HAL
open science

induction non-invasive d'une plasticité de la commande ventilatoire chez l'humain sain

Marie-Cecile Nierat

To cite this version:

Marie-Cecile Nierat. induction non-invasive d'une plasticité de la commande ventilatoire chez l'humain sain. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066080 . tel-01021262

HAL Id: tel-01021262

https://theses.hal.science/tel-01021262v1

Submitted on 9 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physiologie et Physiopathologie

(ED 394)

Présentée par

Marie-Cécile NIÉRAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Induction non-invasive d'une plasticité de la commande ventilatoire chez l'humain sain

Soutenue le 13 juin 2014

devant le jury composé de :

Mme Pascale Pradat-Diehl, PU PH, Président

M. Hervé Devanne, MCF, Rapporteur

M. Jorge Gallego, DR Inserm, Rapporteur

M. Jean-Pascal Lefaucheur, PU PH, Examinateur

Mme Véronique Marchand-Pauvert, CR Inserm, Examinateur

M. Thomas Similowski, PU PH, Directeur de thèse

M. Mathieu Raux, MCU PH, Co-directeur de thèse

« Le laboratoire seul apprend les difficultés réelles de la science à ceux qui le fréquentent, il leur montre que la science pure a toujours été la source de toutes les richesses que l'homme acquiert et de toutes les conquêtes réelles qu'il fait sur les phénomènes de la nature. »

Claude Bernard, Introduction à l’étude de la médecine expérimentale, Baillière, Paris, France, 1865 (402 pages)

Cette thèse a été conduite au sein de l'équipe de recherche ER10 *"Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique"* de l'Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, devenue au 1er janvier 2014 unité mixte de recherche UMR_S 1158 Inserm-UPMC.

L'unité est dirigée par le Pr Thomas Similowski, et est étroitement articulée avec le Département R3S ("Respiration, Réanimation, Réhabilitation, Sommeil") du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix.

L'étude des relations entre le système nerveux central et l'appareil respiratoire chez l'humain sain et malade constitue l'axe de recherche "historique" de l'unité, en particulier au regard des effets des techniques de stimulation nerveuse périphériques et centrales sur les muscles respiratoires, le contrôle de la ventilation, et les sensations respiratoires.

Cet axe de recherche a bénéficié au cours du temps de nombreuses sources de financement, dont, de façon proéminente et depuis près de 20 ans, les revenus du "legs Gaston Poix" distribués sur appels d'offres et concours aux équipes de recherche "respiratoires" franciliennes par la Chancellerie de l'Université de Paris. Dans ce contexte, les travaux qui constituent la présente thèse ont été financés par le legs Poix, une subvention de la Fondation Thierry de Latran (M-C Niérat), et la dotation annuelle de l'UMR_S 1158.

Remerciements

Au Professeur Thomas Similowski pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir ouvert les portes de la recherche scientifique malgré mon parcours atypique. C'est une grande chance pour moi d'avoir pu travailler à vos côtés. Je vous remercie tout particulièrement pour m'avoir dirigé et éclairé tout au long de cette thèse de votre vision de la neurophysiologie respiratoire et de votre savoir.

Au Docteur Mathieu Raux pour m'avoir enseigné la rigueur du raisonnement et m'avoir encouragée.

Au professeur Pascale Pradat-Diehl pour avoir accepté d'être le président du jury de la présente thèse. Vous avez suivi mon parcours depuis le master jusqu'à la thèse. Je vous en suis très reconnaissante.

A messieurs Hervé Devanne et Jorge Gallego pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer cette thèse en tant que rapporteurs. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Mme Véronique Marchand-Pauvert et M le professeur Jean-Pascal Lefaucheur pour avoir accepté de faire partie du jury. Je suis très honorée de pouvoir bénéficier de votre expertise en recherche.

Le chemin se fait en marchant écrit Antonio Machado. Je voudrais remercier les différentes personnes (physique ou morales) qu'y m'ont aidée et accompagnée au cours de ce voyage :

- Le docteur Rose Katz : merci de m'avoir mis le pied à l'étrier de la recherche pendant le master et de m'avoir guidée vers Thomas et son équipe. Vous m'avez fait là un très beau cadeau.
- Philippe Cardot : tu as accepté ma candidature en thèse à l'école doctorale. Je t'en remercie.
- Louis et Anna : vous avez été mes compagnons de recherche et mes tuteurs. Vous m'avez fait découvrir les techniques de la recherche en pneumologie et nos discussions autour de nos études m'ont beaucoup apporté. Cela a été un plaisir de faire des manips ensemble. Vous m'avez manqué pour cette dernière ligne droite.
- Le docteur Christian Straus : nos discussions ont été riches en idées. Tu m'as permis d'orienter mes réflexions d'une façon remarquable.

- Les docteurs Jésus Gonzalez-Bermejo et Capucine Morélot-Panzini : vous m'avez fait découvrir un autre pan de la recherche avec le protocole ainsi que de nouvelles techniques. Mon travail auprès de vous m'a beaucoup enrichi.
- La Fondation Thierry de Latran dont la subvention m'a permis de travailler à temps plein au sein du laboratoire de recherche.
- Jean-Charles : il est des renconres magiques. Celle-ci en fut une. Merci pour … tout et plus encore.
- Pierantonio, Marie-Noëlle, Marion, Laurence, Elise, Marjolaine, Agnès, Fanny, Diane, Camille, Laurence, Caroline. Vous avez été de merveilleux compagnons. Je présente mes excuses à tous ceux d'entre vous que j'ai torturés à coup de TMS ou de charge à seuil. Merci pour tous ces moments que nous avons partagés. Il y en aura d'autres et j'en suis très heureuse.

A tous les sujets qui, par leur participation à mes protocoles expérimentaux, ont permis la réalisation de ces études. Une dédicasse particulière à Sylvain, que je remercie d'avoir des PEM magnifiques ce qui m'a permis d'illustrer cette thèse.

Merci à mes proches de m'avoir supportée, dans tous les sens du terme, pendant ces années bien difficiles pour eux …

« Voyageur, il n'est pas de chemin
Rien que sillages sur la mer ».
Se hace camino al andar,
Antonio Machado.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ **8**
LISTE DES ABRÉVIATIONS **10**
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **12**
INTRODUCTION **15**
ÉTAT DE LA QUESTION **17**
CHAPITRE I : RAPPELS PHYSIOLOGIQUES 17
1. MUSCLES ASSURANT LA VENTILATION 17
1.1 MUSCLES DILATATEURS DES VOIES AÉRIENNES SUPÉRIEURES 17
1.2 DIAPHRAGME 17
1.3 AUTRES MUSCLES RESPIRATOIRES 18
2. RÉCEPTEURS 18
2.1 RÉCEPTEURS MÉTABOLIQUES 18
2.2 MÉCANORÉCEPTEURS 19
3. SUBSTRATS DU CONTRÔLE MOTEUR DE LA VENTILATION 21
3.1 MÉTAMÈRES CERVICAUX 21
3.2 COMMANDE ISSUE DU TRONC CÉRÉBRAL 25
3.3 CONTRÔLE SUPRAPONTIQUE 27
CHAPITRE 2 : PLASTICITÉ DE LA COMMANDE VENTILATOIRE ET TECHNIQUES NON INVASIVES D'INDUCTION DE PLASTICITÉ 38
1. PLASTICITÉ DE LA COMMANDE NEURALE 38
1.1 GÉNÉRALITÉS SUR PLASTICITÉ 38
1.2 FORMES TEMPORELLES DE LA PLASTICITÉ 39
2. PLASTICITÉ DE LA COMMANDE VENTILATOIRE 50
2.1 NEUROMODULATION 51
2.2 FORMES TEMPORELLES DE LA PLASTICITÉ VENTILATOIRE 51
2.3 MÉCANISMES DE LA PLASTICITÉ VENTILATOIRE 55
3. TECHNIQUES NON INVASIVES D'INDUCTION DE PLASTICITÉ 58
3.1 STIMULATION MAGNÉTIQUE TRANSCRÂNIENNE 59
3.2 STIMULATION PAR COURANT CONTINU 72
3.3 TECHNIQUES NON INVASIVES ET MÉTAPLASTICITÉ 76
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL **80**
MÉTHODES EXPÉRIMENTALES **83**
CHAPITRE 1 : MOYENS D'ÉTUDE DE LA COMMANDE VENTILATOIRE 84
1. PRINCIPE DES MÉTHODES DE MESURE DE LA COMMANDE VENTILATOIRE 84
2. TECHNIQUES D'ANALYSE DU PROFIL VENTILATOIRE 85
2.1 MESURES DE DÉBIT ET PRESSION 85
2.2 PLÉTHYSMOGRAPHIE RESPIRATOIRE D'INDUCTION 86
3. ÉVALUATION DE LA COMPLEXITÉ DU SIGNAL RESPIRATOIRE 87

4. RÉPONSE VENTILATOIRE AUX CONTRAINTES MÉCANIQUES 89
4.1 CHARGE ÉLASTIQUE 89
4.2 CHARGE RÉSISTIVE 90
4.3 CHARGE À SEUIL 90
CHAPITRE 2 : MOYENS D'ÉTUDE DE L'EXCITABILITÉ DE LA VOIE CORTICOPHRENIQUE 93
1. STIMULATION MAGNÉTIQUE TRANSCRÂNIENNE 93
1.1 SONDES DE TMS, FORME ET ORIENTATION DU COURANT INDUIT 93
1.2 MATÉRIEL TMS UTILISÉ LORS DES ÉTUDES PRÉSENTÉES DANS CETTE THÈSE 94
1.3 NEURONAVIGATION 94
1.4 REPÉRAGE DE LA POSITION DE L'AMS 95
2. RECUEIL ET MESURE DE L'EXCITABILITÉ CORTICOSPINALE 95
2.1 RECUEIL DE L'ACTIVITÉ ÉLECTROMYOGRAPHIQUE 95
2.2 GRANDEURS DES POTENTIELS ÉVOQUÉS MOTEURS 96
2.3 ÉTUDE DE L'EXCITABILITÉ DE LA VOIE CORTICOPHRÉNIQUE 97
3. TECHNIQUES DE MESURE DE L'EXCITABILITÉ INTRACORTICALE 98
3.1 INHIBITION INTRACORTICALE 99
3.2 AUTRES MESURES DE L'EXCITABILITÉ INTRACORTICALE 102
3.3 PÉRIODE DE SILENCE 103
RÉSULTATS 106
ÉTUDE N°1 107
ÉTUDE N°2 121
ÉTUDE N°3 150
DISCUSSION GÉNÉRALE 191
DISCUSSION MÉTHODOLOGIQUE 191
1. LIMITES DES TECHNIQUES D'INDUCTION DE PLASTICITÉ 191
1.1 STIMULATION RÉPÉTITIVE TRANSCRÂNIENNE 191
1.2 STIMULATION TRANSCUTANÉE SPINALE PAR COURANT CONTINU 194
2. LIMITES DE L'ÉVALUATION DE LA MODIFICATION DE L'EXCITABILITÉ CORTICALE PAR LA SICI 196
3. LIMITES DU CONDITIONNEMENT SHAM 197
4. LIMITES DE L'ANALYSE DU PROFIL VENTILATOIRE 197
DISCUSSION FONCTIONNELLE 198
1. ÉTUDES N°1 ET N°2 198
1.1 MODULATION DE L'EXCITABILITÉ DE LA VOIE CORTICOPHRÉNIQUE 198
2. ÉTUDE N°3 203
2.3 DIFFÉRENCE DES EFFETS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES ET VENTILATOIRES 205
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 207
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 209

RÉSUMÉ

La commande de la ventilation chez l'humain est capable d'une adaptation persistante en réponse à divers stimulus (par exemple, hypoxie, apprentissage). Cette capacité repose sur des mécanismes de plasticité à long terme similaires à ceux décrits pour la commande neurale. Différentes techniques non invasives permettant l'induction de plasticité (stimulation magnétique transcrânienne répétitive [rTMS], stimulation transcranienne par courant continu [tDCS], stimulation transcutanée spinale par courant continu [tsDCS], etc.) sont couramment utilisées dans un but expérimental ou thérapeutique pour moduler l'excitabilité du système nerveux central mais leur application au système de contrôle ventilatoire n'a fait l'objet que de très peu de travaux.

L'objectif de cette thèse est double : (1) examiner la possibilité d'induire des mécanismes de type plasticité à long terme par des techniques de rTMS et de tsDCS en deux sites de la commande ventilatoire destinée au diaphragme, l'aire motrice supplémentaire (AMS) et les métamères C3-C5 ; (2) évaluer les conséquences sur le profil ventilatoire des modifications générées par l'induction de cette plasticité en ventilation de repos et lorsque la ventilation est artificiellement contrainte.

Nous avons examiné les effets d'un conditionnement inhibiteur appliqué par rTMS en regard de l'AMS sur l'excitabilité corticophrénique (étude n°1). Nous avons observé la présence d'une diminution persistante de l'excitabilité corticophrénique, et nous en avons tiré la proposition qu'en ventilation de repos l'AMS augmente l'excitabilité de la commande ventilatoire à l'éveil contribuant ainsi au phénomène du « wakefulness drive to breathe ». Nous avons alors considéré les conséquences de ce conditionnement rTMS sur la ventilation expérimentalement contrainte (charge inspiratoire) (étude n°2). Les modifications du profil ventilatoire induites par la rTMS sont en faveur d'une participation de l'AMS à la production ou au traitement de la copie d'efférence dans le cadre du contrôle ventilatoire ("décharge corollaire"). Dans une troisième étude, nous avons examiné les effets d'une stimulation par tsDCS appliquée en regard des métamères cervicaux C3-C5 sur l'excitabilité corticophrénique et sur le profil ventilatoire (étude n°3). L'augmentation de l'excitabilité corticophrénique et du volume courant en l'absence de modulation de l'activité intracorticale ou bulbaire nous a conduit à suggérer qu'il est possible d'induire une plasticité de la commande ventialtoire au niveau spinal.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'envisager des perspectives thérapeutiques à l'utilisation de la rTMS et de la tsDCS pour modifier la ventilation dans le cadre de pathologies qui en affectent la commande.

ABSTRACT

A salient feature of the ventilatory control system is its ability to persistently adapt its behaviour in response to various stimuli (e.g. hypoxia, learning). This stems from long-term plasticity mechanisms similar to those described for the neural control in general. Plasticity can be induced by various non-invasive stimulation techniques (repetitive transcranial magnetic stimulation [rTMS], transcranial direct current stimulation [tDCS], transcutaneous spinal direct current stimulation [tsDCS], etc.) that are commonly used for experimental or therapeutic purpose. Yet these techniques have not be systematically applied to ventilatory plasticity.

The aim of this thesis is as follows: (1) to examine the possibility of inducing long-term ventilatory plasticity by rTMS and tsDCS at two sites of the ventilatory control system, namely the supplementary motor area (SMA) and the cervical spinal cord where the phrenic motoneurons are localized; (2) to evaluate the impact of such plasticity on breathing pattern during spontaneous ventilation and mechanical inspiratory loading.

We examined the effects of an inhibitory rTMS paradigm applied to the SMA on corticophrenic excitability (Study 1). We observed a persistent decrease in corticophrenic excitability and therefore proposed that the SMA participates in the increased resting state of the ventilatory motor system during wake (i.e. "wakefulness drive to breathe"). Then we considered the consequences of rTMS conditioning of the SMA on breathing pattern during inspiratory load compensation (Study 2). The corresponding modifications support a contribution of the SMA to the production or processing of an ventilatory efference copy (corollary discharge). In a third study, we examined the effects of a tsDCS delivered to C3-C5 on the corticophrenic excitability and on the respiratory pattern. Increased corticophrenic excitability and tidal volume were observed in the absence of arguments for a modulation of activity at the intracortical or brainstem level. This suggests that respiratory plasticity takes place at the spinal level.

Taken together, these results open the perspective of harnessing respiratory plasticity as a therapeutic tool in disorders altering the ventilatory command.

Liste des abréviations

L'usage de certaines abréviations anglaises étant consacré, elles ont été conservées dans le texte en français.

AH : *abductor hallucis*, muscle abducteur de l'hallux
AMS : aire motrice supplémentaire
aMT : *active motor threshold*, seuil moteur actif
AUC : *area under the curve*, aire sous la courbe du signal redressé
CS : *conditioning stimulus*, stimulus conditionnant
cTBS : *continuous thetaburst stimulation*, stimulation continue en « bouffées thêta »
EEG : électroencéphalogramme
EVA : échelle visuelle analogique
f : fréquence respiratoire
GABA : acide gamma-aminobutyrique
ICF : *intracortical facilitation*, facilitation intracorticale
ICI : *intracortical inhibition*, inhibition intracorticale
IRMf : imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle
LTD : *long term depression*, dépression à long terme
LTF : *long term facilitation*, facilitation à long terme
LTP : *long term potentialisation*, potentialisation à long terme
M1 : aire motrice primaire
MN : motoneurone(s)
MSO : *maximum stimulateur output,* puissance du stimulateur exprimée en % du maximum
NREM : *non rapid eye movement* ou sommeil lent
PEM : potentiel évoqué moteur
$P_{ET}CO_2$: *partial pressure of end-tidal* CO_2, pression partielle en CO_2 télé-expiratoire
$P_{ET}O_2$: *partial pressure of end-tidal* O_2, pression partielle en O_2 télé-expiratoire
pLTF : *phrenic long-term facilitation,* facilitation phrénique à long terme
PPSE : potentiel post-synaptique excitateur
préBötC : complexe pré-Bötzinger
PRI : pléthysmographie respiratoire par inductance
RMS : *root mean square* ou racine carré de la moyenne
rMT : *resting motor threshold*, seuil moteur de repos
rTMS : *repetitive transcranial magnetic stimulation*, stimulation magnétique transcrânienne répétitive

RTN/pFRG : ensemble noyau rétrotrapézoïde - groupe respiratoire parafacial

SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil

sICI : *short latency intracortical inhibition*, inhibition intracorticale de courte latence

SNC : système nerveux central

STD : *short-term depression,* dépression à court terme

STP : *short-term potentiation,* potentialisation à court terme

TBS : *thetaburst stimulation*, stimulation en « bouffées thêta »

tDCS : *transcranial direct current stimulation*, stimulation transcrânienne par courant continu

TES : *transcranial electric stimulation*, stimulation électrique transcrânienne

Te : temps expiratoire

TEP : tomographie par emission de positon

Ti : temps inspiratoire

Ti/T_T : temps de consigne

TMS : *transcranial magnetic stimulation*, stimulation magnétique transcrânienne

TS : *test stimulus*, stimulus test

tsDCS : *transcutaneous spinal direct current stimulation*, stimulation transcutanée spinale par courant continu

T_T : temps total du cycle ventilatoire

Ve : ventilation minute

vLTF : *ventilatory long-term facilitation*, facilitation ventilatoire à long terme

VS : ventilation spontanée

V_T : volume courant

V_T/Ti : débit inspiratoire moyen

Liste des figures et tableaux

État de la question :

Figure n°1 : Conception schématique des éléments intervenant dans l'excitabilité des MN phéniques (p24).

