

# Modélisation du réseau de neurone à l'origine des rythmes chez l'embryon de poulet.

**Jean-François Vibert<sup>\*</sup>, Vincent Lagoueyte<sup>\*</sup>, Nicolas Bourrié<sup>\*</sup>,  
Gilles Fortin<sup>\*\*</sup>, Jean Champagnat<sup>\*\*</sup>**

<sup>\*</sup> B3E ESI, INSERM U444, Faculté de médecine Saint-Antoine, Univ. Paris 6, Paris 12<sup>ème</sup>, France

<sup>\*\*</sup> Biologie Fonctionnelle du Neurone, CNRS UPR 2216, Neurobiologie Génétique et Intégrative, Gif-sur-Yvette, France

## Résumé

Nous proposons un modèle du réseau de neurones à l'origine des rythmes chez l'embryon de poulet. C'est certainement à partir de ce réseau que se constituent ensuite les futurs réseaux rythmogènes dont celui de la respiration. Nous avons modélisé ce réseau afin de vérifier certaines hypothèses pour mieux comprendre son fonctionnement, comment il génère une activité rythmique et quels sont les rôles respectifs des différents types neuronaux. Le modèle minimal développé est composé de trois types neuronaux distincts modélisés en utilisant le formalisme d'Hodgkin et Huxley. Pour pouvoir correctement reproduire les données expérimentales, il a été nécessaire d'introduire un courant calcique à bas seuil ( $I_{CaT}$ ), un courant potassique calcium-dépendant ( $I_{AHP}$ ), ainsi qu'une neuromodulation biphasique. Ceci a permis d'obtenir un épisode d'activité similaire aux observations, mais unique. La rythmicité du réseau n'est obtenue que si l'on introduit dans le réseau une hétérogénéité dans un type neuronal. Le modèle simulé montre ainsi une bonne adéquation aux données expérimentales. Il a permis de confirmer certaines hypothèses, d'en proposer de nouvelles (à valider expérimentalement), et d'expliquer les principaux mécanismes à l'origine de cette activité rythmique.

## INTRODUCTION

La respiration est une activité motrice rythmique sous la dépendance d'un générateur de rythme, qui apparaît chez le fœtus et acquiert, évidemment, une importance vitale à la naissance. On sait depuis 1923 (Lumsden 1923) que le tronc cérébral est le siège de la genèse de ce rythme. La localisation des centres respiratoires a fait l'objet de nombreux travaux dans les années 70-80, par enregistrement (Bertrand et al 1974 ; Vibert et al 1976a-b, 1979), lésion (Caille et al 1981) ou en utilisant des drogues (Caille et al 1979). Ils ont été localisés dans le tronc cérébral, avec de nombreuses cellules présentant une modulation respiratoire enregistrées au niveau de la formation réticulée bulbo-pontine (Bertrand et al 1973 ; Vibert et al 1976a).

Les mécanismes présidant à la genèse des rythmes sont encore mal connus, et il n'a pas encore pu être établi si ces rythmicités résultaient des seules propriétés intrinsèques de certains neurones, ou si elles constituaient une propriété émergente d'un réseau du tronc cérébral. Feldman et Cleland (1982), puis Smith et al. (1991) ont suggéré qu'une activité de type pacemaker pourrait être responsable de ces oscillations. Par opposition, d'autres auteurs (Balis et al. 1994 ; Vibert et Azmy 1989 ; Rubio 1972) ont proposé de considérer ces rythmes comme le résultat d'interactions inhibitrices réciproques entre différents types de neurones (c'est-à-dire une activité de réseau). D'un point de vue expérimental, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de certains canaux ioniques membranaires dans le contrôle du démarrage et de l'organisation des décharges neuronales (Champagnat et Richter 1994 ; Miffilin et al. 1985). Ces résultats, bien qu'ils démontrent l'importance des propriétés intrinsèques de certains neurones dans la genèse des rythmes respiratoires, n'impliquent cependant pas que ces propriétés déterminent à elles seules les rythmicités observées.

Des études effectuées chez les mammifères nouveau-nés ou adultes ont mis en évidence que la capacité des réseaux neuronaux centraux à produire une commande motrice en relation avec la respiration est une caractéristique de la formation réticulée du tronc cérébral (Fortin et al. 1994 ; Adrian et Buyendijk 1931). De même, au cours du développement, des mouvements rythmiques préfigurant la respiration sont parmi les premières activités détectables chez le fœtus humain (DeVries et al. 1982 ; Jansen et Chernick 1983). Il apparaît donc que le réseau rythmogène respiratoire est présent bien avant la naissance.

Des auteurs (Champagnat et Fortin 1997 ; LeMetayer 1996 ; Fortin et al. 1995) étudiant les réseaux embryonnaires dans le cerveau postérieur de l'embryon de poulet ont mis en évidence l'existence d'un réseau rythmique composé d'un nombre limité de types neuronaux. Ce réseau semble être le premier mis en place chez l'embryon, et génère spontanément *in vitro* (après isolement) une activité organisée sur tous les nerfs moteurs en provenance du tronc cérébral. Ces auteurs suggèrent que ce réseau puisse constituer une organisation primordiale à partir de laquelle s'établiront, au cours de la vie fœtale, les réseaux neuronaux adultes ayant chacun leur spécificité du point de vue de leur fonction. Ce réseau serait en particulier à l'origine de celui qui générera le rythme respiratoire chez l'adulte. C'est avec ces auteurs, et à partir de leurs données, que nous avons modélisé ce réseau afin de vérifier certaines hypothèses pour mieux comprendre son fonctionnement, comment il génère une activité rythmique et quels sont les rôles respectifs des différents types neuronaux.

Les différents modèles du réseau de neurones responsables des rythmes respiratoires décrits dans la littérature sont basés sur des modèles relativement simples de neurones (Botros et Bruce 1990 ; Duffin 1991 ; Pham et al. 1997) ou sur des modèles plus complexes et plus réalistes s'intéressant aux propriétés intrinsèques des neurones (Rybak et al. 1997a, 1997b, 1997c). Nous avons choisi de modéliser les neurones avec leurs propriétés intrinsèques ainsi que l'ensemble du réseau. L'originalité de cette étude est que le réseau modélisé est embryonnaire. De plus, il est composé d'un nombre limité de types neuronaux distincts. Il est donc relativement simple, et pourtant sans doute à l'origine de rythmes importants tel que la motricité et la respiration. Cette simplicité est peut être aussi un gage de robustesse.

L'objectif de cette étude est donc d'utiliser une approche de neurobiologie numérique pour la simulation des neurones biologiques (Huguenard et McCormick 1991, 1992 ; Vibert et al. 1995) afin de présenter un modèle du réseau de neurones à l'origine des rythmes chez l'embryon de poulet.

## ASPECTS BIOLOGIQUES

Le réseau étudié ici possède, *in vitro*, un unique mode de fonctionnement spontané : le mode rythmique. Ceci peut être observé *via* l'activité du nerf efférent à ce réseau, que nous avons représenté sur la figure 1. Elle se compose d'épisodes répétés à intervalle de temps régulier, chacun de ces épisodes étant composé de plusieurs bouffées de potentiels d'action.

Afin de discriminer les différents types de neurones présents dans ce réseau, trois niveaux d'observation ont été adoptés par le biologiste : morphologique, électrophysiologique et pharmacologique. L'observation morphologique des cellules du réseau a permis de distinguer deux types morphologiques distincts : les motoneurones (neurones projetant vers la périphérie) qui constituent la sortie du réseau, et les interneurones réticulaires projetant au sein du réseau. Dans les conditions *in vitro*, les fibres afférentes sont supprimées. Nous ne nous intéresserons qu'à la modélisation des interneurones réticulaires.

