism. OT was previously shown to act in the DMV to decrease mHR[26]. Photoexcitation of OT fibers in the DMV before and after the injection of the OT-R antagonist in the preBötC/nA induced the same effects as the preBötC/nA photoexcitations, with RSA amplification only before the injection of the OT-R antagonist, and mHR decrease both before and after the antagonist injection (Fig. 2h-k, Extended Data Fig. 3e-g). This suggests that some OT fibers could contact both the preBötC/nA and the DMV to amplify RSA and decrease mHR, respectively. This is supported at the anatomical level, as tracing of OT fibers in CUBICcleared thick brainstem slices of OT::GFP mice containing the preBötC/nA and the DMV showed OT fibers crossing both structures (Fig. 2l).

In the preBötC/nA, a subgroup of inhibitory preBötC neurons expresses the OT-R.

So far, our data show that PVN^{OT} fibers can amplify RSA by releasing OT in the preBötC/nA, most likely acting on preBötC rather than nA neurons because most PVN^{OT} projection fibers were found in the preBötC (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1c-d). To identify the cells modulated by OT to induce RSA amplification, we used OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato) adult mice to label $OT\text{-}R^{+}$ cells (Fig. 3a-e, Extended Data Fig. 5a-d). In the preBötC/nA, very few $OT\text{-}R^{+}$ neurons are nA neurons (7.6 ± 3.8 neurons on each side) or $nA^{Cardiac}$ neurons (2.0 ± 0.9 neurons on each side), identified as nA neurons not expressing the calcitonin gene-related peptide[27,28] - by contrast, most DMV neurons are $OT\text{-}R^{+}$ (587.2.8 ± 106.4 neurons on each side) (Fig. 3a, Extended Data Fig. 5a). $OT\text{-}R^{+}$ cells in the preBötC/nA are predominantly neurons (66.0 ± 4.3

% neurons vs. 12.1 ± 2.6 % astrocytes), with qualitatively small somata (Fig. 3b, Extended Data Fig. 5b). They are present predominantly within the anatomical boundaries of the preBötC, expressing classical markers of the preBötC neuronal population, including the expression of neurokinin 1 and μ-opioid receptors (Fig. 3b, Extended Data Fig. 5c). However, few contralaterally-projecting preBötC neurons were $OT\text{-}R^{+}$. $PreBötC^{OT\text{-}R}$ neurons represent a population of ~700 neurons bilaterally (357.5 ± 4.4 neurons on each side). They are localized throughout the preBötC, with no specific clustering, but appear as a specific population within the respiratory cell column since few $OT\text{-}R^{+}$ neurons were found in the adjacent Bötzinger

Complex (Fig. 3c). These data show that the OT-induced amplification of RSA is most likely mediated via PVN^{OT}→$preBötC^{OT\text{-}R}$ connectivity.

A cumulative body of work suggests that the inspiratory component of RSA is generated by inhibitory preBötC neurons[10–12,14,29]. Also, OT was shown to act selectively on inhibitory neurons in neuronal networks of the hippocampus and the amygdala, to amplify the gain of inhibitory synaptic connectivity[25,30,31]. Accordingly, we tested whether $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons express the two classical inhibitory neurotransmitters GABA or glycine, using OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GAD67::GFP mice, OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GlyT2::eGFP mice and immunolabelling (Fig. 3d-e). We found in adult mice that 50% of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons are GABAergic (Fig. 3d, Extended Data Fig. 5d), and 42% are glycinergic (Fig. 3e, Extended Data Fig. 5d). Therefore, $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons are predominantly inhibitory.

$PreBötC^{OT\text{-}R}$ neurons form a cardiorespiratory hub that controls RSA amplitude *via* $preBötC^{OT\text{-}R}$→$nA^{Cardiac}$ projections.

Our data show that PVN^{OT} neurons can amplify RSA by releasing OT onto $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons, which are predominantly inhibitory, and not by directly modulating the output $nA^{Cardiac}$ neurons. PreBötC neurons are defined as a group of neurons generating the inspiratory rhythm[18–20]. To determine the functional role of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons for cardiorespiratory activities, we injected a Cre-dependent adeno-associated virus (AAV) bilaterally in the preBötC of adult OT-R::Cre mice, to express the somBiPOLES construct that enables bidirectional optogenetic modulation[32] (Fig. 3f, Extended Data Fig. 5e). Prolonged photoexcitation of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons in anesthetized mice induced a rapid and sustained decrease in RSA amplitude (-49.9 ± 6.6 %), an increase in mHR (+5.3 ± 1.8 %) and an increase in respiratory frequency (+23.2 ± 7.3 %) (Fig. 3g-h, Extended Data Fig. 5f). Prolonged photoinhibition of the same neurons induced the opposite effects, causing a rapid and sustained increase in RSA amplitude (+77.2 ± 18.5 %), a decrease in mHR (-3.1 ± 0.7 %) and a decrease in respiratory frequency (-14.3 ± 1.8 %) (Fig. 3g and i, Extended Data Fig. 5g). There was no effect on respiratory amplitude, nor on all parameters in control mice. Interestingly, these bidirectional effects on RSA amplitude indicate that $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons continuously set an ongoing level of RSA amplitude. The large variations in the amplitude of these bidirectional effects indicates that external modulators like OT can induce strong effects on RSA amplitude by acting on $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons. Moreover, $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons are not part of the preBötC inspiratory rhythmogenic subgroup, since the photoinhibition of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons did not terminate respiratory activity, in contrast to an inactivation of preBötC rhythmogenic neurons[12,33,34]. Therefore, $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons form a core cardiorespiratory hub within the preBötC that controls RSA amplitude.

Intraperitoneal injection of the muscarinic receptor antagonist atropine, which blocks parasympathetic activity to the heart, blocked the effects of optogenetic modulations of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons on RSA and mHR, but not the respiratory effects (Fig. 3g-i, Extended Data Fig. 5f and g). This shows that $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons modulate cardiac activity *via* modulation of cardiac parasympathetic activity, therefore most likely *via* $nA^{Cardiac}$ neurons because they are the sole cardiac parasympathetic preganglionic neurons that are respiratory modulated[9–11,14].

Also, the predominantly inhibitory nature of preBötC^{OT-R} neurons (glycinergic and GABAergic) (Fig. 3d and e, Extended Data Fig. 5d), in addition to the direction of mHR effects during the photomodulation of preBötC^{OT-R} neurons (increased mHR during photoexcitation, decreased mHR during photoinhibition) (Fig. 3g-i, Extended Data Fig. 5f and g), strongly suggest that the inputs from preBötC^{OT-R} neurons to cardiac parasympathetic preganglionic neurons are monosynaptic. To determine if preBötC^{OT-R} neurons project onto nA^{Cardiac} neurons, we injected a Cre-dependent AAV in OT-R::Cre mice to express tdTomato and synaptophysin-GFP in preBötC^{OT-R} neurons, and we analyzed the preBötC^{OT-R}→nA^{Cardiac} axonal projections (tdTomato^{+}) and putative pre-synaptic contacts (synaptophysin-GFP^{+}) (Fig. 3j-l). To identify specifically the nA^{Cardiac} neurons, we used intraperitoneal FluoroGold injection to label all nA neurons, and selective immunolabelling of nA^{Cardiac} neurons based on the recent identification of two specific markers, calbindin and butyrylcholinesterase[28] (Fig. 3k and l), and the confirmation of a third marker with the absence of expression of the calcitonin gene-related peptide[27,28]. We found dense preBötC^{OT-R} axonal projections throughout the rostrocaudal extent of the nA. All identified nA^{Cardiac} neurons (51 butyrylcholinesterase^{+} and 17 calbindin^{+} nA^{Cardiac} neurons bilaterally in 4 mice) received projections and putative presynaptic contacts from preBötC^{OT-R} neurons (Fig. 3l). Therefore, these data are consistent with a direct monosynaptic connectivity from preBötC^{OT-R} neurons to nA^{Cardiac} neurons.

The preBötC^{OT-R}→nA^{Cardiac} inspiratory connectivity is glycinergic and amplified by OT. Our results thus far show that preBötC^{OT-R} neurons are predominantly inhibitory, make putative monosynaptic contacts with nA^{Cardiac} neurons, and regulate cardiorespiratory functions and RSA amplitude. It is therefore likely that the amplification of RSA by OT, identified by our optogenetic stimulations of PVN^{OT}→preBötC fibers, is due to an amplification of the preBötC^{OT-R}→nA^{Cardiac} inspiratory and inhibitory connectivity. To test this possibility, we used brainstem slices from newborn mice that contain the preBötC/nA structures, and in which preBötC neurons continue spontaneously to generate rhythmic inspiratory bursting activity[18,35,36]. We first performed extracellular recordings of preBötC population activity, simultaneously with whole-cell current-clamp recordings of inspiratory bursting preBötC neurons (Fig. 4a-b). Bath application of the selective OT-R agonist [Thr^{4},Gly^{7}]-OT (TGOT)[25,37,38] induced an increase in preBötC inspiratory bursting frequency (+47.0 ± 20.4 %), along with an increase in preBötC network excitability as shown by the appearance of spiking activity between ongoing inspiratory bursts (Fig. 4a-c). To confirm that these effects are mediated specifically by TGOT's action on preBötC^{OT-R} neurons, we used isolated preBötC "island" preparations[39], in which TGOT still increased preBötC inspiratory bursting frequency (+40.1 ± 11.5 %) (Fig. 4d-e). Immunolabelling of preBötC^{OT-R} neurons in newborn OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GAD67::GFP and OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GlyT2::eGFP mice displayed a similar expression profile compared to adult mice, with a predominantly inhibitory phenotype (GABAergic and/or glycinergic) (Fig. 4f-g).

Then, to assess the effect of TGOT application on the preBötC^{OT-R}→nA^{Cardiac} connectivity, we performed simultaneous extracellular recordings of preBötC population activity, and whole-cell current- and voltage-clamp recordings of neurons within the nA boundaries that presented inspiratory modulation of their activity (Fig. 4h-i). *Post hoc* immunolabelling confirmed that all recorded neurons were nA neurons (Fig. 4k). As shown previously, inspiratory-modulated

$nA^{Cardiac}$ neurons display spiking activity during the expiratory phase of the respiratory cycle, which is silenced during inspiratory bursts by hyperpolarizing synaptic currents[10,11]. We recorded from nA neurons that were all active during the expiratory period and hyperpolarized during preBötC inspiratory bursts (current-clamp), due to large outward inhibitory currents (voltage-clamp, -40 mV holding voltage) (Fig. 4h-i). TGOT application amplified the volleys of inspiratory inhibitory currents in all recorded nA neurons (+60.6 ± 11.1 %, n = 10 neurons, each from a different mouse) (Fig. 4i-j). Application of the $GABA_A$ receptor antagonist bicuculline had no effect, while application of the glycine receptors antagonist strychnine abolished the inspiratory inhibitory currents in all nA neurons. Following strychnine application, half of these nA neurons showed an absence of remaining currents, while the other half showed excitatory currents during preBötC inspiratory bursts that were undetectable before strychnine application (blocked by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX, data not shown). Also, a post-inhibitory rebound was evident after each volley of inspiratory inhibitory currents on nA neurons (Fig. 4i), inducing an increase in spiking activity immediately after each inspiratory burst (Fig. 4h), which tended to be amplified by TGOT. Together, these electrophysiological data show that OT raises the excitability of inspiratory preBötC neurons, leading to the amplification of the preBötC→$nA^{Cardiac}$ inspiratory glycinergic connectivity.

The OT-induced RSA amplification is mediated *via* amplified respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity from $nA^{Cardiac}$ neurons to the heart.

So far, our data show that a PVN^{OT}→$preBötC^{OT\text{-}R;Glycine}$→$nA^{Cardiac}$ neuronal network can amplify RSA, with PVN^{OT} fibers releasing OT onto inhibitory $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons to amplify the strength of the $preBötC^{OT\text{-}R}$→$nA^{Cardiac}$ inspiratory glycinergic connectivity. This strongly suggests that RSA is then amplified *via* an amplification of the inspiratory modulation of parasympathetic activity from $nA^{Cardiac}$ neurons to the heart. However, preBötC neurons also provide inspiratory modulation of pre-sympathetic neurons of the rostral ventrolateral medulla oblongata, producing a respiratory modulation of blood pressure [12,40,41], which could indirectly regulate RSA amplitude. To address this possibility, we used the *in situ* Working HeartBrainstem Preparation, which enables recording autonomic and respiratory nerve activities in a perfused and decerebrate preparation devoid of the depressant effect of anesthesia[13]. We employed rats because this preparation functions considerably better in rats than in mice, and because the difficult dissection and recording of the vagal branch that provides parasympathetic activity to the heart is more achievable in rats[42]. However, since all our work so far was done in mice, we first used *in vivo* anesthetized rats to confirm the reproducibility of results between both species. Injection of TGOT bilaterally in the preBötC of anesthetized rats induced an amplification of RSA (+52.7 ± 15.8 %), a small yet significant mHR decrease (-1.0 ± 0.4 %), no alteration in respiratory frequency and an increase in inspiratory amplitude (+7.0 ± 4.1 %) (Fig. 5a-c, Extended Data Fig. 6a-c). These effects are therefore very similar to those produced in anesthetized mice by OT release in the preBötC during optogenetic stimulation of PVN^{OT} fibers (Fig. 2). Then, using the *in situ* Working Heart-Brainstem Preparation, injection of TGOT bilaterally in the preBötC induced an amplification of RSA (+107.1 ± 17.8 %), no change in mHR, and no alteration in the frequency and amplitude of inspiratory and postinspiratory discharges recorded from the phrenic and cervical vagus nerves, respectively (Fig. 5d-f, Extended Data Fig.

6d-f). TGOT injection in the preBötC induced no change in thoracic (T8-T10) sympathetic chain recordings, which carry vasomotor activity, and no change in perfusion pressure, which in this preparation is the equivalent to blood pressure. Conversely, TGOT injection in the preBötC induced an amplification of the respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity (+73.6 ± 10.1 %), recorded from the left thoracic cardiac vagal branch[42] (Fig. 5h-i, Extended Data Fig. 6g). These data show that OT in the preBötC induces RSA amplification *via* amplified respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity to the heart, not *via* a modulation of sympathetic vasomotor activity.

OT neurons participate in the recovery of RSA amplitude during calming behavior following a stressful event.

We have identified a multisynaptic neuronal network for OTergic amplification of RSA, from the hypothalamus to the brainstem to the heart. This network can be activated and induce RSA amplification during rest (Fig. 1e-g). Since RSA amplitude is increased during relaxation and calming behaviors[1,3], we tested whether OT neurons can be activated endogenously to participate in the recovery of RSA amplitude during recovery from stress. We used OT::Cre;R26-LSL-hM4Di-DREADD male adult mice to chemogenetically inhibit OT neurons *in vivo* in freely moving condition (Fig. 6, Extended Data Fig. 7). Cardiovascular and respiratory functions were assessed with blood pressure telemetry recordings and whole-body plethysmography. Each mouse was habituated to a dedicated plethysmography chamber for a week, with nesting material from their home cage. At the end of this habituation period, the mice exhibited a predominantly calm and resting behavior in their plethysmography chamber. Then, the mice were injected intraperitoneally with either the DREADD agonist Compound 21 (C21), or vehicle, followed by a resting phase in their plethysmography chamber, a restraint stress test phase in a ventilated cylinder, and a recovery phase back in their plethysmography chamber (Fig. 6c). Compared to vehicle, C21 injections induced no change in RSA amplitude, blood pressure, or respiratory frequency and amplitude during the pre-stress resting phase (Fig. 6d-e, Extended Data Fig. 7). This shows that OT neurons do not influence RSA amplitude in resting condition. However, C21 injection decreased mHR compared to vehicle in both Cre^+ (-8.2 ± 2.3 %) and Cre^- (-6.6 ± 0.9 %) mice, indicating an off-target effect of C21 on mHR. While all DREADD agonists have been shown to exhibit off-target effects[43], importantly here RSA amplitude and respiratory parameters were not affected. Restraint stress induced a strong decrease (by ~50%) in RSA amplitude of the same magnitude in all groups, and a strong increase in mHR, blood pressure and respiratory parameters (Fig. 6c-e, Extended Data Fig. 7). During the recovery from stress, chemogenetic inhibition of OT neurons specifically delayed the recovery in RSA amplitude, but not the return to basal values of other cardiovascular and respiratory parameters. Indeed, in vehicle-injected Cre^+ mice, and in all Cre^- mice, RSA amplitude, mHR, respiratory frequency and amplitude had returned to baseline values 30 min following the stress test. In C21-injected Cre^+ mice, all parameters followed the same recovery kinetic except RSA amplitude which returned to baseline value only 60 min following the stress test. We conclude that the neuronal network for OTergic amplification of RSA is used endogenously during recovery from stress, a calming behavior.

Discussion

We have identified a multisynaptic neuronal network, from the hypothalamus to the brainstem to the heart, for OTergic amplification of RSA, and its implication in the recovery from stress (Extended Data Fig. 8). OT neurons in the caudal PVN in the hypothalamus project to the preBötC/nA and the DMV in the brainstem. PVN^{OT} fibers exert a dual control on HR *via* both areas, inducing RSA amplification through the release of OT in the preBötC/nA, and concomitantly decreasing mHR *via* the DMV. In the preBötC/nA, the OT-R is expressed in a subgroup of preBötC neurons. $PreBötC^{OT\text{-}R}$ neurons are predominantly inhibitory (glycinergic and GABAergic), they regulate both respiratory and cardiac activities, forming a cardiorespiratory hub that controls RSA amplitude. $PreBötC^{OT\text{-}R}$ neurons make putative monosynaptic contacts with $nA^{Cardiac}$ neurons. OT increases the excitability of preBötC neurons, amplifying the inspiratory inhibitory (glycinergic) connectivity from preBötC to nA neurons. This induces an amplification of the respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity, thereby amplifying RSA. On the other hand, sympathetic vasomotor activity is not affected. Our work has thus identified a PVN^{OT}→$preBötC^{OTR;Glycine}$→$nA^{Cardiac}$→Parasympathetic→Heart circuit for RSA amplification, which was found in female and male mice as well as in rats. This connectivity was identified on different experimental preparations in newborn, juvenile and adult animals. Behaviourally, OT does not influence RSA amplitude in resting adult animals, a condition where RSA amplitude is actually large. A stressful event, such as a restraint test, induces a large decrease in RSA amplitude, and OT neurons are involved in the rapid recovery in RSA amplitude during the recovery from stress, but not in the recovery of other respiratory and vascular parameters.