Figure n°2 : Représentation schématique de la localisation des groupes de neurones du tronc cérébral (vue latérale) impliqués dans le contrôle de la ventilation (p26).

Figure n°3 : Représentation du diaphragme au sein de l'homonculus du cortex moteur primaire (p29).

Figure n°4 : Localisation de la position de l'AMS sur une IRM anatomique (vue sagittale) du cerveau (p31).

Figure n°5 : Représentation schématique des deux voies corticophréniques (p32).

Figure n°6 : Représentation de la notion de copie d'efférence (p34).

Figure n°7 : Schématisation d'un phénomène de plasticité (p39).

Figure n°8 : Schématisation de la plasticité synaptique associative (p43).

Figure n°9 : Schématisation de l'induction de la LTP et de la LTD au niveau d'une synapse excitatrice (p45).

Figure n°10 : Schématisation de l'évocation d'une réponse motrice par la stimulation magnétique en simple impulsion (p60).

Figure n°11 : Représentation schématique de l'activation des neurones pyramidaux par la TMS (p62)

Figure n°12 : Figure représentative d'une courbe de recrutement construire à partir des PEM du diaphragme (p64).

Figure n°13 : Représentation schématique de la stimulation transcrânienne répétitive (p67).

Figure n°14 : Effets sur les PEM du diaphragme d'un conditionnement en rTMS à 5Hz délivré sur l'AMS (p68).

Figure n°15 : Schématisation des effets de la plasticité synaptique bidirectionnelle selon la théorie de Bienenstock-Cooper-Munro (p78).

Méthodes expérimentales

Figure n°16 : Représentation schématique d'un spirogramme (p85).

Figure n°17 : Représentation schématique du système d'acquisition du profil ventilatoire par la technique de la pléthysmographie respiratoire d'induction (p87).

Figure n°18 : Charge mécanique externe munie d'un embout buccal (p90).

Tableau A : Comportement ventilatoire en compensation de charge à seuil selon le niveau de contrainte (p91).

Figure n°19 : Grandeurs des potentiels évoqués moteurs (p96)

Figure n°20 : Représentation schématique d'un protocole en double choc à un intervalle interstimulus évoquant une inhibition intracorticale de courte latence (sICI) (p99).

Figure n°21 : Évolution de l'amplitude des PEM selon l'intensité du stimulus conditionné dans le paradigme expérimental décrit par Kujirai *et al.*, 1993 (p100)

Tableau B : Récapitulatif des effets des conditionnements en double choc sur la taille du PEM conditionné selon l'intervalle interstimulus et l'intensité des stimulus test et conditionné. (p102)

Résultats

Étude n°1

Figure n°22 : Schéma expérimental de l'étude n°1 (p109)

Figure n°23 : Graphique présentant l'évolution de la taille des PEM du diaphragme suite au conditionnement en cTBS et en rTMS à 5Hz (p110).

Étude n°2

Figure n°24 : Schéma expérimental de l'étude n°2 (p124)

Figure n°25 : Effet d'un conditionnement sham, rTMS à 5Hz et cTBS en regard de l'AMS sur le les grandeurs du profil ventilatoire et la pression partielle en CO2 télé-expiratoire pendant la ventilation en charge (p125)..

Tableau C : Effet d'un conditionnement cTBS sur le temps inspiratoire (TI), le temps expiratoire (Te), le temps de consigne (Ti/TT), le volume courant (VT), la ventilation minute (Ve) et la pression partielle en C02 télé-expiratoire (PETCO2) avant et aux trois temps après conditionnement (Post 1, Post2 et Post 3) (p126).

Tableau D : Effet d'un conditionnement rTMS à 5Hz sur le temps inspiratoire (TI), le temps expiratoire (TE), le temps total du cycle respiratoire (TT), le temps de consigne (Ti/TT), le volume courant (VT), la ventilation minute (V'E) et la pression partielle en C02 télé-expiratoire (PETCO2) et l'évaluation de la dyspnée (EVA) avant et aux trois temps après conditionnement (Post1, Post2 et Post3) (p127).

Étude n°3

Figure n°26 : Schéma expérimental de l'étude n°3 (p154) ;

Figure n°27 : Graphique présentant l'évolution de la taille des PEM du diaphragme suite à un conditionnement tsDCS en polarité anodale, cathodale ou sham (p155)

Figure n°28 : Graphique présentant l'évolution du volume courant suite à un conditionnement tsDCS en polarité anodale, cathodale ou sham (p155).

INTRODUCTION

Le système de contrôle de la ventilation est un ensemble complexe de circuits neuraux qui intègre des influx issus de nombreuses afférences et élabore, en retour, une commande motrice qui permet la ventilation des poumons et le maintien de l'homéostasie avec la valeur de la $PaCO_2$ pour principale grandeur réglée. Le profil ventilatoire construit à partir de la commande automatique bulbaire peut être modulé par des voies dites suprapontiques en fonction des émotions ressenties ou des besoins de contrôle volontaire de la ventilation. Ce contrôle volontaire est principalement assuré au niveau cortical par deux aires motrices (aire motrice primaire et aire motrice primaire supplémentaire). L'ensemble de ces influx est intégré au niveau des motoneurones phréniques étagés dans les métamères C3 à C5 chez l'humain.

Au cours de la vie, le profil d'activité des muscles respiratoires est constamment modifié, de façon transitoire, en fonctions des adaptations posturales, de la locomotion, de la phonation, de la déglutition, du cycle veille-sommeil, etc. mais aussi de façon durable par exemple lors d'apprentissages. Le système de contrôle de la ventilation est ainsi capable d'adaptation à long terme c'est-à-dire de mécanismes de plasticité. Ces évolutions physiologiques persistantes de la commande et sa traduction en termes de profil ventilatoire ont été étudiées chez l'animal et l'humain adulte sain ou malade depuis quelques dizaines d'années.

La capacité du système de commande à s'adapter à l'environnement se traduit par différentes formes de modulation temporelles de la réponse ventilatoire depuis des modulations transitoires, à court terme, de la commande après l'arrêt de l'application du stimulus jusqu'à des phénomènes perdurant au-delà de l'arrêt de la stimulation, parfois plus de soixante minutes. Ces derniers reposent probablement sur les mécanismes de potentialisation / dépression à long terme (LTP/LTD) tels qu'ils ont été décrits au niveau de l'hippocampe. La présence de cette plasticité est rapportée dans la littérature aux différents niveaux de la commande ventilatoire depuis le cortex moteur jusqu'aux motoneurones phréniques.

Depuis les années 1980, de considérables progrès techniques ont été réalisés permettant de modifier chez l'humain de façon non-invasive, transitoire et réversible, l'activité électrique neuronale. Deux techniques sont couramment utilisées au niveau cortical dans les études électrophysiologiques ou comportementales afin d'analyser les conséquences de la modulation d'une aire et ainsi d'établir des relations causales entre réseaux neuronaux et comportements. Ces deux techniques sont la stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS) et la stimulation transcrânienne par courant continu (TDCS). Selon la même technique d'application d'un courant continu, une stimulation en regard des

métamères a été récemment utilisée dans les études chez l'humain et cette technique dite de stimulation transcutanée spinale par courant continu (tsDCS) est actuellement en plein essor.

Ces techniques appliquées au niveau moteur, évoquent une plasticité de type facilitation ou inhibition à long terme de la réponse grâce à différents paradigmes de stimulation. Les modifications induites se traduisent aussi au niveau comportemental dans des tâches motrices.

La possibilité d'évoquer des mécanismes de plasticité de la commande ventilatoire grâce à ces techniques non invasives chez l'humain sain permettrait non seulement d'améliorer les connaissances sur la commande neurale de la ventilation, d'interférer avec des sensations ventilatoires mais aussi de corriger des anomalies de cette commande comme, par exemple celles présentes dans le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénital (SHACC).

La première partie de ce manuscrit est composée d'un rappel bibliographique comportant deux chapitres : le premier porte sur les éléments constitutifs de la commande ventilatoire et le second sur la plasticité neurale et son application au contrôle ventilatoire.

La deuxième partie est consacrée à la présentation des matériels et méthodes d'analyses communs aux travaux sur lesquels repose cette thèse.

La troisième partie est constituée des articles publié, accepté pour révision ou en cours d'écriture issus des trois études réalisées. Les articles sont en anglais, chacun est précédé d'un résumé en français.

La quatrième partie comporte une interprétation théorique méthodologique et fonctionnelle des résultats obtenus et les apports à la compréhension des mécanismes de contrôle de la ventilation de ce travail.

Enfin, une conclusion générale sur l'ensemble des études évoque, les perspectives théoriques puis thérapeutiques des modifications électrophysiologiques et comportementales persistantes de la commande ventilatoire induites par des techniques non invasives à partir de deux niveaux du système nerveux.

ÉTAT DE LA QUESTION

CHAPITRE I : RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

La ventilation est un acte moteur survenant en trois phases successives identifiables en termes d'activité musculaire et nerveuse, l'inspiration, la phase post-inspiratoire et l'expiration. Pour cela, elle implique des muscles, des récepteurs et une commande neurale complexe étagée à plusieurs niveaux du système nerveux central.

1. Muscles assurant la ventilation

1.1 Muscles dilatateurs des voies aériennes supérieures

Différents groupes musculaires oro-faciaux jouent un rôle important au cours de la ventilation (*alae nasi*, génioglosse…). Ces muscles sont des dilatateurs des voies aériennes supérieures. Leur contraction vise à diminuer les résistances à l'écoulement de l'air à travers ces structures souples et à s'opposer à l'effet de collapsus produit par la dépression intrathoracique lors de l'inspiration. Ils sont innervés par les nerfs des Vème, VIIème et XIIème paires crâniennes.

1.2 Diaphragme

Parmi les muscles permettant la respiration, le diaphragme est le générateur principal du débit inspiratoire (Agostoni *et al.*, 1960).

Anatomiquement, ce muscle est formé de trois parties. Les fibres de la portion sternale s'insèrent sur l'appendice xiphoïde, celles de la portion chondro-costale sur la face interne des 6 dernières côtes, la portion crurale sur la face antérieure des corps vertébraux de Th12 à L3. Ces trois parties sont réunies par un tendon central, le centre phrénique. En termes d'aspect global, il est décrit comme formé de 2 coupoles réunies par le centre phrénique.

Fonctionnellement, le diaphragme intervient pour des tâches respiratoires et non respiratoires. A l'inspiration, il agit sur le thorax et l'abdomen pour y générer respectivement une pression négative et une pression positive, mais son rôle dans la ventilation ne se limite pas à l'inspiration puisqu'il persiste une activité excentrique, freinatrice, assurant un contrôle actif de la première phase de l'expiration (Richter, 1982 ; Richter *et al.,* 1987). Le diaphragme participe à des tâches non respiratoires (phonation, toux, défécation, parturition …) notamment en co-contraction avec les abdominaux et il a également un rôle postural (Hodges et Gandevia, 2000 ; Perry *et al.*, 2010).

Chaque coupole de ce muscle est innervée par un nerf phrénique.

1.3 Autres muscles respiratoires

Certains muscles du cou comme les scalènes ou les sterno-cléido-mastoïdiens possèdent une activité inspiratoire. Les premiers sont innervés par un nerf issu de la racine C4, les seconds par la branche spinale de la XIème paire crânienne.

Des muscles du tronc participent également à l'inspiration et/ou à l'expiration. Ce sont les muscles intercostaux et abdominaux. Ces muscles sont innervés par des motoneurones étagés sur les métamères Th1 à L1.

2. Récepteurs

Ces activités musculaires assurent la ventilation des poumons au travers de mouvements de la paroi thoracique qu'ils induisent et participent ainsi au maintien de l'homéostasie de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans le sang. Pour cela le système de contrôle de la ventilation possède de nombreux récepteurs de différents types qui sont situés dans le système respiratoire et en dehors. Les afférences qu'ils transmettent sont essentiellement de nature métabolique et mécanique. L'intégration de ces afférences est un élément essentiel de la régulation de la commande motrice respiratoire.

2.1 Récepteurs métaboliques

Ces récepteurs renseignent les centres de la commande automatique sur la valeur de la pression partielle artérielle en oxygène (PaO_2) et la pression partielle artérielle en dioxyde de carbone ($PaCO_2$) (Nurse, 2005), mais la ventilation garantit l'homéostasie principalement de la valeur de la $PaCO_2$ (Nattie, 1999 ; Feldman *et al.,* 2003). Ils participent à l'adéquation de la commande ventilatoire en fonction de la production de CO_2 via une boucle de contrôle de type rétroaction (feed-back). En conditions physiologiques, les chémorécepteurs participent au maintien de la $PaCO_2$ autour de 40mm Hg (Smith *et al.,* 2006).

Les chémorécepteurs sont localisés en des positions anatomiques périphériques et centrales qui permettent l'évaluation du contenu du sang artériel et du liquide céphalorachidien.

2.1.1 Chémorécepteurs périphériques

Les afférences métaboliques périphériques proviennent de chémorécepteurs situés à deux niveaux du système aortique, la bifurcation des artères carotides communes et la crosse de l'aorte.

Les récepteurs carotidiens contribuent à la modification de la ventilation d'une part lors d'augmentation du CO_2 (hypercapnie) pour environ 30% du total de la réponse et d'autre part en cas de baisse de la PaO_2 (hypoxémie). Lorsque les deux stimulus sont combinés, la modification réflexe de la ventilation dépasse la somme des changements induits par chacun de ces stimulus ; la réponse des récepteurs carotidiens à l'hypercapnie et à l'hypoxémie est dite synergique (Cunningham *et al.,* 1986).

Les récepteurs aortiques sont sensibles à la diminution du transport d'oxygène en cas d'anémie même en normoxie (Prabhakar et Peng, 2004). Le rôle de ces chémorécepteurs est notamment visible lors d'une chute de la PaO_2 en dessous de 60mm Hg car ce stimulus génère une élévation de la fréquence de décharge de ces récepteurs et une augmentation hyperbolique de la ventilation (Sun et Reis, 1994).

Les corpuscules carotidiens sont innervés par le nerf IX et les corpuscules aortiques par le nerf X.

2.1.2 Chémorécepteurs centraux

L'augmentation de la capnie se traduit par un accroissement linéaire de la ventilation (Duffin, 2005) et la dénervation des chémorécepteurs périphériques ne conduit pas à une disparition mais juste à une diminution de la réponse ventilatoire à ce stimulus. Ceci traduit la présence d'autres capteurs. Les récepteurs centraux assureraient environ les 2/3 (63%) de la réponse à l'hypercapnie (Smith *et al.*, 2006). Ces récepteurs sont toniques et la baisse de la capnie (hypocapnie) induit une diminution de la ventilation par la baisse de leur fréquence de décharge (Sun *et al.,* 2001).

Les récepteurs au CO_2 ou aux ions hydrogène ($[H^+]$), seraient disséminés dans différentes structures centrales (le locus coeruleus, le noyau du tractus solitaire, les neurones du raphé médian, le noyau rétrotrapézoïdal et le noyau fastigial du cervelet) (Coates *et al.,* 1993 ; Nattie, 2006).

2.2 Mécanorécepteurs

De nombreuses afférences non métaboliques interviennent dans le contrôle de la ventilation.

2.2.1 Propriocepteurs

Des afférences émanent de mécanorécepteurs situés dans les articulations du gril costal et les muscles respiratoires.

Quelle que soit l'espèce étudiée, les fuseaux neuromusculaires et les organes tendineux de Golgi sont présents dans les muscles intercostaux (Critchlow et Euler, 1963) mais ils sont faiblement représentés au sein du diaphragme (Corda *et al.,* 1965 ; Muller *et al* ., 1979).

Chez le chat, deux types de fuseaux neuromusculaires, des organes tendineux de Golgi, deux types d'afférences (I et II) et des MN γ sont décrits mais leur nombre est plus faible qu'au sein d'un muscle squelettique (Corda *et al.,* 1965 ; pour revue, Road, 1990). L'activité diaphragmatique chez le chat n'est pas modifiée par la section des racines dorsales (même lors de manœuvres connues pour augmenter la décharge sur les racines postérieures telles que la ventilation en pression négative ou la compression abdominale) ce qui est cohérent avec la faible représentation des fuseaux neuromusculaires dans les muscles respiratoires (Sant'Ambrogio *et al.,* 1962).

Les données histologiques chez l'humain rapportent également une faible représentation des fuseaux neuromusculaires dans le diaphragme (Muller *et al*, 1979). Les propriocepteurs diaphragmatiques ont un faible rôle dans la ventilation de repos (Frazier *et al.,* 1991).

L'implication des propiocepteurs diaphragmatiques lors des mouvements respiratoires plus amples ou lorsque la ventilation est rendue difficile est mal connue mais le rôle des récepteurs des autres muscles respiratoires (intercostaux et muscles du cou) serait prépondérant par rapport au diaphragme (Corda *et al.,* 1965).

Les afférences proprioceptives se projettent sur le cortex somato-sensoriel primaire (S1), via les neurones de la corne postérieure de la moelle et renseignent sur les forces générées par les muscles et les déplacements de la cage thoracique. Ces afférences participent à l'ajustement de la commande ventilatoire, par exemple en cas de modification de fonction des muscles ou d'augmentation de l'impédance du système respiratoire (Younes, 1995).

2.2.2 Autres mécanorécepteurs

Les grosses bronches contiennent des tensiorécepteurs et des nocicepteurs sensibles à la distension et à l'irritation bronchique. Des récepteurs alvéolaires juxtacapillaires (récepteurs J) disséminés dans les alvéoles sont sensibles à la dilatation des capillaires et à la pression interstitielle. L'ensemble de ces afférences est transmises aux centres respiratoires du tronc cérébral par les fibres de la Xème paire crânienne (Widdicombe, 2009).

Des informations intéroceptives sont également véhiculées par le nerf phrénique. Elles font relais dans les centres respiratoires du tronc cérébral et sont traitées au niveau de structures cérébrales impliquées dans le contrôle de fonctions autonomes (hypothalamus, insula, amygdale, thalamus, …) (Cechetto *et al.,* 2009 ; Davenport et Vovk, 2009).