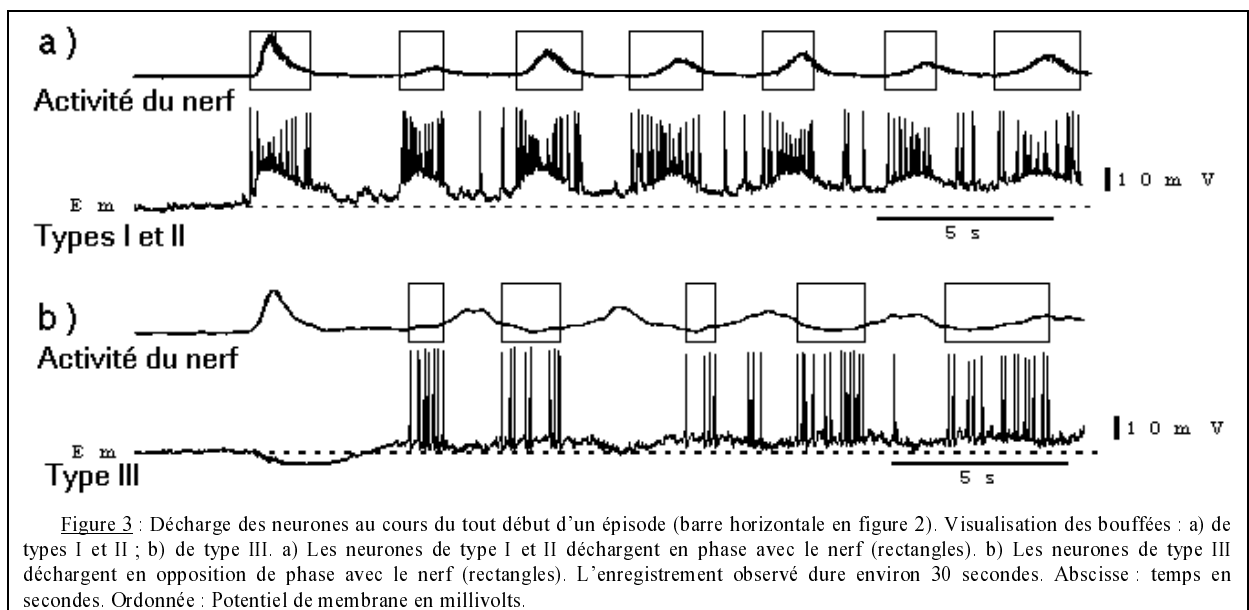
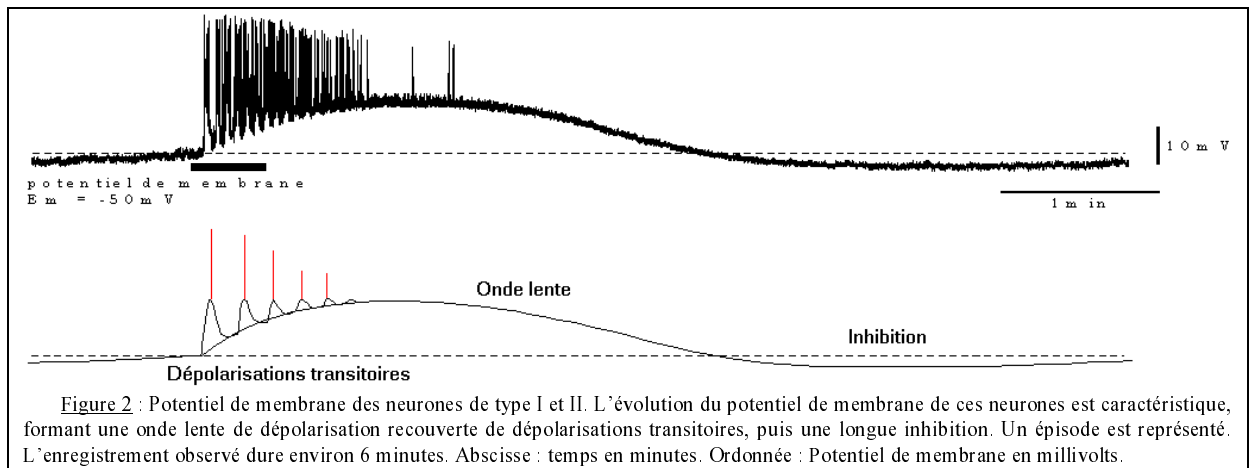
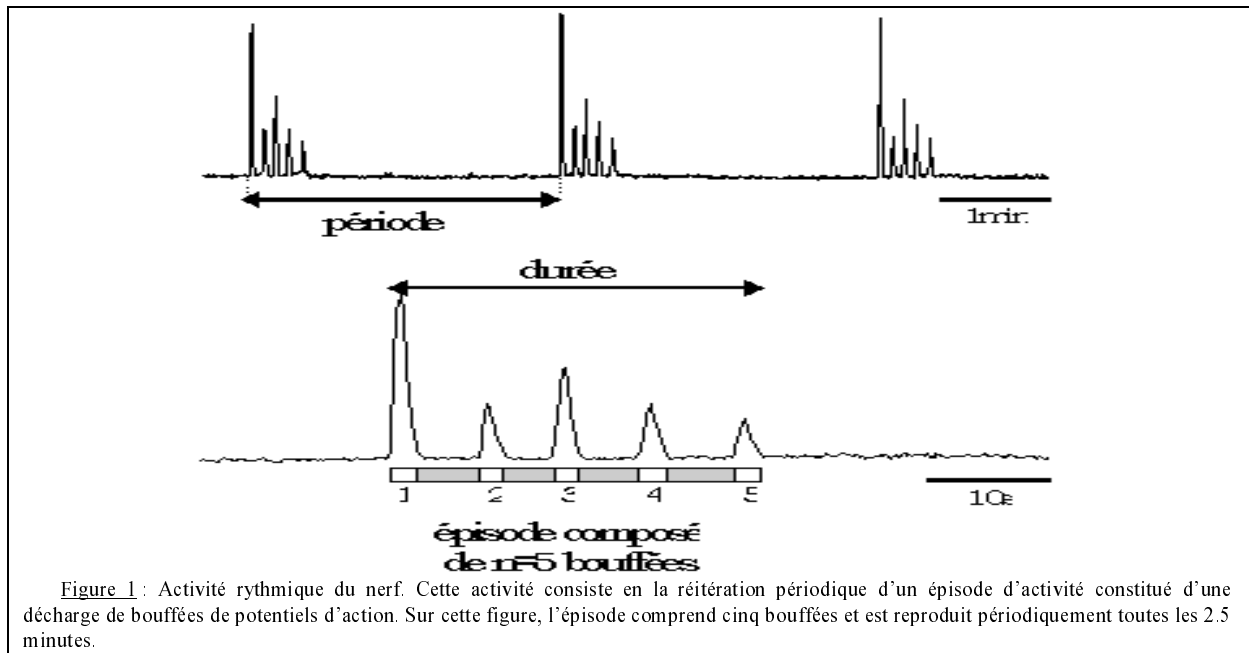
L'observation de l'activité électrophysiologique des cellules a conduit à distinguer deux sous-populations neuronales au sein du réseau, associées à deux modes de décharges distincts (voir infra). L'étude pharmacologique des activités synaptiques, enfin, a permis de caractériser trois types de connexions interneuronales entre les cellules du réseau. Il s'agit des systèmes GABA (inhibiteur), Glutamate (excitateur) et d'un système neuromodulateur.

Sur la base de ces résultats (deux types d'activité et trois types de synapses), Champagnat et Fortin (1997), LeMetayer (1996) ont proposé un modèle du réseau ainsi qu'un ensemble de mécanismes permettant d'expliquer l'activité globale observée. Ce modèle met en jeu trois types de neurones :

- 1- des neurones de type I se comportant, du point de vue de leur décharge (figure 3-a), comme des motoneurones (décharge en relation de phase avec celle des nerfs moteurs) et libérant un neurotransmetteur excitateur (Glutamate) ;
- 2- des neurones de type II en tous points comparables aux neurones de type I du point de vue de leur décharge (figure 3-a), mais libérant un neurotransmetteur inhibiteur (GABA) ;
- 3- des neurones de type III déchargeant en opposition de phase avec le nerf (figure 2-b) et susceptibles de libérer un neuromodulateur biphasique excitateur et inhibiteur (avec des délais d'activation différents). La neuromodulation excitatrice ( $Nm^+$ ) a un temps de montée de 5 secondes et un temps de descente de 30 secondes, alors que la neuromodulation inhibitrice ( $Nm^-$ ) est beaucoup plus longue, avec un temps de montée de 1 minute et un temps de descente de plus de 2 minutes.

Les neurones de type I et II ont les mêmes propriétés électrophysiologiques (figure 2) : au cours de chaque épisode, leur potentiel de membrane est décrit une onde de dépolarisation lente, sur laquelle se développent des dépolarisations transitoires de plus grandes amplitude (bouffées), surmontées de potentiels d'action. Les épisodes sont séparés par une longue inhibition. Le courant calcique à bas seuil  $I_{CaT}$  intervient dans ces neurones et participe à la genèse des bouffées. Les neurones de type III, particulièrement nombreux, présentent la caractéristique de se dépolariser à la suite d'une inhibition ; produisant ainsi des « rebonds post-inhibiteurs ». Les biologistes supposent que tous les neurones sont interconnectés, sauf les neurones de type II ayant pour cible spécifique les neurones de type III (voir *Matériels et Méthodes - Description du réseau*).

La modélisation est une des voies possibles vers la compréhension de l'évolution des comportements des réseaux de neurones au cours du développement de l'embryon de poulet. Pour cela, il est nécessaire de comprendre la genèse des rythmes observés *in vitro*, leur mode de fonctionnement, et éventuellement de déterminer les paramètres les plus sensibles dans cette activité.



## MATERIELS ET METHODES

Chacun des trois types neuronaux présentés précédemment a été modélisé par un model mono-compartimental, et est représenté par un système d'équations différentielles dérivé du formalisme d'Hodgkin et Huxley (1952). Nous allons tout d'abord brièvement rappeler ce formalisme ; ensuite, nous allons préciser les différents courants membranaires utilisés, puis définir le modèle du réseau.