OT neurons were previously shown to regulate cardiac function, including by decreasing mHR, *via* an action on $DMV^{Cardiac}$ neurons[23,26]. However, $DMV^{Cardiac}$ neurons represent only 20% of all cardiac parasympathetic preganglionic neurons, and are commonly referred to as the vagal slow lane to the heart because their axons are unmyelinated C fibers in rodents. Our work showing that OT neurons can only evoke a small (< 5%) decrease in mHR is consistent with the bradycardia levels previously obtained upon direct stimulation of DMV neurons or regulation by OT. Conversely, $nA^{Cardiac}$ neurons represent the remaining 80% of all cardiac parasympathetic preganglionic neurons, and are referred to as the vagal fast lane to the heart because their axons are myelinated B fibers. Stimulation of nA neurons induces fast and profound bradycardia, which is consistent with the encoding of RSA - i.e. fast and large oscillations in HR - *via* $nA^{Cardiac}$ neurons. We show that OT can induce a large amplification of RSA (> 50%) by modulating the strength of the $preBötC^{OT\text{-}R;Glycine}$→$nA^{Cardiac}$ neuronal connectivity. Therefore, our data provide further evidence for the dichotomy in the regulation of cardiac activity by $nA^{Cardiac}$ and $DMV^{Cardiac}$ neurons, with OT neurons regulating independently RSA amplitude and mHR *via* each nucleus (respectively).

Our results also identify a phenotypic signature of key nodal neurons - $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons - that control RSA amplitude by generating at least part of the inspiratory component of RSA. Optogenetic modulations of the activity of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons enabled large and bidirectional variations in RSA amplitude (+80 % / -50 %), indicating that this preBötC neuronal subgroup participates in setting the ongoing RSA level. Further, we show that (i) $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons are predominantly inhibitory, (ii) they are presynaptic partners to $nA^{Cardiac}$ neurons, and (iii) OT

application enhances the excitability of preBötC inspiratory neurons and amplifies the inspiratory inhibitory (glycinergic) post-synaptic currents recorded in nA neurons. Given that about half of the inhibitory preBötC neurons are inspiratory[36,44], collectively our data show that preBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons generate at least part of the inhibitory inspiratory modulation of cardiac parasympathetic activity, which leads to the increase in HR during inspiration. This is a major component in the generation of RSA, since HR automatically decreases after inspiration due to a predominant parasympathetic tone in mammals at thermoneutrality. PreBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons may even participate in the increased parasympathetic tone just after inspiration, by inducing a post-inhibitory rebound of excitation on nA neurons after inspiration (Fig. 4h-i). Still, part of the cardiac parasympathetic tone originates from respiratory neurons that are active during early expiration (post-inspiration), most likely the pontine Kölliker-Fuse neurons[42]. Future studies could investigate a putative role of OT in the amplification of the expiratory component of RSA.

When anxious, stressed or scared, and feeling our heart pounding in our chest, taking deep breaths is a universal way to calm down. Indeed, slow and deep breaths strongly amplify RSA and decrease mHR. Ancestral breathing techniques, such as yogic pranayama, and more recent ones like “boxed” breathing or the “365” breathing method, all rely on deep slow breathing to amplify RSA. Even Buddhist mantras and Catholic rosary prayers amplify RSA by inducing slow deep breathing[45]. In all these practices, voluntary deep slow breathing is used to indirectly decrease mHR, by amplifying the respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity and therefore RSA. Our work identifies a non-voluntary hypothalamus-brainstem neuronal network that similarly amplifies RSA when calming down during recovery from stress. This network could participate more globally in the amplification of RSA during positive socio-emotional states in humans where breathing is not consciously altered, such as during parental bonding. Interestingly, the OTergic amplification of RSA is mediated by a specific amplification of the respiratory→cardiac parasympathetic (preBötC$^{OTR;Glycine}$→nA^{Cardiac}) connectivity, with very little (if any) alteration in the respiratory activity *per se*. Therefore, RSA amplification by OT administration could be used as a therapeutic strategy in cardiovascular and mental disorders in which RSA amplitude is severely decreased, without adverse effects on respiratory function. Finally, whether variations in RSA amplitude are exclusively a physiological representation of mental states, or can also cause variations in mental states *per se*, remains unanswered. Recently, the finding that tachycardia is anxiogenic *per se*, which has been empirically accepted but never definitively proven, was demonstrated through elegant and selective optogenetic control of HR[46]. We propose that chronic modulations of preBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons will enable the selective amplification or reduction of RSA, to clearly resolve its physiological and psychological functions.

Bibliography

1. Elstad, M., O'Callaghan, E. L., Smith, A. J., Ben-Tal, A. & Ramchandra, R. Cardiorespiratory interactions in humans and animals: rhythms for life. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **315**, H6–H17 (2018).

2. Shanks, J. *et al.* Reverse re-modelling chronic heart failure by reinstating heart rate variability. *Basic Res Cardiol* **117**, 4 (2022).

3. Balzarotti, S., Biassoni, F., Colombo, B. & Ciceri, M. R. Cardiac vagal control as a marker of emotion regulation in healthy adults: A review. *Biol Psychol* **130**, 54–66 (2017).

4. Lee, H.-J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H. & Young, W. S. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* **88**, 127–151 (2009).

5. O'Callaghan, E. L. *et al.* Enhancing respiratory sinus arrhythmia increases cardiac output in rats with left ventricular dysfunction. *J Physiol* **598**, 455–471 (2020).

6. Rassler, B., Schwerdtfeger, A. R., Schwarz, G. & Pfurtscheller, G. Negative respiratory sinus arrhythmia (nRSA) in the MRI-scanner - a physiologic phenomenon observed during elevated anxiety in healthy persons. *Physiol Behav* **245**, 113676 (2022).

7. Patriquin, M. A., Hartwig, E. M., Friedman, B. H., Porges, S. W. & Scarpa, A. Autonomic response in autism spectrum disorder: Relationship to social and cognitive functioning. *Biol Psychol* **145**, 185–197 (2019).

8. Norman, G. J. *et al.* Oxytocin increases autonomic cardiac control: moderation by loneliness. *Biol Psychol* **86**, 174–180 (2011).

9. Gourine, A. V., Machhada, A., Trapp, S. & Spyer, K. M. Cardiac vagal preganglionic neurones: An update. *Auton Neurosci* **199**, 24–28 (2016).

10. Neff, R. A., Wang, J., Baxi, S., Evans, C. & Mendelowitz, D. Respiratory sinus arrhythmia: endogenous activation of nicotinic receptors mediates respiratory modulation of brainstem cardioinhibitory parasympathetic neurons. *Circ. Res.* **93**, 565–572 (2003).

11. Gilbey, M. P., Jordan, D., Richter, D. W. & Spyer, K. M. Synaptic mechanisms involved in the inspiratory modulation of vagal cardio-inhibitory neurones in the cat. *J. Physiol. (Lond.)* **356**, 65–78 (1984).

12. Menuet, C. *et al.* PreBötzinger complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. *eLife* **9**, e57288 (2020).

13. Paton, J. F. R. *et al.* Advancing respiratory–cardiovascular physiology with the working heart–brainstem preparation over 25 years. *The Journal of Physiology* **600**, 2049–2075 (2022).

14. Frank, J. G., Jameson, H. S., Gorini, C. & Mendelowitz, D. Mapping and identification of GABAergic neurons in transgenic mice projecting to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus using photo-uncaging. *J. Neurophysiol.* **101**, 1755–1760 (2009).

15. Mack, S. O. *et al.* Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **92**, 826–834 (2002).

16. Mack, S. O., Wu, M., Kc, P. & Haxhiu, M. A. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **102**, 189–199 (2007).

17. Son, S. *et al.* Whole-Brain Wiring Diagram of Oxytocin System in Adult Mice. *J Neurosci* **42**, 5021–5033 (2022).

18. Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W. & Feldman, J. L. PreBötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726–729 (1991).

19. Del Negro, C. A., Funk, G. D. & Feldman, J. L. Breathing matters. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 351–367 (2018).

20. Ramirez, J.-M. & Baertsch, N. A. The Dynamic Basis of Respiratory Rhythm Generation:

One Breath at a Time. *Annu. Rev. Neurosci.* **41**, 475–499 (2018).

21. Bouvier, J. *et al.* Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat. Neurosci.* **13**, 1066–1074 (2010).

22. Ruangkittisakul, A., Kottick, A., Picardo, M. C. D., Ballanyi, K. & Del Negro, C. A. Identification of the pre-Bötzinger complex inspiratory center in calibrated 'sandwich' slices from newborn mice with fluorescent Dbx1 interneurons. *Physiol Rep* **2**, e12111 (2014).

23. Piñol, R. A., Jameson, H., Popratiloff, A., Lee, N. H. & Mendelowitz, D. Visualization of oxytocin release that mediates paired pulse facilitation in hypothalamic pathways to brainstem autonomic neurons. *PloS One* **9**, e112138 (2014).

24. Hasan, M. T. *et al.* A Fear Memory Engram and Its Plasticity in the Hypothalamic Oxytocin System. *Neuron* **103**, 133-146.e8 (2019).

25. Owen, S. F. *et al.* Oxytocin enhances hippocampal spike transmission by modulating fastspiking interneurons. *Nature* **500**, 458–462 (2013).

26. Dyavanapalli, J. *et al.* Activation of Oxytocin Neurons Improves Cardiac Function in a Pressure-Overload Model of Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci* **5**, 484–497 (2020).

27. Richardson, R. J., Grkovic, I. & Anderson, C. R. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res* **314**, 337–350 (2003).

28. Veerakumar, A., Yung, A. R., Liu, Y. & Krasnow, M. A. Molecularly defined circuits for cardiovascular and cardiopulmonary control. *Nature* **606**, 739–746 (2022).

29. Furuya, W. I., Dhingra, R. R., Trevizan-Baú, P., McAllen, R. M. & Dutschmann, M. The role of glycinergic inhibition in respiratory pattern formation and cardio-respiratory coupling in rats. *Curr Res Physiol* **4**, 80–93 (2021).

30. Huber, D., Veinante, P. & Stoop, R. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science* **308**, 245–248 (2005).

31. Knobloch, H. S. *et al.* Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* **73**, 553–566 (2012).

32. Vierock, J. *et al.* BiPOLES is an optogenetic tool developed for bidirectional dual-color control of neurons. *Nat Commun* **12**, 4527 (2021).

33. Tan, W. *et al.* Silencing preBötzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat. Neurosci* **11**, 538–540 (2008).

34. Koizumi, H. *et al.* Voltage-Dependent Rhythmogenic Property of Respiratory PreBötzinger Complex Glutamatergic, Dbx1-Derived, and Somatostatin-Expressing Neuron Populations Revealed by Graded Optogenetic Inhibition. *eNeuro* **3**, ENEURO.0081-16.2016 (2016).

35. Ashhad, S. & Feldman, J. L. Emergent Elements of Inspiratory Rhythmogenesis: Network Synchronization and Synchrony Propagation. *Neuron* **106**, 482-497.e4 (2020).

36. Baertsch, N. A., Baertsch, H. C. & Ramirez, J. M. The interdependence of excitation and inhibition for the control of dynamic breathing rhythms. *Nat Commun* **9**, 843 (2018).

37. Manning, M. *et al.* Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol* **24**, 609–628 (2012).

38. Eliava, M. *et al.* A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* **89**, 1291–1304 (2016).

39. Johnson, S. M., Koshiya, N. & Smith, J. C. Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Bötzinger complex 'island'. *J Neurophysiol* **85**, 1772–1776 (2001).

40. Menuet, C. *et al.* Excessive Respiratory Modulation of Blood Pressure Triggers Hypertension. *Cell Metab.* **25**, 739–748 (2017).

41. Dempsey, B. *et al.* Mapping and Analysis of the Connectome of Sympathetic Premotor Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla of the Rat Using a Volumetric Brain Atlas. *Front. Neural Circuits* **11**, (2017).

42. Farmer, D. G. S., Dutschmann, M., Paton, J. F. R., Pickering, A. E. & McAllen, R. M. Brainstem sources of cardiac vagal tone and respiratory sinus arrhythmia. *J. Physiol. (Lond.)* **594**, 7249–7265 (2016).

43. Jendryka, M. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep* **9**, 4522 (2019).

44. Morgado-Valle, C., Baca, S. M. & Feldman, J. L. Glycinergic pacemaker neurons in preBötzinger complex of neonatal mouse. *J. Neurosci.* **30**, 3634–3639 (2010).

45. Bernardi, L. *et al.* Effect of rosary prayer and yoga mantras on autonomic cardiovascular rhythms: comparative study. *BMJ* **323**, 1446–1449 (2001).

46. Hsueh, B. *et al.* Cardiogenic control of affective behavioural state. *Nature* 1–8 (2023) doi:10.1038/s41586-023-05748-8.

47. Yang, C. F., Kim, E. J., Callaway, E. M. & Feldman, J. L. Monosynaptic Projections to Excitatory and Inhibitory preBötzinger Complex Neurons. *Front Neuroanat* **14**, 58 (2020).

48. Fukushima, A., Kataoka, N. & Nakamura, K. An oxytocinergic neural pathway that stimulates thermogenic and cardiac sympathetic outflow. *Cell Rep* **40**, 111380 (2022).

Methods

Table 1: Animal sources

Species and genetic background	Designation	Reference	Additionnal informations
Mice, C57BL6/J	WT		Charles River
Mice, Swiss	WT		Janvier Labs
Mice, C57BL6/J	OT::cre	(Wu *et al.*, 2012)[49]	JAX stock #024234
Mice, C57BL6/J	Ai27(LSL-ChR2)	(Madisen *et al.*, 2012)[50]	JAX stock #012567
Mice, C57BL6/J	OXTR::cre	(Daigle *et al.*, 2018)[51]	JAX stock #031303
Mice, C57BL6/J	Ai14(LSL-tdTomato)	(Madisen *et al.*, 2010)[52]	JAX Stock 007914
Mice, mixed	GAD67::EGFP	(Tamamaki *et al.*, 2003)[53]	Gift from Dr. A.Baude, Inmed
Mice, C57BL6/J	GlyT2::EGFP	(Zeilhofer *et al.*, 2005)[54]	Zeilhofer lab, ETH Zurich
Mice, C57BL6/J	OT::GFP		GENSAT project: Tg(OxteGFP)LC317Gsat/Mmucd

Mice, C57BL6/J	R26-LSL-hM4Di-DREADD	(Zhu *et al.*, 2016)[64]	JAX stock #026219
Rat, Wistar	WT		Janvier Labs

Table 2: Virus and tracer sources

Type	Designation	Source	Identifiers	Additionnal information
Virus, AAV	AAV-phSyn1FLEX-tdTomato-T2A-sypEGFP-WPRE	Addgene	Addgene #51509	Titer : $1.8x10^{13}$ GC/ml
Virus, AAV	AAV9-hSynDIOsomBIPOLESmCerulean	Addgene	Addgene #3154951	Titer : $1.7x10^{13}$ GC/ml
Tracer	FluoroGold	Fluorochrome		0.2 % (IP), 0.5 % (intracerebral) in NaCl
Tracer	Cholera toxin subunit B, Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Ctb-488)	ThermoFisher	C34775	0.01% in NaCl

Tracer	Fluorescent beads (580/605 nm)	ThermoFisher	F8793	0.5 % in aCSF without D-Glucose

Table 3: Primary and secondary antibody sources

Rabbit polyclonal anti-CGRP	Sigma	C8198	1/2500
Rabbit polyclonal anti-NK1R (or antiSubstance P receptor)	Sigma	S8305	1/5000
Mouse monoclonal anti-Tyrosine Hydroxylase	Merk Millipore	MAB318	1/1000
Goat polyclonal anti-Choline Acetyltransferase (ChAT)	Merk Millipore	AB144P	1/200
Rabbit polyclonal anti-Glutamine synthetase	Sigma	G2781	1/1000

Mouse polyclonal anti-PS38	A gift of H. Gainer		1/50
Chicken polyclonal anti-GFP	Avès	1020	1/500
Rabbit polyclonal anti-DsRed	Clontech	632496	1/1000
Goat polyclonal antimCherry	Sicgen antibodies	AB0040-200	1/1000
Mouse monoclonal anti-NeuN	Synaptic System	266011	1/500
Rabbit polyclonal anti-CTB	Invitrogen	PA1-25635	1/1000

Rabbit monoclonal anti-μOpioid Receptor	Abcam	Ab134054	1/100
Goat polyclonal anti-BCHE	Biotechne	AF9024	1/100
Rabbit anti-Calbindin	Swant	CB-38a	1/8000
Rabbit polyclonal anti-Oxytocin receptor	Alomone labs	AVR-013	1/200

Mouse monoclonal anti-HA tag	Cell Signaling Technology	2367S	1/300
Mouse monoclonal anti-Phox2b	Santa Cruz Biotechnology	sc-376997	1/100
Alexa 488-conjugated donkey polyclonal anti-rabbit	Invitrogen	A21206	1/500
Alexa 488-conjugated donkey polyclonal anti-chicken	Jackson	703545155	1/500
Alexa 488-conjugated donkey polyclonal anti-goat	Invitrogen	A11055	1/500
Alexa 488-conjugated donkey polyclonal anti-mouse	Invitrogen	A21202	1/500
Alexa 555-conjugated donkey polyclonal anti-rabbit	Invitrogen	A31572	1/500
Alexa 555-conjugated donkey polyclonal anti-goat	Invitrogen	A21432	1/500
Alexa 555-conjugated donkey polyclonal anti-mouse	Invitrogen	A31570	1/500

Alexa 647-conjugated donkey polyclonal anti-mouse	Invitrogen	A31571	1/500
Alexa 647-conjugated donkey polyclonal anti-rabbit	Invitrogen	A31573	1/500
Alexa 647-conjugated donkey polyclonal anti-goat	Invitrogen	A21447	1/500
Alexa 647- conjugated donkey polyclonal anti-mouse	Invitrogen	A31571	1/500

Table 4: Chemical compound sources

Designation	Supplier	Identifiers	Concentration
(Thr^{4},Gly^{7})-Oxytocin (TGOT)	Bachem	4013837.0005	0.5 µM
(d(CH$_2$)$_5$^{1},Tyr(Me)^{2},Thr^{4},Orn^{8},des-Gly-NH$_2$^{9})-Vasotocin trifluoroacetate salt	Bachem	4031339	1 µM

Isoflurane	Axience	Isorane	4 % induction, 2 % holding
Vasopressin acetate	Sigma	V9879	2 nM
Vecuronium bromide	Sigma	PHR1627	2 µg/ml
Cyanure (KCN)	Sigma	1064371000	0.01 %
Atropine	Sigma	A0132	10 mg/kg (IP)
Ficoll 70	Sigma	17-0310-50	1.25 %
DREADD agonist 21 (Compound 21)	Hello Bio	HB6124	2.5 mg/kg (IP)

Animal experiments

Animals were handled and cared for in accordance with the Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals (N.R.C., 1996) and the European Communities Council Directive of September 22th 2010 (2010/63/EU,74). Experimental protocols received approval from the institutional Ethical Committee guidelines for animal research from the French Ministry of Agriculture (authorization APAFIS #12006). Animals were group-housed with a 12-h lightdark cycle, at a constant temperature (22 ± 1°C) with *ad libitum* access to standard chow and water. Experiments were performed on transgenic or wild-type (WT) mice and rats (Table 1). All efforts were made to reduce animal suffering and minimize the number of experimental animals.

Viruses

The AAV9-hSyn-DIO-somBIPOLES-mCerulean (somBiPOLES) virus for optogenetic inhibition or excitation of preBötC^{OT-R} neurons in OT-R::Cre mice was obtained from Addgene (Table 2, Addgene viral prep # 154951; http://n2t.net/addgene:154951; RRID:Addgene_154951)[32].