3. Substrats du contrôle moteur de la ventilation

L'activation des différents muscles nécessaires à la ventilation est finement régulée par deux grands systèmes de commande et de nombreux circuits du contrôle moteur. Ces commandes sont catégorisées anatomiquement en deux grandes régions. Située dans le bulbe et le pont, une première commande, automatique, assure la ventilation courante et la réponse réflexe aux modifications des demandes métaboliques ; un ensemble de régions, dit suprapontique, permet les adaptations de la ventilation d'une part aux changements liés aux manifestations émotionnelles (Heywood *et al*., 1996) et aux modifications posturales (Hodges et Gandevia, 2000) et d'autre part aux actions volitionnelles (Shea, 1996).

Toutes ces commandes sont transmises aux métamères cervicaux et thoraciques qui représentent un premier niveau de contrôle.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse ayant l'activité électromyographique du diaphragme comme grandeur de sortie de nos évaluations, seul l'étage des métamères cervicaux comprenant les motoneurones phréniques est détaillé au cours de cette thèse.

3.1 Métamères cervicaux

3.1.1 Généralités sur les MN phréniques

A l'exception des muscles des voies aériennes supérieures, toutes les commandes efférentes sont transmises à l'étage spinal.

Les métamères cervicaux C3-C5 contiennent les colonnes de motoneurones α (MN) dont la dépolarisation, transmise par les nerfs phréniques, provoque la contraction du diaphragme (Vérin *et al.,* 2011). En ventilation spontanée chez l'animal, ces MN phréniques présentent une activité uniquement phasique corrélée avec le profil d'activation des neurones bulbaires (pour revue, Monteau et Hilaire, 1991). Chez l'humain, leur excitation débute quelques millisecondes avant l'apparition d'un débit inspiratoire et se prolonge sur le début de l'expiration, période pendant laquelle la contraction excentrique du diaphragme freine l'expiration (Saboisky *et al.,* 2007). Pendant la seconde moitié de l'expiration, chez le chat, les motoneurones phréniques reçoivent, une inhibition monosynaptique (Berger, 1979) issue de noyaux bulbaires contrôlant l'activité expiratoire (Merrill et Fedorko, 1984 ; Duffin *et al.,* 2000).

3.1.2 Facteurs de contrôle de l'activité des MN phréniques

Cette relation entre les influx afférents et les potentiels d'action produits par ses neurones n'est pas linéaire mais elle dépend des propriétés intrinsèques des neurones (par exemple,

la morphologie du neurone) et de leurs propriétés synaptiques (par exemple, la nature des récepteurs présents à la surface de la cellule, les types de neurotransmetteurs et les neuromodulateurs auxquels ils sont sensibles) (pour revues, Rekling *et al.,* 2000 ; Lee et Fuller, 2011).

3.1.2.1. Propriétés intrinsèques des MN phréniques

Les caractéristiques électrophysiologiques des MN reposent en particulier sur les dimensions du corps cellulaire (Cushing *et al.,* 2005 ; pour revue, Rekling *et al.,* 2000).

La première description faite chez l'animal de la présence de cellules aux propriétés singulières au sein d'un même groupe de MN phréniques revient à Berger (1979). Selon cette classification, basée sur les différences de potentiel de membrane de repos lors de l'expiration, l'auteur rapporte que les cellules qui déchargent tôt dans l'inspiration (délai de 4 ± 9ms après le début de l'inspiration) ont une résistance membranaire plus élevée que celles qui sont activées plus tard dans l'inspiration (délai de 696 ± 6ms). Les motoneurones phréniques sont ainsi classifiés en deux grands sous-types (*early inspiratory*, *early-I* ; *late-inspiratory, late-I*) (Kong et Berger, 1986 ; Lee *et al.,* 2009). Les MN phréniques de petite taille (*early-I*), à l'inverse des MN de grande taille, présentent une rhéobase basse (ils sont plus excitables) et ils ont une vitesse de conduction basse (Jodkowski *et al.,* 1987). Cette classification comporte d'autres types de MN, notamment des MN phréniques silencieux en ventilation spontanée (VS) qui sont recrutés pour la production de contractions plus importantes (Lee *et al.,* 2009).
En ventilation spontanée, chez l'humain comme chez l'animal, les MN « *early-I* » présentent, par cycle respiratoire, un nombre de bouffées de potentiels d'action ainsi que des durées de décharges supérieurs aux MN « *late-I* » (Kong et Berger, 1986 ; Saboisky *et al.,* 2007 ; Lee *et al.,* 2009).

3.1.2.2. Propriétés synaptiques des MN phréniques

Les influx synaptiques excitateurs et inhibiteurs qui parviennent alternativement aux motoneurones phréniques assurent le passage du diaphragme d'une phase de contraction à une phase de repos (Merrill et Fedorko, 1984).

Ces influx reçus par les MN au niveau présynatique sont de différente nature et agissent sur deux types de récepteurs situés dans la membrane post-synaptique. Les récepteurs ionotropiques induisent des flux d'ions (Na^+, Cl^-) qui agissent en modifiant la polarisation membranaire (dépolarisation, hyperpolarisation). Les récepteurs métabotropiques ont une action à plus long terme, puisqu'ils génèrent des cascades d'action par l'activation de seconds messagers. Par ce biais, ils peuvent moduler la transmission synaptique de façon transitoire ou durable. Leurs effets, à travers la modification de la réponse cellulaire aux

neuromodulateurs affectent le fonctionnement des canaux voltage dépendants et ainsi modifient la genèse des courants ioniques et des potentiels d'action en termes de probabilité d'apparition et de fréquence.

Les influx excitateurs bulbaires reçus par les MN phréniques lors de l'inspiration sont de nature glutamatergiques. Le blocage sélectif de la recapture du glutamate sur des préparations de bulbe-moelle de rat nouveau-né se traduit par une augmentation de la décharge des bouffées inspiratoire enregistrée sur le nerf phrénique (McCrimmon *et al.,* 1989 ; Greer *et al.*, 1991).
L'action de ces influx glutamatergiques sur la transmission synaptique se fait par le biais de récepteurs NMDA (N-methyl-D-aspartate) et non-NMDA (acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique, AMPA; kainite, KA) comme montré chez le lapin (Böhmer *et al.,* 1991) et le rat (Chitravanshi et Sapru, 1996). La microinjection d'antagonistes des récepteurs NMDA (acide 2-amino-5-phosphonovalérique, APV) et non NMDA (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione, DNQX) au niveau des métamères C3-C5 induit un effet inhibiteur conduisant à une diminution des potentiels d'action émis par les MN phréniques, confirmant ainsi le rôle de ces récepteurs (Böhmer *et al.,* 1991).
Les autres influx (notamment corticospinaux) sont peu étudiés dans la littérature portant sur la ventilation mais à partir des connaissances sur la voie corticospinale, lorsque destinée à des muscles squelettiques innervés par des MN cervicaux, il est possible d'inférer que des mécanismes analogues régissent ces influx excitateurs (Hori *et al.,* 2002).

Lors de la seconde phase de l'expiration, les motoneurones sont soumis à une inhibition présynaptique directe issue de noyaux bulbaires transmise par le GABA (acide gamma-aminobutyrique) (Merrill et Fedorko, 1984 ; Tian *et al.,* 1998). Ce neurotransmetteur agit via des récepteurs ionotropiques de type $GABA_A$ (McCrimmon *et al.,* 1995).

Ces MN sont aussi l'objet d'influx neuromodulateurs. Ceux-ci sont notamment transmis par les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé. Dans la littérature, les effets des influx sérotoninergiques sur les MN phréniques sont surtout étudiés dans le cadre du développement de la plasticité ventilatoire. Les mécanismes d'action de la sérotonine dans le cadre de la plasticité de la commande ventilatoire sont détaillés au chapitre 2 paragraphe 2 (Plasticité de la commande ventilatoire) de cette partie (État de la question) de la thèse.

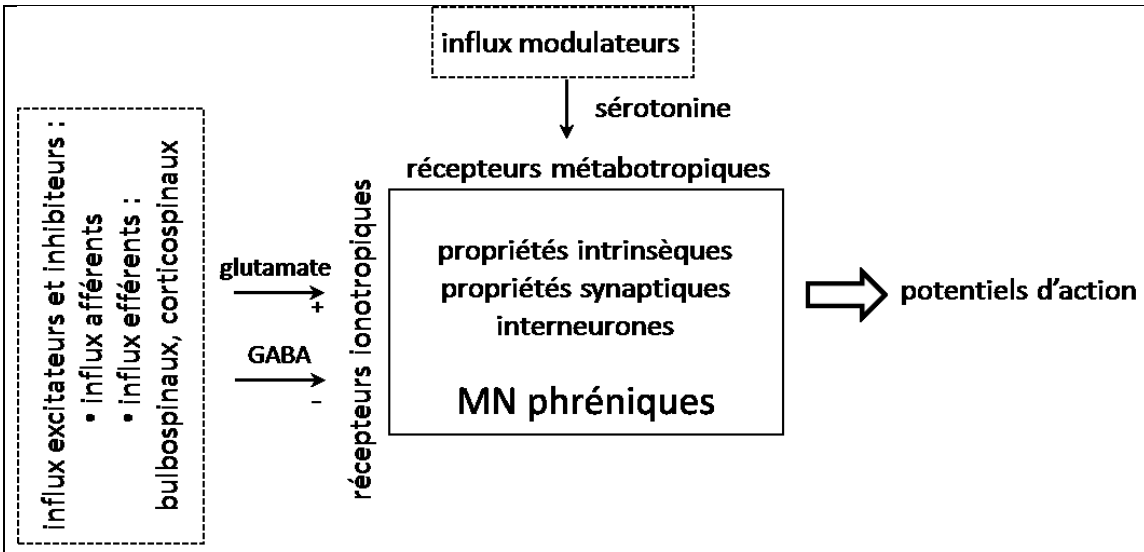


Figure n°1 : **Conception schématique des éléments intervenant dans l'excitabilité des MN phéniques**.

Les commandes bulbospinales et corticospinales sont transmises aux MN par des influx excitateurs (glutamatergiques) et inhibiteurs (GABAergiques, glycinergiques). Ces neurotransmetteurs activent des récepteurs ionotropiques au niveau de la synapse et génèrent une modification du potentiel de membrane. Selon les propriétés intrinsèques des MN et les influx qu'ils reçoivent d'interneurones spinaux, les MN génèrent un potentiel d'action qui conduit à une contraction du diaphragme. Les neuromodulateurs, notamment la sérotonine, agissent par le biais de récepteurs métabotropiques, en modifiant l'excitabilité via des changements de fonctionnement de récepteurs postsynaptiques mais aussi présynaptiques.

(Schéma adapté d'après Rekling *et al.,* 2000).

3.1.2.3. Interneurones

Les motoneurones phréniques reçoivent principalement la commande automatique d'origine bulbaire de façon monosynaptique (Ellenberger et Feldman, 1988 ; Ellenberger *et al.,* 1990). Cependant, ces influx seraient aussi transmis indirectement via des interneurones pré-phréniques situés au niveau cervical haut (C1-C3) (Lipski et Duffin, 1986 ; Lipski *et al.,* 1993 ; Lane *et al.,* 2008a,b). Ces interneurones propriospinaux, décrits chez le chat, ont une projection bilatérale sur les MN phréniques. Montrés également chez le rat (Dobbins et Feldman, 1994 ; Lane *et al.,* 2008a,b), l'hypothèse de leur existence est posée chez l'humain (Saboisky *et al.,* 2007). Leur implication neurophysiologique est supposée dans le contrôle de la décharge émise par les motoneurones phréniques en ventilation spontanée ou en cas d'altération de la commande (hémisection transverse de la moelle) (Lane *et al.,* 2009 ; Sandhu *et al.,* 2009) mais aussi pour la coordination des contractions des influx destinés aux MN phréniques et aux MN thoraciques impliqués dans le contrôle de muscles respiratoires (Butler *et al.,* 2007 ; Lane 2011).

Un autre type d'interneurones intervient dans le contrôle des potentiels d'action émis par les MN phrénique ce sont les interneurones de Renshaw. La présence de potentiels inhibiteurs pendant la stimulation de la racine ventrale du nerf phrénique permet à Lipski et collaborateurs (1985) de poser l'hypothèse de l'activation de ces interneurones par une collatérale récurrente de l'axone. L'existence de ces interneurones est actuellement reconnue chez l'animal mais non établie chez l'humain (Lee et Fuller, 2011).

3.1.2.4. Ordre de recrutement des MN phréniques

Comme pour tous les muscles squelettiques, chaque MN phrénique innerve des fibres musculaires de composition homogène formant ainsi une unité motrice (UM). Les MN de petite taille innervent des fibres musculaires lentes (*slow, S*), les plus gros, des fibres rapides (*fast, F*). Les UM d'un muscle squelettique sont recrutées selon un ordre précis qui suit le principe de la taille, dit principe d'Henneman (Henneman *et al.,* 1965). Celui-ci énonce que, pour un influx synaptique donné, les MN les plus petits sont recrutés avant les plus gros et que l'influx augmentant, des MN de taille croissante sont excités.

Cet ordre de recrutement est retrouvé en ventilation spontanée et pour de faibles efforts (Dick *et al.,* 1987 ; Jodkowski *et al.,* 1988 ; pour revue, Lee et Fuller, 2011). Cependant, lors de niveaux de ventilation plus élevés (intensités de contraction plus élevées), qu'ils soient induits de façon réflexe par chémostimulation (hypercapnie, hypoxie) ou volontaire, ce principe ne serait plus respecté (Road *et al.,* 1997 ; Butler *et al.*, 1999 ; Mantilla *et al.,* 2010 ; pour revue, Butler *et al.,* 2007).

3.2 Commande issue du tronc cérébral

3.2.1 Réseaux assurant la commande automatique

Ce niveau de commande assure la ventilation spontanée et le maintien de l'homéostasie de façon réflexe en réponse aux influx reçus des chémorécepteurs. Cette commande est étagée dans le tronc cérébral.

Les neurones respiratoires sont concentrés en trois zones principales du tronc cérébral : la colonne respiratoire ventrale, qui s'étend de la jonction entre la moelle et le bulbe jusqu'au noyau du nerf facial (VII), le groupe respiratoire dorsal situé dans le noyau du tractus solitaire (NTS) et le groupe respiratoire pontique localisé dans la partie dorsale du pont (Alheid et McCrimmon, 2008).

La ventilation spontanée, automatique dans des conditions de repos, est le résultat de l'activation de noyaux situés dans la partie la plus rostrale de la colonne ventrale. Cette commande rythmique, faite d'alternance de bouffées de potentiels d'action inspiratoires et

expiratoires, est générée successivement dans le complexe pré-Bötzinger (préBötC) et dans l'ensemble noyau rétrotrapézoïde - groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG) (Onimaru et Homma, 2003 ; Feldman et Del Negro, 2006). Ces deux groupes fonctionnent en inhibition réciproque (Richter *et al.,* 2000). Ces réseaux de neurones aux propriétés d'oscillateurs (*pace-makers*) constituent le « générateur central » du profil ventilatoire (*central pattern generator, CPG*) (Bianchi *et al.,* 1995 ; Richter *et al.,* 2000). Le rythme généré est transmis intégralement vers les motoneurones phréniques et les muscles intercostaux.

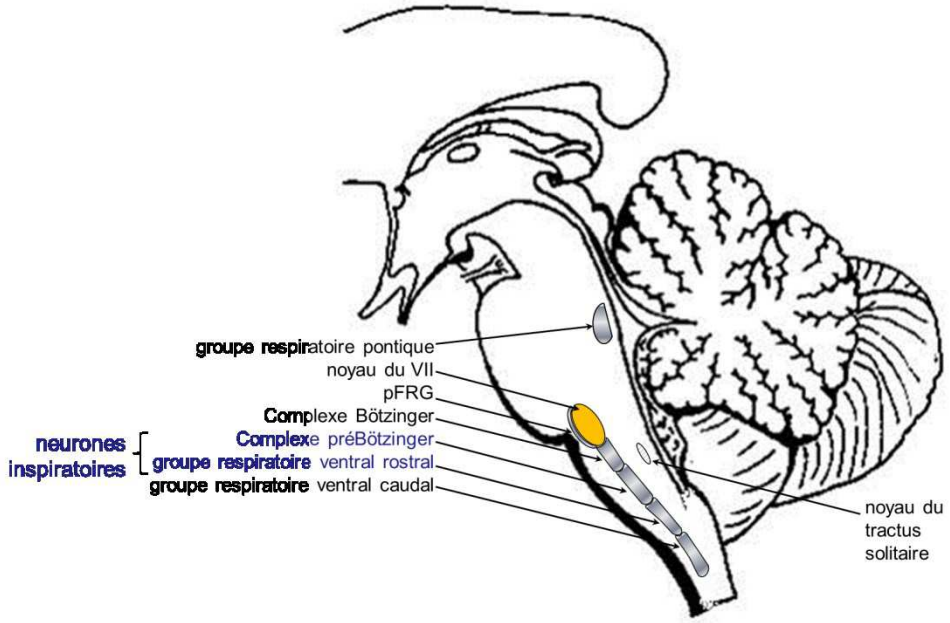


Figure n°2 : **Représentation schématique de la localisation des groupes de neurones du tronc cérébral (vue latérale) impliqués dans le contrôle de la ventilation.**

La colonne respiratoire ventrale comprend le groupe respiratoire ventral rostral et caudal.
Le groupe respiratoire dorsal est situé dans le noyau du tractus solitaire (NTS).
Le groupe respiratoire pontique est localisé dans la partie dorsale du pont.
Le groupe respiratoire ventral rostral et le complexe pré-Bötzinger constituent les neurones du groupe inspiratoire.

Le groupe respiratoire dorsal possède surtout des neurones inspiratoires groupés dans le NTS. Il reçoit de nombreuses afférences issues des poumons et des chémorécepteurs périphériques (Alheid et McCrimmon, 2008).

Des neurones phasiques situés dans le pont participent également à la formation du rythme et du patron des bouffées d'activités bulbaires (Feldman, 1986**)**. Ces neurones agissent par exemple dans la modulation du rythme bulbaire lors de tâches comme la parole ou l'exercice physique (pour revue, Duffin, 2004).