### Modèle de Hodgkin et Huxley

Les neurobiologistes A. L. Hodgkin et A. F. Huxley ont proposé, en 1952, le premier modèle cinétique des mécanismes membranaires survenant au cours d'un potentiel d'action. Ce formalisme constitue, aujourd'hui encore, un paradigme pour la modélisation de l'activité électrique des neurones. La plupart des modèles à conductances en sont dérivés.

Le potentiel de membrane du neurone est déterminé, à chaque instant, par l'intensité de ses courants membranaires. Ceci se traduit par le formalisme suivant :

$$C_m \times \frac{dV}{dt} = - \sum I_{Intrinsèques} - \sum I_{Synaptiques}$$

Où  $V$  est le potentiel de membrane du neurone,  $C_m$  est la capacité spécifique de la membrane,  $\sum I_{Intrinsèques}$  et  $\sum I_{Synaptiques}$  la somme des intensités des courants transmembranaires intrinsèques et synaptiques, et  $t$  le temps.

L'intensité de chacun des courants ioniques est fonction (1) de l'ouverture des canaux membranaires spécifiques, (2) du potentiel d'équilibre des espèces ioniques représentées dans ce courant. L'expression générique de l'intensité d'un courant est dérivé de la loi d'Ohm, et est :

$$I = \bar{g} \times \Theta \times (V - E)$$

Où  $I$  est l'intensité du courant,  $\bar{g}$  une constante caractéristique de la cellule représentant sa conductance maximale pour le courant considéré, et  $E$  le potentiel de réversion de ce courant (c'est-à-dire la valeur vers laquelle le courant tend à stabiliser le potentiel de membrane).  $\Theta$  est un facteur variable, déterminé de façon non linéaire en fonction de  $V$ , et qui représente l'ouverture des canaux spécifiques au courant considéré.

Pour expliquer  $\Theta$ , Hodgkin et Huxley ont défini la notion de particule. Une particule est une molécule chargée ou polaire ayant une influence sur une membrane composée de molécules neutres. C'est la position de ces particules chargées qui permettrait ou empêcherait les ions de passer à travers le canal. La dépendance au temps et au potentiel est donc reliée à la cinétique de changement d'état de ces particules. On se limite ici à des cinétiques d'ordre 1.

Chaque canal est constitué de  $M$  particules activatrices et  $N$  particules inactivatrices.  $m$  représente la probabilité qu'une particule activatrice soit en état permissif, et  $h$  la probabilité qu'une particule inactivatrice soit « silencieuse » (et donc permette le passage du courant). Ces probabilités sont fonction du potentiel de membrane. C'est la variation initiale de celui-ci qui, en modifiant la perméabilité ionique va entraîner des variations secondaires de potentiel de membrane, et donc, parfois des potentiels d'action.

### Modèles des neurones

#### Neurones de type I

Le potentiel de membrane est déterminé à chaque instant par l'équation différentielle suivante :

$$C_m \times \frac{dV}{dt} = -I_{CaT} - I_{AHP} - (I_{Na} + I_K) - I_{NaL} - I_{NL} - I_{Nm+}^{III} - I_{Nm-}^{III} - I_{Glu}^I \quad (1)$$

Où  $V$  est le potentiel de membrane du neurone, et  $C_m$  la capacité spécifique de la membrane.  $I_{CaT}$  est le courant calcique à bas seuil (aussi appelé courant calcique transitoire) (Richter et al. 1993),  $I_{AHP}$  est un courant potassique dont l'activation dépend de la concentration intracellulaire en calcium (Mifflin et al. 1985 ; Wallenstein 1994),  $I_{Na}$  et  $I_K$  sont respectivement les courants sodique et potassique responsables des potentiels d'action rapides,  $I_{NaL}$  et  $I_{NL}$  sont les courants de fuite liés aux canaux sodiques et non-spécifique. Les courants  $I_{Nm+}^{III}$ ,  $I_{Nm-}^{III}$ , et  $I_{Glu}^I$  sont les différents courants synaptiques.  $I_{Nm+}^{III}$  et  $I_{Nm-}^{III}$  sont les courants synaptiques dépolarisant (+) et hyperpolarisant (-) résultant de la neuromodulation provoquée par les neurones de type III. Et  $I_{Glu}^I$  est le courant synaptique dépolarisant produit lors de la fixation de neurotransmetteur glutamate (émis lors des décharges des autres neurones de type I) sur les récepteurs AMPA.

Les neuromodulateurs modifient la perméabilité de la membrane de la cellule nerveuse cible d'une manière beaucoup plus durable que les neurotransmetteurs classiques (Glutamate, GABA,...) (McCormick 1992).

## Neurones de type II

Les courants membranaires présents dans les neurones de types II sont du même type que ceux des neurones de type I. Le potentiel de membrane des neurones de type II est donc régis par une équation identique à (1).

Pour les neurones de type I et II, il est nécessaire de calculer la concentration intracellulaire en calcium (car l'intensité du courant  $I_{AHP}$  dépend de cette valeur). Un modèle de la gestion intracellulaire de calcium (dérivé de Wallenstein 1994) a donc été rajouté dans les neurones de type I et II.

## Neurones de type III

Le potentiel de membrane est déterminé à chaque instant par l'équation différentielle suivante :

$$C_m \times \frac{dV}{dt} = -I_{CaT} - (I_{Na} + I_K) - I_{NL} - I_{Nm+}^{III} - I_{Nm-}^{III} - I_{Glu}^I - I_{GABA}^{II} \quad (2)$$

Où  $V$  est le potentiel de membrane du neurone, et  $C_m$  la capacité spécifique de la membrane.  $I_{CaT}$  est le courant calcique à bas seuil,  $I_{Na}$  et  $I_K$  sont respectivement les courants sodique et potassique responsables des potentiels d'action rapides, et  $I_{NL}$  est le courant de fuite non-spécifique. Les courants  $I_{Nm+}^{III}$ ,  $I_{Nm-}^{III}$ ,  $I_{Glu}^I$ , et  $I_{GABA}^{II}$  sont les différents courants synaptiques.  $I_{Nm+}^{III}$  et  $I_{Nm-}^{III}$  sont les courants synaptiques dépolarisant (+) et hyperpolarisant (-) résultant de l'interconnexion des neurones de type III.  $I_{Glu}^I$  est le courant synaptique produit lors de la fixation de neurotransmetteur glutamate (émis lors des décharges des autres neurones de type I) sur les récepteurs AMPA, et  $I_{GABA}^{II}$  est le courant synaptique hyperpolarisant produit lors de la fixation de neurotransmetteur GABA (émis lors des décharges des neurones de type II).

Chacun des courants précédents a donc été modélisé par :

$$I_i = \bar{g}_i \times m_i^M(V,t) \times h_i^N(V,t) \times (V - E_i)$$

avec :

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{m_{\infty_i}(V) - m_i}{\tau_{m_i}(V)}$$

$$\frac{dh_i}{dt} = \frac{h_{\infty_i}(V) - h_i}{\tau_{h_i}(V)}$$

Où  $\bar{g}_i$  est la conductance maximale du courant  $I_i$  ;  $m_i$  et  $h_i$  sont les variables représentant respectivement les particules d'activation et d'inactivation.  $E_i$  représente le potentiel de réversion (valeur vers laquelle le courant tend à stabiliser le potentiel de membrane) de l'ion  $i$ .  $E_{CaT}$  est calculé à partir de l'équation de Nernst. Les autres potentiels de réversion sont des données issues de la littérature (LeMetayer 1996 ; Hammond et Trisch 1990).

Les phénomènes mis en jeu dans cette étude sont très lents. Les dépolarisations transitoires observées dans les potentiels de membrane des neurones de type I et II durent environ 10 s, et sont recouvertes de potentiels d'action sodiques embryonnaires durant 10 ms chacun. Nous nous sommes alors demandés s'il était nécessaire de modéliser ces courants rapides (sodique et potassique). Il a été prouvé (Golomb et al. 1996) que, dans certains cas, la modélisation des potentiels d'action sodiques n'était pas nécessaire, et que les caractéristiques biologiquement observées étaient obtenues par simulation du modèle sans incorporer ces courants rapides. Nous avons donc effectué des simulations avec, puis sans les courants sodique et potassique. Les résultats nous ont permis de vérifier que ces courants rapides n'intervenaient pas dans les différentes caractéristiques observées *in vitro*. Nos modèles de neurone ont donc été simplifiés. Dans le reste de ce rapport, les courants sodique et potassique rapides ne seront donc pas modélisés.