The AAV1-phSyn1(S)-FLEX-tdTomato-T2A-SypEGFP-WPRE virus for tracing experiments from preBötC^{OT-R} neurons to nA^{Cardiac} neurons in OT-R::Cre mice was obtained from Addgene (Table 2, Addgene viral prep # 51509; http://n2t.net/addgene:51509; RRID:Addgene_51509)[55].

Viral and tracer microinjections in the preBötC

For tracing experiments, 3/4-month-old male and female mice received a pre-surgery injection of a non-steroidal, anti-inflammatory drug (carprofen, Rimadyl®, 5 mg/kg, s.c.). Anesthesia was induced by inhalation of isoflurane (4 %, 80 % O_2, Isorane, 1000 mg/g, Axience, France) in an induction box. Mice were placed in a stereotaxic frame with the nose ventro-flexed (40°) and maintained under isoflurane anesthesia (2 %). Body temperature was maintained at 37.5°C using a heating pad (40-90-8D model, FHC, ME, USA). A midline incision of the skin and muscle tissues was made at the occipital level, a cranial window was created on the caudal occipital bone using a dental drill, and the atlanto-occipital membrane was opened to expose the brainstem. Glass micropipettes (~30 µm tip diameter) were filled with injectate and connected *via* a silver wire to an electrophysiology amplifier (Neuro Amp Ex, ADInstruments) for neuronal activity recording. The pipette (20° angled in the rostro-caudal axis, tip pointing forward) was descended into the brainstem 1.25 mm lateral to the midline. Extracellular recordings of multiunit activity were used to functionally map the preBötC, defined as the most rostral point displaying distinct inspiratory-locked activity (typically 0.0 ± 0.2 mm rostral, 1.4 ± 0.2 mm ventral to the *calamus scriptorius*).

For the somBiPOLES virus injections, the mice were placed in the stereotaxic frame with a horizontal head position. The extracellular recording pipette was tilted 10° in the rostro-caudal axis, pointing towards the caudal part of the mouse. A cranial window was made at the rostral end of the occipital bone, at its junction with the parietal bone. Glass micropipettes were descended through the cerebellum to the brainstem, 1.25 mm lateral to the midline. Injection spots were typically 1.7 ± 0.3 mm caudal and 6.0 ± 0.3 mm ventral to the *Lambda*.

Bilateral injections were performed for all experimental conditions, except for unilateral FluoroGold injections. Viral vectors (25 nl for the tracing virus and 35 nl for the somBiPOLES virus per injection site over 5 min, into two rostro-caudal sites 200 µm apart) or tracers (Cholera toxin subunit B (CTB): 70 nl per injection site over 5 min, into three rostrocaudal sites 200 µm apart ; FluoroGold: 25 nl per injection site over 5 min, into two rostrocaudal sites 200 µm apart) were microinjected using a picospritzer (PICOSPRITZER® III, Parker, NH, USA) and a graduated monocular. At each site, pipettes were left in place for 10 min after injection before being withdrawn. Wounds were closed with sterile sutures. Experiments were conducted 3 weeks after viral injections and 1 week after tracer injections. All injection sites were verified following the experiments.

Optogenetic cannula and ECG telemetric transmitter implantation

For *in vivo* freely moving experiments, OT::cre;Ai27(LSL-ChR2) mice (3/4-month-old) were anesthetized and placed in a stereotaxic frame as described above for preBötC microinjections. A midline incision was made over the cranial bone and all attached muscles were removed. Head horizontality was checked using *bregma* and *lambda* coordinates, and a cranial window was made at the rostral level of the occipital bone, at the junction with the parietal bone. ECG

and EMG inspiratory recordings were obtained using 3 electrodes: two in cranial muscles and one subcutaneously through a dorsal incision, which was subsequently used to insert the telemetric transmitter. Signals were amplified, filtered, digitized (Power 1401, Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK), rectified and integrated by Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK). Extracellular recordings were performed to map the preBötC, following the same techniques as for somBiPOLES viral injections (typically 1.25 mm lateral to the midline and 1.2 ± 0.3 mm caudal, 6.0 ± 0.3 mm ventral to the *Lambda*). Bilateral optogenetic cannulas (200 µm, NA 0.22, Doric Lenses Inc., Québec, Canada) were then implanted at the preBötC rostro-caudal and medio-lateral coordinates. The dorso-ventral position was determined based on optimal RSA amplification and bradycardia induction during optogenetic stimulation, typically 0.4 mm above the best extracellular inspiratory recording. Cannulas were fixed with cyanoacrylate (Super Glue, Loctite).

During the same surgery, ECG telemetric transmitters (ETA-F10, Data Sciences International (DSI), Harvard Bioscience, Inc., MN, USA) were also implanted. The transmitter body was placed subcutaneously along the mouse's flank, using the dorsal incision made at the beginning of the surgery. Two subcutaneous electrodes, previously exposed by 1 cm, were fixed with sutures near the right shoulder and the left rib region. The wound was closed with sterile sutures. ECG signal from the transmitter was recorded (Matrix 2.0, DSI, Harvard Bioscience, Inc., MN, USA), sampled at 2000 Hz, and integrated into Spike2 software using a DSI talker.

After a 1-week recovery, respiratory activity was recorded by plethysmography and ECG by telemetry for 3h, during which optogenetic stimulations of OT^+ fibers in the preBötC were performed periodically.

In vivo plethysmography recordings

Breathing of unrestrained, non-anesthetized mice was recorded using whole-body plethysmography (EMKA Technologies, Paris, France). A constant air flow (0.5 l/min) circulated inside the 200 ml plethysmography chambers (maintained at 25 ± 0.5 °C) using a vacuum pump (Vent 4, EMKA, Paris, France). During each recording, the amplitude of the signal measured was calibrated by injecting 1 ml of air into the chamber containing the mouse. Analog signals were amplified (Amplipower, EMKA, Paris, France), converted (Power 1401, Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK) and integrated into Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK).

In vivo RSA recordings in anesthetized animals

For RSA recordings in the anesthetized condition *in vivo*, animals were anesthetized and placed in a stereotaxic frame similar to preBötC microinjections for tracing experiments, with the nose ventro-flexed (40°), providing access to the brainstem surface. For mice experiments, ECG and EMG inspiratory recordings were obtained using 3 electrodes placed under the skin of the hind legs and a front leg. For rat experiments, the EMG inspiratory recordings were obtained *via*

external intercostal muscle electrodes and the ECG was recorded using three electrodes placed under the skin of the hind legs and thorax. All signals were then amplified, filtered, digitized (Power 1401, Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK), rectified and integrated by the Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK).

In Wistar rats, as described previously, extracellular recordings were made to functionally map the preBötC bilaterally (typically 1.8 mm lateral to the midline and 0.7 ± 0.2 mm rostral, 1.7 ± 0.3 mm ventral to the *calamus scriptorius*). A specific OT-R agonist (TGOT[37], 0.5 µM diluted in artificial cerebrospinal fluid (aCSF, composition as used for the Working Heart-Brainstem preparation below), 50 nl) or aCSF (vehicle injections, 50 nl), diluted with 0.5% fluorescent beads, was slowly injected bilaterally into each preBötC using a syringe and a graduated monocular.

In OT::cre;Ai27(LSL-ChR2) mice, unilateral photostimulations were performed in the preBötC. The optical fiber was tilted by 20° in the rostro-caudal axis, with the tip pointing towards the animal's head. The preBötC was located by the following coordinates: 1.25 mm lateral to the midline and 0.0 mm rostral to the *calamus scriptorius*. The dorso-ventral coordinate was functionally determined based on the optogenetic stimulation-induced bradycardia and RSA amplification. After identifying the optimal position, several stimulations were performed at intervals of at least 5 min. To precisely perform OT-R antagonist injections into the preBötC, extracellular recordings were made, as previously described. Optimal inspiratory extracellular activities were generally located 400 µm ventral to the coordinate defined for the optogenetic stimulations. OT-R antagonist (d(CH_2)$_5^1$,Tyr(Me)^2,Thr^4,Orn^8,desGly-NH_2^9)-Vasotocin trifluoroacetate salt (OTA), 1 µM diluted in aCSF, 200 nl, Table 4) was then injected unilaterally in the preBötC[23,25,56]. Several photostimulations were performed every 5 min for 1h after OTA injection. In some animals, photostimulations were also performed on the contralateral preBötC and in the ipsilateral DMV (coordinates: 0.3 mm lateral to midline, 0.0 ± 0.3 mm rostral and 0.2 ± 0.2 mm ventral to the *calamus scriptorius*). For control experiments aCSF without OTA was injected. Fluorescent beads (0.5%) were added to all injectate solutions to enable the localisation of the injection spots *a posteriori*.

In mice injected with the somBiPOLES virus, bilateral photoexcitations and photoinhibitions were performed in the preBötC using the techniques described for photostimulations in OT::cre;Ai27(LSL-ChR2) mice experiments. At the end of the experiment, intraperitoneal injection of atropine was administered (10 mg/kg, diluted in NaCl, 600 µl for a 30g mouse, Table 4), followed by additional stimulations after a 20-min interval.

Optogenetic stimulations

For the experimental setups, uni- or bi-lateral cannulas (200 µm, NA 0.22, Doric Lenses Inc.,Québec, Canada) were connected to one or two optical fibers (200 µm, NA 0.22, Doric Lenses Inc., Québec, Canada), themselves connected to a rotary joint allowing the laser light beam to be split if necessary. A common optical fiber was connected to either a blue laser (473 nm, DPSS, ADR-800A, Shanghai Laser & Optics Century Co., Ltd., China), or a dual laser with blue and red light (473 nm and 561 nm, DPSS, 06 Series, Cobolt AB, Hübner Photonics GmbH,

Germany) for mice injected with the somBiPOLES virus. Lasers were triggered by a TTLPulse-generator (PulserPlus, Prizmatics Ltd., Israel) configured in Pulser software and signals were integrated into Spike2 software.

In experiments involving OT::cre;Ai27(LSL-ChR2) mice, either in freely moving or anesthetized conditions, photostimulations were conducted using 10 ms pulses at 10mW/mm^2 power, 3000 pulses, and a frequency of 50 Hz. Photostimulations in freely moving experiments were performed during calm periods characterized by a stable respiratory frequency.

In experiments with mice injected with the somBiPOLES virus, photoinhibition was carried out using the blue laser (473 nm) and consisted of 10 ms pulses (1.2 mW/mm^2, 3000 pulses, 50 Hz), whereas photoexcitation was performed with the red laser (561 nm) and consisted of 10 ms pulses (10 mW/mm^2, 3000 pulses, 50 Hz). The power difference was due to the varying sensitivities of the two opsins.

A minimum of 5 min was allowed between two consecutive photostimulations in all experiments. A light meter (PM100D fiber power meter, Thorlabs, Newton, NJ, USA) was used to calibrate the light density imposed by each optical fiber up to 10 mW/mm^2 (for a distance of around 400 µm between the optical fiber and the preBötC/nA), as determined to induce maximal effects without any adverse impact on the tissue[57]. All photostimulation protocols were repeated multiple times in each animal and a strong intra-preparation reproducibility was noted.

Working Heart-Brainstem preparation

Experiments were performed using the arterially perfused *in situ* Working Heart-Brainstem preparation (WHBP)[13,58], as previously described[12,40], and used on juvenile Wistar rats of both sexes, aged 21-30 days. Rats were deeply anesthetized with isoflurane, bisected below the diaphragm, exsanguinated and cooled in aCSF solution on ice (composition in mM: 125 NaCl, 24 NaHCO3, 3 KCl, 2.5 CaCl2, 1.25 MgSO4, 1.25 KH2PO4 and 10 D-Glucose, pH 7.3 after saturation with carbogen gas (chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, France)). The decerebration was performed precollicularly, the lungs were removed, and the descending aorta was isolated and cleaned. Preparations were transferred to a recording chamber. Retrograde perfusion of the thorax and head was achieved via a double-lumen catheter (ø1.27 mm, PowerPICC, Bard, NJ, USA) inserted into the descending aorta. The perfusion solution consisted of aCSF solution containing Ficoll (1.25 %), vasopressin acetate (2 nM, V9879, Sigma-Aldrich, France) and vecuronium bromide (2-4 µg/ml, PHR1627, Sigma-Aldrich, France) warmed to 31°C and gassed with carbogen (closed loop reperfusion circuit, 25-30 ml/min). A transducer connected to the second lumen of the catheter monitored perfusion pressure (PP) in the aorta. The head of the preparation was fixed with ear and mouth bars. A peristaltic pump (520S, Watson-Marlow Bredel Pumps, UK) was used to slowly increase the flow rate of the perfusion solution to tune the preparation. For most WHBPs, simultaneous recordings of phrenic nerve activity (PNA), cervical vagus nerve activity (VNA, left side) and thoracic sympathetic chain activity (tSNA, between T8-10) were obtained using glass suction electrodes.

For some WHBPs the cardiac vagal branch activity (CVBA) was recorded, instead of the cervical vagus nerve activity, in accordance with the protocols described previously[42]. Briefly, a small amount of parenchymal tissue around the cut left bronchus was kept and the thymus was resected to gain access to the left cardiac vagal branch. In the recording chamber, the left thoracic vagus nerve could be observed parallel to the oesophagus and was carefully dissected away from the surrounding tissue to expose its branches. The left cardiac vagus branch was usually found just caudal to the left recurrent laryngeal nerve and was cut as distally as possible. The functional validity of the cardiac vagal branch recording was tested with an excitatory baroreceptor challenge by briefly (2-3 s) increasing the perfusion pump setting to its maximum, taking care that rising fluid levels caused no artefact, and chemoreceptor challenge by injection of KCN (0.2 ml, 0.01 %). Preparations that failed this test were either repositioned until the test was successful or discarded.

All neurograms were amplified, filtered (300-5000 Hz band-pass, A-M system, 1700 Model, Carlsborg, USA), digitized (Power 1401, Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK), rectified and integrated using Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK). Heart Rate (HR) was derived by using a window discriminator to trigger from the systolic pressure recorded from the perfusion pressure sensor.

Once the WHBP was tuned, bilateral brainstem extracellular recordings were performed to locate inspiratory activity from preBötC neurons. They were typically found 1.5mm lateral, 0.9 ± 0.3mm rostral, 2.0 ± 0.3 mm ventral to the *calamus scriptorius*. TGOT (0.5 µM, 50 nl, diluted in aCSF with 0.5% fluorescent beads) or aCSF (vehicle injections, 50 nl, with 0.5% fluorescent beads) were slowly injected in each preBötC bilaterally using a syringe and a graduated monocular.

Nerve activity and HR traces were smoothed before analysis (PNA: time constant 0.05 s (DC remove); tSNA: time constant 0.1 s (smoothing) and 0.032 s (DC remove); VNA: time constant 0.2 s (smoothing) and 0.032 s (DC remove); CVBA: time constant 0.032 s (DC remove); HR: time constant 0.5 s (smoothing)).

Rhythmic preBötC/nA slice and island preparations

Brainstem transverse slice preparations containing the preBötC network and the nA were obtained from mouse pups (P0-P5) as follows. Swiss newborns were quickly decapitated at the C4 spinal level and the brainstem was carefully dissected in a chilled oxygenated aCSF composed of (in mM): 120 NaCl, 8 KCl, 1.26 CaCl2, 1.5 MgCl2, 21 NaHCO3, 0.58 NaH2PO4, 30 glucose, pH 7.4. The isolated hindbrain was embedded in a low melting point agar block (ThermoFisher, France) and oriented to enable serial transverse sectioning along the rostrocaudal axis using a vibratome (VT1200S, Leica, Germany). A 500 µm thick slice, with its anterior limit set ~300 µm caudal to the posterior limit of the facial nucleus, was isolated. To define the correct rostro-caudal level at which the expected slice would be obtained we also used other anatomical landmarks as previously described[59]. Slices were then transferred to a recording chamber, rostral surface upwards, and continuously superfused with oxygenated

aCSF at 30°C. Preparations were allowed to recover for 20-30 min before any recording sessions began.

The island preparations were obtained from transverse slices obtained as detailed above by additionally trimming away tissue outside the region hosting the preBötC network and the nA using fine scissors[60].

Procedure for recordings in preBötC/nA slice and island preparations

PreBötC network activities in slice and island preparations were recorded using glass micropipettes (tip diameter 80-100 µm) positioned on the slice's rostral surface, ventral to the nA where the preBötC respiratory circuitry is located. The micropipettes were fabricated from aCSF-filled borosilicate glass tubes (Harvard Apparatus, Germany) broken at the tip and used as suction electrodes connected to a high-gain amplifier (AM Systems, USA). Signals were filtered (3Hz-3kHz), integrated (time constant 100 ms; Neurolog, Digitimer, England) and stored on a computer through a Digidata 1440 interface and PClamp10 software (Molecular Devices, USA).

Whole cell patch-clamp recordings were visually guided using differential interference contrast. For nA neurons recordings, the patch pipette was positioned close-to the nA pars compacta, slightly dorso-lateral to the micropipette monitoring preBötC activity. The patch pipette for recording individual preBötC neurons was also positioned close to the pipette used for extracellular recordings, and the recorded neurons were selected according to their activity in phase with the preBötC network activity. Patch pipettes were fabricated with borosilicate glass tubes using a puller (Sutter Instrument, USA) and filled with a solution composed of (in mM): 140 K-gluconate acid, 1 CaCl2.6H2O, 10 EGTA, 2 MgCl2, 4 Na2ATP, 10 HEPES, pH 7.2, supplemented with AlexaFluor 568 and had tip resistances of 5-7MΩ when filled with this solution. Electrophysiological signals were recorded using an Axoclamp 2A amplifier (Molecular Devices) and the same digitizing interface and software mentioned before. nA neurons were selected for patch-clamp recording on the basis of their location (between the dorsal part of the preBötC and the ventral part of the nA pars compacta) and their rhythmic inhibitory synaptic inputs received during each preBötC respiratory burst. The magnitude of the synaptic drive, representing the summation of inhibitory post-synaptic currents during individual inspiratory bursts, was measured as the maximal envelope amplitude, averaged over 10 consecutive bursts per neuron in slices. Drugs were applied in the bath at a final concentration of: 0.5 µM TGOT (Bachem, Bubendorf, Switzerland); 10 µM Bicuculline (Trocris, Bio-Techne, MN, USA); 5 µM Strychnine (SigmaAldrich, St Louis, USA); 20 µM CNQX (SigmaAldrich, St Louis, USA).

PVN slice preparations

P20 OT::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);R26-LSL-hM4Di-DREADD mice were anesthetized using 5% isoflurane and rapidly decapitated. Coronal slices containing the PVN (350 µm) were obtained using a vibratome (VT 1200S, Leica, Germany). Slices were allowed to equilibrate before use for

1h in standard recording aCSF (in mM: 124 NaCl, 3 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 1.2 $MgSO_4$, 25 $NaHCO_3$, 11 D-glucose, and 2 $CaCl_2$, saturated with 95% O_2/5% CO_2, pH 7.4, ~300 mosM) at room temperature. During experiments the recording chamber was superfused at ~3 mL/min with standard recording aCSF.