L'ensemble de ces réseaux neuronaux est impliqué dans l'activité rythmique automatique et leur activité s'accroît en réponse à une stimulation chimique (hypercapnie) comme montré par des études en tomographie par émission de positons (TEP) et en IRM fonctionnelle (IRMf) (Pattinson *et al.,* 2009 ; McKay *et al.,* 2010). En clinique, l'absence d'adaptation du comportement respiratoire des patients présentant un syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (SHACC ou syndrome d'Ondine), lorsqu'ils sont exposés à l'hypercapnie ou l'hypoxie, montre bien l'importance du circuit bulbospinal dans le contrôle automatique de la chémorégulation (Harper *et al.,* 2005; Macey *et al.,* 2005).

Les neurones bulbaires intègrent les influx afférents issus des récepteurs et les influx efférents suprabulbaires qui leur parviennent et envoient la commande résultante par la voie bulbospinale aux motoneurones des muscles respiratoires, directement ou indirectement via des interneurones propriospinaux (Aminoff et Sears, 1971 ; Yokota *et al.,* 2001 ; pour revue, Lane, 2011).

3.2.2 Voies bulbospinales

La commande ventilatoire qui émane des neurones de la partie rostrale du groupe respiratoire ventral et du groupe respiratoire dorsal est transmise aux MN phréniques. L'importance relative des projections issues de chacun de ces groupes et l'anatomie des voies véhiculant ces influx diffèrent selon les espèces étudiées. Pour exemple, chez le chat, les neurones du groupe dorsal envoient des influx aux MN phréniques controlatéraux (Dick *et al.,* 1988 ; Rikard-Bell *et al.,* 1984) mais ces fibres croisées ne sont pas retrouvées chez le rat (Tian et Duffin, 1998). Chez le rat et le lapin, les voies issues de la partie rostrale du groupe respiratoire ventral descendent homolatéralement et seules quelques fibres décussent (Lipski *et al.,* 1994 ; Tian et Duffin, 1998) au niveau du bulbe ou des étages spinaux (Duffin et Li, 2006).

Au niveau de la moelle, ces voies descendantes sont situées dans les cordons latéraux et ventraux (Feldman *et al.,* 1985). Chez le rat, les axones issus de la partie rostrale du groupe respiratoire ventral se projetant homolatéralement sont localisés dans le cordon latéral alors que ceux destinés aux motoneurones controlatéraux sont placés dans le cordon ventral et ventromédian (Lipski *et al.,* 1994).

3.3 Contrôle suprapontique

Chez l'humain sain, la ventilation est un acte automatique qui ne nécessite aucune action volontaire. Cependant, une modulation de la ventilation non liée aux modifications du métabolisme est rendue possible dans différentes situations telles que les réactions émotionnelles ou la parole par la mise en jeu de structures cérébrales.

3.3.1 Modulation émotionnelle et comportementale

Les grandeurs de la ventilation (volume courant, fréquence et débit ventilatoire) sont modifiées par les émotions ou lors de tâches non volontaires comme l'activité mentale, la posture et ses changements ainsi que lors de sensations d'inconfort respiratoire (par exemple une confrontation au CO_2 ou à des sensations dyspnéisantes).

Cette commande prend sa source dans le système limbique et paralimbique (amygdale, hippocampe, cortex cingulaire) ; il projette ses efférences vers l'hypothalamus et le complexe respiratoire bulbaire (Brannan *et al.,* 2001 ; Liotti *et al.,* 2001 ; Peiffer *et al.,* 2001 ; Evans *et al.,* 2002 ; Pattinson *et al.,* 2009) et aussi, directement, sur les MN spinaux contrôlant les muscles respiratoires (Munschauer *et al.*, 1991). Le cortex limbique, plus précisément le gyrus cingulaire, recevrait des afférences phréniques (Straus *et al.*, 1997).

Il représenterait la structure dans laquelle la sensation d'inconfort respiratoire (dyspnée) prend sa dimension affectivo-comportementale (Peiffer *et al.,* 2001).

3.3.2 Contrôle volontaire

La commande volitionnelle assure le contrôle volontaire de la ventilation pour des tâches respiratoires (apnée, manœuvres respiratoires, par exemple) ou non respiratoires (langage, par exemple). Elle est d'origine corticale et fait intervenir principalement le cortex moteur et l'aire motrice supplémentaire.

3.3.2.1. Cortex moteur primaire

L'aire motrice primaire ou M1 est située au niveau de la circonvolution frontale ascendante, en avant de la scissure de Rolando. Les muscles squelettiques sont disposés dans ce cortex selon une organisation somatotopique. La découverte de la représentation du diaphragme au sein de l'homonculus du cortex moteur primaire (M1) est faite en neurochirurgie par stimulation directe de l'aire motrice primaire (Foerster, 1936 ; Smith, 1938) puis elle est montrée par des techniques non invasives de stimulation électrique et magnétique (Gandevia et Rothwell, 1987 ; Maskill *et al.,* 1991 ; Similowski *et al.,* 1996a) (cf. Méthodes expérimentales, Chapitre 2, paragraphe 1 Stimulation magnétique transcrânienne). Chaque coupole diaphragmatique est représentée au niveau du cortex primaire controlatéral (Maskill *et al.,* 1991 ; Similowski *et al.,* 1996a).

L'homonculus est une carte déformée du corps selon l'importance de la représentation des muscles. Elle indique une zone au sein du cortex moteur pour chaque muscle ou groupe de muscles cependant il ne s'agit pas d'une cartographie exacte et même les concepteurs de cette description notent que la stimulation électrique de sites différents évoque parfois des mouvements assez similaires (Penfield et Boldrey, 1937).

Figure n°3 : **Représentation du diaphragme au sein de l'homonculus du cortex moteur primaire**.

(Adapté d'après Foerster, 1936)

Plusieurs arguments chez l'humain permettent d'étayer l'hypothèse de l'existence d'une voie directe issue des neurones du cortex primaire destinée aux motoneurones phréniques indépendante de la voie bulbospinale (Corfield *et al.,* 1998). Premièrement, l'excitation des motoneurones phréniques à partir du cortex pendant la ventilation spontanée, à différents moments du cycle respiratoire, ne modifie pas l'activité des neurones bulbaires puisque ni le profil ventilatoire, ni le volume courant suivant l'impulsion magnétique ne sont affectés par l'activation corticale (Corfield *et al.,* 1998). Ces auteurs montrent également l'absence d'influence de la dépression de l'activité des centres bulbaires (condition d'hypocapnie) sur l'amplitude de la réponse EMG évoquée en stimulation magnétique lors de ventilation de repos ou active (Corfield *et al.,* 1998). Un dernier argument indirect en faveur de l'absence d'influence de l'excitabilité de la voie bulbospinale sur la voie corticospinale vient d'une étude qui montre une corrélation similaire de la durée de la période de silence évoquée en stimulation magnétique pendant une hyperventilation réflexe ou volontaire avec la force de contraction du diaphragme (Lefaucheur et Lofaso, 2002).

Cette voie corticospinale destinée aux motoneurones phréniques est mono ou oligosynaptique ; Gandevia et Rothwell (1987) montrent que le temps de conduction central (temps de transmission de l'influx du cortex moteur aux motoneurones phréniques) est sensiblement égal à celui du deltoïde dont les MN sont situés dans les mêmes métamères. L'observation d'une paralysie diaphragmatique controlatérale à la lésion uniquement chez des patients présentant un accident vasculaire ischémique capsulaire permet de poser l'hypothèse que cette voie, dite corticophrénique, décusse totalement et que ces fibres n'empruntent que le faisceau pyramidal croisé (Similowski *et al.,* 1996a).

Le rôle fonctionnel de M1 pendant diverses tâches d'inspiration volontaire est confirmé par des études de l'activité cérébrale par imagerie (TEP ou IRMf) qui identifient une augmentation d'activité souvent bilatérale des aires corticales motrices (Colebatch *et al.,* 1991 ; Ramsay *et al.,* 1993 ; Fink *et al.,* 1996 ; Evans *et al.,* 1999 ; Smejkal *et al.,* 2000 ; McKay *et al.,* 2003 ; Nakayama *et al.,* 2004). A l'inverse, aucune activité est montrée dans ces aires lors de la ventilation sponantée ou non volontaire passive (ventilation mécanique) (Evans *et al.*, 1999) et lors d'une activation réflexe de la commande automatique (confrontation au CO_2) (Corfield *et al.,* 1995 ; Brannan *et al.,* 2001).

3.3.2.2. Aire motrice supplémentaire

D'un point de vue anatomique, l'AMS est une partie de l'aire prémotrice (aire 6 de Brodmann). Elle est située à la face médiale du gyrus frontal supérieur, en avant de la représentation du pied au sein de l'homonculus de M1. Elle est limitée en avant par le cortex préfrontal, caudalement par le lobule paracentral, ventralement par le gyrus cingulaire et latéralement par l'aire prémotrice (Fried *et al.,* 1991).

D'un point de vue anatomique et fonctionnel, l'AMS est composée de deux structures distinctes, la pré-AMS et l'AMS-proper. La limite anatomique séparant la pré-AMS en avant et l'AMS-proper en arrière est la ligne « VCA ». Celle-ci est formée par une perpendiculaire passant par le point antérieur de l'axe réunissant la commissure antérieure (CA) à la commissure postérieure (CP) du 3ème ventricule (ligne CA-CP) (Picard et Strick, 1996 ; Vorobiev *et al.,* 1998).

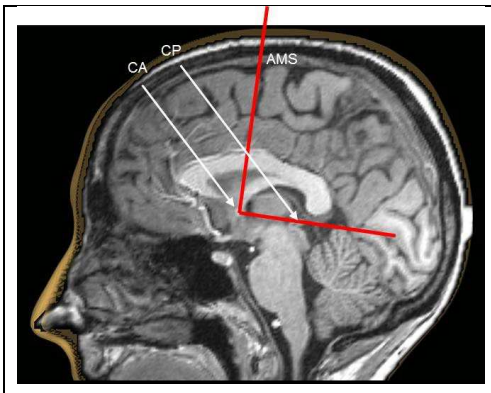


Figure n°4 : **Localisation de la position de l'AMS sur une IRM anatomique (vue sagittale) du cerveau**.

Une ligne tracée à partir de la commissure antérieure et perpendiculaire à la ligne bicommissurale réunissant la commissure antérieure (CA) à la commissure postérieure (CP) permet de définir les limites de l'AMS-proper en arrière de la ligne et la pré-AMs en avant.

(Adapté d'après Picard et Strick, 1996)

Chez l'animal comme chez l'humain, l'AMS-proper présente une organisation somatotopique dans laquelle se succèdent d'avant en arrière, la face, le membre supérieur, le tronc puis le membre inférieur (Fried *et al.,* 1991 ; Cauda *et al.,* 2011). Parmi les muscles représentés figure le diaphragme puisqu'une réponse électromyographique est enregistrée chez l'humain après activation des neurones de cette aire par une technique de stimulation magnétique transcrânienne (TMS) (Sharshar *et al.,* 2004a) (cette technique est détaillée dans la partie Méthodes expérimentales, Chapitre 1, paragraphe 1 Stimulation magnétique transcrânienne). La comparaison des caractéristiques des potentiels évoqués moteurs (latence et amplitude) à partir de la représentation du diaphragme au niveau de l'AMS et de M1 permettent de suggérer l'existence d'une voie directe entre l'AMS et les MN phréniques (Sharshar *et al.,* 2004a).

Les études chez l'animal montrent l'existence de nombreuses fibres d'association unissant l'AMS-proper avec les aires motrices primaires homolatérale et controlatérale et les aires prémotrices (Picard et Strick, 1996 ; Johansen-Berg *et al.,* 2004) ; l'AMS est également impliquée dans des boucles du contrôle moteur cortical comprenant les cortex sensitifs primaire et secondaire, le cortex pariétal associatif et des régions sous-corticales (ganglions de la base, thalamus), le cervelet et les noyaux du pont (Fink *et al.,* 1996 ; Lehéricy *et al.,* 2004 ; pour revue, Nachev *et al.,* 2008).

L'AMS serait impliquée dans de nombreux processus moteurs et fonctions exécutives parmi lesquels, le contrôle de tâches dites complexes (en opposition aux mouvements simples) (Roland *et al.*, 1980), la programmation des mouvements volontaires (auto-initiés vs extérieurement guidés) (Cunnington *et al.*, 2002), la programmation temporelle (encodage et

estimation de la durée d'un événement) (Macar *et al.*, 2006), la vitesse du mouvement et sa direction (Tankus *et al.*, 2009), l'exécution réelle d'un mouvement moteur mais aussi l'inhibition d'une action (Sumner *et al.*, 2007 ; pour revue, Nachev *et al.*, 2008).

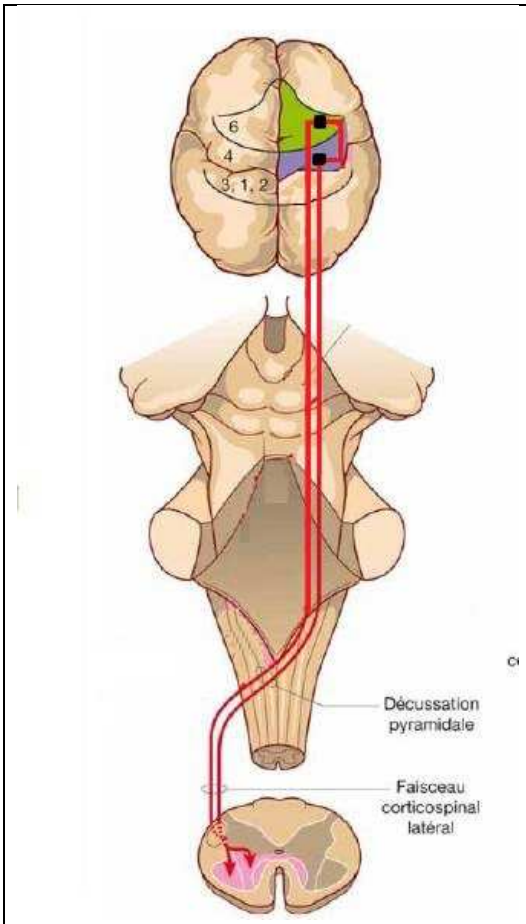


Figure n°5 : **Représentation schématique des deux voies corticophréniques**.

Une voie est issue du cortex moteur primaire et l'autre voie de l'aire motrice supplémentaire (AMS). Ces deux voies empruntent le faisceau corticospinal et sont destinées aux motoneurones phréniques.
Des fibres cortico-corticales unissent les deux aires motrices.

Une activation au niveau de l'AMS lors de manœuvres de ventilation volontaire est mise en évidence par des enregistrements en imagerie fonctionnelle (PET, IRMf) (Colebatch *et al.,* 1991 ; Ramsay *et al.,* 1993 ; Evans *et al.,* 1999 ; McKay *et al.,* 2003) et en électroencéphalographie (EEG) (Macefield et Gandevia 1991 ; Raux *et al.*, 2007a, b, 2013 ; Trémoureux *et al.,* 2010, 2014). De même que pour M1, aucune activation n'est détectée en ventilation de repos par les techniques usuelles d'EEG et d'imagerie fonctionnelle. La présence d'une activité au niveau des aires prémotrices est retrouvée en EEG sous la forme d'un potentiel prémoteur enregistré au vertex 1,5 à 2 secondes avant le début d'une

manœuvre inspiratoire volontaire ; ce potentiel est nommé potentiel préinspiratoire (Macefield et Gandevia 1991 ; Raux *et al.*, 2007a, b, 2013 ; Trémoureux *et al.,* 2010, 2014). La présence de ce potentiel, dont l'amplitude est maximale au vertex (position Cz), est mis en lien avec la préparation du mouvement (Barrett *et al.,* 1986 ; Deecke *et al.,* 1987). Ce potentiel semble trouver sa source au sein de l'AMS, du cortex prémoteur et de M1. Par analogie avec le potentiel prémoteur, il pourrait indiquer une facilitation de l'activité du cortex moteur par l'AMS avant le début du mouvement (Ball *et al.,* 1999 ; Colebatch, 2007).

Le rôle de l'AMS dans la préparation du mouvement serait ainsi non seulement d'augmenter l'excitabilité de M1 mais aussi d'élaborer et de traiter, avec d'autres régions cérébrales, un message participant au contrôle du mouvement.

Connaître l'état de notre corps, la position de nos membres et leur vitesse de déplacement, par exemple, est fondamental pour assurer un contrôle moteur précis. La correction des mouvements rétroactivement à partir des afférences sensorielles qui renseignent sur l'état du système est un mécanisme trop lent pour permettre un contrôle moteur optimal. Le modèle de la copie d'efférence propose qu'un signal sensitif prédictif des conséquences du mouvement soit adressé aux structures centrales simultanément à la commande motrice adressée aux effecteurs. Ce message contient une anticipation des conséquences sensitives du mouvement. La comparaison des afférences réelles à cette copie permet d'évaluer la réussite du mouvement. Ainsi toute réafférence obtenue au cours du mouvement qui ne correspond pas aux réafférences anticipées provoque un ajustement du geste ; en revanche, tant que les réafférences continuent, en suivant le flux de l'action, à être conformes aux réafférences attendues, aucun réajustement n'est opéré (Wolpert et Flanagan, 2001 ; Feldman, 2009 ; Shadmehr *et al.*, 2010).

En parallèle à ce mécanisme d'estimation des conséquences motrices, la copie d'efférence permet le filtrage des messages sensitifs en atténuant les informations non pertinentes attendues et en accentuant des sensations importantes en discordance avec les réafférences prédites (Shadmehr *et al.*, 2010).

Les études en TMS (Haggard et Whitford, 2004 ; Makoshi *et al.*, 2011) et en imagerie fonctionnelle (Stock *et al.*, 2013) montrent que l'AMS participe à la production et l'intégration de cette copie d'efférence.

Haggard et Whitford (2004) étudient le rôle de l'AMS dans la suppression des retours sensitifs lors de la préparation et l'exécution d'actions volontaires. Ils montrent qu'une flexion volontaire de l'index réduit la perception de la réponse motrice générée par une impulsion en choc unique de TMS délivrée sur l'aire motrice du doigt lorsque les deux mouvements se déroulent simultanément. Cette suppression sensitive disparait lorsque l'AMS est stimulée

en TMS 10ms avant que l'impulsion ne soit délivrée sur M1. Ces auteurs suggèrent que l'AMS produit une copie d'efférence qui permet la suppression du message réafférent généré par le mouvement.