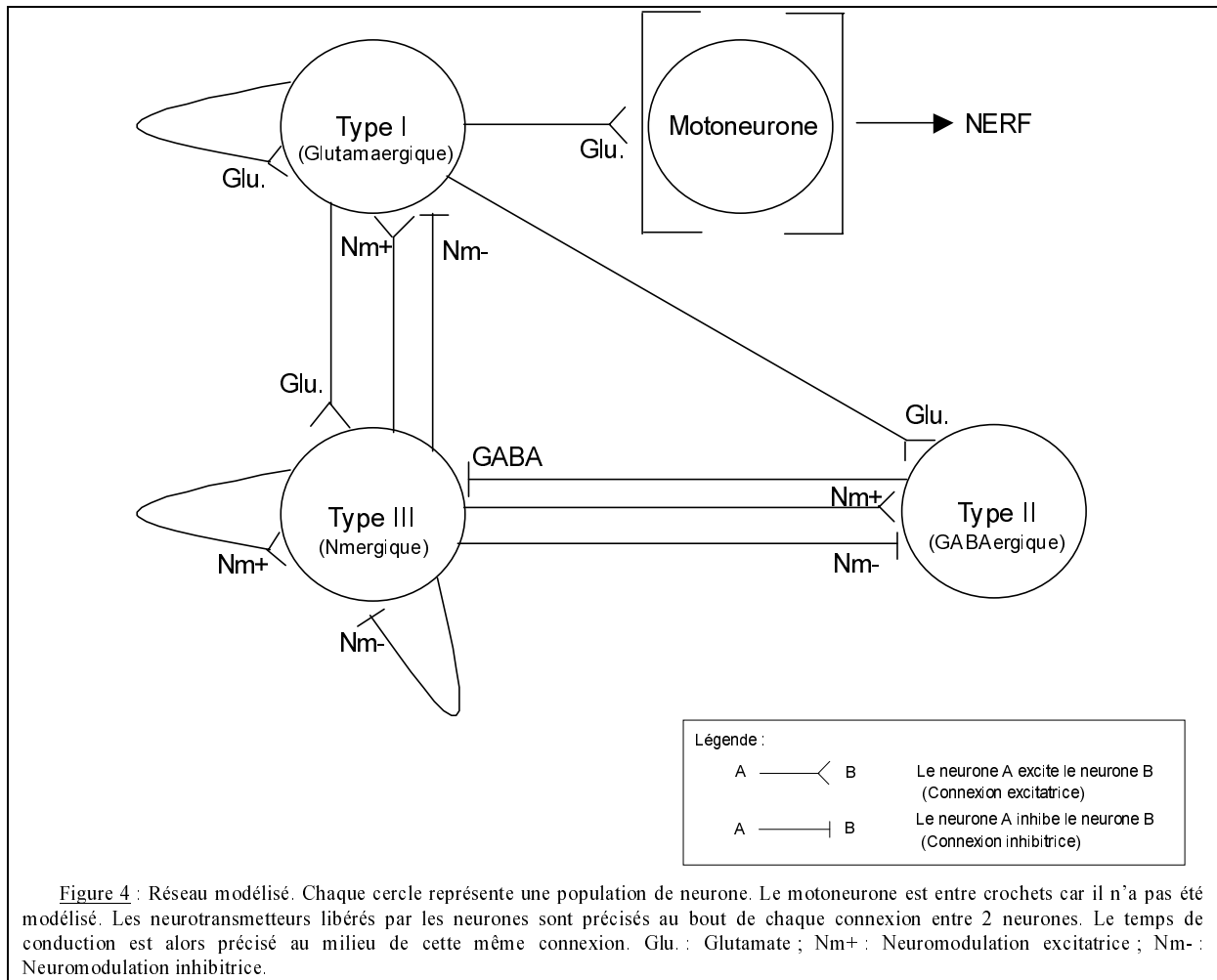
Le problème de la transmission synaptique s'est alors posé : comment effectuer le largage des neurotransmetteurs sans potentiels d'action ? La décharge des neurones se fera lorsque le potentiel de membrane dépassera un seuil. Nous avons déterminé un seuil fixe, commun aux trois types neuronaux égal à  $-36$  mV. C'est lorsque ce seuil est dépassé que les neurotransmetteurs sont libérés au bout de l'axone de cette cellule avec un temps de conduction variant selon la cellule.

De nombreux modèles de transmission synaptique ont été développés (Golomb et al. 1996 ; Destexhe et al. 1993 ; Rybak et al. 1997a). Nous avons choisi de nous inspirer du modèle utilisé dans le logiciel XNBC (Vibert et al. 1994 ; Vibert et al. 1997) pour son efficacité et sa simplicité. Il consiste à décrire la proportion de canaux synaptiques ouverts au cours du temps par des fonctions alpha modifiées.

Les modèles de bruit utilisés par la suite sont (1) un bruit Gaussien d'écart-type  $\sigma \leq 5$ , (2) un bruit coloré d'écart-type  $\sigma \leq 5$  proposé par Kohn (1997).

## Description du réseau

Le réseau simulé est composé de 20 neurones répartis de la manière suivante : 5 neurones de type I, 5 neurones de type II, et 10 neurones de type III. Il est schématisé dans la figure 4.



## Implémentation

L'utilisation du logiciel XNBC, dont le module G\_Neuron permet de définir des modèles à conductances de neurones, nous a permis d'obtenir nos premiers résultats. Cependant, il nous est parut nécessaire de modifier certains modèles (gestion du calcium intracellulaire, courants de fuites multiples, etc...). Le logiciel XNBC ne permettant pas encore ces modifications, un programme spécifique a été développé. Les modèles développés à cette occasion seront inclus dans la prochaine version de XNBC.

Les équations du modèle ont été intégrées en utilisant une méthode proposée par MacGregor (1987) avec un pas de 0.5 ms. Les résultats ont été validés par la méthode d'Euler avec un pas de 0.01 ms. Les programmes ont été écrits en Langage C ANSI et compilés sur Digital Unix. Ils ont été exécutés sur Alpha Station 600 5/266 (Digital Unix 3.2). Une simulation de N=20 neurones durant 80 secondes simulées (sans l'implémentation des potentiels d'action sodique et potassique rapides) avec la méthode proposée par MacGregor dure 10 minutes.



## RESULTATS

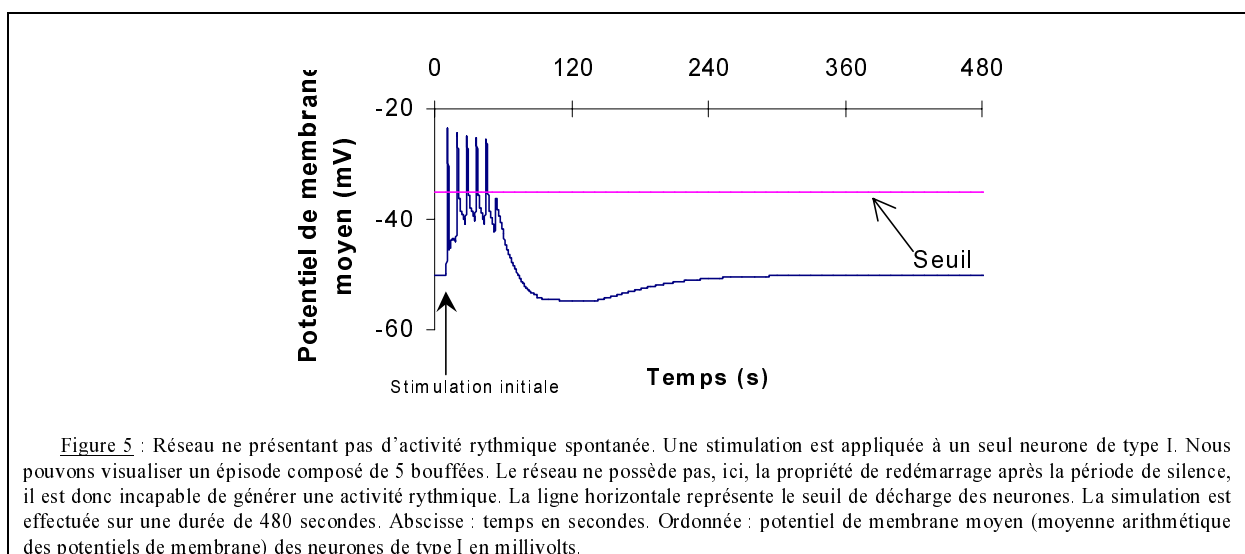
### Comportement du réseau

Un réseau minimum constitué d'un neurone de chaque type, en suivant le mode de connexion décrit dans la figure 4, a été simulé. En l'absence de stimulation extérieure, le réseau reste silencieux. Lorsqu'une stimulation est appliquée au neurone de type I, une activité de réseau est obtenue. Celle-ci consiste en un épisode composé de plusieurs bouffées.

Un réseau de N neurones constitué de neurones de type I (resp. II et III) dans les proportions  $\frac{1}{4}$  (resp.  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{1}{2}$ ) ne montre pas non plus d'activité en l'absence de stimulation extérieure. La stimulation de l'ensemble de la population des neurones de type I permet d'obtenir un épisode. La figure 5 montre que la stimulation initiale d'un unique neurone de type I est même suffisante pour générer un épisode. Cette stimulation unitaire permet l'activation de l'ensemble du réseau par le biais des connexions excitatrices émises par les neurones de type I. L'activité du réseau n'est cependant pas auto-entretenu : il n'y a plus d'activité après l'épisode initial. Ce réseau ne possède donc pas la propriété de démarrage spontané des épisodes.