Procedure for recordings in PVN slices

Electrodes (resistance ~3.0-6.0 MOhm) were prepared using a Narishige micropipette puller (PC-100) and filled with (in mM) 130 K^+-gluconate, 10 NaCl, 11 EGTA, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES, 1 $MgCl_2$, 2 Mg-ATP, 0.2 Na-GTP, pH 7.3, and ~280 mosM. Recording pipettes were guided using a piezoelectric manipulator (Luigs & Neumann, GmbH). PVN^{OT} neurons expressing tdTomato were identified in Cre^+ mice using a Hamamatsu scientific camera. In Cre^- mice, unlabeled neurons in caudal PVN slices were recorded. Following initial membrane rupture the resting membrane potential was measured. Resting membrane potential, spontaneous action potentials, and evoked action potentials were recorded in current clamp mode. The DREADD agonist C21 (10 µM) was applied for 5 min. Data obtained from PVN slice experiments were acquired in pClamp 10.7 using a HEKA EPC 10 Double amplifier (HEKA Elektronik), filtered at 2 kHz and sampled at 20 kHz. Data were analyzed using Clampfit 10.7 and MiniAnalysis (Synaptosoft, USA).

Histology and image acquisition

After *in vivo* anesthetized and WHBPs experiments, brains were fixed in antigenfix solution (Diapath, P0016, Italy) at 4°C for 48-72h and cryoprotected in 30 % sucrose. After *in vitro* slice experiments, the slices were fixed in 4 % paraformaldehyde for 2-3h and cryoprotected in 20 % sucrose solution. For other conditions, animals were transcardially perfused with 20 ml phosphate-buffered saline followed by 25 ml of antigenfix. Brains were removed, post-fixed in antigenfix at 4°C for 24h and cryoprotected in 30 % sucrose. In experiments requiring nA labeling, animals received an intraperitoneal injection of the retrograde tracer FluoroGold (0.2 %, 300 µl, Fluorochrome LLC, CO, USA) 5 days prior to perfusion. Coronal sections of brainstems or hypothalamus were obtained using a cryostat (CM350S, Leica Microsystems), with 30 µm sections for *in vitro* slices and 50 µm sections for all others.

For immunohistochemistry, 50 µm sections were blocked and permeabilized in phosphate-buffered saline (PBS, 1X) containing 5% normal goat serum, 2 % BSA and 0.3 % Triton X-100 for 1h at room temperature. 30 µm sections were incubated in PBS solution with 1 % BSA and 0.3 % Triton X-100 for 90 min. Sections were incubated with primary antibodies for 72h at 4°C (50µm sections) or overnight at room temperature (30 µm sections). After washing, sections were left for 2h (50 µm sections) or 90 min (30 µm sections) with secondary antibodies at room temperature. Sections were mounted on microscope slides using Vectashield mount medium without DAPI (H-1000, VectorLabs Inc., CA, USA) for

FluoroGold-containing sections or with DAPI (H-1200, VectorLabs Inc., CA, USA) for others. Primary and secondary antibodies used are listed in Table 3.

Fluorescent staining was examined under a Zeiss LSM-800 (or LSM-900) confocal microscope with ×10, ×20 or ×40 objectives and captured using ZEN 2.6 (blue edition) imaging software. For cell counting analysis, z stacks images with 0.5 µm z-steps were used.

Mapping of injection spots

For all experiments with chemical compound injections in the preBötC, fluorescent beads (excitation 580 nm, emission 605 nm, F8793, ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA) were co-injected to enable the localisation of the injection spots. In each animal, sections were observed under a stereo-microscope (Olympus SZX16 with fluorescent lamp X-cite Series 120) and sections containing fluorescent beads were co-labeled with TH, NK1R antibody to localize preBötC, as well as ChAT antibody or Fluorogold (0.2 %, IP) to visualize nA. These markers helped align the sections in the Paxinos-Watson atlas (rats) or in the Paxinos-Franklin atlas (mice). Injection spots were imaged using an Apotome Zeiss epi-fluorescence microscope with a ×10 air objective and captured with an axioCam MRm camera and ZEN 2.6 imaging software (blue edition).

Tissue clearing

Paraformaldehyde-fixed whole OT::GFP mouse brains were cut with a slicer to obtain coronal slices of ~1mm thickness. Tissue was cleared using the CUBIC method[61–63]. Briefly, fixed tissue was immersed in 50%-diluted reagent-1A (containing 5 % aminoalcohol #10, 10 % Triton and 10 % urea) for 6h at 25°C with shaking, then replaced by reagent-1A for 42h at 25°C with shaking. From day2 to day4 tissue was shaken at 37°C. Clearing was stopped with PBS. The sliced tissue was then immersed with 50%-diluted reagent-2 (containing 50 % sucrose, 25 % urea, 10 % aminoalcohol #16 and 0.1 % Triton) for 24h at 25°C and then in reagent-2 for 48h at 25°C. The sliced tissue was mounted with a coverslip immersed in a 1:1 mixture of silicon oil and mineral oil. Images were acquired using a Zeiss LSM-800 confocal microscope.

Blood pressure telemetric transmitter implantation

Male OT::cre;R26-LSL-hM4Di-DREADD mice were implanted with a telemetric blood pressure sensor (PA-C10, DSI, Harvard Bioscience, Inc., MN, USA) in the left carotid artery. 3/4-month-old mice were administered a non-steroidal anti-inflammatory drug (carprofen, Rimadyl®, 5 mg/kg, s.c.) 30 min prior to surgery. Anesthesia was induced with isoflurane inhalation in an induction box, followed by an intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine mixture (ketamine: 100 mg/kg, Imalgene 1000, IP; xylazine: 10 mg/kg, Rompun 2%, IP). Mice were positioned on their back on a heating pad maintaining their temperature at 37.5°C. A midline neck incision was made, and the carotid artery sheath was accessed by gently displacing the

salivary glands and muscles. The left carotid artery was isolated from the vagus nerve and carotid vein until the carotid bifurcation was located. A ligature was placed around the carotid bifurcation and used to create tension, facilitating the positioning of a vascular clamp approximately 1 cm upstream of the bifurcation. A needle was used to make an incision in the carotid artery, allowing catheterization with the telemetric sensor catheter. Once in place, the clamp was removed, and the catheter was inserted approximately 1 mm into the aorta and ligated to the carotid artery. The transmitter was subcutaneously inserted into the back of the animal. The incision was closed using sterile sutures, and lidocaine (5% cream, Lidocaïne Prilocaïne, Biogaran, France) was applied to the incision area. The animal was allowed to recover for 1 week.

Behavioral studies of recovery from stress

Prior to chemogenetic experiments, male OT::cre;R26-LSL-hM4Di-DREADD mice were habituated daily to their plethysmography chamber for 1 week. Then, mice received a slight isoflurane anesthesia for intraperitoneal injection of compound 21 (2.5 mg/kg diluted in NaCl 0.9 %, DREADD agonist 21 dihydrochloride, HB6124, Hello Bio Ltd, Ireland) or vehicle solution (NaCl 0.9 %). The mice were then placed in their plethysmography chamber, which was positioned on the receiver plate to simultaneously record respiratory activity and blood pressure. Respiratory signals were amplified (Amplipower, EMKA, Paris, France) and digitized (Power 1401, Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK). Blood pressure telemetry signals were recorded (Matrix 2.0, DSI, Harvard Bioscience, Inc., MN, USA) and rectified according to the measurement of ambient pressure (APR-2, DSI, Harvard Bioscience, Inc., MN, USA). Respiratory and telemetric signals were integrated into Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK) at 2000 Hz sampling rate. After a 1-hour control period in a low-light room at room temperature, mice were placed in a restraining ventilated cylinder that severely restricted their movements for 10 min, before returning to the plethysmography chamber for 70 min. Heart rate was derived from systolic blood pressure through automatic detection threshold with manual verification. Analysis was performed before the stress stimulus (during calm periods), during the stress phase, and twice during the post-stress recovery phase (25-35 min and 55-65 min post-stress). Stress effects on respiratory parameters and RSA were quantified within the first 5 min after mice returned to their plethysmography chamber. Each animal had six recording sessions over consecutive days, lasting about 2h30 each, to obtain three recordings in each condition (Compound 21 or NaCl). NaCl sessions always preceded Compound 21 sessions due to the compound's prolonged effects (up to 6 hours).

Data analysis and statistics

Cell counting was carried out on serial 1:4 sections, following the imaging process previously described. Cell counting of OT-R^{+}, Calbindin^{+} and BCHE^{+} neurons in the preBötC/nA, as well as quantifications in OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GAD67::GFP mice and OTR::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GlyT2::GFP mice, were performed on serial 1:2 sections.

Manual counting was performed unilaterally. For PVN counts, three sections were selected to cover the entire rostro-caudal axis. For nA counts, all sections with FluoroGold injection or ChAT labeling were included, and all labeled sections were counted (approximately 5-6 sections per series). PreBötC counts were based on the location of the nA, ventricular aperture, slice shape, and marker selection, resulting in a set of slices containing preBötC neurons (approximately 3 slices per series). The total number of each cell type per group was estimated by the sum of the neurons counted per series, multiplied by 4 (series 1:4) or by 2 (series 1:2).

Measurements of RSA amplitude were always performed following respiratory triggered averaging of HR. The trigger was placed at the end of each inspiration, for >15 respiratory cycles in each condition studied. HR windows corresponding to each respiratory cycle centered on the end of inspiration were then averaged to enable an accurate measurement of mean RSA amplitude in each condition studied.

Delta values in percentages (%) show the change in post-stimulus values relative to prestimulus values. Statistics on delta values to determine the effect of a given stimulus were performed on absolute values (raw data), when comparing the pre-stimulus and stimulus conditions. Group data are presented as mean ± SEM when in numerical values, and as violin plots (truncated or untruncated) with median and quartiles on graphs. Normal distribution of the data was tested with the Shapiro-Wilk test, and statistical analyses were performed using parametric or non-parametric tests accordingly. The statistical tests used and post-hoc analysis performed are detailed in the corresponding figure legends. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (v. 9.5.1, GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was set at $P < 0.05$. P values are indicated in brackets when between 0.05 and 0.1, but not for values above 0.1.

Methods bibliography

49. Wu, Z. *et al.* An obligate role of oxytocin neurons in diet induced energy expenditure. *PLoS One* **7**, e45167 (2012).

50. Madisen, L. *et al.* A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for lightinduced activation and silencing. *Nat. Neurosci.* **15**, 793–802 (2012).

51. Daigle, T. L. *et al.* A Suite of Transgenic Driver and Reporter Mouse Lines with Enhanced Brain-Cell-Type Targeting and Functionality. *Cell* **174**, 465-480.e22 (2018).

52. Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133–140 (2010).

53. Tamamaki, N. *et al.* Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* **467**, 60–79 (2003).

54. Zeilhofer, H. U. *et al.* Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* **482**, 123–141 (2005).

55. Oh, S. W. *et al.* A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* **508**, 207–214 (2014).

56. Wahis, J. *et al.* Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala on neuronal activity and affective states in rodents. *Nat Neurosci* **24**, 529–541 (2021).

57. Shin, Y. *et al.* Characterization of fiber-optic light delivery and light-induced temperature changes in a rodent brain for precise optogenetic neuromodulation. *Biomed Opt Express* **7**, 4450–4471 (2016).

58. Paton, J. F. The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J. Physiol. (Lond.)* **493 (Pt 3)**, 819–831 (1996).

59. Ruangkittisakul, A., Panaitescu, B. & Ballanyi, K. K(+) and Ca^2(+) dependence of inspiratory-related rhythm in novel 'calibrated' mouse brainstem slices. *Respir Physiol Neurobiol* **175**, 37–48 (2011).

60. Tryba, A. K. *et al.* Differential modulation of neural network and pacemaker activity underlying eupnea and sigh-breathing activities. *J Neurophysiol* **99**, 2114–2125 (2008).

61. Susaki, E. A. *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, 726–739 (2014).

62. Susaki, E. A. *et al.* Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc* **10**, 1709–1727 (2015).

63. Tainaka, K. *et al.* Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* **159**, 911–924 (2014).

64. Zhu, H. *et al.* Cre-dependent DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) mice. *Genesis* **54**, 439–446 (2016).

Acknowledgements

We thank Dr Jean-Charles Viemari for assistance with preliminary rhythmic slice recordings, Laura Cardoit for assistance in immunostaining and confocal imaging of brainstem transverse slices, Dr Gilles Fortin for providing experimental equipment, Pr Andrew Allen and Dr John Simmers for their critical analysis of the manuscript, Dr Agnès Baude for providing the GAD67::GFP mouse line, the CTB tracer and the NeuN antibody, and members of the Inmagic, PBMC and Animal core facilities at Inmed. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE14-0009-01 to C.M.), from the French government under the Programme « Investissements d'Avenir » (Initiative d'Excellence d'AixMarseille Université via A*Midex funding (AMX-19-IET-004), and ANR (ANR-17-EURE0029), to C.M.), from the French Ministry of Research (PhD fellowship to J.B.), from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM end-of-PhD Fellowship to J.B.), from Marseille Institute for Rare Diseases (Marmara, Master's Fellowship to A.L.), and from the Institute Marseille Imaging (A*Midex AMX-19-IET-002).

Author contributions

C.M. and J.B. designed the research project, with help from F.M. on matters related to oxytocin, and help from M.T.B. on in vitro electrophysiological aspects. J.B. performed all experiments except those cited hereinafter. C.M. performed the virus and tracer injections, and the optogenetic cannula implantations. M.T.B. performed the in vitro electrophysiology experiments on preBötC/nA rhythmic slices and their analysis. A.L. performed the in vivo anesthetized rat experiments and their analysis. R.T. performed the in vitro electrophysiology experiments on OT neurons and their analysis. C.G. and F.S. contributed to the histological experiments. M.S.F. and V.M. performed the CUBIC-clearing experiments. J.B. and C.M. analyzed the data. C.M. and J.B. wrote the paper.

Competing interest declaration

The authors declare no competing interests.

Data availability

The data are available upon request to the corresponding author. Source data are provided with this paper.

Figures and legends

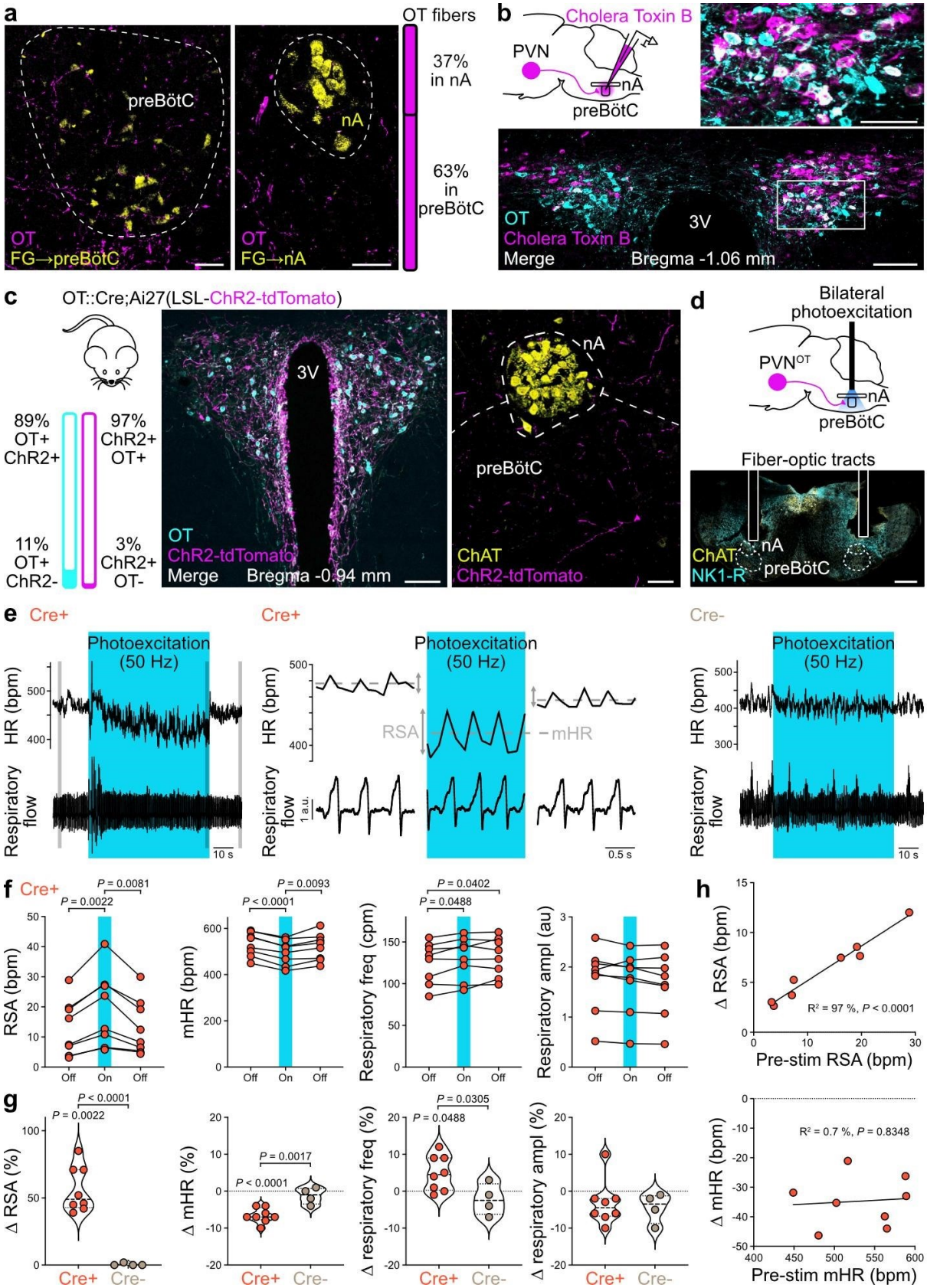


Fig. 1: OT fibers from the caudal PVN to the preBötC/nA can amplify RSA, decrease mHR and increase respiratory frequency in adult freely moving mice at rest.

a, Immunohistochemical labeling of OT fibers in the preBötC and nA. The nA was identified using FluoroGold (FG) retrograde tracing following intraperitoneal injection (Extended Data Fig. 1a). The preBötC was identified using a combination of FG retrograde tracing from injections in the contralateral preBötC (Extended Data Fig. 1b), and from classical anatomical landmarks[22]. The proportion of the number of fibers counted in the nA vs. preBötC is represented (n = 6 for nA, n = 6 for preBötC, 3 sections counted per animal, Extended Data Fig. 1c, d). Scale bar, 50 µm. **b**, Retrograde tracing with Cholera Toxin B to localize OT neurons that project onto preBötC/nA neurons (n = 2, bilateral injections) (Extended Data Fig. 1e-g). Scale bars, large image 100 µm, inset 50 µm. **c**, ChR2-tdTomato expression in OT neurons, with very little, and likely overestimated, non-specific expression (Extended Data Fig. 2a). ChR2-tdTomato was detected in fibers in the preBötC/nA, enabling local photoexcitation. ChAT, choline acetyltransferase. Scale bars, left 100 µm, right 50 µm. **d**, Strategy for bilateral photoexcitation of OT fibers in the preBötC/nA. Optical fibers were positioned following electrophysiological mapping of the preBötC. NK1-R, neurokinin 1 receptor. Scale bar 500 µm. **e**, Photoexcitation (1 min, 50 Hz, 10 ms pulses) of OT fibers in the preBötC/nA of freely moving mice placed individually in plethysmography chambers to record respiratory activity, and previously implanted with ECG telemetry probes to measure HR. Adult OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2) (Cre^+, n = 8) and Ai27(LSL-ChR2) female littermates (Cre^-, n = 4) were used. Gray shaded areas on the left trace correspond to the recordings shown in the middle trace. bpm, beats per minute. **f**, Photoexcitation of OT fibers in the preBötC/nA of Cre^+ mice induced an amplification of RSA, a decrease in mHR, an increase in respiratory frequency (freq) and no change in respiratory amplitude (ampl). Each point corresponds to the average of ~5 photoexcitation trials per mouse. RM one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. cpm, cycles per minute. au, arbitrary units. **g**, Quantification of the relative effects (delta (Δ) in %) induced by photoexcitation of OT fibers in Cre^+ (from absolute values shown in **f**) and Cre^- (absolute values not shown) mice. Cre^- mice showed no changes in any parameters measured. Intra-group delta (Δ) changes (photoexcitation *vs.* pre-photoexcitation, shown in **f**), RM oneway ANOVA, Tukey's multiple comparison. Inter-group comparison (Cre^+ *vs*. Cre^-), unpaired t-test. **h**, The delta (Δ) increase in RSA amplitude upon OT fibers' photoexcitation is correlated with the absolute RSA amplitude during the pre-photoexcitation control period, while the delta decrease in mHR is not correlated to the pre-photoexcitation mHR level. Pearson correlation 1053 analysis, simple linear regression plotted. Pearson correlation analysis, simple linear regression plotted.