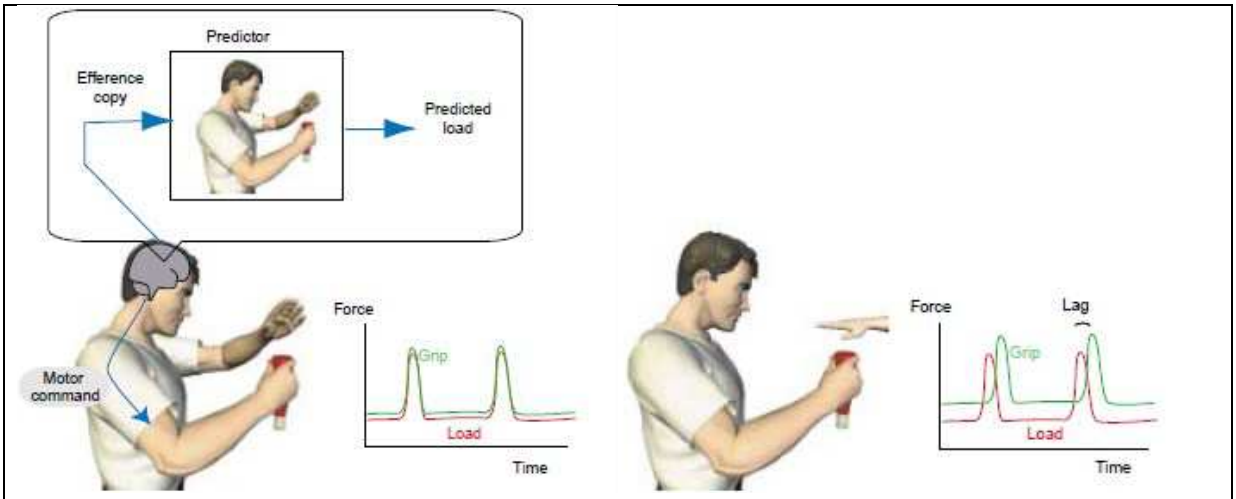


Figure n°6 : **Représentation de la notion de copie d'efférence**.

Pour tenir un objet dans la main, il faut exercer une force de pression nécessaire pour éviter tout glissement. Lorsque le sujet appuie lui-même sur l'objet puis relâche brutalement, l'augmentation et la diminution de la force de serrage de l'objet suivent fidèlement la courbe d'augmentation du poids appliqué sur l'objet.
En revanche, la même adjonction de poids par un appui extérieur se traduit par un décalage dans la réaction de serrage et par une augmentation de la force exercée pour prévenir le glissement de l'objet.
Dans la 1ère situation, une copie d'efférence de la commande motrice à venir permet l'anticipation parfaite des modifications à venir.
Dans la 2nde situation, les forces sont exercées a priori (augmentation de la force de serrage) et a postériori (décalage) en réaction aux conséquences des changements induits.

(Adapté d'après Wolpert et Flanagan, 2001)

Une deuxième étude montre la dégradation de la préparation d'un mouvement de port d'un poids lorsqu'une impulsion en TMS en simple choc en regard de l'AMS est délivrée 400ms avant le début du mouvement (Makoshi *et al.*, 2011). La stimulation de l'AMS perturberait la planification correcte du mouvement en altérant la production d'une copie d'efférence par l'AMS.

De même, l'application d'un protocole facilitateur en stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS à 10Hz) sur l'AMS au moment où débute l'action induit une surestimation de la force nécessaire à la réalisation d'un mouvement de saisie pouce-index (White *et al.*, 2013) ; cet effet serait la conséquence d'une modification du fonctionnement de l'AMS dans son rôle d'élaboration de messages internes de type copie d'efférence.

L'AMS est impliquée dans ce processus au sein d'un large réseau comprenant le cortex prémoteur, le cervelet, les ganglions de la base, le cortex sensoriel primaire (Wolpert et Ghahramani, 2000 ; Lafargue et Sirigu, 2006).

Au niveau de la commande ventilatoire, un déséquilibre entre la copie de la commande motrice produite et les réafférences de l'action des muscles respiratoires sur les poumons conduirait à un message d'alerte se traduisant par une sensation de ventilation non récompensée par un débit inspiratoire c'est-à-dire d'effort inspiratoire excessif (Parshall *et al.*, 2012).

Les afférences ventilatoires sont transmises à différentes structures neurales centrales selon qu'elles transmettent des informations relatives à l'intensité des sensations ou à leur composante émotionnelle. Ces dernières sont traitées au niveau du cortex limbique alors que les afférences discriminatives sont envoyées au cortex somato-sensoriel. Grace à une technique de localisation de source, Logie et collaborateurs (1998) montrent que le potentiel évoqué sensitif respiratoire recueilli suite à une occlusion inattendue des voies aériennes reflète l'activation de l'AMS. Les messages de l'ensemble des éléments impliqués dans la ventilation parviendraient à l'AMS qui constituerait ainsi un lieu d'intégration des informations motrices, sensitives (notamment proprioceptives ou nociceptives) (Gandevia et Macefield, 1989 ; Zifko *et al.*, 1996 ; Straus *et al.*, 1997 ; Logie *et al.*, 1998). L'hypothèse de la perturbation du mécanisme de copie d'efférence est posée dans le cadre de la dyspnée générée par l'effort respiratoire excessif chez les patients (O'Donnell *et al.*, 2007).

3.3.2.3. Implication des aires motrices dans la ventilation

Le rôle du cortex en ventilation spontanée est d'abord proposé par Fink (1961) qui fait le constat d'une nette différence de comportement respiratoire chez les sujets hyperventilés sous ventilation mécanique lorsqu'ils sont anesthésiés ou éveillés. L'hypocapnie induite par l'hyperventilation conduit à une diminution réflexe des influx bulbaires et dans la condition où les sujets sont anesthésiés, Fink et collaborateurs (1961, 1963) notent la présence de nombreuses et longues périodes d'apnées, inexistantes à l'éveil.

Diverses études menées chez des sujets anesthésiés ou en sommeil lent confirment cette observation. L'anesthésie et le sommeil lent (NREM) ont en commun de diminuer l'excitabilité des aires motrices (M1 et AMS) et l'activité des réseaux fonctionnels corticaux (Massimini *et al.*, 2005).

Des sujets rendus hypocapniques pendant le sommeil lent (*non-rapid eye movement*, *NREM*) présentent des apnées (Skatrud et Dempsey, 1983 ; Datta *et al.,* 1991). Heywood et collaborateurs (1996) confirment le rôle de la commande corticale dans la préservation de la ventilation en cas d'absence de stimulation métabolique de la commande bulbaire en

observant la présence d'apnées induite par l'hypocapnie chez un patient éveillé présentant, suite à un *locked-in syndrom*, une interruption des projections corticospinales.
Le rôle des commandes corticales est aussi montré lors de la soumission artificielle à une contrainte mécanique (charge) qui impose la production d'un effort à l'inspiration. Cette charge induit une hypoventilation chez les sujets anesthésiés ou endormis (Whitelaw *et al.,* 1976 ; Polacheck, 1980 ; Wiegand *et al.,* 1988). Ce même comportement est noté chez l'animal qui hypoventile dans un premier temps et n'augmente sa ventilation que secondairement en réponse à la stimulation chimique liée à l'hypercapnie résultant de la diminution du volume courant. En revanche, chez l'humain éveillé, la compensation de charge est immédiate et l'augmentation de la commande destinée aux muscles respiratoires prévient l'hypoventilation voire induit une hyperventilation (Axen et Haas, 1979 ; Yanos *et al.,* 1990).

La participation des réseaux corticaux à la ventilation à l'éveil est confirmée en électrophysiologie par les résultats d'une étude mettant en évidence la diminution de la réponse du diaphragme à la stimulation magnétique en simple choc pendant le sommeil (Méhiri *et al.,* 2006). Cette étude démontre également que l'éveil diminue l'amplitude de la facilitation de la réponse induite par l'inspiration spontanée. Ceci est en faveur de l'existence d'un tonus cortical ventilatoire à l'éveil (Méhiri *et al.,* 2006). L'étude électrophysiologique de l'excitabilité de la voie corticospinale par TMS lors d'un processus de compensation de charge ventilatoire mécanique à l'éveil met également en évidence l'implication de la commande issue des aires motrices dans ce processus de préservation de la ventilation (Locher *et al.,* 2006).

Fink nomme ce phénomène *wakefulness drive to breathe* (Fink, 1961; Fink *et al.*, 1963).

L'étude de patients présentant un syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale permet de préciser les aires motrices impliquées dans le phénomène de *wakefulness drive to breathe*. En effet, Trémoureux et collaborateurs (2014) montrent la présence de potentiels pré-inspiratoires au cours de la ventilation de repos à l'éveil chez ce type de patients dont la commande automatique de la ventilation est déficiente. Ces potentiels sont absents chez les sujets témoins dans les mêmes conditions. Ce constat conduit les auteurs à suggérer que c'est l'activation de l'AMS à l'éveil qui permet le maintien de la ventilation au cours de l'hypoventilation alvéolaire congénitale (plasticité ventilatoire de type « lésionnel »). L'abolition de la connectivité intracorticale par le sommeil serait, dans cette hypothèse, à l'origine de l'expression du déficit ventilatoire automatique caractéristique de la maladie et de la profonde hypoventilation correspondante.

Ces études révèlent le rôle excitateur des aires corticales motrices sur la commande ventilatoire à l'éveil, mais celles-ci enverraient également des projections inhibitrices sur les centres de la commande automatique bulbaire (McKay *et al.*, 2008). En clinique, à partir de l'étude d'un patient présentant une apraxie respiratoire, Haouzi et collaborateurs (2006) montrent la persistance de l'activité rythmique des oscillateurs bulbaires lors de l'apnée volontaires. Ils proposent que cette absence d'inhibition de l'activité spontanée soit liée à une lésion de l'AMS.

CHAPITRE 2 : PLASTICITÉ DE LA COMMANDE VENTILATOIRE ET TECHNIQUES NON INVASIVES D'INDUCTION DE PLASTICITÉ

La capacité du système de commande ventilatoire à évoluer au cours du développement est une évidence mais le caractère indispensable de cette fonction à la survie des espèces a longtemps fait penser que son contrôle était fixe, immuable et génétiquement déterminé à l'âge adulte. Toutefois, depuis les années 1980, plusieurs équipes rapportent des évolutions durables de son fonctionnement en réponse à divers mécanismes physiologiques ou pathologiques, attestant ainsi des capacités de plasticité du contrôle ventilatoire.

Par ailleurs, dans la même décennie, sont apparues diverses techniques non invasives offrant la possibilité de modifier l'excitabilité du système nerveux central (SNC) afin d'induire « artificiellement » une plasticité. Ces dispositifs ont évolué et sont maintenant couramment utilisés dans les études physiologiques et pour des traitements (neurologie, psychiatrie,…).

1. Plasticité de la commande neurale

1.1 Généralités sur plasticité

Au niveau du SNC, la plasticité est définie comme la faculté du système nerveux à modifier sa réponse à une stimulation donnée (ou à l'absence prolongée de stimulation) au-delà de l'arrêt du mécanisme qui l'a fait naître. Ce processus est mis en jeu suite à des contraintes imposées par une modification de l'environnement (apprentissage, mémorisation, enrichissement/déprivation sensoriels) ou par des changements d'états physiologiques (développement, vieillissement normal, lésion aiguë ou chronique du système nerveux ou d'un autre système impliquant le système nerveux). Son but est d'améliorer le fonctionnement du système à travers l'évolution de ses réseaux neuronaux (Wolpaw et Carp, 2006).

Ce mécanisme peut se traduire par des modifications à différents niveaux d'organisation du système nerveux, depuis le niveau macroscopique (cortical, sous-cortical et spinal), la synapse jusqu'à des modifications des cellules elles-mêmes (Duffau, 2006).

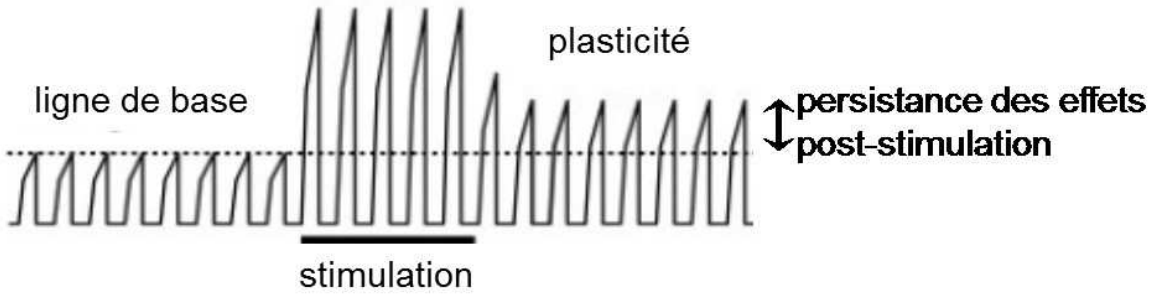


Figure n°7 : **Schématisation d'un phénomène de plasticité.**
Pendant la stimulation, la réponse du système est accrue par rapport à la ligne de base ; la plasticité se manifeste par une augmentation de la réponse qui persiste après l'arrêt de la stimulation qui l'a fait naitre. Les mécanismes de la plasticité induit une modification durable du fonctionnement du système aux stimulus en fonction des expériences vécues.

(Adapté d'après Mitchell et Johnson, 2003)

1.2 Formes temporelles de la plasticité

Deux formes de plasticité sont décrites en fonction de leur décours temporel allant de quelques millisecondes à plusieurs dizaines de minutes voire des heures.

1.2.1 Plasticité à court terme

Les modifications synaptiques à court terme sont généralement évoquées par des stimulations répétées. L'amplitude de la réponse après stimulation exprimée en relation à la ligne de base traduit une facilitation (*short term potentiation, STP*) ou une dépression à court terme (*short term depression, STD*).

L'exemple le plus étudié de plasticité à court-terme est un réflexe respiratoire conditionné chez un mollusque gastéropode, l'aplysie (pour revue, Kandel, 2001). Ce réflexe, mono ou polysynaptique, est lié à l'activation coordonnée de neurones sensoriels et moteurs.
Le sens de la réponse dépend du type de stimulus et de sa fréquence ; l'intensité de la réponse est modulée par l'expérience. Deux types de comportements sous-tendus par des mécanismes différents sont décrits, la sensibilisation et l'habituation du réflexe de rétraction. Ils correspondent à deux formes de mémoire à court terme, la potentialisation ou la dépression à court terme de la réponse (STP ; STD). Le mécanisme de sensibilisation est mis en évidence par l'application consécutive d'une stimulation neutre (tactile) du manteau et d'une stimulation nociceptive (choc électrique) sur la queue ou la tête du mollusque. Après répétition de cette association, les stimulations tactiles seules entrainent des réponses de rétraction branchiale plus importantes qu'avant conditionnement, exprimant un mécanisme de STP. Le développement de cette STP repose sur l'existence d'un intervalle interstimulus

bref entre le stimulus inconditionnel (le choc électrique) et le stimulus conditionné. A l'inverse, le phénomène d'habituation se caractérise par une atténuation de la réponse suite à l'application répétée d'un stimulus non nociceptif. La répétition des stimulations se traduit par une diminution du mouvement de retrait sous-tendue par un mécanisme de STD (Castellucci *et al.* 1980).

Les mécanismes de l'altération de la réponse reposent principalement sur des modifications présynaptiques (les afférences sensorielles) et ils n'impliquent pas ou peu de modification de l'efficacité de la partie postsynaptique (le motoneurone).

Les mécanismes de la STP reposent sur une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et sur l'activation de neurones modulateurs.
En arrivant au niveau du bouton présynaptique, le potentiel d'action ouvre des canaux calciques voltage dépendant. L'arrivée successive de ces potentiels augmente la quantité de calcium (Ca^{2+}) présent dans la terminaison. La forte quantité de Ca^{2+} accroît proportionnellement la probabilité de la libération du neurotransmetteur en permettant la fixation des vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur à la membrane synaptique. L'afflux massif de calcium s'accompagne d'une inactivation des canaux potassiques (K^+). La repolarisation de la membrane présynaptique est retardée, la quantité de neurotransmetteur libéré est accrue et la dépolarisation de la membrane postsynaptique est plus importante. Le stimulus inconditionnel active des neurones libérant un neuromodulateur (la sérotonine). Cette libération est plus intense lorsque les neurones sensoriels sont préalablement stimulés. La fixation de la sérotonine sur son récepteur métabotropique au niveau l'élément présynaptique, entraine, via une cascade complexe de réactions, une augmentation de l'activité des canaux Ca^{2+} et la diminution de celle des canaux K^+ ; cette neuromodulation participe ainsi au renforcement de la STP de la réponse (pour revue, Zucker et Regehr, 2002).

A l'inverse, la diminution de la réponse par STD est liée à une diminution de la transmission synaptique. La quantité de neurotransmetteur libérée décroît au fur et à mesure de l'arrivée des potentiels d'action par diminution du nombre de vésicules pouvant être ancrées à la membrane ; ce mécanisme est associé à l'action au niveau présynaptique et/ou postsynaptique de substances neuromodulatrices inhibitrices ($GABA_B$) conduisant à l'inactivation de canaux calciques présynaptiques. Un autre élément est la diminution de la sensibilité des récepteurs postsynaptiques au neurotransmetteur (pour revue, Zucker et Regehr, 2002).

Ce type de plasticité à court terme existe aussi chez le mammifère. La STP/STD permettent aux synapses d'agir comme des filtres et de transmettre les potentiels avec plus ou moins

d'efficacité selon la fréquence à laquelle elles sont stimulées (pour revue, Abbott et Regehr, 2004). Cette plasticité jouerait un rôle important dans les adaptations sensorimotrices brèves et la mémoire à court terme (Citri et Malenka, 2008).

1.2.2 Plasticité à long terme

Les stimulations de courte durée conduisent à des formes de plasticité de type STP. Mais lorsque les stimulus faisant naitre la plasticité sont appliqués de façon répétée, ces modifications se traduisent par des altérations à long terme connues sous le nom de plasticité à long terme (LTP). L'accroissement de la réponse par mécanisme de plasticité synaptique est nommé potentiation ou facilitation à long terme (*long term potentiation*, LTP ; *long term facilitation, LTF*) ; le mécanisme inverse, au cours duquel l'efficacité de la transmission synaptique est réduite et la réponse est diminuée, est appelé dépression à long terme (*long term depression*, LTD).