L'ajout de bruit synaptique (bruit gaussien d'écart-type  $\leq 5$  ou bruit coloré de même écart-type) sur la population des neurones de type I ne permet pas le démarrage spontané de l'activité. En revanche, une modification de la zone d'activation du courant calcique pour une partie des neurones de type I permet la production d'une activité spontanée du réseau. Nous appellerons dans la suite ces neurones modifiés « type  $I_M$  ». L'ajout d'un seul neurone de type  $I_M$  permet, en l'absence de toute stimulation extérieure, la genèse d'un épisode et l'entretien de l'activité rythmique du réseau. La figure 6 décrit l'activité d'un tel réseau sur 480 secondes : l'épisode initial est suivi d'un épisode similaire après un temps de silence du réseau. Les potentiels de membrane moyens des neurones de type I,  $I_M$  et II sont présentés dans la figure 6-a et ceux des neurones de type III dans la figure 6-b. Les neurones de type I,  $I_M$  et II présentent une onde lente de dépolarisation recouverte de plusieurs dépolarisations transitoires sur lesquels se greffent des potentiels d'actions (non représentés ici). Les neurones de type III sont le siège de rebonds post-inhibiteurs. Les décharges des neurones de type III sont en opposition de phase avec les décharges des neurones de type I,  $I_M$  et II.

Isolément, les neurones de type  $I_M$  présentent une activité de type pacemaker : ils déchargent spontanément, et de manière régulière sans stimulation extérieure (figure 7). Cependant, lorsqu'ils sont connectés au sein du réseau, et subissent alors les mêmes influences que tous les neurones de type I, ces neurones n'expriment plus cette activité pacemaker : ils connaissent une période de silence déterminée par la neuromodulation, et décrivent une activité rythmique (l'épisode) dont la fréquence n'est pas leur fréquence propre.



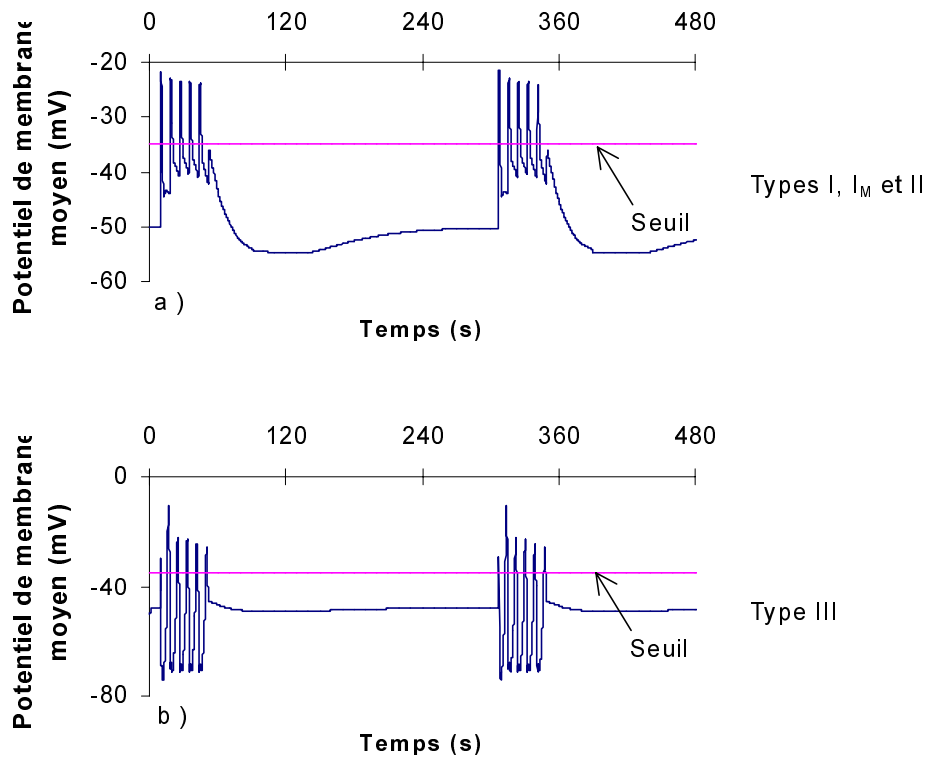


Figure 6 : Evolution des potentiels de membrane moyens au cours du temps. a) Neurones de type I, I<sub>M</sub> et II. L'onde lente est présente, recouverte de dépolarisations transitoires, et suivie d'une inhibition. b) Neurones de type III. On peut visualiser une suite de rebonds post-inhibiteurs, suivie par une inhibition. Ces figures sont le résultat d'une simulation de 500 secondes mettant en évidence 2 épisodes composés de 5 bouffées chacun, et séparés de 4 min environ. La ligne horizontale représente le seuil de décharge des neurones. Abscisse : temps en secondes. Ordonnée : potentiel de membrane moyen en millivolts.

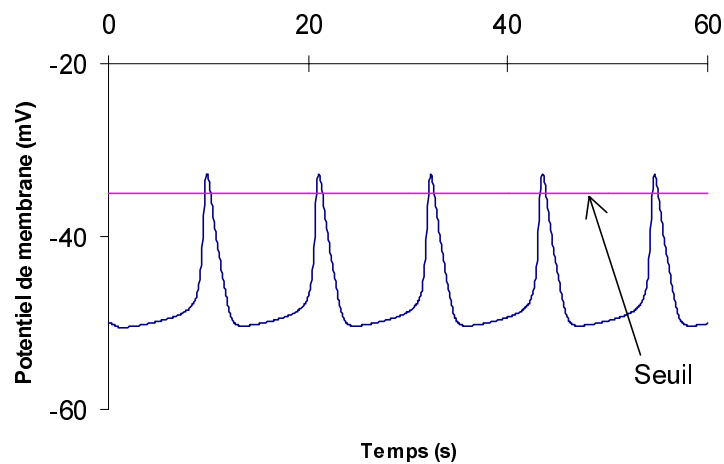


Figure 7 : Activité de type pacemaker d'un neurone de type I<sub>M</sub> observé hors réseau. La ligne horizontale représente le seuil de décharge. Simulation d'une durée de 60 secondes. Abscisse : temps en secondes. Ordonnée : potentiel de membrane d'un neurone de type I<sub>M</sub>, en millivolts.

## Analyse du réseau à activité rythmique auto-entretenu

L'analyse de l'activité rythmique du réseau passe par l'étude des trois phases qui la composent : (1) la genèse des bouffées responsable de l'activité du nerf ; (2) l'arrêt de l'épisode et (3) la période de silence.

### *Genèse des bouffées*

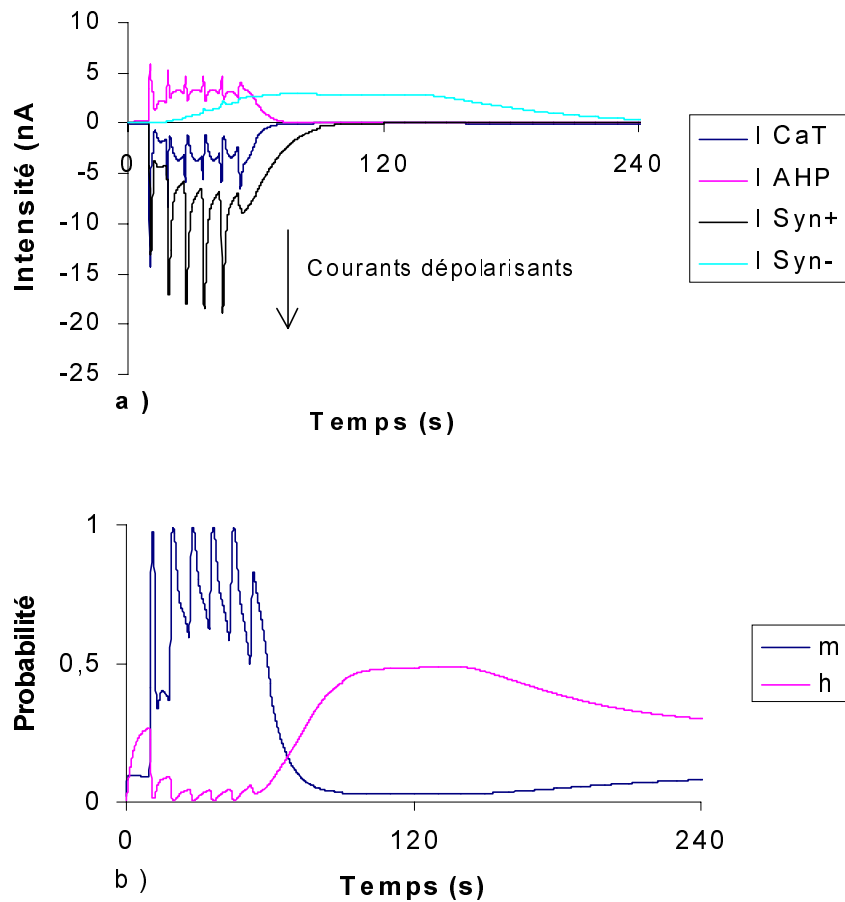
Les bouffées sont produites par les neurones de type I,  $I_M$  et II. La neuromodulation générée par les neurones de type III dépolarise lentement les neurones de type I,  $I_M$  et II (figure 8-a). Cette dépolarisation entraîne une activation des canaux calciques  $I_{CaT}$ , comme détaillé en figure 8-b, et donc une entrée massive de calcium dans la cellule. La dépolarisation résultante entraîne le potentiel de membrane jusqu'au seuil de libération des neurotransmetteurs. L'activité est alors transmise *via* les synapses. Suite à une bouffée, la repolarisation de la membrane est assurée par le courant potassique calcium-dépendant  $I_{AHP}$ . Durant la repolarisation, les neurones de type III présentent un rebond post-inhibiteur suite à l'inhibition GABA, et déchargent en libérant un neuromodulateur biphasique. L'épisode s'arrête dans nos simulations après un nombre limité de bouffées.