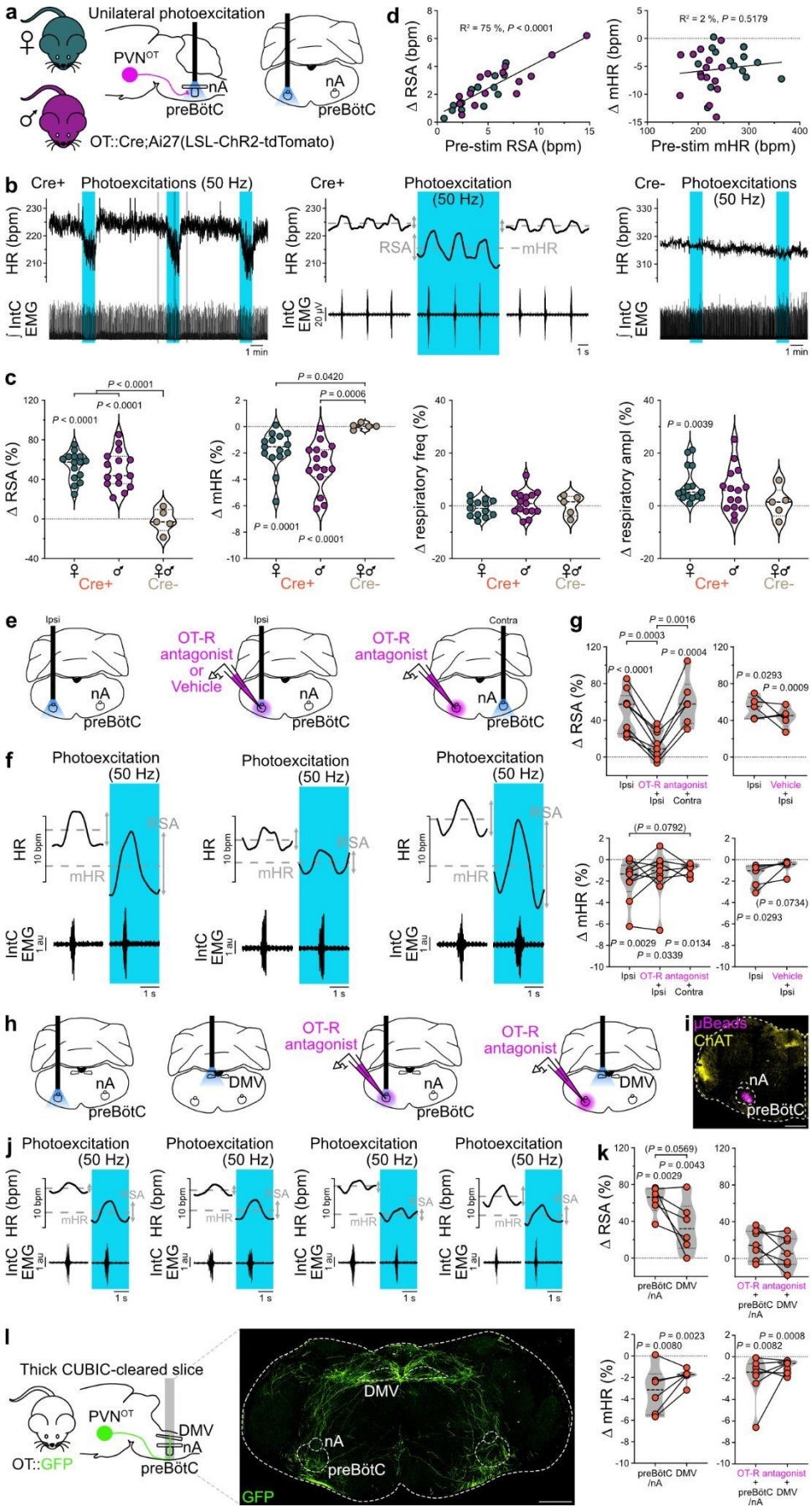

a
Unilateral photoexcitation
PVNOT
nA
preBötC
OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2-tdTomato)
d
R² = 75 %, P < 0.0001
Δ RSA (bpm)
Pre-stim RSA (bpm)
R² = 2 %, P = 0.5179
Δ mHR (bpm)
Pre-stim mHR (bpm)
b
Cre+ Photoexcitations (50 Hz)
Cre+ Photoexcitation (50 Hz)
Cre- Photoexcitations (50 Hz)
HR (bpm)
∫ IntC EMG
RSA
mHR
IntC EMG 20 µV
1 min
1 s
c
Δ RSA (%)
Δ mHR (%)
Δ respiratory freq (%)
Δ respiratory ampl (%)
P < 0.0001
P = 0.0420
P = 0.0006
P = 0.0001
P = 0.0039
Cre+
Cre-
e
Ipsi
Contra
OT-R antagonist or Vehicle
OT-R antagonist
nA
preBötC
g
P = 0.0016
P = 0.0003
P = 0.0004
P < 0.0001
P = 0.0293
P = 0.0009
(P = 0.0792)
(P = 0.0734)
P = 0.0029
P = 0.0134
P = 0.0339
Ipsi
OT-R antagonist + Ipsi
Contra
Vehicle + Ipsi
f
Photoexcitation (50 Hz)
HR
10 bpm
RSA
mHR
IntC EMG
1 au
1 s
h
DMV
i
µBeads
ChAT
j
k
(P = 0.0569)
P = 0.0043
P = 0.0029
preBötC DMV /nA
OT-R antagonist + preBötC DMV /nA
l
Thick CUBIC-cleared slice
PVNOT
DMV
nA
preBötC
OT::GFP
GFP
P = 0.0023
P = 0.0080
P = 0.0008
P = 0.0082

Fig. 2: PVN^{OT} fibers can amplify RSA by releasing OT in the preBötC/nA, and can decrease mHR *via* DMV connectivity, in adult anesthetized mice.

a-c, Unilateral photoexcitation of PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA of anesthetized OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2) adult female and male mice (**a**) induces RSA amplification and mHR decrease (**b**, **c**) (n = 15 Cre^+ females, n = 15 Cre^+ males, n = 5 Cre^- females and males). Intra-group delta (*Δ*) changes (photoexcitation *vs*. pre-photoexcitation), RM one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. Inter-group comparison (Cre^+ females *vs*. Cre^+ males *vs*. Cre^-), one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, except for mHR and respiratory amplitude, Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison. Raw data are shown in Extended Data Fig. 3a. IntC EMG, intercostal electromyography. **d**, The delta increase in RSA amplitude resulting from OT fibers' photoexcitation is correlated with the absolute RSA amplitude during the prephotoexcitation control period, while the delta decrease in mHR is not correlated to the prephotoexcitation mHR level. Pearson correlation analysis, simple linear regression plotted. **e-g**, Ipsilateral (ipsi) injection of a selective OT receptor (OT-R) antagonist ($(d(CH_2)_5^1,Tyr(Me)^2,Thr^4,Orn^8,des\text{-}Gly\text{-}NH_2^9)$-Vasotocin, 200 nl at 1 µM) in the preBötC/nA (**e**) abolishes the photoexcitation-induced RSA amplification, but not the mHR decrease (**f**, **g**). Photoexcitation following ipsilateral vehicle injection (**g**, traces shown in Extended Data Fig. 4a), and photoexcitation in the contralateral (contra) preBötC/nA, induced similar RSA and mHR effects as ipsilateral pre-injection photoexcitation (n = 9 for "ipsi" and "OT-R antagonist + ipsi", n = 6 for "ipsi" and "OT-R antagonist + ipsi" and "OT-R antagonist + contra", n = 5 for "ipsi" and "vehicle + ipsi"). Intra-condition delta (*Δ*) changes (photoexcitation *vs*. prephotoexcitation), RM one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. Inter-conditions comparisons for OT-R antagonist ("ipsi" *vs*. "OT-R antagonist + ipsi" *vs*. "OT-R antagonist + contra"), RM mixed-effects analysis with the Geisser-Greenhouse correction, Tukey's multiple comparison. Inter-conditions comparisons for vehicle ("ipsi" *vs*. "vehicle + ipsi"), paired t-test. Traces in **f** were obtained in the conditions shown above in **e**, following OT-R antagonist injection for the middle trace. Raw data for RSA and mHR, and data for the effects on respiratory frequency and respiratory amplitude, are shown in Extended Data Fig. 3b-d. Localisation of injection spots are shown in Extended Data Fig. 4b. **h**-**k**, Photoexcitation of PVN^{OT} fibers either in the preBötC/nA or in the DMV induce the same effects, both before or after injection of the OT-R antagonist in the preBötC/nA (n = 6 for "preBötC/nA" and "DMV" before OT-R antagonist, n = 7 for "preBötC/nA" and "DMV" after OT-R antagonist). Intracondition delta (*Δ*) changes (photoexcitation *vs*. pre-photoexcitation), RM one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. Inter-conditions comparisons before and after OT-R antagonist injection ("preBötC/nA" *vs*. "DMV"), paired t-test. Traces in **j** were obtained in the conditions shown above in **h**. Raw data for RSA and mHR, and data for the effects on respiratory frequency and respiratory amplitude, are shown in Extended Data Fig. 3e-g. **i**, Fluorescent microbeads in the injectate solutions enabled the localisation of the injection spots for the OTR antagonist or vehicle *a posteriori*. Scale bar, 500 µm. **l**, CUBIC clearing of thick (1 mm) coronal brainstem slices at the level of the preBötC/nA in OT::GFP mice (n = 3) shows OT fibers crossing both the preBötC/nA and the DMV. Scale bar, 500 µm.

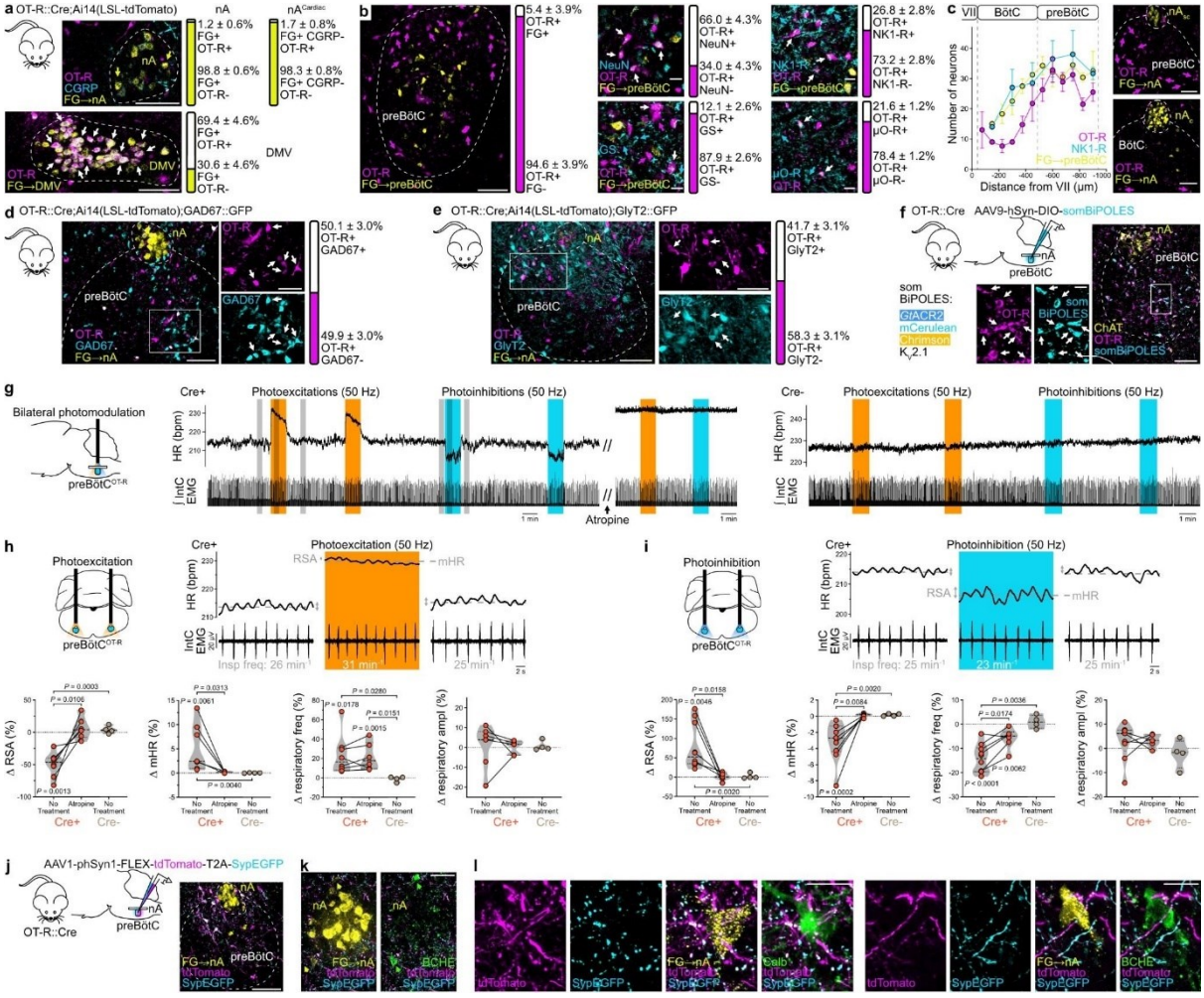


Fig. 3: Anatomo-functional characterisation of OT-R$^+$ cells in the preBötC/nA controlling RSA amplitude.

a, Crossing of OT-R::Cre mice with Ai14(LSL-tdTomato) mice to express tdTomato only in OT-R$^+$ cells. FG was injected intraperitoneally, to label nA and DMV neurons (n = 6 mice for nA counts, n = 5 mice for DMV counts). nA^{Cardiac} neurons were detected as nA FG$^+$ neurons that do not express the calcitonin gene-related peptide (CGRP$^-$). Arrows indicate labeled neurons, with white arrows showing double labeled OT-R$^+$ FG$^+$ neurons. Individual data are shown in Extended Data Fig. 5a. Scale bars, 100 µm. **b**, Unilateral preBötC boundaries were mapped using contralateral preBötC FG injection (Extended Data Fig. 1b and c), and using classical anatomical landmarks of the preBötC location[22]. PreBötC^{OT-R} (OT-R$^+$) cells were tested for their contralateral projection phenotype (FG$^+$, n = 4 mice), neuronal vs. astrocytic phenotype (NeuN$^+$ vs. Glutamine Synthetase (GS)$^+$, respectively, n = 4 mice), and for the expression of two classical markers of preBötC neurons (NK1-R$^+$, n = 4 mice; µO-R$^+$, n = 6 mice). Arrows indicate labeled neurons, with white arrows showing double labeling between OT-R$^+$ and the cyan marker. Individual data are shown in Extended Data Fig. 5b and c. Scale bar for preBötC^{OT-R} and FG only, 100 µm ; other scale bars, 20 µm. **c**, OT-R$^+$ cells are densely present in the preBötC, and little present in the adjacent Bötzinger Complex (BötC). nA$_{sc}$, semicompact formation of the nA ; nA$_c$, compact formation of the nA. Scale bars, 100 µm. **d-e**, Crossing of OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato) mice with GAD67::GFP mice (**d**) or GlyT2::GFP mice (**e**) to label OT-R$^+$ cells (tdTomato$^+$) and GABAergic

or glycinergic neurons (GFP^+), respectively (n = 4 mice for GABAergic counts, n = 4 mice for glycinergic counts). Individual data are shown in Extended Data Fig. 5d. Scale bars full images, 100 µm ; scale bars insets, 50 µm. **f**, Viral-mediated expression of the somBiPOLES optogenetic construct in $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons of OT-R::Cre mice. Viral injections in Cre^- mice did not induce somBiPOLES expression (Extended Data Fig. 5e). An anti-OT-R antibody was used for immunohistochemical labeling. Scale bar full image, 100 µm; scale bar inset, 20 µm. **g**, Effects of bilateral photomodulations of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons in an anesthetized mouse (Cre^+) on HR and inspiratory activity (IntC EMG), before and after intraperitoneal injection of the muscarinic receptor antagonist atropine (10 mg/kg, 600 µl), and compared to a control (Cre^-) mouse. **h-i**, Expanded traces from the gray shaded areas in (**g**), and individual data showing bidirectional cardiorespiratory effects of photoexcitation (**h**) vs. photoinhibition (**i**) of $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons (n = 8 Cre^+ mice for photoexcitation and n = 10 Cre^+ mice for photoinhibition without treatment, n = 6 Cre^+ mice for photoexcitation/photoinhibition before vs. after atropine, n = 4 Cre^- mice). Intra-group delta (*Δ*) changes (photoexcitation *vs.* pre-photoexcitation), RM oneway ANOVA, Tukey's multiple comparison, except for Cre^- RSA photoinhibition, Friedman test, Dunn's multiple comparison. Cre^+ before and after atropine comparison, paired t-test, except for respiratory amplitude photoexcitation, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Inter-group comparison (Cre^+ no treatment *vs*. Cre^+ atropine *vs*. Cre^- no treatment), KruskalWallis test, Dunn's multiple comparison. Raw data are shown in Extended Data Fig. 5f and g. **j**, Viral-mediated expression of tdTomato and synaptophysin-enhancedGFP (SypEGFP) in $preBötC^{OT\text{-}R}$ neurons. Scale bar, 100µm. **k-l**, $PreBötC^{OT\text{-}R}$ neurons project to ($tdTomato^+$ fibers) and make putative pre-synaptic contacts with ($SypEGFP^+$ puncta) $nA^{Cardiac}$ neurons (FG^+ $BCHE^+$ and FG^+ $Calb^+$ neurons). BCHE, butyrylcholinesterase ; Calb, calbindin. Scale bar in (**k**), 50 µm ; scale bars in (**l**), 20 µm.