Ces phénomènes de LTP/LTD sont très étudiés car ils sous-tendent les mécanismes de la mémoire et de l'apprentissage. Ces phénomènes reposent notamment sur les modifications de la force de transmission synaptique mais aussi sur des modifications ne faisant pas directement intervenir la synapse. Ces phénomènes de plasticité synaptique et non synaptique sont décrits à différents niveaux du système nerveux central et notamment le cortex moteur primaire (Aroniadou et Keller, 1995) et la moelle épinière (pour revue, Wolpaw, 2007). Les modifications générées sont finement régulés par des mécanismes de plasticité homéostasiques.

1.2.3 Plasticité synaptique

Il est classique de distinguer deux formes de plasticité selon les protocoles qui les induisent. La plasticité homosynaptique ou non associative, se manifeste en réponse à des stimulations répétitives d'une voie afférente alors que la plasticité associative ou hebbienne dépend de la relation temporelle existant entre les activités pré et postsynaptiques et implique diverses voies.

La plasticité de la transmission synaptique est généralement décrite au niveau de synapses glutamatergiques, excitatrices, mais elle implique aussi des synapses GABAergiques, inhibitrices.

1.2.3.1. Plasticité homosynaptique ou non associative

Les premières démonstrations de l'existence de phénomènes de LTP homosynaptique sont faites in vivo sur les cellules hippocampiques de lapins anesthésiés (Bliss et Lomo, 1973) et éveillés (Bliss et Gardner-Medwin, 1973). Les auteurs observent que des trains de

stimulation électriques à haute fréquence (≈ 100Hz) sur une voie afférente en provenance de la région CA3 induit une augmentation durable des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) des neurones de la région CA1 de l'hippocampe au stimulus test (Bliss et Lomo, 1973). Cette augmentation repose sur la coïncidence des dépolarisations des éléments pré et postsynaptique induite par la stimulation à haute fréquence.

Cette plasticité est dite homosynaptique puisqu'elle se développe exclusivement dans la synapse entre la fibre afférente et le neurone post-synaptique.

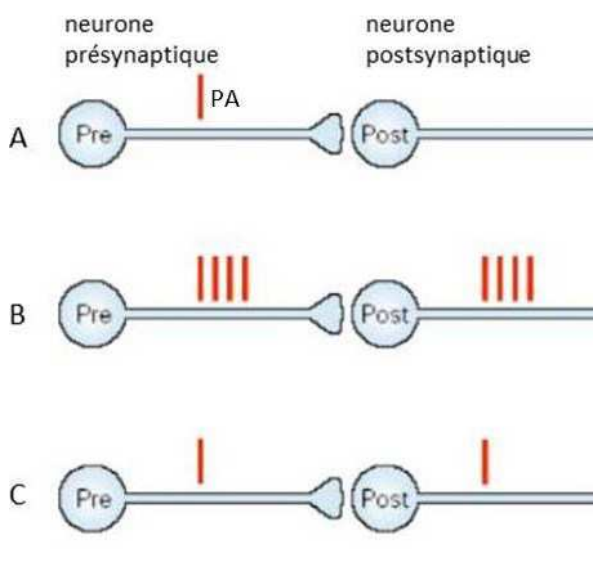
Dans ces études, la facilitation persiste pendant plusieurs jours et la répétition des stimulations conduit, chez un animal, à des modifications jusqu'à plusieurs mois (Bliss et Gardner-Medwin, 1973). Des résultats similaires sont retrouvés par d'autres équipes chez des rats et pour des zones corticales étendues à tout le cortex (pour revue, Abraham, 2003). L'induction de LTP au niveau du cortex somatosensoriel est étudiée in vivo chez des rats. Les auteurs montrent que la formation de LTP n'apparait qu'après la répétition de trains de stimulations à haute fréquence (300Hz) sur plusieurs jours (Racine *et al.,* 1995).

Toutes ces études soulignent l'importance des paramètres de la stimulation et celle de la répétition des stimulations au sein d'une même journée ou sur des jours consécutifs (Bliss et Gardner-Medwin 1973 ; Abraham *et al.,* 2002 **;** pour revue, Abraham, 2003). Ainsi, l'application de trains de stimulations espacés de 5 à 10 minutes est d'une efficacité supérieure à l'application du même nombre total de stimulus en un seul train (Abraham *et al.,* 2002).

Un phénomène inverse à la LTP c'est-à-dire une dépression persistante de la réponse de la cellule post synaptique est mis en évidence, chez le lapin, en réponse à des trains de stimulations à basse fréquence (1Hz) appliqués sur les afférences olivaires des cellules de Purkinje du cervelet (Ito *et al.,* 1982).

1.2.3.2. Plasticité associative

La plasticité synaptique a été développée par Donald Hebb qui énonce que la mémoire résulte de modifications de l'efficacité synaptique entre neurones liés par une synapse : « *when an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased* » (Cooper, 2005).



A : la synapse entre neurone pré et postsynaptique n'est pas assez permissive pour permettre la transmission du potentiel d'action (PA, barre rouge)

B : Une plus forte activité du neurone présynaptique conduit à la transmission des potentiels d'action au neurone postsynaptique. L'activation concomitante des neurones pré et post-synaptiques occasionne une modification de l'activité de la synapse.

C : la synapse est renforcée ; le passage du PA est facilité et un même PA induit une activité sur le neurone postsynaptique.

Figure n°8 : **Schématisation de la plasticité synaptique associative**.

Cette théorie stipule que l'efficacité de la connectivité entre deux neurones augmente lorsqu'il existe une relation causale entre leurs activités respectives. Ces changements reposent sur la coïncidence de l'activation des synapses pré et postsynaptiques et dépendent de l'activité préalable des éléments neuronaux directement impliqués (Ganguly *et al.*, 2000). Ce mécanisme induit un renforcement des liens fonctionnels préexistants entre les neurones et se traduit par une consolidation de schémas d'activation puis à un apprentissage (Donoghue, 1995 ; Rioult-Pedotti *et al.,* 2000 ; pour revue, Sanes et Donoghue, 2000). A l'inverse, une LTD associative est induite par une désynchronisation des activités pré et postsynaptiques (Stent, 1973). Elle résulte en une diminution de la force de transmission.

Les études in vitro révèlent les autres caractéristiques de cette plasticité. Tout d'abord elle est spécifique de la voie dans laquelle la plasticité est induite puisque des synapses voisines peuvent être l'objet d'une potentialisation pour l'une et d'une dépression pour l'autre. D'autre part, elle repose sur l'associativité car si la stimulation sur une voie n'est pas suffisante pour générer de la plasticité, ces dépolarisations sous liminaire peuvent néanmoins conduire à une potentiation si elles sont couplées avec celles d'une voie séparée mais convergent sur le même neurone postsynaptique, conduisant ainsi au renforcement des deux voies. Enfin, cette plasticité ne se développe qu'au-delà d'un certain seuil, c'est-à-dire qu'un nombre suffisant de fibres présynaptiques doivent être activées simultanément pour générer de la plasticité, c'est la propriété de coopérativité (Sjöström *et al.*, 2001).

La mémoire et l'apprentissage reposeraient sur ce mécanisme qui dépend de l'ordre temporel des stimulations de l'élément pré et post-synaptique.

1.2.4 Plasticité intrinsèque

La plasticité intrinsèque peut être succinctement définie comme les modifications persistantes des décharges des neurones liées à des changements de leur niveau d'excitabilité. Celle-ci est fonction de l'état de modulation des canaux voltage dépendants quel que soit leur position sur le neurone (dendritique, soma, axone). Ces modifications sont le résultat d'altérations (qualitatives ou quantitatives) des propriétés des neurones comme, par exemple, la composition la membrane plasmique en canaux voltage dépendant potassiques, sodiques et surtout calciques (pour revue, Daoudal et Debanne, 2003).

Ce n'est que récemment qu'une première étude met en évidence la participation de zones du neurone spécialisées dans l'intégration et la genèse du message nerveux dans les mécanismes de plasticité induits par l'apprentissage de comportement (Spitzer, 1999). Chez des chats entrainés avec un conditionnement classique composé de l'association d'une tape sur la glabelle précédé d'un son, les enregistrements intracellulaires au niveau du cortex sensorimoteur montrent une augmentation durable (> 28 jours) de l'excitabilité des cellules motrices impliquées dans la réponse conditionnelle (clignement des yeux et retrait de la truffe) (Brons et Woody, 1980). D'autres études chez le rat montrent des mécanismes de plasticité intrinsèque suite à des conditionnements classiques ou opérants (pour revue, Zhang et Linden, 2003).

Il est maintenant admis que la plasticité non synaptique interagit ainsi de manière cohérente avec la plasticité synaptique et participe à tous les mécanismes d'induction de plasticité et ces formes de plasticité sont toutes deux impliquées fonctionnellement dans les phénomènes de stockage (mémoire, apprentissage) et de façon plus générale, d'adaptation du SNC (pour revues, Daoudal et Debanne,2003 ; Zhang et Linden, 2003).

1.3 Mécanismes de la plasticité

1.3.1 Mécanismes de la plasticité synaptique

Au niveau des synapses excitatrices glutamatergiques, les mécanismes de la plasticité synaptique (associative ou non associative) reposent principalement, sur trois phénomènes : l'activation de récepteurs ionotropiques au glutamate (NMDA et non NMDA), l'augmentation postsynaptique des niveaux calciques et la diminution de l'inhibition postsynaptique (pour revue, Malenka et Bear, 2004).

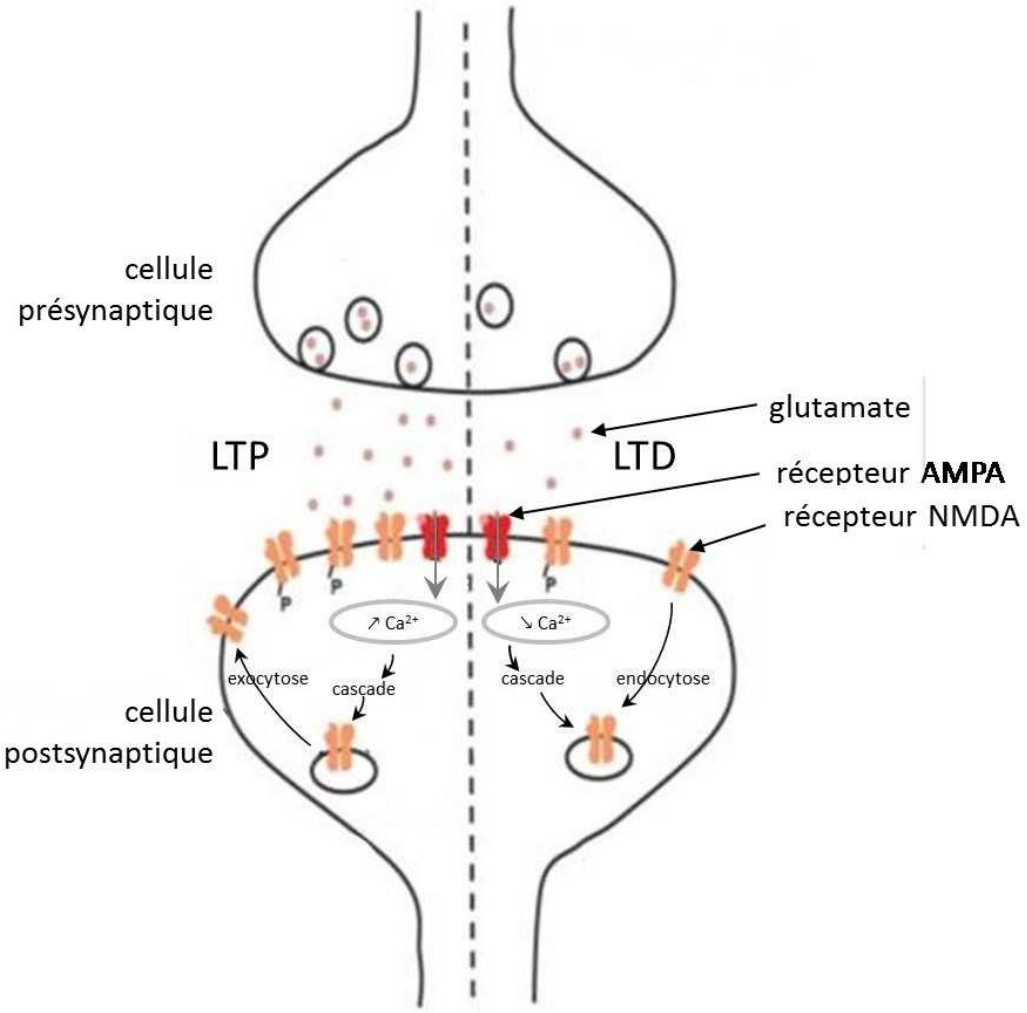


Figure n°9 : **Schématisation de l'induction de la LTP et de la LTD au niveau d'une synapse excitatrice**.
L'arrivée du potentiel d'action au niveau du bouton synaptique provoque une libération de glutamate. Ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs AMPA et NMDA au niveau postsynaptique. L'activation des récepteurs NMDA provoque un important flux entrant en Ca^{2+} au niveau postsynaptique. Le calcium participe à une cascade importante d'évènements permettant l'expression et le maintien de la LTP par l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA à la synapse.
A l'inverse, une libération moins importante de glutamate provoque, par ouverture des récepteurs NMDA une entrée en Ca^{2+} de plus faible importance au niveau postsynaptique. Cette moindre concentration en calcium intracellulaire induit l'activation de cascades différentes conduisant à l'expression de la LTD et à son maintien par déphosphorylation et endocytose de récepteurs AMPA. La LTD se traduit ainsi par une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la synapse

(Adapté à partir de Le Roux *et al.*, 2008)

Pour de faibles influx, le récepteur NMDA ne participe pas ou peu à la transmission synaptique car son canal, voltage dépendant, est bloqué par la présence d'un ion magnésium (Mg^{2+}). Seuls les autres canaux ionotropiques sont ouverts et permettent les flux ioniques conduisant à la dépolarisation. Lorsque la polarité de la membrane parvient à une valeur seuil, l'ion magnésium est libéré de son site de fixation au sein du récepteur NMDA. Le pore du canal dépendent du voltage, ainsi largement ouvert, permet un flux entrant, transitoire et important, de Ca^{2+} qui induit la dépolarisation de la membrane postsynaptique (une augmentation faible et lente du flux de calcium induirait une LTD) (pour revue, Caporale et Dan, 2008). Dans ce processus, les récepteurs NMDA représentent un détecteur de coïncidence entre l'activité pré et postsynaptique puisque l'ouverture du canal voltage dépendant repose sur la présence de glutamate, reflet d'une activité présynaptique et d'une dépolarisation de la membrane post synaptique (pour revue, Bliss et Collingridge, 1993).
En plus de sa liaison aux récepteurs ionotropiques (NMDA), le glutamate agit également sur des récepteurs métabotropiques (AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) couplés aux protéines G qui active (ou inhibe dans le cas de LTD) une enzyme (phospholipase, cyclase, kinase). Celle-ci va modifier la concentration intracellulaire de seconds messagers (adénosine monophosphate cyclique, ...) dont le rôle est d'activer des réactions biochimiques successives impliquant principalement des protéines kinases. Cette cascade conduit à une modification des récepteurs AMPA présents, à l'insertion de nouveaux récepteurs à la surface de la membrane postsynaptique et à leur stabilisation par des protéines d'ancrage ainsi qu'à la régulation de la concentration du calcium intracellulaire. Ces divers événements sont à la base d'une élévation rapide de la sensibilité des cellules postsynaptiques au glutamate (Engert et Bonhoeffer, 1999 ; pour revue, Malenka et Bear, 2004).
A ces modifications postsynaptiques s'ajoutent des mécanismes présynaptiques d'augmentation de la quantité de glutamate libéré (Lynch, 2004).

Les systèmes de seconds messagers mis en jeu dans la LTP ou la LTD impliquent l'activation de phosphatases qui sont responsables réciproquement de l'externalisation ou de l'internalisation de récepteurs AMPA au niveau de la membrane post synaptique mais aussi du remodelage persistant de ces éléments. L'activité répétitive des neurones favorise également l'expression, la sécrétion et l'action de neurotrophines au niveau de la synapse. Ces neurotrophines, notamment le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), permettent la modulation de la transmission synaptique en modifiant durablement l'élément postsynaptique dans sa morphologie et sa sensibilité au neurotransmetteur mais aussi l'élément présynaptique dans sa capacité de relargage du neurotransmetteur (pour revue, Schinder et

Poo, 2000). Les modifications ainsi induites affectent les synapses des circuits impliqués pendant plusieurs semaines, voire des mois ou plus.

En parallèle à ces modifications de l'excitabilité des neurones glutamatergiques, des changements d'autres populations de neurones et de synapses affectent la plasticité. Le GABA, comme le glutamate peut agir comme neurotransmetteur d'action rapide via des récepteurs ionotropiques (par ex. $GABA_A$ et récepteurs NMDA et non-NMDA) ou comme neuromodulateur via des récepteurs couplés à une protéine G (par exemple $GABA_B$ et récepteurs métabotropiques). Les interneurones et synapses GABAergiques sont donc le lieu de renforcement et de dépression à long terme selon des mécanismes similaires à ceux décrits pour les synapses excitatrices (Buonomano et Merzenich, 1998 ; Wolpaw et Tennissen, 2001).

En cas de LTP, les effets des influx excitateurs sont ainsi augmentés par une diminution des courants synaptiques inhibiteurs et inversement lors de LTD.

1.3.2 Mécanismes de la plasticité intrinsèque

La plasticité intrinsèque se manifeste par une augmentation ou une diminution de l'excitabilité de la membrane des dendrites et des somas induite par des modifications biochimiques des canaux sensibles au voltage. De ceci résulte, par exemple, des modulations du potentiel de repos, de la fréquence d'émission de potentiels mais aussi des altérations de la propagation du signal le long de l'axone, des dendrites, des épines.

Comme pour la plasticité synaptique, les modifications des niveaux calciques suite à l'ouverture de récepteurs NMDA sont un élément essentiel dans les mécanismes conduisant à la plasticité intrinsèque. La participation de ces récepteurs est établie par des études chez l'animal qui indiquent que l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA induit une disparition des changements d'activité des neurones (pour revue, Daoudal et Debanne, 2003). Au-delà des changements immédiats, l'action des neurotrophines (BDNF par exemple) se traduit par des modifications au long cours comme l'émergence de nouvelles épines dendritiques (Engert et Bonhoeffer, 1999).