### *Arrêt de l'épisode*

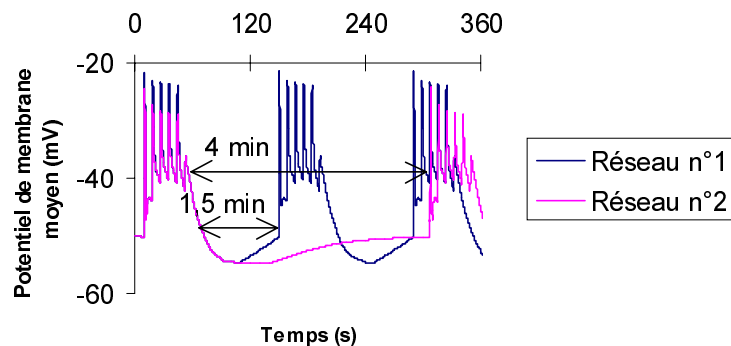
L'épisode cesse lorsque le réseau n'est plus en condition de produire une nouvelle bouffée. La production d'une bouffée résulte, comme dit plus haut, de l'intervention synergique de la neuromodulation excitatrice et de l'activation du courant calcique. L'arrêt de l'épisode va résulter, (1) de l'inhibition lente et persistante provenant des neurones de type III qui s'oppose à la neuromodulation excitatrice et diminue ainsi l'amplitude d'une éventuelle bouffée, (2) de l'inactivation du courant calcique, comme décrit en figure 8-b. La fin de l'épisode est marquée par une dernière dépolarisation, de faible amplitude, qui n'atteint pas le seuil de décharge du neurone.

### *Période de silence du réseau*

La figure 9 montre l'effet de la constante de temps de la neuromodulation inhibitrice. La comparaison de deux simulations effectuées à partir de réseaux ayant des constantes de temps différentes pour la neuromodulation inhibitrice montre que cette constante peut déterminer de façon critique la durée de la période de silence entre les épisodes. Ce résultat suggère que la période de silence résulte de l'inhibition de l'ensemble du réseau par la neuromodulation générée par les neurones de type III. Celle-ci se traduit par un courant inhibiteur persistant, comme on l'observe sur la figure 8-a. Cette longue neuromodulation permet au réseau de dispenser une activité rythmique sur les motoneurones, et donc sur le nerf.



**Figure 8 :** Mécanisme de la genèse des bouffées. Simulation d'une durée de 240 secondes. a) Principaux courants mis en jeu dans les neurones de type I. Le courant synaptique excitateur est relativement important, et permet l'activation du courant calcique ; le courant potassique calcium-dépendant permet de repolariser la membrane suite à l'entrée massive du calcium dans le milieu intracellulaire ; le courant synaptique inhibiteur ne cesse d'augmenter, intervenant dans le déroulement de l'épisode. b) Particules d'activation  $m$  et d'inactivation  $h$  du courant calcique dans les neurones de type I. Ces courbes des particules d'activation et d'inactivation du courant calcique sont caractéristiques : dans un premier temps, le courant s'active ( $m$  est maximum) ; puis la membrane se dépolarise, atteignant le seuil d'inactivation du courant ( $h$  est maximum).  $I_{CaT}$  : courant calcique à bas seuil ;  $I_{AHP}$  : courant potassique calcium dépendant ;  $I_{Syn+}$  : courant synaptique dépolarisant (somme des courants synaptiques excitateurs) ;  $I_{Syn-}$  : courant synaptique hyperpolarisant (somme des courants synaptiques inhibiteurs).  $m$  : particule d'activation du courant calcique ;  $h$  : particule d'inactivation du courant calcique. a) Abscisse : temps en secondes. Ordonnée : intensité en nano-ampères. b) Abscisse : temps en secondes. Ordonnée : probabilité que la particule ( $m$  ou  $h$ ) soit à l'état permissif.



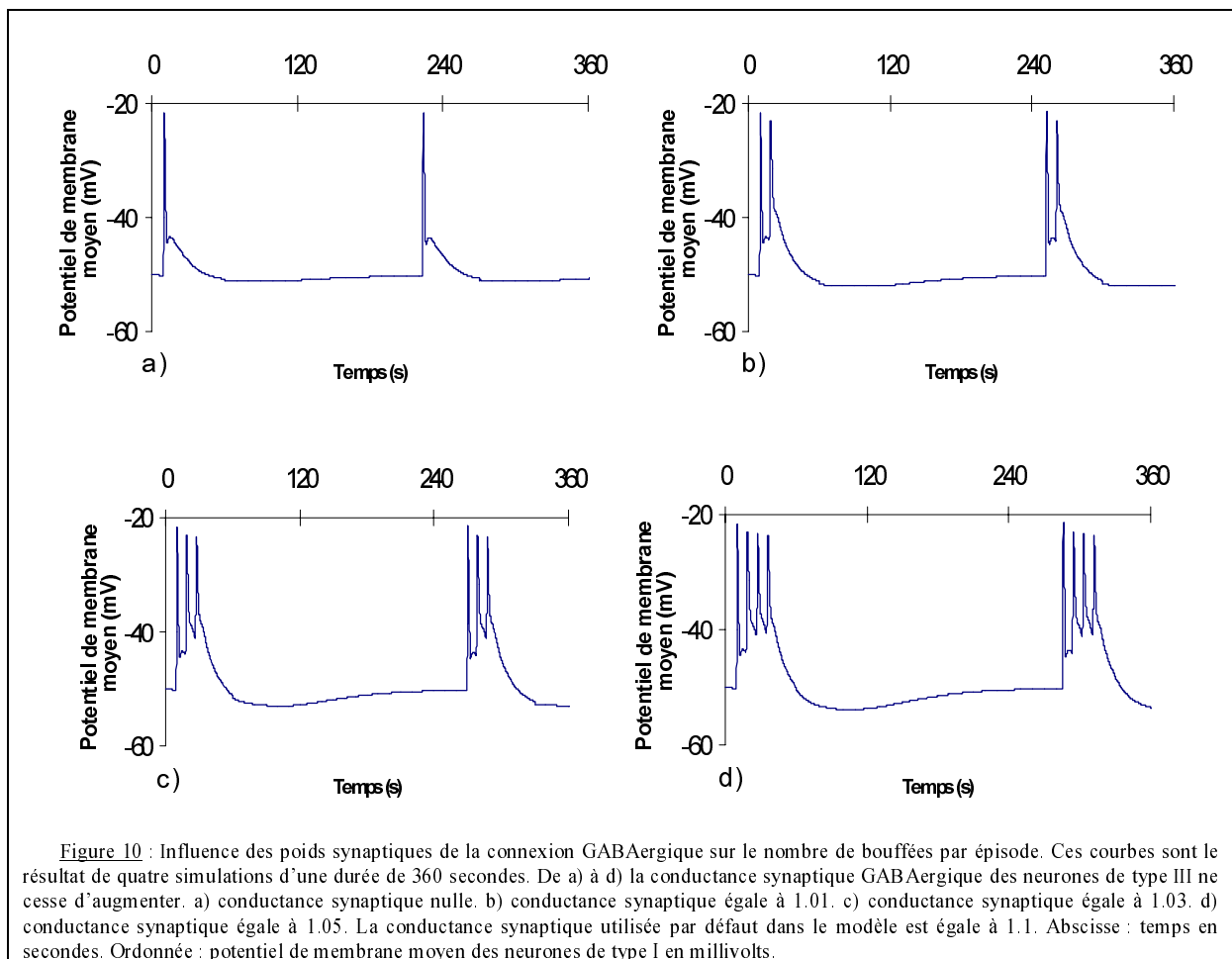
**Figure 9 :** Comparaison de deux réseaux. Les constantes de temps de la neuromodulation inhibitrice, générée par les neurones de type III de ces deux réseaux sont différentes. Le temps de descente de cette neuromodulation est beaucoup plus important dans le réseau n°2. La simulation dure 360 secondes. La courbe relative au réseau n°1 est composée de 3 épisodes de 5 bouffées chacun ; alors que la courbe relative au réseau n°2 n'est composée que de 2 épisodes de 5 bouffées. Le nombre d'épisode est moins important dans le réseau ayant la constante de temps la plus élevée. La durée de la neuromodulation inhibitrice est donc un paramètre sensible dans la détermination de la période inter-épisode. Abscisse : temps en secondes. Ordonnée : potentiel de membrane moyen des neurones de type I,  $I_M$  et II en millivolts.