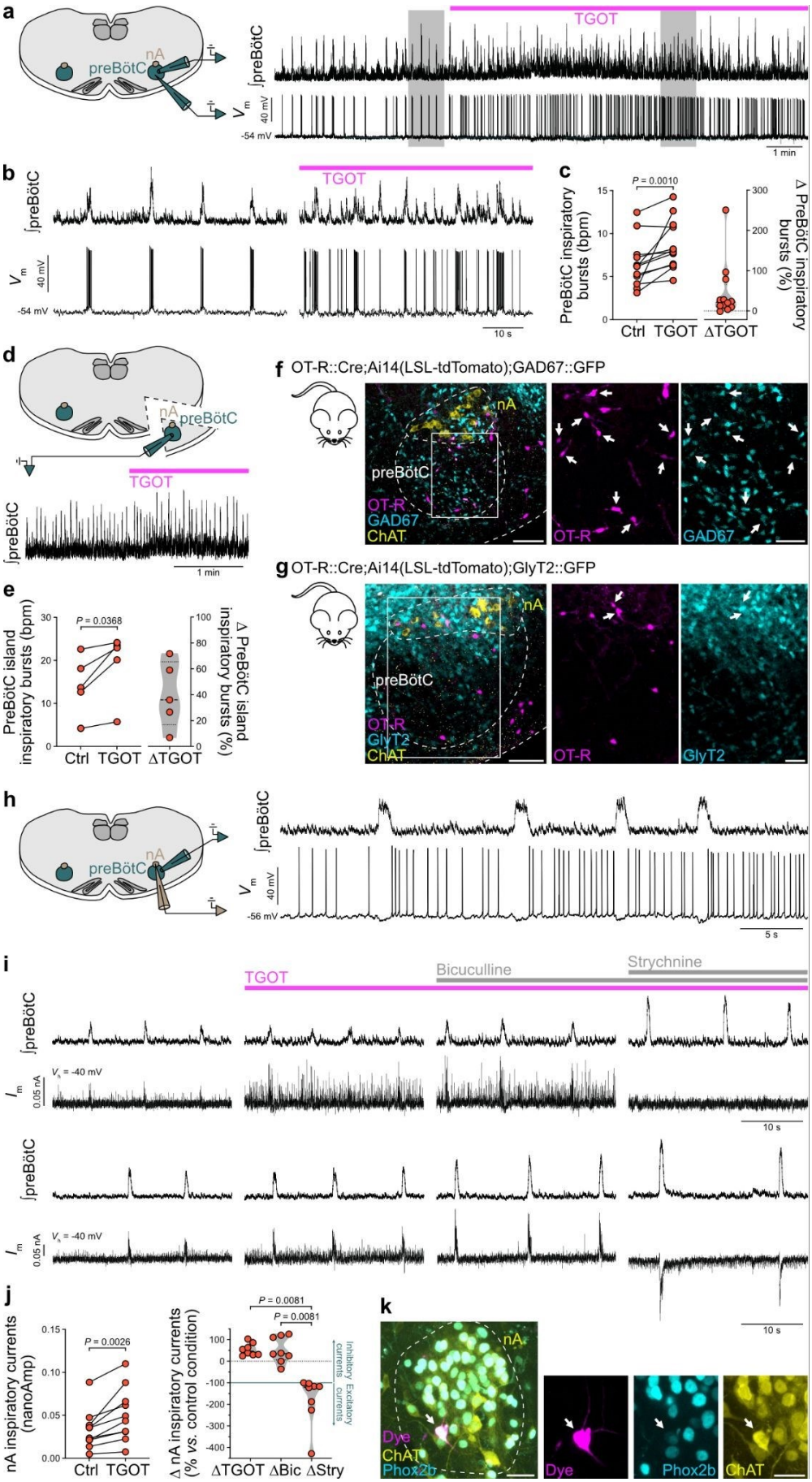

a
preBötC
nA
∫preBötC
TGOT
V_m
40 mV
-54 mV
1 min
b
∫preBötC
TGOT
V_m
40 mV
-54 mV
10 s
c
P = 0.0010
PreBötC inspiratory bursts (bpm)
Δ PreBötC inspiratory bursts (%)
Ctrl
TGOT
ΔTGOT
d
nA
preBötC
TGOT
∫preBötC
1 min
e
P = 0.0368
PreBötC island inspiratory bursts (bpm)
Δ PreBötC island inspiratory bursts (%)
Ctrl
TGOT
ΔTGOT
f OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GAD67::GFP
nA
preBötC
OT-R
GAD67
ChAT
OT-R
GAD67
g OT-R::Cre;Ai14(LSL-tdTomato);GlyT2::GFP
nA
preBötC
OT-R
GlyT2
ChAT
OT-R
GlyT2
h
nA
preBötC
∫preBötC
V_m
40 mV
-56 mV
5 s
i
TGOT
Bicuculline
Strychnine
∫preBötC
I_m
V_h = -40 mV
0.05 nA
10 s
∫preBötC
I_m
V_h = -40 mV
0.05 nA
10 s
j
P = 0.0026
nA inspiratory currents (nanoAmp)
Ctrl
TGOT
P = 0.0081
P = 0.0081
Δ nA inspiratory currents (% vs. control condition)
Inhibitory currents
Excitatory currents
ΔTGOT
ΔBic
ΔStry
k
nA
Dye
ChAT
Phox2b
Dye
Phox2b
ChAT

Fig. 4: TGOT increases the frequency of preBötC inspiratory bursts and amplifies the inspiratory glycinergic currents occurring in nA neurons in rhythmic slices *in vitro*.

a, Effects induced by the application of the selective OT-R agonist TGOT (0.5 µM) on preBötC population activity (∫preBötC, extracellular recordings) and on the activity of an individual inspiratory neuron (V_m, whole-cell current-clamp recordings), in a rhythmic preBötC slice from a neonatal mouse (all recordings performed at P0-P5). **b**, Expanded traces from the gray shaded areas in (**a**). **c**, TGOT increases the frequency of preBötC inspiratory bursts in rhythmic preBötC slices (n = 12 mice). Wilcoxon matched-pairs signed rank test. bpm, bursts per minute. **d**, Effects induced by the application of TGOT (0.5 µM) on preBötC population activity in a preBötC "island" preparation, where the preBötC is isolated from the rest of the slice. **e**, TGOT increases the frequency of preBötC inspiratory bursts in preBötC "island" preparations (n = 5 mice). Paired t-test. **f-g**, In P0 triple transgenic mice, preBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons show the same predominantly GABAergic (**f**) or glycinergic (**g**) phenotype as in adult mice (Fig. 3d-e) (arrows indicate OT-R and GAD67 or GlyT2 co-labelling). Scale bars full images, 100 µm ; scale bars insets, 50 µm. **h**, Simultaneous recordings of preBötC population activity and of the activity of a typical respiratory-modulated nA neuron (V_m, whole-cell current-clamp recordings). All respiratory-modulated nA neurons (n = 10 mice) were hyperpolarized during the inspiratory preBötC bursts, causing inhibition of their spiking activity. **i**, Successive effects induced by the application of TGOT (0.5 µM), bicuculline ($GABA_A$ receptor antagonist, 10 µM) and strychnine (glycine receptors antagonist, 5 µM) on preBötC population activities and on the currents recorded from respiratory-modulated nA neurons (I_m, whole-cell voltage-clamp recordings; V_h, -40 mV holding voltage). The top and bottom traces are representative examples of the two types of effects found following strychnine application. **j**, All recorded respiratorymodulated nA neurons showed volleys of inhibitory currents during preBötC inspiratory bursts in the control condition, which were amplified by TGOT application (n = 10 mice). During TGOT application, bicuculline application did change the delta (Δ) amplification of the inspiratory inhibitory currents relative to control condition (n = 8 mice), while strychnine application either abolished all currents (n = 5 mice), or exposed the presence of volleys of excitatory currents during preBötC inspiratory bursts (n = 3 mice). Control vs. TGOT, paired t-test. Delta changes following TGOT, bicuculline and strychnine applications, Friedman test, Dunn's multiple comparison. **k**, Example of a recorded nA neuron (arrows indicate the dye$^+$ recorded neuron that is Phox2b$^+$ and ChAT$^+$). Scale bar full image, 40 µm ; scale bar inset, 20 µm.

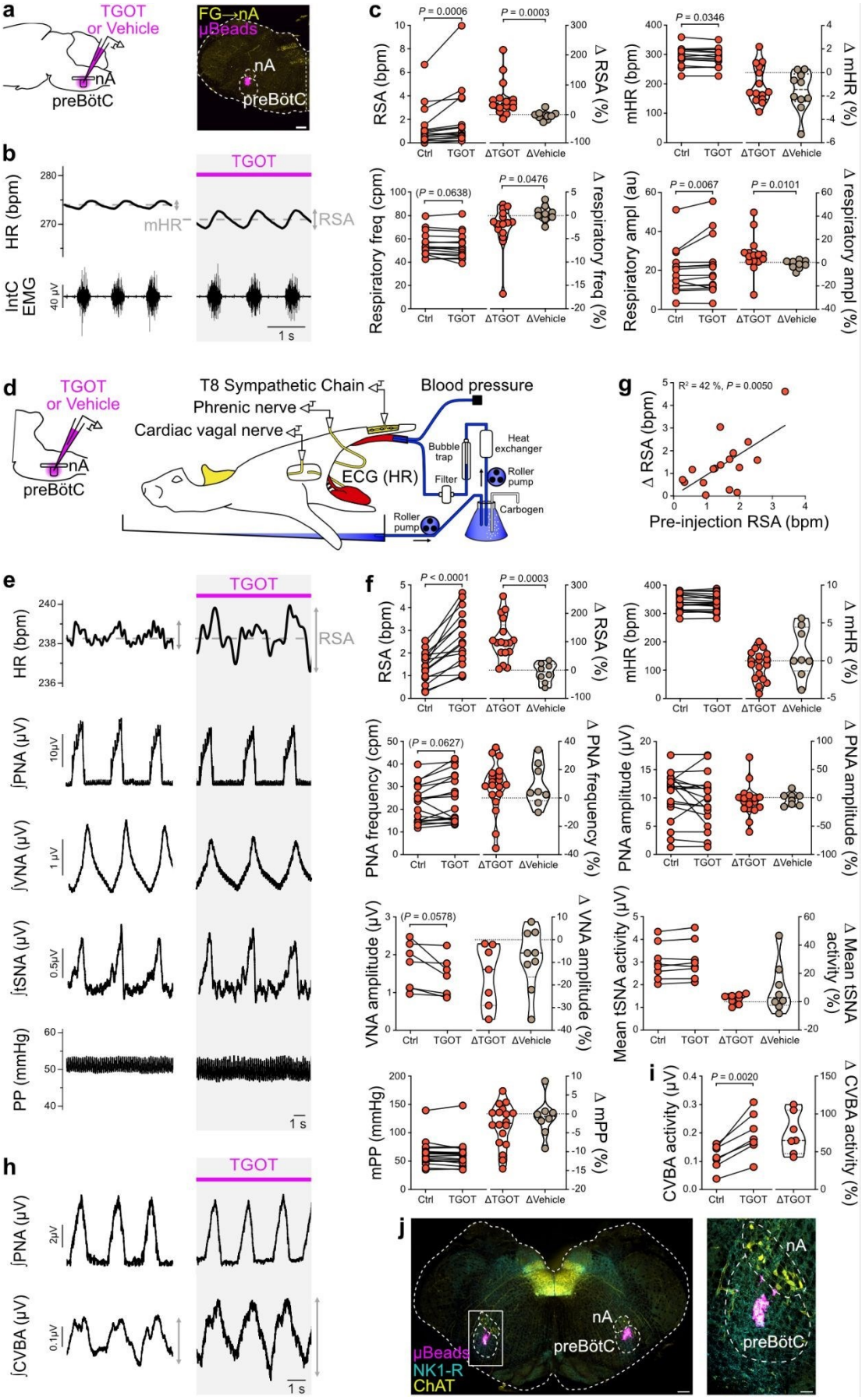

a
TGOT
or Vehicle
nA
preBötC
FG→nA
μBeads
nA
preBötC
b
TGOT
HR (bpm)
mHR
RSA
IntC EMG
40 μV
1 s
c
P = 0.0006
P = 0.0003
RSA (bpm)
Δ RSA (%)
P = 0.0346
mHR (bpm)
Δ mHR (%)
(P = 0.0638)
P = 0.0476
Respiratory freq (cpm)
Δ respiratory freq (%)
P = 0.0067
P = 0.0101
Respiratory ampl (au)
Δ respiratory ampl (%)
Ctrl
TGOT
ΔTGOT
ΔVehicle
d
TGOT
or Vehicle
nA
preBötC
T8 Sympathetic Chain
Phrenic nerve
Cardiac vagal nerve
Blood pressure
Bubble trap
Heat exchanger
Filter
Roller pump
ECG (HR)
Carbogen
Roller pump
g
R² = 42 %, P = 0.0050
Δ RSA (bpm)
Pre-injection RSA (bpm)
e
TGOT
HR (bpm)
RSA
∫PNA (μV)
10μV
∫VNA (μV)
1 μV
∫tSNA (μV)
0.5μV
PP (mmHg)
1 s
f
P < 0.0001
P = 0.0003
RSA (bpm)
Δ RSA (%)
mHR (bpm)
Δ mHR (%)
(P = 0.0627)
PNA frequency (cpm)
Δ PNA frequency (%)
PNA amplitude (μV)
Δ PNA amplitude (%)
(P = 0.0578)
VNA amplitude (μV)
Δ VNA amplitude (%)
Mean tSNA activity (μV)
Δ Mean tSNA activity (%)
mPP (mmHg)
Δ mPP (%)
i
P = 0.0020
CVBA activity (μV)
Δ CVBA activity (%)
h
TGOT
∫PNA (μV)
2μV
∫CVBA (μV)
0.1μV
1 s
j
nA
preBötC
μBeads
NK1-R
ChAT
nA
preBötC

Fig. 5: TGOT injection in the preBötC induces RSA amplification due to amplified respiratory modulation of cardiac parasympathetic activity in adult anesthetized rats and in *in situ* Working Heart-Brainstem Preparations of juvenile rats.

a, Bilateral injection of TGOT (50 nl at 0.5 µM) or vehicle in the preBötC of adult anesthetized Wistar rats. Fluorescent microbeads in the injectate solutions enabled the localisation of the injection spots *a posteriori* (mapped in Extended Data Fig. 6c). Scale bar, 300 µm. **b-c**, The bilateral injection of TGOT in the preBötC induced an amplification of RSA, a decrease in mHR, an increase in respiratory amplitude (ampl) but no change in respiratory frequency (freq). Absolute values for the conditions before and after TGOT injection (n = 15), paired t-test for respiratory frequency and Wilcoxon matched-pairs signed rank test for RSA, mHR and respiratory amplitude. Relative effects (delta (*Δ*) in %) induced by TGOT or vehicle (n = 10, absolute values in Extended Data Fig. 6b) injections, Mann-Whitney test or unpaired t-test (mHR). IntC EMG, intercostal electromyography. **d**, Bilateral injection of TGOT or vehicle in the preBötC of *in situ* Working Heart-Brainstem Preparations of juvenile Wistar rats (P21-30). ECG, Electrocardiogram. **e-i**, Bilateral TGOT injection induced an amplification of RSA (**e**, **f**) and an increase in the respiratory modulation of the cardiac vagal branch activity (CVBA) (**h**, **i**), with no change in mHR, amplitude or frequency of the phrenic nerve activity (PNA), amplitude of the cervical vagal nerve activity (VNA), mean thoracic sympathetic nerve activity (tSNA) or mean perfusion pressure (PP). PNA, HR and PP were recorded in all *in situ* Working Heart-Brainstem Preparations, while VNA and tSNA (**e**, **f**), and CVBA (**h**, **i**), were recorded in different preparations. Integrated traces (**e**, **h**) are respiratory triggered averaging over >15 respiratory cycles. Absolute values for the conditions before and after TGOT injection (**f**, **i**) (RSA, n = 16; mHR, n = 18; PNA frequency, n = 19; PNA amplitude, n = 18; VNA, n = 7; tSNA, n = 8; mPP, n = 18; CVBA, n = 7), paired t-test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Relative effects (delta (*Δ*) in %) induced by TGOT or vehicle injections (absolute values for vehicle injections in Extended Data Fig. 6e; RSA, n = 8; mHR, n=8; PNA frequency, n = 9; PNA amplitude, n = 8; VNA, n = 9; tSNA, n = 8; mPP, n = 8), Mann-Whitney test or unpaired t-test. The delta (*Δ*) increase in RSA amplitude following TGOT injection is correlated with the absolute RSA amplitude during the pre-injection control period (**g**). Pearson correlation analysis, simple linear regression plotted. **j**, Fluorescent microbeads in the injectate solutions enabled the localisation of the injection spots of TGOT or vehicle *a posteriori* (mapped in Extended Data Fig. 6h). NK1-R, neurokinin 1 receptor. ChAT, choline acetyltransferase. Scale bar large image 300 µm, inset 100 µm.