1.4 Lieux d'induction de la plasticité

Outre la plasticité évoquée par stimulation répétée, le SNC est naturellement capable de générer de la plasticité en réponse à des sollicitations environnementales, physiologiques ou pathologiques. Cette plasticité comprend, au niveau sensorimoteur, les modifications de comportement induites par l'apprentissage. L'apprentissage d'un geste moteur est défini comme l'acquisition favorisée par la répétition d'une nouvelle coordination sensorimotrice ou l'augmentation de la précision et de la vitesse du geste à exécuter.

1.4.1 Aires somatomotrices

L'organisation topographique des cortex moteur et sensitif, homonculus, est l'objet de réorganisation en relation avec des changements de configuration des membres suite à des désafférentations (compression ou section nerveuse, amputation) ou à la pratique d'un mouvement (pour revues, Buonomano et Merzenich, 1998 ; Sanes et Donoghue, 2000).

Ainsi, la lésion d'un nerf périphérique (nerf facial par exemple), conduit à un accroissement de la taille de la zone permettant d'évoquer, en TMS, une réponse des muscles sains représentés à proximité sur l'homonculus moteur (muscles de la main) (Rijntjes *et al.,* 1997).

Avec la même technique, l'étude de l'excitabilité de muscles proches du niveau d'amputation montre qu'ils répondent pour des intensités de stimulation plus basses que leur homologue côté sain (Chen *et al.*, 1998a) et que cette réponse peut être évoquée d'un plus grand nombre de points sur le scalp, traduisant une augmentation de la surface de représentation du muscle par rapport à sa représentation sur l'homonculus controlatéral (Fuhr *et al.* 1992).

Plusieurs études en TMS indiquent que, chez des sujets sains, l'apprentissage s'accompagne d'une augmentation de la taille des zones représentants les muscles impliqués dans le mouvement travaillé et d'un accroissement de l'excitabilité de ces zones du cortex moteur (doigts) (Pascual-Leone *et al.,* 1995 ; Classen *et al.,* 1998) ainsi que d'une diminution de l'excitabilité du muscle antagoniste (Suzuki *et al.,* 2012). Ces changements s'organisent que l'apprentissage soit de courte ou de longue durée (5 ou 10 min ; 5jours, 2h/jour) (Pascual-Leone *et al.,* 1995 ; Classen *et al.,* 1998).

Au niveau macroscopique, les études en imagerie fonctionnelle chez l'animal, révèlent que la pratique d'un geste se traduit non seulement par un agrandissement de la surface des cartes corticales représentant la ou les zones du corps impliquées dans l'action (Karni *et al.,* 1995) mais aussi par une modification de l'activation d'aires impliquées dans le traitement du signal, telles que le cortex sensorimoteur (Hund-Georgiadis et Von Cramon, 1999), l'AMS (pré SMA, SMA-proper) (pour revue, Picard et Strick, 2001), le cervelet, les ganglions de la base et le thalamus (pour revue, Draganski et May, 2008). Ces modifications des cartes s'accompagnent de changements structurels comme la synaptogenèse (par bourgeonnement axonal), la multiplication/disparition des connexions dendritiques ou encore l'activation de synapses préexistantes mais latentes (Marik *et al.,* 2010).

Les mécanismes de la plasticité induite par l'apprentissage étudiés chez l'animal montrent que les modifications induites sont liés à des phénomènes de plasticité synaptique de type LTP/LTD (Rioult-Pedotti *et al.,* 2000). La plasticité intrinsèque participe aussi à ces mécanismes de stockage de l'information. Au niveau des neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur, une étude in vivo chez le rat montre que l'application de stimulations

répétées augmente leur sensibilité à de faibles influx par modification des canaux voltage dépendants (Paz *et al.,* 2009).

Le site et les mécanismes synaptiques précis sous tendant ces évolutions sont encore mal connus mais ils impliqueraient les denses connexions intracorticales horizontales entre les couches II, III et V au sein du cortex moteur (Aroniadou et Keller 1993). Ces connexions horizontales sont excitatrices glutamatergiques (Keller, 1993), leurs synapses comportent des récepteurs non NMDA et NMDA et elles reçoivent une inhibition GABAergique (Donoghue, 1995 ; Smyth *et al.,* 2010 ; pour revue, Sanes et Donoghue, 2000). L'hypothèse de la participation de modifications de l'inhibition GABAergique à la réorganisation des cartes corticales lors de l'apprentissage repose en partie sur des études en TMS répétitive. Une désafférentation transitoire par bloc nerveux ischémique induit une désinhibition au niveau du cortex controlatéral sans modification de l'excitabilité intracorticale. Un protocole de stimulation magnétique transcrânienne répétitive à basse fréquence (rTMS à 0,1Hz), n'ayant pas d'effet sans une déafférentation, appliqué au cortex controlatéral renforce l'augmentation de l'excitabilité corticale et induit l'effet inverse sur le cortex homolatéral ; en étudiant l'activité des réseaux intracorticaux, Ziemann et collaborateurs (1998b) montrent une diminution de l'inhibition intracorticale du cortex controlatéral à la lésion et une augmentation du côté homolatéral. Les auteurs posent l'hypothèse d'une diminution d'activité des interneurones GABA du côté homolatéral et d'une augmentation au niveau du cortex controlatéral (Ziemann *et al.,* 1998c). Ces auteurs montrent également que, dans les mêmes conditions expérimentales, la prise de lorazepam (agoniste des récepteurs $GABA_A$) conduit à l'abolition des effets potentialisateurs de la rTMS (Ziemann *et al.* 1998c). Ce mécanisme lié au $GABA_A$ reposerait sur la diminution des courants inhibiteurs postsynaptiques qui tendent à maintenir l'obstruction de l'ion magnésium au niveau des récepteurs NMDA empêchant l'induction de LTP (Castro-Alamancos et Borrell, 1995).

1.4.2 Moelle épinière

Les étages médullaires ne sont pas constitués de systèmes statiques mais au contraire, ils forment une structure neurale complexe capable d'adaptation et de rétention d'information indépendamment du cerveau. La moelle représente ainsi un lieu important d'expression de mécanismes de plasticité au cours des apprentissages moteurs. La plasticité au niveau spinal est étudiée au travers de modifications d'amplitude d'un réflexe monosynaptique spinal évoqué par stimulation électrique de la voie afférente (réflexe H) et de la réponse enregistrée au niveau du muscle cible qu'elle soit évoquée par stimulation électrique ou magnétique.

Des modifications à court et long terme de la taille du réflexe H sont démontrées dans plusieurs études après apprentissage moteur (pour revue, Wolpaw, 2010). Ainsi, Mazzocchio et collaborateurs (2006) montrent une diminution persistante de la taille du réflexe H d'un muscle de la jambe (soléaire) après un apprentissage basé sur le maintien d'une vitesse de pédalage constante alors que de fréquentes modifications de la résistance sont imposées.
De même, lors d'un apprentissage par conditionnement opérant (les sujets disposent immédiatement après chaque tache d'une information sur leur niveau de réussite), les sujets doivent modifier sur demande l'amplitude du réflexe H évoqué au niveau du soléaire. Les modifications induites par l'apprentissage sont d'installation rapide ; l'augmentation des sessions d'apprentissage se traduit par une persistance des modifications (augmentation ou diminution du réflexe) induites par le conditionnement pendant des semaines après son arrêt. Les changements à court terme seraient à mettre en lien avec des modifications des influences supraspinales sur ce réflexe alors que les modifications à plus long terme confirment la présence de mécanismes de type plasticité modifiant durablement le fonctionnement de cette boucle réflexe (Thompson *et al.*, 2009).
Une étude reprenant le protocole de Mazzocchio et collaborateurs (2006) établit que ce changement qui perdure au moins 24h après l'arrêt de la stimulation qui l'a fait naître, est le fait d'une plasticité synaptique liée à une diminution de l'efficacité de la synapse entre l'afférence Ia et le MN du muscle cible au niveau présynaptique (Meunier *et al.,* 2007).

Des mécanismes non synaptiques accompagnent ces modifications de la régulation du réflexe H. Une diminution de l'amplitude du réflexe s'accompagne d'un accroissement du seuil de décharge des MN et d'une diminution de la vitesse de conduction ; ces changements sont mis en lien avec une modification de l'activation des canaux sodium voltage dépendants au niveau du motoneurone (Carp et Wolpaw 1994).

2. Plasticité de la commande ventilatoire

De nombreuses études, chez l'animal et l'humain, portent sur la possibilité d'évoquer de la plasticité à plusieurs niveaux du système neural de la ventilation (chémorécepteurs, étage spinal, tronc cérébral, cortex). Les effets de ces stimulations sont évalués par des modifications d'activité d'un nerf ou de la ventilation. Ces études s'intéressent également à divers muscles de la ventilation (muscles des voies aériennes supérieures, diaphragme,…).

Seules les études portant sur le diaphragme et sa commande sont décrites dans les paragraphes suivants.

2.1 Neuromodulation

La neuromodulation représente un précurseur nécessaire à l'induction de plasticité de la commande ventilatoire.

Différents types de modulateurs aux actions excitatrices ou inhibitrices interviennent selon les conditions environnementales rencontrées, pour induire et/ou maintenir de nombreuses formes de plasticité ventilatoire (Fuller *et al.,* 2001 ; pour revue, Mitchell et Johnson, 2003). La sérotonine, la dopamine et la noradrénaline sont les substances le plus souvent citées chez l'animal (pour revues, Kinkead *et al.* 2001 ; Mitchell et Johnson, 2003 ; Doi et Ramirez, 2008 ; Baker-Herman et Strey, 2011).
Les récepteurs sérotoninergiques, par exemple, sont impliqués dans l'augmentation du rythme et de l'amplitude des bouffées inspiratoires générées par le CPG et dans le gain de la réponse des MN phréniques aux influx bulbaires (pour revues, Kinkead *et al.,* 2001 ; Doi et Ramirez, 2008).

2.2 Formes temporelles de la plasticité ventilatoire

La facilitation et la dépression de la réponse de la commande ventilatoire présentent les mêmes caractéristiques temporelles que celles décrites dans les généralités c'est-à-dire qu'il existe une plasticité ventilatoire à court et à long terme.

2.2.1 Plasticité ventilatoire à court terme

Différents stimulus évoquant cette forme de plasticité ont été étudiés, dont notamment la stimulation électrique d'un récepteur ou d'une voie afférente, ou encore la stimulation chimique (hypoxie, hypercapnie). Ces stimulus induisent des augmentations progressives de la réponse pendant leur application puis un lent retour à l'activité de base après l'arrêt de la stimulation, durant quelques secondes à quelques minutes, sous forme de STP ou STD. Cette plasticité est analysée en termes de modification de l'activité sur le nerf phrénique, et/ou de modification de la ventilation (ventilation minute, fréquence respiratoire).

Chez l'animal, la stimulation des voies afférentes par une exposition unique courte (2–5min) à une importante hypoxie ou l'application de stimulation électrique à haute fréquence (20-25Hz) sur le nerf afférent du sinus carotidien, une courte branche du IX, se traduit par un même profil de modification des variables d'activité électrique du nerf ou de la ventilation pendant et après la stimulation. Lorsque le stimulus est présent, une rapide augmentation des bouffées est enregistrée sur le nerf phrénique alors que la fréquence respiratoire augmente puis se stabilise à un niveau plateau. Dans les secondes à minutes après l'arrêt du stimulus, l'activité du nerf phrénique, le volume courant et la ventilation minute reviennent lentement au niveau de base (STP) mais la fréquence diminue en dessous du niveau pré-

stimulus (STD) (Hayashi *et al.,* 1993 ; Coles et Dick, 1996 ; Powell *et al.,* 1998 ; pour revue, Eldridge et Millhorn, 1986).

Chez l'humain sain éveillé, une STP est montrée par la persistance d'un niveau élevé de la ventilation dans les secondes suivant l'arrêt d'une brève période d'hyperventilation (6 à 10 ventilations ; STP de 9 à 59s) (Tawadrous et Eldridge 1974 ; Swanson *et al.,* 1976) ou d'une hypoxie intense suivie d'hyperoxie (35 à 51s d'hypoxie ; STP de 6 à 45s) (Georgopoulos *et al.,* 1990). Cette facilitation est aussi présente pendant le sommeil lent (NREM) après hypoxie (1min d'hypoxie ; STP > 30s) (Badr *et al.,* 1992). L'augmentation de la ventilation est due à un accroissement du volume courant car les paramètres temporels ne sont peu ou pas modifiés (Mahutte et Rebuck 1978 ; Bender *et al.,* 1987).

La réponse à l'hypoxie du système de commande de la ventilation est exclusivement transmise par une boucle impliquant les chémorécepteurs périphériques. Cette réponse pourrait donc être réflexe mais différents éléments permettent d'écarter cette hypothèse. En effet, l'hyperventilation existe malgré des taux de $P_{ET}CO_2$ bas ou une correction de la $P_{ET}O_2$. De plus, la dénervation (nerf du sinus carotidien et nerf vague) n'empêche pas ce phénomène d'exister. Ces éléments confirment que ces adaptations ne dépendent pas de la transduction au niveau des chémorécepteurs ni de l'implication de mécanismes métaboliques périphériques (Eldridge, 1974 ; Tawadrous et Eldridge, 1974). De plus, les structures cortiales ne sont pas impliquées puisque leur ablation n'influe pas sur la formation de STP (Eldridge, 1976).

En revanche, l'implication des motoneurones spinaux dans la STP est démontrée par McCrimmon et collaborateurs (1997) qui montrent une augmentation des réponses du nerf phrénique ipsilateral en réponse aux stimulations orthodromiques à haute fréquence de la voie bulbospinale dans le cordon latéral après section complète de la moelle en C1.

2.2.2 Plasticité ventilatoire à long terme

La plasticité à long terme de la commande ventilatoire nait de la répétition des stimulations ayant conduit à l'émergence de plasticité à court terme. Elle peut durer de quelques dizaines de minutes jusqu'à plusieurs semaines après l'arrêt du stimulus.

Une LTP, persistant environ 50 minutes après l'arrêt du stimulus, est notée suite à la stimulation répétées (25Hz, 5 répétitions) du nerf du sinus carotidien chez le chat (Millhorn *et al.,* 1980a) mais aussi à la suite d'épisodes répétés, brefs et importants, d'hypoxie. La plasticité induite par le stimulus hypoxique est l'exemple le plus étudié de la plasticité respiratoire. L'usage de protocoles basés sur l'hypoxie a l'intérêt d'être plus proche de processus physiopathologiques puisqu'il mime les hypoxémies successives des patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil (SAOS). Les protocoles utilisés présentent de

nombreuses différences mais ont en commun d'utiliser des épisodes répétés d'hypoxie intense séparés par des temps de récupération en normoxie (pour revues, Mitchell et Johnson, 2003 ; Mateika et Sandhu, 2011). Cette plasticité est montrée chez de nombreuses espèces d'animaux anesthésiés par une facilitation à long terme de l'amplitude des bouffées sur le nerf phrénique (*phrenic long-term facilitation, pLTF*) (Hayashi *et al.,* 1993 ; Fregosi et Mitchell, 1994 ; Bach et Mitchell, 1996 ; Baker-Herman et Mitchell, 2002 ; pour revue, Mitchell *et al.,* 2001) et chez des animaux éveillés par une facilitation ventilatoire à long terme (*ventilation long-term facilitation, vLTF*) (Cao *et al.,* 1992 ; Turner et Mitchell, 1997 ; ; Olson *et al.,* 2001 ; McGuire *et al.,* 2002 ; Terada et Mitchell, 2011 ; pour revues, Powell *et al.,* 1998 ; Fuller *et al.,* 2000 ; Mitchell *et al.,* 2001).

Chez l'humain, pendant de nombreuses années, la vLTF n'est rapportée que pendant le sommeil (NREM) chez des patients présentant une obstruction modérée des voies aériennes supérieures (SAOS), c'est-à-dire un terrain potentiellement favorisant pour l'émergence d'une plasticité respiratoire (Babcock et Badr, 1998 ; Aboubakr *et al.,* 2001 ; Babcock *et al.,* 2003) mais pas chez des sujets sains ou des patients traités par ventilation à pression positive (Babcock et Badr, 1998 ; Babcock *et al.,* 2003) ; deux études montrent même une impossibilité d'évoquer cette plasticité à l'éveil (McEvoy *et al.,* 1996 ; Jordan *et al.,* 2002). Depuis, diverses études (avec des protocoles poikilocapniques ou isocapniques) retrouvent cette vLTF pendant le sommeil (NREM) chez les patients SAOS (Lee *et al.,* 2009) mais aussi chez les sujets sains (Pierchala *et al.,* 2008 ; Chowdhuri *et al.,* 2010 ; Syed *et al.,* 2013) ainsi qu'à l'éveil chez les patients SAOS (Gerst *et al.,* 2011 ; Syed *et al.,* 2013) et les sujets sains (Harris *et al.,* 2006 ; Wadwha *et al.,* 2008 ; Lee *et al.,* 2009 ; Syed *et al.,* 2013 ; pour revue, Mateika et Sandhu 2011). Une étude récente rapporte que la vTLF est plus importante à l'éveil par rapport au sommeil et que, quel que soit le moment de la journée, ce phénomène de plasticité est plus marquée chez les patients (Syed *et al.,* 2013).

Une première mise en évidence expérimentale de phénomènes de dépression à long terme (LTD) au niveau du système ventilatoire est faite sur des tranches de bulbe par la démonstration d'une diminution persistante (> 30min) des PPSE dans les neurones du noyau du tractus solitaire chez le rat suite à une stimulation à basse fréquence d'une voie afférente (5Hz, 5min) (Zhou *et al.,* 1997). La LTD de la commande ventilatoire, bien que peu étudiée, est induite chez le rat anesthésié après exposition continue ou intermittente à l'hypercapnie (25min avec 10% de CO_2 inspiré) et se traduit par une diminution de l'amplitude et de la fréquence des bouffées sur le nerf phrénique (> 60 min) (Bach et Mitchell, 1998 ; Baker *et al.,* 2001).

Hormis les stimulus chimiques, un autre moyen très utilisé pour évoquer de la plasticité à long terme est l'apprentissage d'un comportement ventilatoire.