## Etude du nombre de bouffées par épisode

Le courant synaptique résultant de la fixation de GABA dans les neurones de type III joue un rôle important dans la détermination du nombre de bouffées par épisode. La figure 10 montre l'activité d'un réseau pour quatre valeurs du poids synaptique de la connexion GABA. Lorsque ce poids synaptique est nul (ce qui revient à supprimer la connexion GABA), l'épisode est avorté et ne comporte qu'une seule bouffée. Une augmentation du poids synaptique s'accompagne d'une augmentation régulière du nombre de bouffées. Il existe cependant une valeur seuil du poids synaptique, pour laquelle le nombre de bouffées est maximal.

Ceci peut être expliqué de la manière suivante. La forme du rebond post-inhibiteur des neurones de type III dépend (1) de la connexion inhibitrice GABAergique des neurones de type II vers ceux de type III et (2) de l'interconnexion des neurones de type III. Cette interconnexion est excitatrice et inhibitrice, elle rend donc la membrane moins sensible aux stimulations extérieures, et en particulier aux hyperpolarisations dues au GABA libéré par les neurones de type II. L'amplitude du rebond post-inhibiteur suivant est, par conséquent, plus faible. Si ce rebond dépasse le seuil de décharge de ces neurones alors le neuromodulateur excitateur est libéré et peut éventuellement produire une nouvelle bouffée dans les neurones de type I,  $I_M$  et II (voir *Arrêt de l'épisode*) ; sinon, l'épisode s'arrête.

Le nombre de bouffées par épisode est donc directement lié au nombre de rebonds post-inhibiteurs dans les neurones de type III. La durée inter-épisode est dépendante de la neuromodulation inhibitrice : plus le nombre de décharge des neurones de type III est important, plus la neuromodulation dure, et plus la fréquence des épisodes est faible. L'augmentation du nombre de bouffées par épisode serait donc due à une augmentation de la densité des connexions GABAergiques entre les neurones de type II et III.



## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons défini, puis analysé un modèle du réseau à l'origine des rythmes chez l'embryon de poulet. Afin de répondre aux besoins des biologistes, ce modèle a été conçu dans un souci de « parcimonie » : n'y ont été inclus que les types cellulaires et les connexions nécessaires pour reproduire l'activité rythmique observée *in vitro*. Nos résultats montrent que, conformément au schéma proposé par le biologiste, l'interaction de trois types de neurones (I, II et III), *via* trois types de connexions distincts, permet de rendre compte de cette activité. Nous avons cependant été conduits à émettre plusieurs hypothèses concernant les propriétés intrinsèques des neurones.

L'une des principales propriétés dont nous avons eu à rendre compte est le démarrage spontané des épisodes. Les résultats expérimentaux indiquent que ce démarrage est initié dans les neurones de type I. Plus précisément seule une petite partie de ces neurones présente une activité spontanée, laquelle se propage ensuite à l'ensemble des neurones de type I puis à la totalité du réseau, *via* les connexions excitatrices glutamaergiques. Des données de la littérature biologique et de modélisation indiquent que l'existence d'un bruit synaptique au sein d'un réseau de neurones peut induire l'apparition d'une activité spontanée dans ce réseau (Pham et al. 1998a-b). Nos résultats montrent que le bruit seul ne suffit pas à produire une activité spontanée dans ce type de réseau lorsque la population des neurones de type I est homogène. Nous avons introduit une hétérogénéité dans la population des neurones de type I. L'ajout de neurones de type  $I_M$  dans le réseau initialement décrit permet d'obtenir une activité rythmique auto-entretenu. L'expérimentation n'a jusqu'à présent pas enregistré de neurones ayant une activité spontanée dans le tronc cérébral de l'embryon de poulet (Champagnat et Fortin 1997). Cependant, les simulations montrent que ces neurones, une fois connectés en réseau, sont indiscernables des autres. Leur détection serait donc difficile, d'autant plus qu'un petit nombre est suffisant pour donner la propriété de redémarrage.

Nous avons émis une hypothèse relative aux courants mis en jeu. Il a été nécessaire de rajouter un courant potassique dans les neurones de type I,  $I_M$  et II afin de repolariser leur membrane. Nous avons ajouté le courant potassique calcium-dépendant. Bien que non encore validé expérimentalement car non recherché, ce courant a déjà été envisagé dans les neurones respiratoires adultes (Mifflin et al. 1985). De plus, le courant calcique est très important dans ces types neuronaux, et joue de nombreux rôles (en particulier dans la genèse des bouffées). Il est donc raisonnable de supposer qu'un courant potassique dépendant de la concentration intracellulaire en calcium intervienne dans les neurones de type I,  $I_M$  et II.

L'expérimentation a prouvé que la suppression des connexions GABAergiques entraînait une modification des épisodes, qui n'était alors plus composé que d'une bouffée. Notre modèle permet de rendre compte de cette observation (figure 10-a). De plus, la modification du poids synaptique de la connexion GABAergique dans notre modèle, montre une augmentation régulière du nombre de bouffées par épisode (figure 10-b, c, d). Cette modification de l'activité a aussi été observée dans le réseau biologique au cours de l'embryogenèse du poulet. Il semble donc que la modification des connexions (qui sont renforcées ou détruites) soit une des caractéristiques importante de l'embryogenèse.

Les résultats obtenus par simulation correspondent aux observations biologiques. Ils nous ont donc permis d'émettre des hypothèses relatives aux mécanismes mis en jeu dans les différentes phases de l'activité. Cependant, notre modèle ne permet pas de rendre compte de tous les phénomènes observés *in vitro*. Lors de l'évolution embryonnaire, l'activité du réseau se développe. Au cours de ce développement, le nombre de bouffées par épisode augmente, ainsi que la période inter-épisode (figures 9 et 10), mais les enregistrements électrophysiologiques montrent aussi une diminution conjointe de la durée bouffée, non observées dans les simulations. Il semblerait que cette différence soit due à la manière dont la neuromodulation (McCormick 1992) a été modélisée, probablement trop simplement du fait des données biologiques non encore disponibles.

La validation du modèle est réalisée par la comparaison qualitative entre le comportement du réseau et les observations biologiques. Cependant, les enregistrements électrophysiologiques, réalisés *in vitro*, portent sur le comportement d'un réseau et non sur des neurones isolés. Pourtant, la modélisation nécessite la description individuelle des neurones, et la validité des paramètres choisis ne peut être ici vérifiée que par l'observation du comportement global du réseau.

## CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons modélisé, puis analysé le réseau de neurones à l'origine des rythmes chez l'embryon de poulet. Nous avons pu confirmer certaines hypothèses relatives au fonctionnement du réseau et de son activité rythmique. L'analyse des simulations effectuées à partir du modèle développé nous ont apporté les informations suivantes.

Le réseau le plus parcimonieux est composé de trois types neuronaux. Ceci est nécessaire et suffisant pour décrire les activités rythmiques observées. De plus, la contribution de chacun de ces types neuronaux à la genèse de l'activité est établie, et la connectivité proposée pour le réseau a été validée. Néanmoins, il a fallu adjoindre aux modèles des modifications non prévus lors de l'analyse préliminaire.

L'activité du réseau est mieux comprise grâce à la mise en avant des différents courants qui en sont responsables. En particulier, le courant calcique qui est fortement présent dans chacun des trois types neuronaux puisqu'il joue un rôle important dans la genèse des bouffées émises par les neurones de type I, I<sub>M</sub> et II (donc dans l'activité rythmique), et qu'il est responsable des rebonds post-inhibiteurs dans les neurones de type III. Il faut noter que le courant potassique activé par le calcium est nécessaire dans les neurones de type I, I<sub>M</sub> et II pour la genèse des bouffées. De plus, tous les courants synaptiques interviennent dans les différentes composantes de l'activité rythmique.