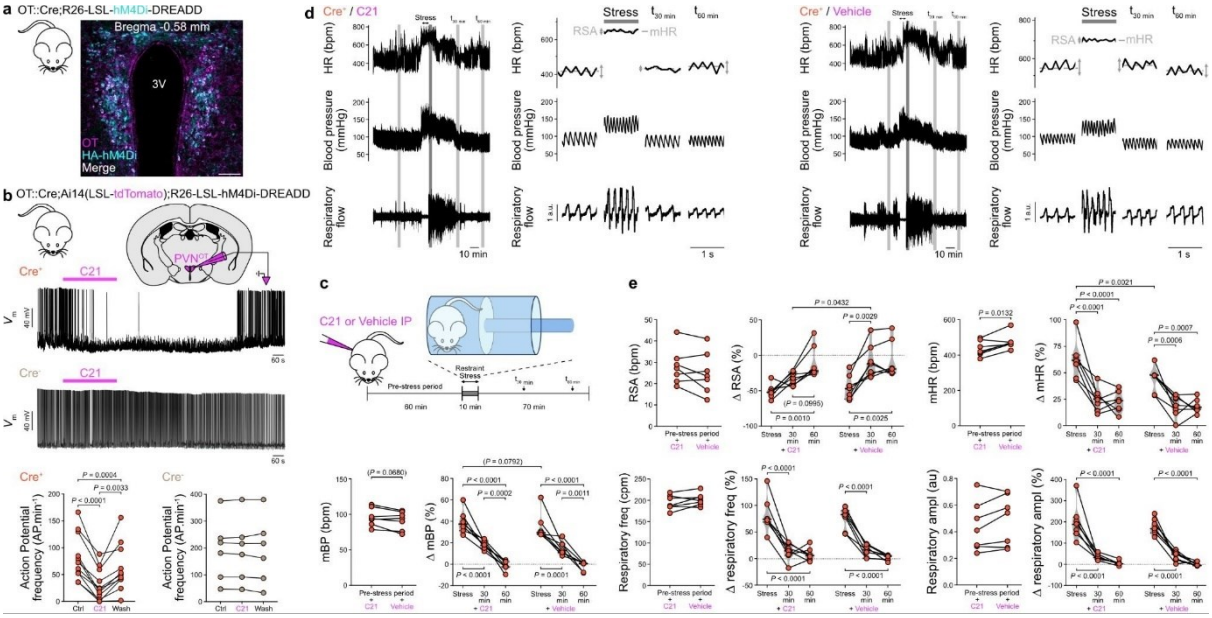
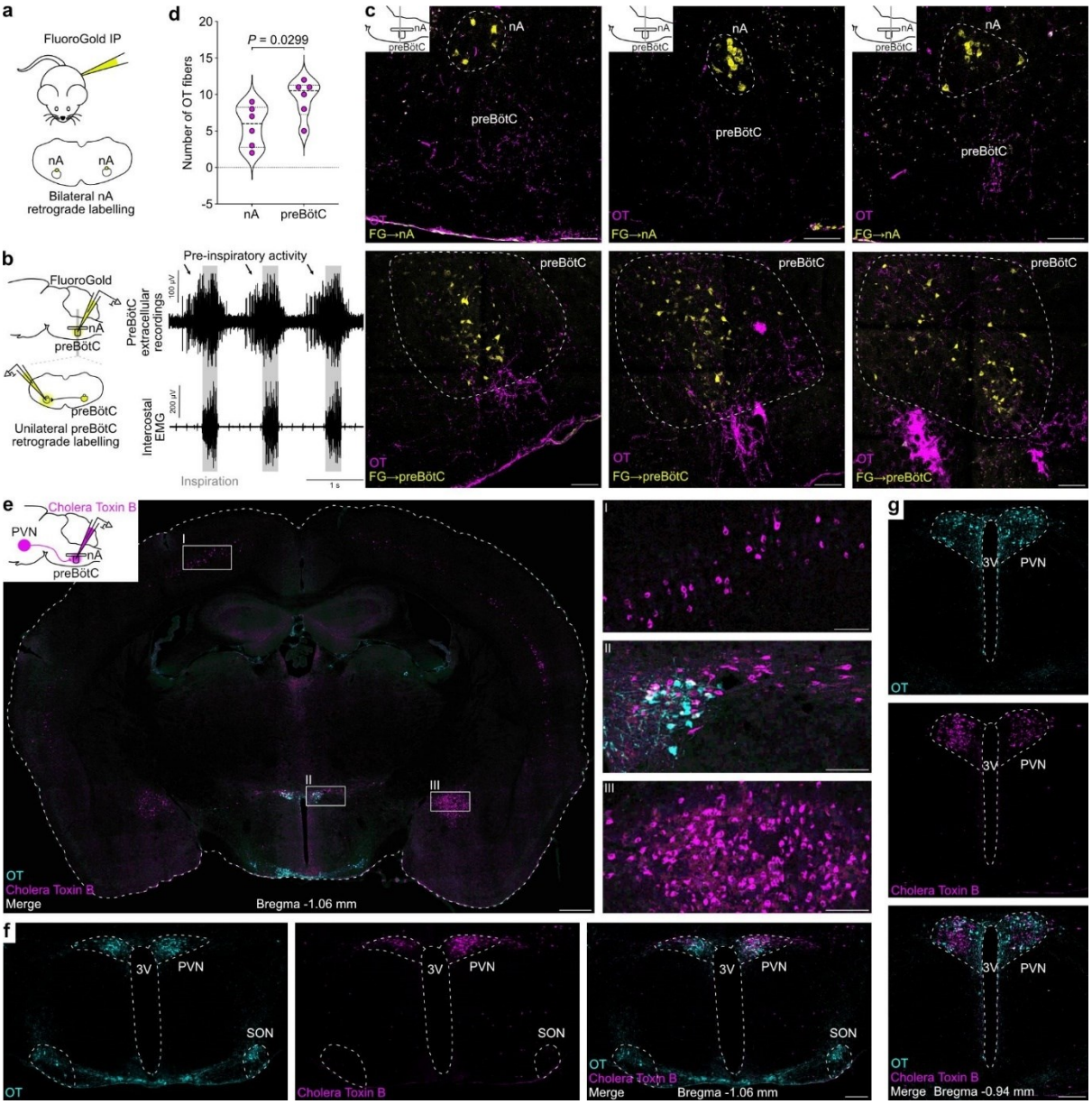


Fig. 6: Chemogenetic inhibition of OT neurons slows down the recovery of RSA amplification following a restraint stress test.

a, Expression of the HA-tagged inhibitory chemogenetic actuator hM4Di in OT neurons in adult transgenic mice. hM4Di is a $G_{\alpha i/o}$-protein coupled receptor from the Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) system. Scale bar, 100 µm. **b**, Wholecell current-clamp recordings of PVN^{OT} neurons expressing tdTomato and hM4Di in slices from Cre^+ mice, showing that application of the DREADD agonist Compound 21 (C21, 10 µM, for 5 min) inhibits action potentials. C21 had no effect on neurons recorded in the PVN in Cre^- mice (n = 3 Cre^+ and n = 2 Cre^- P20 mice, at least 3 recorded neurons per mouse, each from a different slice). RM one-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction, Tukey's multiple comparison. **c**, Experimental strategy to test the effect of chemogenetic inhibition of OT neurons on respiratory and cardiovascular parameters, before and after a restraint stress test in a ventilated cylinder. The mice were implanted with blood pressure telemetry probes to enable measurements of blood pressure and HR. They were placed in a plethysmography chamber (to which they were habituated for 1 week) during the pre-stress and post-stress conditions, to enable measurement of their respiratory activity. **d-e**, Effects induced by the intraperitoneal injection of the hM4Di agonist Compound 21 (C21) or vehicle in adult Cre^+ mice (n = 7, three trials averaged for each condition, C21 and vehicle, in each mouse; C21 or vehicle trials spaced by at least 24h). Traces on the right for both the C21 and vehicle conditions are enlargements of the grayed areas on their respective traces on the left (**d**). Chemogenetic inhibition of OT neurons did not alter RSA amplitude at rest, but slowed down the recovery of RSA amplification following the restraint test. Pre-stress conditions, C21 *vs*. vehicle, paired ttest (**e**). Stress and post-stress delta (*Δ* in %) effects compared to the pre-stress condition, C21 *vs*. vehicle, RM two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison. Cre^- data are shown in Extended Data Fig. 7.

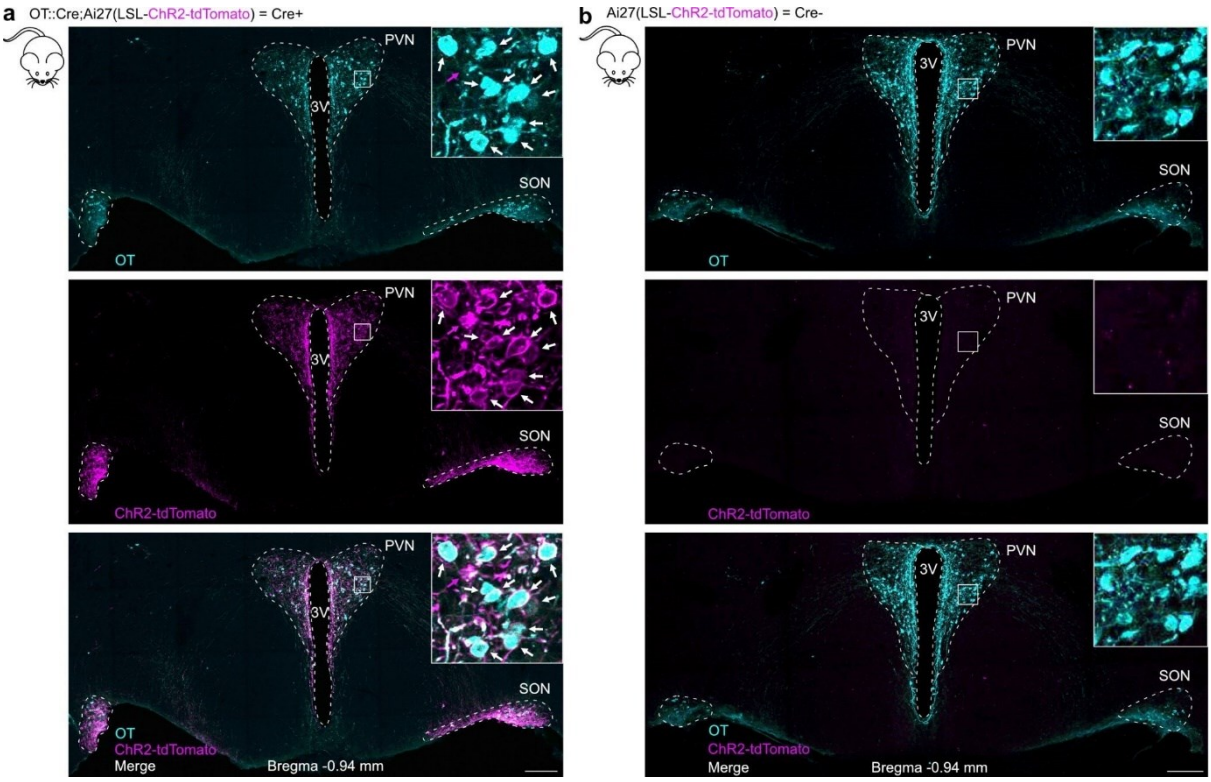
Extended data figures and legends



Extended Data Fig. 1: OT fibers are predominantly present in the preBötC compared to the nA, and OT neurons from the caudal PVN form a dense and regionally-specific cluster projecting to preBötC/nA neurons.

a, Intraperitoneal (IP) injection of the retrograde tracer FluoroGold labels nucleus ambiguus neurons. **b**, FluoroGold injection in the preBötC unilaterally labels a subgroup of contralateral preBötC neurons, enabling delineation of the preBötC boundaries. PreBötC injections were guided by extracellular recordings made with the injection pipette, to localize the peak preinspiratory/inspiratory activity on the rostral side of the inspiratory cell column. **c**, Coronal sections at three rostro-caudal levels (insets) with immunohistochemical labeling of OT fibers, and labeling of either nA neurons (top) or contralaterally-projecting preBötC neurons (bottom) with FluoroGold (FG), using the strategies for FG injection shown in adjacent panels **a** and **b**. The

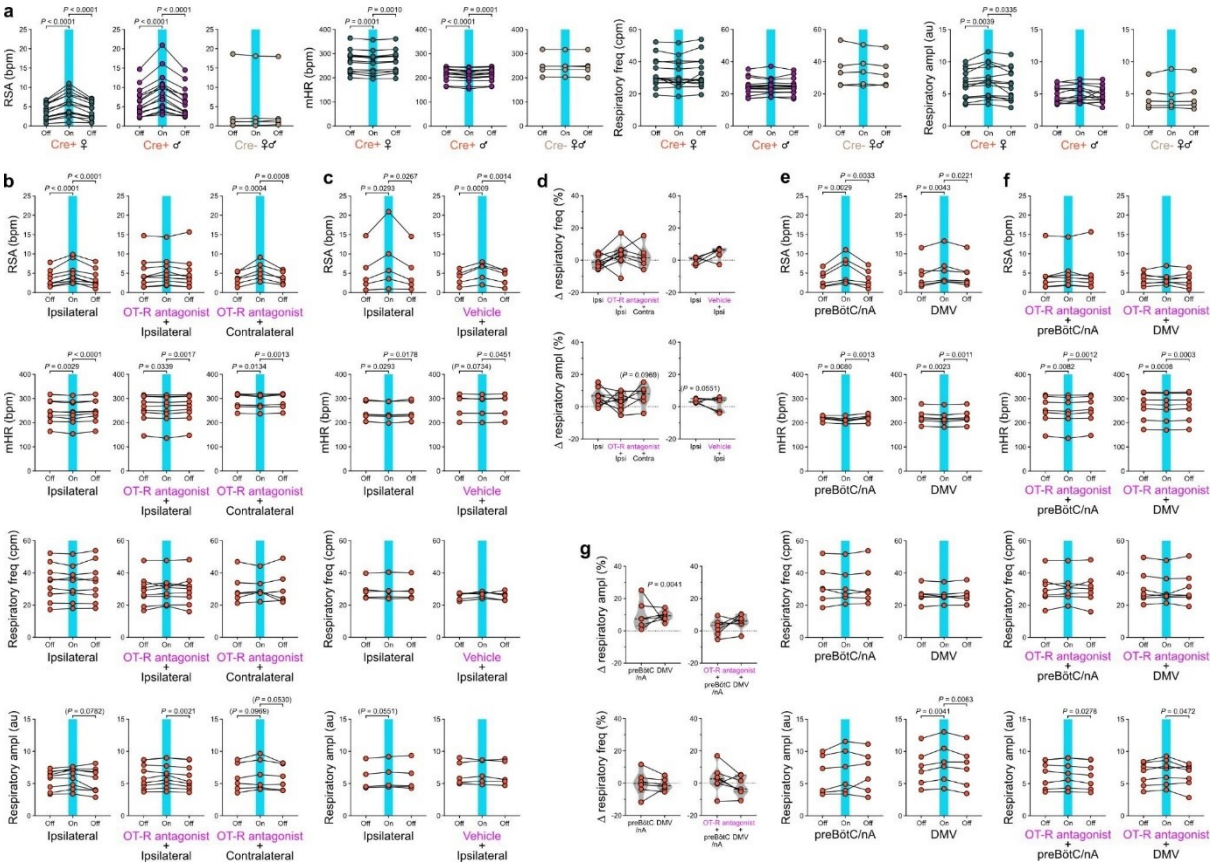
preBötC contains a greater density of OT fibers compared to the nA. Scale bars, 100 µm. **d**, Each point represents the average number of OT fibers counted in three brainstem sections (50 µm thick) per animal (n = 6 for nA, n = 6 for preBötC). The sections were taken at three rostro-caudal positions through the preBötC/nA. Paired t-test for nA *vs*. preBötC. **e-g**, Bilateral injection of the retrograde tracer cholera toxin B in the preBötC/nA. OT neurons that project to the preBötC/nA are restricted to the caudal PVN. The most rostral level showing OT neurons co-labelled with cholera toxin B is at ~ Bregma -0.94 mm (**g**). The level with the highest proportion of OT neurons co-labelled with cholera toxin B is at ~ Bregma -1.06 mm (**e**, **f**). At this level, only three structures are labeled with cholera toxin B (**e**), the cortex (I in **e**), the PVN (II in **e**), and the central amygdala (III in **e**), similarly to what was shown previously using monosynaptic retrograde viral tracing from preBötC neurons[47]. We found no cholera toxin B labeling in the supraoptic nucleus (SON) (**f**). Scale bars, 500 µm (whole section in **e**), 100 µm (I, II and III in **e**), 200 µm (**f**, **g**).



Extended Data Fig. 2: Specificity of ChR2-tdTomato expression in the OT neurons of OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2-tdTomato) mice.

a, The selective expression in OT neurons of the blue light gated cation channel ChR2 fused to the fluorescent protein tdTomato is induced by crossing OT::Cre mice with Ai27(LSL-ChR2tdTomato) mice. ChR2-tdTomato labeling is mostly membranous, due to the membrane targeting of ChR2. White arrows in insets indicate neurons counted as OT^+ and $ChR2tdTomato^+$. A magenta arrow indicates a neuron counted as OT^- and $ChR2\text{-}tdTomato^+$, therefore representing one of the rare neurons counted as non-specific expression (3% of OT^- $ChR2^+$ neurons, Fig. 1c). This very low non-specific expression is likely overestimated by our count, because of the limited sensitivity of OT immunohistochemical labeling leading to an underestimation of the number of OT neurons[48], and because we counted neurons showing

faint OT labeling as OT$^-$ neurons (such as the one indicated by the magenta arrow). Scale bar, 200 µm. **b**, Littermates that did not express the Cre recombinase (Cre$^-$), but were genotyped positive for the LSL-ChR2-tdTomato transgene, obtained from crossings between OT::Cre mice with Ai27(LSL-ChR2-tdTomato) mice, were used as control mice. No ChR2-tdTomato expression was found in these mice. Scale bar, 200 µm.

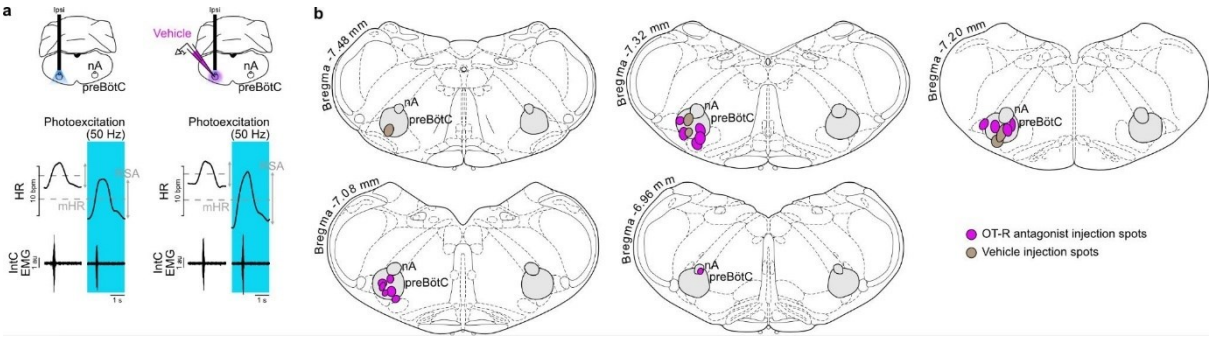


Extended Data Fig. 3: Individual data showing the respiratory and cardiac effects of the photoexcitation of PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA and DMV, before and after injection of an OT-R antagonist in the preBötC/nA.

a, Individual data from the photoexcitation of OT fibers unilaterally in the preBötC/nA of adult anesthetized OT::Cre;Ai27(LSL-ChR2) female and male mice (n = 15 Cre$^+$ females, n = 15 Cre$^+$ males, n = 5 Cre$^-$ females and males). Each point is the average of ~5-10 photoexcitation trials per mouse. RM one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. The pre-

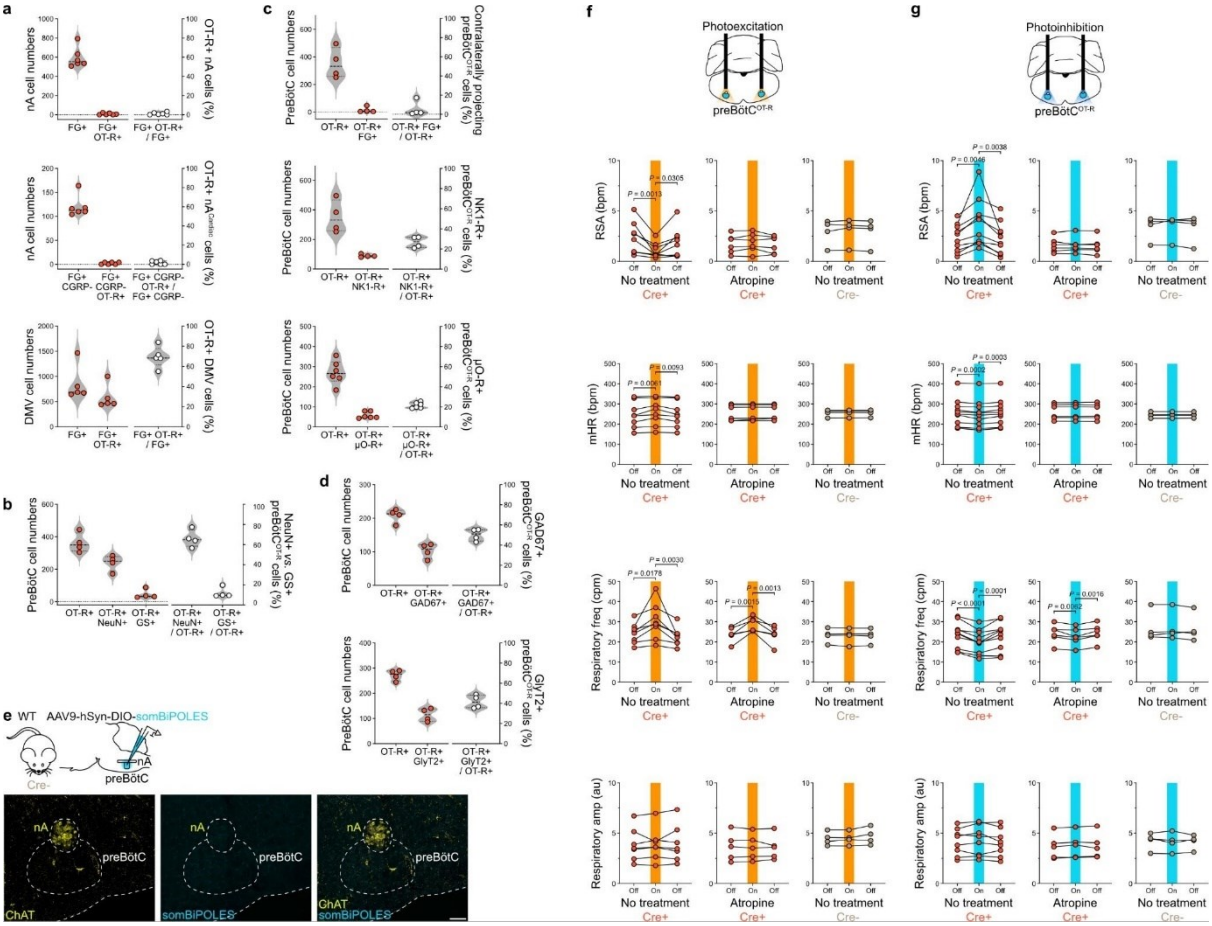
photoexcitation and photoexcitation data were used to calculate the delta changes for each measured parameter represented in Fig. 2c. freq, frequency. ampl, amplitude. **b**-**c**, In a subgroup of mice shown in **a**, after ~5-10 photoexcitation trials ("ipsilateral" data in **b** and **c**), an OT-R antagonist (**b**) or vehicle (**c**) was injected in the preBötC/nA where the photoexcitations were performed, and photoexcitations at the same ipsilateral site were repeated ("OT-R antagonist + ipsilateral" data in **b**, "vehicle + ipsilateral" in **c**) (n = 9 for "ipsilateral" and "OT-R antagonist + ipsilateral" in **b**, n = 5 for "ipsilateral" and "vehicle + ipsilateral" in **c**). In a subgroup of mice injected with the OT-R antagonist, photoexcitations in the contralateral preBötC/nA

were made after the ipsilateral photoexcitations (n = 6, “OT-R antagonist + contralateral” in **b**). Each point is the average of ~5-10 photoexcitation trials per mouse for the “ipsilateral” condition, and the average of ~3-5 photoexcitation trials per mouse for the “OT-R antagonist + ipsilateral”, “OTR antagonist + contralateral” and “vehicle + ipsilateral” conditions (**b**, **c**). RM one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison. The pre-photoexcitation and photoexcitation data were used to calculate the delta changes for the RSA and mHR parameters represented in Fig. 2g. **d**, Delta (*Δ*) changes in respiratory frequency and respiratory amplitude, from the prephotoexcitation and photoexcitation data shown in **b** and **c**. Intra-condition delta changes (photoexcitation *vs.* pre-photoexcitation), RM one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison. Inter-conditions comparisons for OT-R antagonist (“ipsi” *vs.* “OT-R antagonist + ipsi” *vs.* “OT-R antagonist + contra”), RM mixed-effects analysis with the Geisser-Greenhouse correction, Tukey’s multiple comparison. Inter-conditions comparisons for vehicle (“ipsi” *vs.* “vehicle + ipsi”), paired t-test. **e**, In a subgroup of mice shown in **a**, after ~5-10 photoexcitation trials in the preBötC/nA, photoexcitations of the ipsilateral DMV were performed (n = 6). RM one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison. **f**, In a subgroup of mice shown in **b**, after ~5 photoexcitation trials in the preBötC/nA following injection of the OT-R antagonist, photoexcitations of the ipsilateral DMV were performed (n = 7). RM one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison. **g**, Delta changes in respiratory frequency and respiratory amplitude, from the pre-photoexcitation and photoexcitation data shown in **e** and **f**. Intracondition delta changes (photoexcitation *vs.* pre-photoexcitation), RM one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison. Inter-conditions comparisons before and after OT-R antagonist injection (“preBötC/nA” *vs.* “DMV”), paired t-test.



Extended Data Fig. 4: Raw traces for the photoexcitation of PVN^{OT} fibers in the preBötC/nA before and after vehicle injection, and localisation of the injection spots of the OT-R antagonist and vehicle.

a, Vehicle injection in the preBötC/nA did not alter the effects induced by the photoexcitation of PVN^{OT} fibers (individual data in Fig. 2g and Extended Data Fig. 3c). **b**, Localisation of the injection spots of a selective OT-R antagonist (200 nl) and of vehicle (200 nl) in the preBötC/nA, for data shown in Fig. 2e-k and Extended Data Fig. 3b-g. Each spot corresponds to a single injection in one mouse.

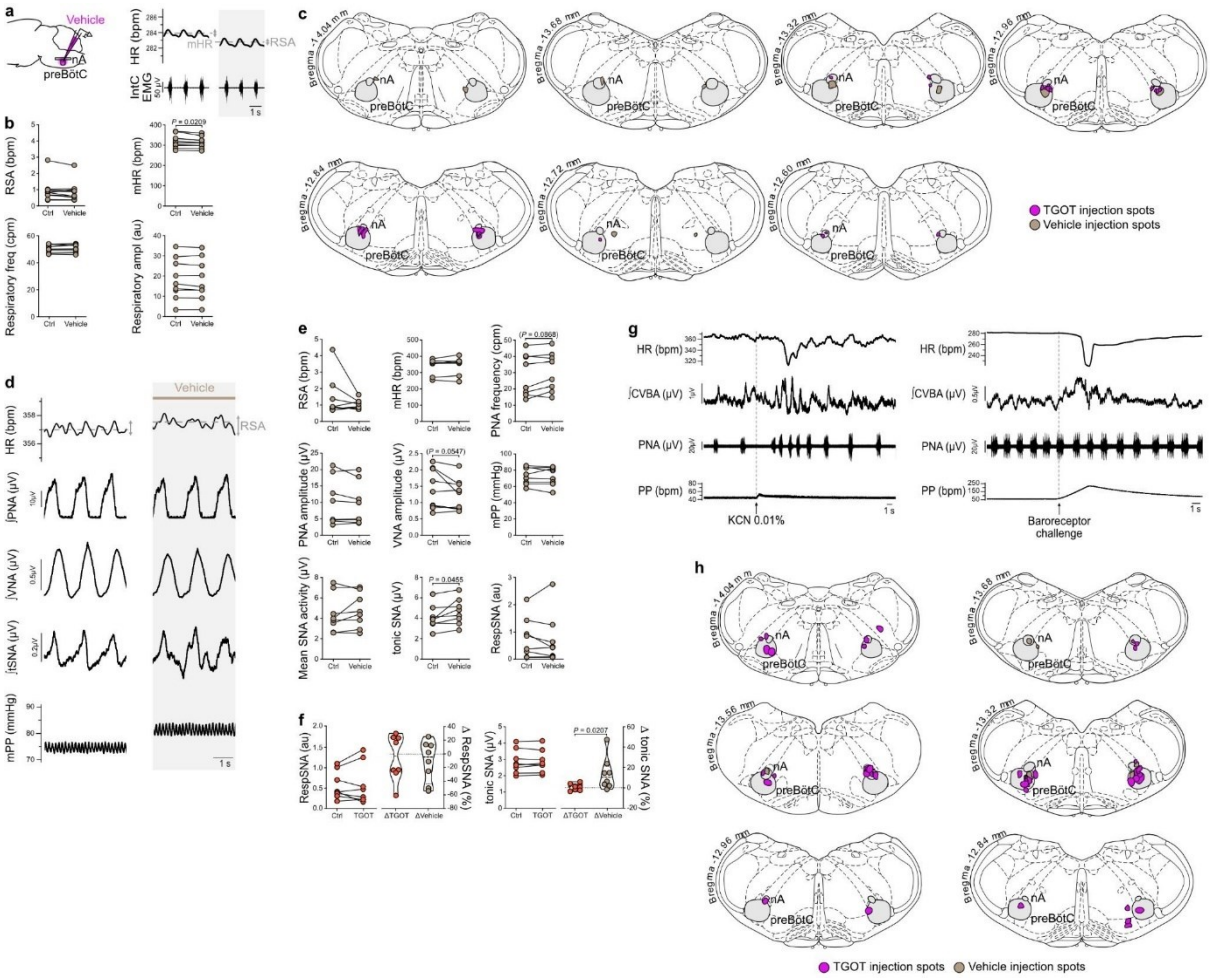


Extended Data Fig. 5: Individual data for the anatomo-functional characterisation of OTR$^+$ cells in the preBötC/nA, and absence of somBiPOLES expression in Cre$^-$ mice.

a-d, Individual data for the averaged counts shown on Fig. 3a-b and d-e. Each point represents the total number of cells counted unilaterally in one mouse (n = 6 mice for nA counts and n = 5 mice for DMV counts in (**a**); n = 4 mice in (**b**); n = 4 mice for FG$^+$ counts, n = 4 mice for

NK1-R$^+$ counts and n = 6 mice for μO-R$^+$ counts in (**c**); n = 4 mice for GAD67$^+$ counts and n = 4 mice for GlyT2$^+$ counts in (**d**)). **e**, Absence of somBiPOLES expression in Cre$^-$ mice following viral injection in the preBötC. Scale bar, 100 μm. **f-g**, Individual data from the photoexcitation (**f**) and photoinhibition (**g**) of preBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons bilaterally in adult anesthetized mice (n = 8 Cre$^+$ mice for photoexcitation and n = 10 Cre$^+$ mice for photoinhibition with no treatment, n = 6 Cre$^+$ mice for photoexcitation/photoinhibition after atropine, n = 4 Cre$^-$ mice). Each point corresponds to the average of ~5 photoexcitation or photoinhibition trials per mouse. RM one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. The pre-

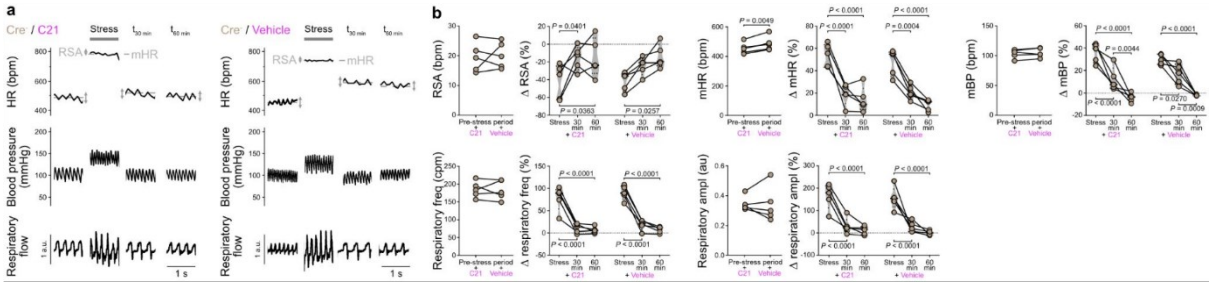
photomodulation and photomodulation data were used to calculate the delta changes for each measured parameter represented in Fig. 3h and i. freq, frequency. ampl, amplitude.



Extended Data Fig. 6: Vehicle injections in the preBötC of adult anesthetized rats and *in situ* Working Heart-Brainstem Preparations of juvenile rats, maps of preBötC injections, and functional characterisation of CVBA recordings.

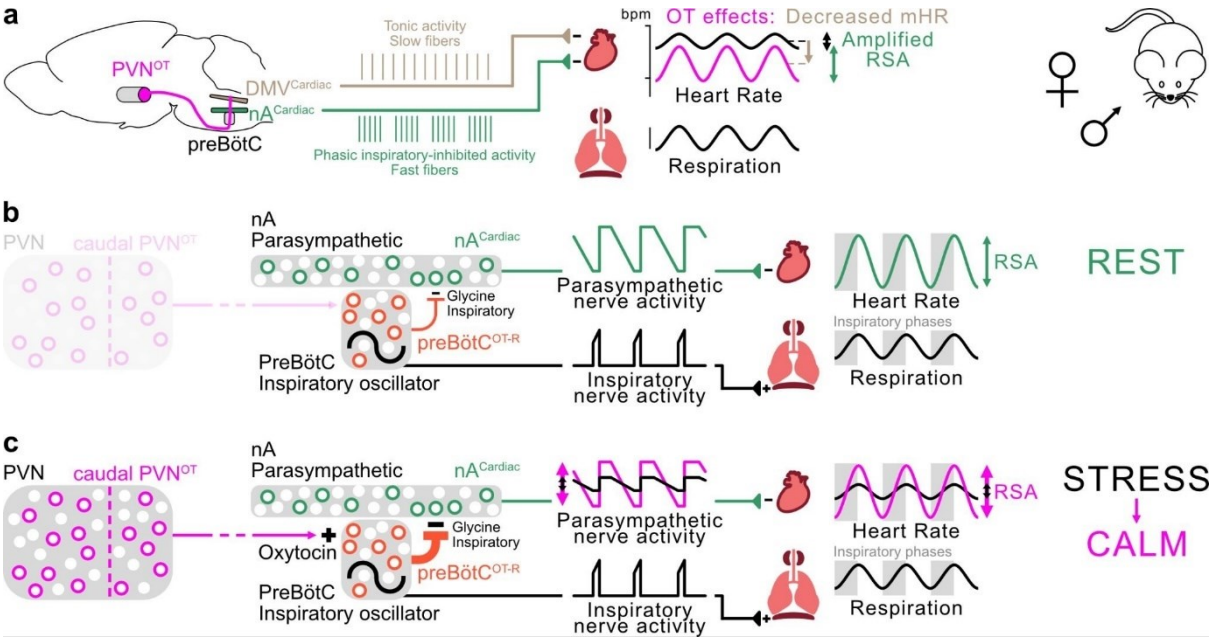
a-b, Bilateral injection of vehicle in the preBötC of adult anesthetized Wistar rats had no effect on HR and inspiratory activity (IntC EMG). Absolute values are represented for the conditions before and after vehicle injection (n = 10). Paired t-test for respiratory frequency, respiratory amplitude and mHR, Wilcoxon matched-pairs signed rank test for RSA. **c**, Schematic coronal maps showing the distribution of all TGOT and vehicle injection spots in adult anesthetized Wistar rats. **d-e**, Effects of vehicle injection in the preBötC of *in situ* Working Heart-Brainstem Preparations of juvenile Wistar rats (P21-30) (HR, n = 8; PNA frequency, n = 9; PNA amplitude, n = 8; VNA, n = 9; tSNA, n = 8; mPP, n = 8). Integrated traces (**d**) are respiratory triggered averages over >15 respiratory cycles. Absolute values are represented for the conditions before and after vehicle injection (**e**). Paired t-test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **f**, Effects of bilateral TGOT *vs*. vehicle injection in the preBötC of *in situ* Working Heart-Brainstem Preparations of juvenile Wistar rats on the two components of tSNA, the phasic burst of respiratory modulation of tSNA (RespSNA) and the tonic SNA (n = 8 TGOT and n = 8 vehicle). Before vs. after injection conditions, paired t-test. Comparison of the relative effects of TGOT and vehicle (delta (*Δ*) in %), unpaired t-test for RespSNA, Mann-Whitney test for tonic SNA. **g**, Peripheral chemoreflex (potassium cyanide (KCN) injection) and baroreflex (increased perfusion flow rate) challenges were used to confirm functionally the validity of the CVBA recordings (data

shown from the same preparation). **h**, Schematic coronal maps showing the distribution of all TGOT and vehicle injection spots in the *in situ* Working HeartBrainstem Preparations of juvenile Wistar rats.



Extended Data Fig. 7: The DREADD agonist Compound 21 is mostly inert on cardiovascular and respiratory functions in OT::Cre;R26-LSL-hM4Di-DREADD Cre^{-} mice, except for mHR.

a-b, Effects induced by the intraperitoneal injection of the hM4Di agonist Compound 21 (C21) or vehicle, before, during and after a restraint stress test in a ventilated cylinder, in Cre^{-} mice from the OT::Cre;R26-LSL-hM4Di-DREADD transgenic mouse line (n = 7, three trials averaged for each condition, C21 and vehicle, in each mouse; C21 or vehicle trials spaced by at least 24h). Traces on the right for both the C21 and vehicle conditions are enlargements of the gray shaded areas on their respective traces on the left (**a**). There were no off-target effects of C21 in Cre^{-} mice on RSA amplitude, mBP, respiratory frequency and respiratory amplitude, but mHR which was increased during the pre-stress condition. Pre-stress conditions, C21 *vs*. vehicle, paired t-test (**b**). Stress and post-stress delta (*Δ* in %) effects compared to the pre-stress condition, C21 *vs*. vehicle, RM two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison.



Extended Data Fig. 8: Schematic model of the preBötC$^{OT\text{-}R}$→nA^{Cardiac} neuronal circuit that controls RSA at rest, and its modulation by PVN^{OT} neurons for RSA amplification during a calming behavior.

a, Oxytocinergic neurons from the caudal PVN project to the brainstem, with axons traversing the medulla oblongata in the coronal plane and crossing cardiorespiratory nuclei including the preBötC, nA and DMV. The stimulation of these fibers releases OT in the preBötC/nA which induces RSA amplification, and concomitantly induces a mHR decrease *via* the DMV. The OTergic amplification of RSA was found in both female and male mice and rats. **b**, At rest, OT is not involved in the regulation of RSA amplitude. Yet, expression of the OT-R in a subgroup of preBötC neurons, the group that generates the inspiratory rhythm, defines a subpopulation of cells that participates in the control of RSA. PreBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons induce inspiratory glycinergic inhibition of the activity of nA^{Cardiac} neurons *via* putative monosynaptic contacts. This results in a decrease in cardiac parasympathetic activity that is concomitant with each inspiratory burst in the phrenic nerve, and at the effector level in an increase in HR during inspiration. **c**, PVN^{OT} neurons are involved in the recovery of RSA amplitude during calming behavior following a stress. The release of OT by PVN^{OT} neurons on preBötC$^{OT\text{-}R}$ neurons amplifies RSA, by raising the excitability of inspiratory preBötC neurons leading to the amplification of the preBötC→nA^{Cardiac} inspiratory glycinergic connectivity. The RSA amplification is generated *via* amplified respiratory modulation of parasympathetic activity to the heart. Inhibition of PVN^{OT} neurons slows the recovery of RSA amplitude following a stress.