Le caractère rythmogène ne repose pas sur l'intégralité du tronc cérébral. Au contraire, ce caractère est réitéré de l'avant à l'arrière du tronc cérébral au sein de segments (isolables chirurgicalement), en correspondance avec les noyaux contenant les différentes populations de motoneurones ; donc, en correspondance avec les sorties du réseau. Nous nous sommes intéressés, au cours de cette étude, à la modélisation d'un de ces segments. Les différents segments génèrent des activités rythmiques distinctes lorsqu'ils sont isolés les uns des autres. Une intégration de ces différentes activités est normalement effectuée par le biais des neurones réticulaires, qui relient ces différents étages. Ceci conduit à une activité rythmique globale, commune à tous. Le travail futur va consister à interconnecter huit réseaux identiques à celui étudié dans ce rapport, à valider ces connexions, puis à modifier certains paramètres afin de mieux comprendre la façon dont s'opère la spécialisation des propriétés rythmogènes dans le tronc cérébral au cours de l'embryogenèse. L'objectif est donc d'étudier l'évolution de ce réseau primordial afin de déterminer les causes susceptibles d'altérer le fonctionnement de l'appareil respiratoire chez l'adulte.

## Références bibliographiques :

- Adrian, E. D. and Buyendijk, F. J. J. (1931). Potential changes in the isolated brainstem of goldfish. *J. Physiol.*, 71:121-135.
- Balis, U. J., Morris, K. F., Koleski, J. and Lindsey, B. G. (1994). Simulations of a ventrolateral medullary neural network for respiratory rhythmogenesis inferred spike train cross-correlation. *Biol. Cybern.*, 70:311-327.
- Bertrand, F., Hugelin, A. and Vibert, J.-F. (1973). Quantitative study of anatomical distribution of respiration related neurons in the pons. *Exp. Brain Res.*, 16:383-399.
- Bertrand, F., Hugelin, A. and Vibert, J.-F. (1974). A stereologic model of pneumotaxic oscillator based on spatial and temporal distribution of neuronal bursts. *J. Neurophysiol.*, 37:91-107.
- Botros, S. M. and Bruce, E. N. (1990). Neural network implementation of the three-phase model of respiratory rhythm generation. *Biol. Cybern.*, 63:143-153.
- Caille, D., Vibert, J.-F., Bertrand, F., Gromysz, H. and Hugelin, A. (1979). Pentobarbitone effects on respiration related units ; selective depression of bulbopontine reticular neurones. *Respir. Physiol.*, 36:201-216.
- Caille, D., Vibert, J.-F. and Hugelin, A. (1981). Apneusis and apnea after parabrachial or Kolliker Fuse N. lesion ; influence of wakefulness. *Respir. Physiol.*, 45:79-95.
- Champagnat, J and Fortin, G. (1997). Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. *Trends Neurosci.*, 20:119-124.

- Champagnat, J. and Richter, D. W. (1994). The roles of K conductance in expiratory pattern generation in anaesthetized cats. *J. Physiol. Lond.*, 479:127-138.
- Destexhe, A., McCormick, D. A. and Sejnowski, T. J. (1993). A model for 8-10 Hz spindling in interconnected thalamic relay and reticularis neurons. *Biophys. J.*, 65:2473-2477.
- DeVries, J. I. P., Visser, G. H. A. and Prechtl, H. F. R. (1982). The emergence of behavior. I. Qualitative aspects. *Early Hum. Dev.*, 7:301-322.
- Duffin, J. (1991). A model of respiratory rhythm generation. *NeuroReport*, 2:623-626.
- Feldman, J. L. and Cleland, C. L. (1982). Possible roles of pacemaker neurons in mammalian respiratory rhythmogenesis. In : *Cellular Pacemakers*, edited by D. O. Carpenter. New-York : Wiley, vol. 2, p. 101-119.
- Fortin, G., Champagnat, J. and Lumsden, A. (1994). Onset and maturation of branchiomotor activities in the chick hindbrain. *NeuroReport*, 5:1149-1152.
- Fortin, G., Kato, F., Lumsden, A. and Champagnat, J. (1995). Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. *J. Physiol.*, 486:735-744.
- Golomb, D., Wang, X. J. and Rinzel, J. (1996). Propagation of spindle waves in a thalamic slice model. *J. Neurophysiol.*, 75:750-769.
- Hammond, C. and Trish, D. (1990). *Neurobiologie Cellulaire*. Doin, Paris, France.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. Lond.*, 117:500-544.
- Huguenard, J. R. and McCormick, D. A. (1991). *Vclamp and Cclamp. A computational simulation of single thalamic relay and cortical pyramidal neurons. Neural simulation instruction manual*. Stanford, CA : Stanford Univ.
- Huguenard, J. R. and McCormick, D. A. (1992). Simulation of the currents involved in rhythm oscillations in thalamic relay neurons. *J. Neurophysiol.*, 68:1373-1383.
- Jansen, A. H. and Chernick, V. (1983). Development of respiratory control. *Physiological Reviews*, 63:437-483.
- Kohn, F. (1997). Computer simulation of noise resulting from random synaptic activities. *Comput. Biol. Med.*, 27:293-308.
- LeMetayer, A. (1996). Activité rythmique primordiale dans le tronc cérébral isolé embryonnaire de poulet. *Rapport de DEA de Neurosciences*. Fr, 22 p.
- Lumsden, T. (1923). Observations on the respiratory centers in the cat. *J. Physiol. Lond.*, 57:153-160.
- MacGregor, R. J. (1987). *Neural and Brain Modeling*. Academic Press, San Diego.
- McCormick, D.A. (1992). Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. *Prog. Neurobiol. (Oxford)*, 39:337-388.
- Mifflin, S., Ballantyne, D., Backman, S. and Richter, D. W. (1985). Evidence for a calcium-activated potassium conductance in medullary respiratory neurons. In : *Neurogenesis of Central Respiratory Rhythm*, edited by A. M. Bianchi and M. Denavit-Saubié. Lancaster, UK : MTP, p. 179-182.
- Pham, J., Pakdaman, K., Champagnat, J. and Vibert, J.-F. (1998a). Spontaneous Activity in Sparsely Connected Excitatory Neural Networks: Effect of Connectivity. *Neural Networks*, 11:415-434
- Pham, J., Pakdaman, K. and Vibert, J.-F. (1997). Simulation of spontaneous activity generation in an excitatory network involved in the control of the respiratory rhythm. In : *Computational Neurosciences: Trends in Research*, edited by J. Bower. New-York : Plenum, p. 455-461.
- Pham, J., Pakdaman, K. and Vibert, J.-F. (1998b). Noise-induced coherent oscillations in randomly connected neural networks. *Physical Review E*, Accepted.
- Richter, D. W., Champagnat, J., Jacquin, T. and Benacka, R. (1993). Calcium currents and calcium-dependent potassium currents in mammalian medullary respiratory neurons. *J. Physiol. Lond.*, 470:23-33.
- Rubio, J. E. (1972). A new mathematical model of the respiratory center. *Bull. Math. Biophys.*, 34:467-481.



- Rybak, I. A., Paton, J. F. R. and Schwaber, J. S. (1997a). Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. I. Models of respiratory neurons. *J. Neurophysiol.*, 77:1994-2006.
- Rybak, I. A., Paton, J. F. R. and Schwaber, J. S. (1997b). Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. II. Network models of the central respiratory pattern generator. *J. Neurophysiol.*, 77:2007-2026.
- Rybak, I. A., Paton, J. F. R. and Schwaber, J. S. (1997c). Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. III. Comparison of model performances during afferent nerve stimulation. *J. Neurophysiol.*, 77:2027-2039.
- Smith, J. C., Ellenberger, H., Ballanyi, K., Richter, D. W. and Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzinger complex : a brain stem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science Wash, DC* 254:726-729.
- Vibert, J.-F. and Azmy, N. (1989). Simulation de la genèse d'un rythme biologique par des réseaux interconnectés. In : *Neural networks and their applications*, edited by J. Héroult. Paris : EC2, p. 317-330.
- Vibert, J.-F., Bertrand, F., Denavit-Saubié, M. and Hugelin, A. (1976a). Discharge patterns of bulbo-pontine respiratory unit populations in cat. *Brain Res.*, 114:211-225.
- Vibert, J.-F., Bertrand, F., Denavit-Saubié, M. and Hugelin, A. (1976b). Three dimensional representation of bulbo-pontine respiratory networks architecture from unit density maps. *Brain Res.*, 114:227-244.
- Vibert, J.-F., Caille, D., Bertrand, F., Gromysz, H. and Hugelin, A. (1979). Ascending projection from the respiratory centre to mesencephalon and diencephalon. *Neurosci. Lett.*, 11:29-33.
- Vibert, J.-F., Pakdaman, K., Boussard, E. and Av-Ron, E. (1995). Computational neuroscience and neurology. *Nature-Medecine*, 1:1247-1248.
- Vibert, J.-F., Pakdaman, K., Boussard, E. and Av-Ron, E. (1997). XNBC: A simulation tool. Application to the study of neural coding using hybrid networks. *BioSystems*, 40:211-218.
- Vibert, J.-F., Pakdaman, K., Pham, J., Lambolez, D. and Azmy, N. (1994). XNBC : Station de simulation pour le neurobiologiste. *Biométrie et intelligence artificielle*, 13:16-30.
- Wallenstein, G. V. (1994). A model of the electrophysiological properties of nucleus reticularis thalami neurons. *Biophys. J.*, 66:978-988.