La possibilité de faire varier le comportement ventilatoire est tout d'abord révélée chez des chats après un conditionnement classique associant un son à une bouffée d'ammoniaque qui induit, suite à un temps d'apprentissage, une apnée conditionnelle à la seule production du son (Orem et Netick, 1986). Chez l'humain, Gallego et Perruchet (1991a) mettent en évidence des modifications du comportement ventilatoire par l'apprentissage ; une augmentation non consciente de la durée du temps total du cycle respiratoire est obtenue rapidement (après 8 cycles respiratoires) suite aussi à un conditionnement pavlovien associant un son (100Hz, ≈ 20db) avec un stimulus hypoxique alors que seul le son est produit (Gallego et Perruchet, 1991a). Suite à un conditionnement dans lequel est développée la capacité du sujet à associer un comportement à un effet donné (conditionnement opérant), une augmentation de la durée de l'inspiration, suivie par retour d'information sur la performance (feedback visuel), est obtenue chez 3 sujets sains après 8 répétitions des exercices (Gallego et Perruchet, 1991b). Ce même type d'apprentissage, utilisé avec des patients présentant une bronchite chronique obstructive conduit également à des modifications de leur profil ventilatoire spontané et à une amélioration de leurs performances aux tests spirométriques (Estève *et al.,* 1996 ; Yamaguti *et al.,* 2012).

L'apprentissage d'un comportement ventilatoire, comme celui d'un geste moteur, peut être défini comme l'acquisition puis l'amélioration d'une coordination sensorimotrice. Une expansion de la taille de la représentation du diaphragme au sein de l'homonculus moteur est mise en évidence en TMS dans une étude portant sur l'apprentissage de la contraction diaphragmatique avec protrusion de l'abdomen (10min, 2 fois/jour, pendant 1 semaine) (Demoule *et al.,* 2008). De la même façon que décrit précédemment, l'apprentissage ventilatoire requiert une remarquable intégration sensorimotrice et se traduit, en IRM fonctionnelle, chez des sujets sains, à différents niveaux de la commande. . La comparaison en IRMf de l'activité corticale générée par le compensation d'une charge inspiratoire "unique" (appliquée pendant un seul cycle ventilatoire) et la compenastion de la même charge appliquée de façon continue (5 minutes) permet à Raux et collaborateurs (2013) de confirmer la notion d'automatisation de tâches ventilatoires en réponse à un apprentissage. En effet, cette étude permet d'observer des modifications d'activité cérébrales lors du maintien de la charge (diminution d'activité du cortex préfrontal et au niveau sous-cortical) qui étaient similaires à celles observées lors de l'automatisation d'une tâche motrice (Wu *et al.*, 2008). L'activité au niveau de la face médiale du cerveau, englobant une partie de l'AMS, persiste dans la tâche d'effort continu. Il convient de noter que dans l'étude de Demoule et collaborateurs (2008), l'apprentissage de la tâche ventilatoire est « explicite », les sujets ayant à effectuer volontairement les manoeuvres demandées. Il est au contraire « implicite » dans l'étude de Raux et coll. (2013), au cours de laquelle les sujets sont obligés d'effectuer

l'effort ventilatoire pour surmonter la charge inspiratoire, sans avoir reçu aucune instruction pour le faire. Ce constat suggère par conséquent la possibilité d'une plasticité ventilatoire « lésionnelle ». Des manifestations de plasticité ventilatoire consistant en des modifications « correctives » ou « adaptatives » consécutives à des lésions ou dysfonctions ventilatoires sont décrites. Ainsi, chez des patients atteints de dysfonction dipahragmatique isolée (Bennett *et al.*, 2004) ou dans le cadre d'une maladie neuromusculaire généralisée (sclérose latérale amyotrophique) (Arnulf *et al.*, 2000), l'hypoventilation en sommeil paradoxal est parfois prévenue par le recrutement de muscles extradiaphragmatiques normalement atones pendant cette phase du sommeil. Ainsi également, chez des patients atteints d'hypoventilation alvéolaire centrale dont la commande automatique de la ventilation est déficiente, la présence à l'éveil d'une activité corticale liée à la ventilation spontanée de repos témoigne d'une plasticité adaptative de la commande ventilatoire. Une interprétation possible, parmi d'autres, des mécanismes en jeu serait une sensibilitation des motoneurones phréniques par l'influx corticospinal à l'influx bulbospinal déficient.

2.3 Mécanismes de la plasticité ventilatoire

Les mécanismes propres à la plasticité respiratoire induite par un apprentissage ou un conditionnement n'ont pas été spécifiquement étudiés mais il est possible de penser qu'ils sont similaires à ceux déjà décrits suite à l'acquisition d'autres comportements moteurs.
En revanche de nombreuses études posent des hypothèses sur les mécanismes de la plasticité évoquée par des stimulations électriques des sinus carotidiens et surtout par des épisodes d'hypoxie aiguë. Seules certaines hypothèses qui portent sur l'implication des MN phréniques sont synthétiquement rapportées ici.

2.3.1 Mécanismes liés aux propriétés intrinsèques des MN

Il existe peu d'études portant sur les capacités de chaque sous type de MN à répondre à l'induction de plasticité.

Cependant, en reprenant les travaux de McCrimmon et collaborateurs (1997) sur la STP, Hayashi et collaborateurs (2003) montrent que les MN phréniques répondent de façon hétérogène à ces influx synaptiques descendants issus de stimulations à haute fréquence des fibres du cordon latéral en C1-C2. Ces auteurs décrivent trois patrons de dépolarisation en réponse à la stimulation à haute fréquence.
Tout d'abord certains neurones présentent une réponse par modification de la phase de repolarisation. La durée des modifications induites par ce mécanisme est courte (14s) ce qui mène à l'hypothèse de la participation de ces neurones uniquement au début de la STP. D'autres neurones répondent par deux phases de dépolarisation spontanée pour une durée

totale couvrant presque celle de la STP (33s). Un troisième type de motoneurones possède un comportement bistable. Pendant la stimulation, ceux-ci présentent une dépolarisation modérée (supérieure à leur seuil de décharge pour certains) qui est persiste après la stimulation pour toute la période de STP (≥ 45s). Chez le chat décérébré, ce comportement bistable dépend de l'activation tonique de voies sérotoninergiques issues des noyaux du raphé (Hounsgaard *et al.,* 1988).

Ces données suggèrent une diversité de la nature des MN phréniques et de leur réponse à l'induction de plasticité (Hayashi *et al.,* 2003) et elles indiquent aussi le rôle de la sérotonine dans la régulation des propriétés de membrane des MN.

Un autre facteur intervient dans les mécanismes de plasticité intrinsèque, ce sont les modifications des fréquences de décharge.
Avec une stimulation par hypoxie (3min) chez des rats, Lee et collaborateurs (2009) montrent pendant la stimulation une franche augmentation de la fréquence de décharge des MN qui persiste après l'arrêt de l'hypoxie (STP). Cette augmentation de fréquence concerne, de façon égale, les MN phréniques à décharge précoce et tardive (*early-I, late-I*).
La phase de STP est caractérisée, pour les MN précoces, par une activation inchangée en termes de temps de participation à la phase inspiratoire mais par une diminution de la durée de chacune de leur décharge ; pour les MN tardifs (Late-I), leur temps d'activité global est accru puisque leur activation dans le cycle respiratoire est plus précoce néanmoins leur temps de décharge n'est pas modifié (St John et Bartlett 1979 ; Lee *et al.,* 2009).
Globalement, malgré une augmentation de la fréquence de décharge, l'activité des MN précoces décroît car leur durée de décharge diminue. A l'inverse, pour les MN d'activation tardive, le nombre de potentiel d'actions par inspiration est augmenté. Les MN tardifs semblent donc contribuer, par ces modifications de leur patron de décharge, à la STP de l'activité du nerf phrénique et à sa traduction en termes ventilatoires (Lee *et al.,* 2009).

2.3.2 Mécanismes liés aux propriétés synaptiques des MN

L'expression de la plasticité ventilatoire est intimement liée au système sérotoninergique (Baker-Herman *et al.,* 2004 ; McFarlane *et al.,* 2009 ; pour revues, Baker *et al.,* 2001 ; Feldman *et al.,* 2003 ; Ling, 2008), mais elle dépend aussi, selon un schéma classique, de l'activation de récepteurs NMDA et de la synthèse de BDNF.

Divers neurones ventilatoires qui possèdent des récepteurs sérotoninergiques (5-HT) sont directement ou indirectement impliqués dans le contrôle de la commande ventilatoire. Ainsi, les neurones du bulbe et particulièrement ceux du raphé, qui possèdent des récepteurs de sous-type 5-HT_2, projettent sur les neurones du groupe respiratoire ventral et les motoneurones phréniques (Bianchi *et al.,* 1995 ; McCrimmon *et al.,* 1995 ; Bach et Mitchell,

1996 ; pour revue, Doi et Ramirez, 2008). Le rôle de la sérotonine au niveau des motoneurones cervicaux dans la genèse d'une LTF respiratoire est mis en évidence en montrant que la facilitation induite par une stimulation électrique du nerf du sinus carotidien chez le chat est bloquée par un prétraitement par antagoniste des récepteurs de la sérotonine (méthysergide) (Millhorn *et al.,* 1980b). Des démonstrations similaires sont faites chez le rat avec l'hypoxie où un prétraitement par méthysergide ou par un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques (kétansérine) empêche le développement de la plasticité (Bach et Mitchell, 1996 ; Kinkead et Mitchell, 1999) ; l'injection intrathécale d'un antagoniste des récepteurs des sérotoninergiques (méthyserside) au niveau des étages cervicaux chez le rat établit le rôle essentiel de ces récepteurs médullaires dans la génération de la pLTF (Baker-Herman et Mitchell, 2002).Si la sérotonine est nécessaire à l'induction de la LTF elle n'est pas nécessaire à son maintien puisque la prise d'un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques (kétanserine) après l'application des stimulus (de 0 à 45min après les stimulus) n'empêche pas le développement de la plasticité post-stimulation (Fuller *et al.,* 2001).

Comme dans le cadre de la sensibilisation, la pLTF dépendant de la sérotonine diffère selon le patron de délivrance des stimulus. Alors que de brefs épisodes intenses et répétés d'hypoxie induisent une LTF phrénique et une augmentation de la ventilation, une application continue ne produit pas cette facilitation chez le rat anesthésié (Baker et Mitchell, 2000).

La microinjection chez des rats d'un antagoniste des récepteurs NMDA (dizocilpine, MK-801) au niveau des motoneurones phréniques, 1 heure avant l'induction de plasticité par hypoxie, empêche le développement de cette plasticité (McGuire *et al.,* 2005). L'implication de ces récepteurs, en comparaison avec les récepteurs non NMDA, est confirmée par l'absence de plasticité ventilatoire mesurée chez des rats éveillés suite à l'injection, avant ou au moment des chémostimulations, d'un antagoniste des récepteurs NMDA (acide 2-amino-5-phosphonovalerique ; APV) alors que l'injection, selon le même protocole d'un antagoniste des récepteur non-NMDA (6-ciano-7nitroquinoxaline-2,3-dione ; CNQX) n'agit pas sur la vLTF (McGuire *et al.,* 2008).

Cette même forme de plasticité est aussi associée à une augmentation de la synthèse de BDNF au niveau de la corne ventrale de la moelle cervicale (Mitchell *et al.,* 2001), l'administration intrathécale d'inhibiteurs de la synthèse protéique (émétine, cycloheximide, méthysergide) altère l'émergence de la vLTF (Baker-Herman et Mitchell, 2002) mais l'injection intrathécale de BDNF en absence de stimulus hypoxique augmente l'activité sur le nerf phrénique d'une façon comparable à l'effet de la LTF (Baker-Herman *et al.,* 2004).

Le BDNF agirait au niveau des motoneurones phréniques en permettant la phosphorylation et l'insertion de nouveaux récepteurs au glutamate sur la membrane postsynaptique, au

niveau présynaptique, en augmentant la libération de glutamate et en diminuant la transmission GABAergique des influx aux motoneurones phréniques (Baker-Herman *et al.,* 2004).

La présence de récepteurs $GABA_A$ergiques au niveau des motoneurones phréniques et des réseaux du tronc cérébral est très importante et leur action dans les transitions de phase entre inspiration et expiration chez le chien et le rat sont bien décrits (McCrimmon *et al.,* 1995, 1997 ; Parkis *et al.,* 1999 ; Zimmer et Goshgarian, 2007). Ainsi, chez le chien, la micro injection au niveau des neurones bulbaires de bicuculine (antagoniste des récepteurs $GABA_A$) produit une réduction de la phase expiratoire et, associé à une injection de glutamate, une augmentation importante de l'activité inspiratoire enregistrée sur le nerf phrénique (McCrimmon *et al.*, 1997). A l'instar des mécanismes généraux connus, la neurotransmission inhibitrice est impliquée dans les phénomènes de plasticité respiratoire à court terme évoqués par l'exposition à une hypoxie (Weil, 1994 ; Hsieh *et al.*, 2004).

En conclusion, la plasticité respiratoire présente des caractéristiques similaires à celles décrites à partir des études sur l'hippocampe, la mémoire et l'apprentissage avec un décours temporel comparable et des mécanismes reposant également sur le glutamate, les récepteurs NMDA, le BDNF, le GABA et l'implication de la sérotonine comme neuromodulateur.

3. Techniques non invasives d'induction de plasticité

Grace aux avancées de la technologie, il est possible d'induire chez l'humain, par des méthodes artificielles non invasives, des modifications persistantes de l'excitabilité corticospinale via des mécanismes de plasticité. Ceci peut être réalisé par des méthodes impliquant une stimulation corticale seule (stimulation magnétique transcrânienne répétitive, rTMS, stimulation transcrânienne par courant continu, *transcranial direct current stimulation*, TDCS), une stimulation périphérique seule (*transcutaneous electrical nerve stimulation*, TENS), une stimulation spinale (stimulation transcutanée spinale par courant continu, *transcutaneous spinal direct current*, tsDCS) ou l'association d'une stimulation corticale avec une stimulation périphérique (*paired-associative stimulation ; dual stimulation*) (pour revue, Ziemann *et al.,* 2008).

Parmi ces techniques, seules celles dites de stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS classique et en « patron ») et de stimulation spinale par courant continu (tsDCS) sont présentées ci-dessous. Les études portant sur la rTMS sont nombreuses et s'intéressent à de nombreuses aires corticales ; c'est pourquoi seules celles se rapportant

aux modifications d'excitabilité des voies sensitivo-motrices chez l'humain sain sont développées.

3.1 Stimulation magnétique transcrânienne

L'étude du cortex moteur présente l'avantage d'être facilement évaluable en couplant une stimulation d'une zone précise sur l'homonculus du cortex moteur à l'enregistrement électromyographique (EMG) de la réponse du muscle controlatéral correspondant.

Cette réponse peut être évoquée de façon non invasive grâce à deux techniques de stimulation transcrânienne : électrique et magnétique (Merton et Morton, 1980). La stimulation électrique (*transcranial electric stimulation*, TES) consiste en l'application d'un courant bref à travers 2 électrodes placées sur le scalp (1 électrode placée au vertex, l'autre en regard de la région d'intérêt sur le cortex moteur primaire). La TES permet d'enregistrer, à partir d'un certain seuil de stimulation, une réponse EMG qui croit jusqu'à un maximum. Ce type de stimulation présente l'inconvénient majeur d'être douloureux puisque le courant (jusqu'à 1A), en circulant entre les deux électrodes, produit une sensation désagréable, une contraction des muscles au niveau du scalp et que seule une faible part du courant parvient au cortex (Rothwell *et al.*, 1987 ; Day *et al.*, 1989). Un résultat similaire est obtenu avec la stimulation magnétique transcrânienne (TMS). Introduite en 1985 par Barker, cette technique non invasive, indolore, représente un moyen d'étude notamment de l'excitabilité de la voie de la motricité volontaire (Barker *et al.,* 1987) mais aussi de modulation de l'activité neuronale de diverses régions corticales (motrices et non motrices). La TMS consiste en l'application à une bobine de fil conducteur d'un courant électrique de haute intensité et rapidement variable. Cette variation de courant, de très courte durée (≈150µs), génère dans la bobine un champ magnétique d'environ 2 teslas. Ce champ traverse le scalp sans atténuation et induit des courants électriques secondaires circulaires dans les tissus excitables sous-jacents. Le champ électrique généré dans le cortex est relativement homogène et parallèle à la surface du cerveau. Il créé une activation des axones si ceux-ci traversent au moins deux lignes de champ électrique. Pour cela la sonde de stimulation doit être orientée perpendiculairement au gyrus visé. Appliquée en stimulus unique en regard du cortex moteur la TMS génère des potentiels électriques descendants (volées) dans la voie corticospinale, lesquels sont transmis aux unités motrices du muscle cible (Terao et Ugawa, 2002 ; Rossi *et al.,* 2009).

Lorsque les impulsions sont délivrées de façon répétée elles peuvent induire une modification de l'excitabilité corticospinale pendant les minutes suivant l'arrêt de cette application. Cette technique prend alors le nom de *repetitive TMS* ou rTMS.

3.1.1 Principe général de la stimulation magnétique transcrânienne

Le courant magnétique généré par la TMS induit des courants électriques circulaires dans les tissus excitables sous-jacents à la bobine dans un plan parallèle à la surface du cerveau et dans un sens inverse à celui du courant traversant l'anneau de fils (Roth *et al.,* 1991).

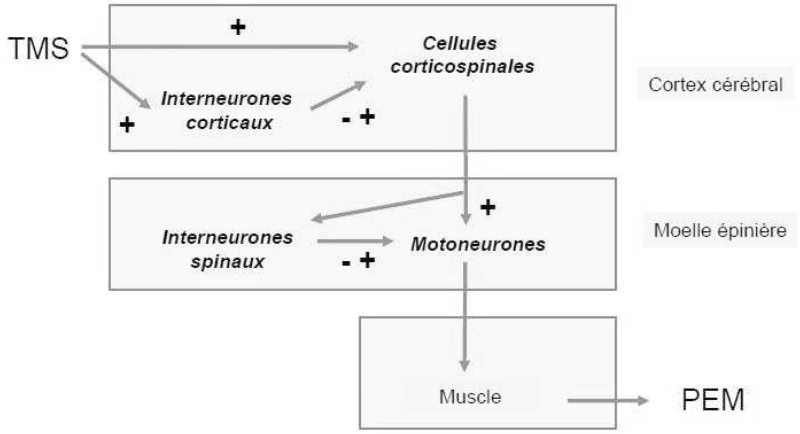


Figure n°10 : **Schématisation de l'évocation d'une réponse motrice par la stimulation magnétique en simple impulsion**.

(Adapté d'après Petersen et al., 2003)

L'excitation directe ou indirecte (interneurones intracorticaux) des neurones pyramidaux de la couche V du cortex moteur conduit à la genèse de potentiels d'action (PA) au niveau de leurs cônes d'émergence, (Rothwell, 1997) ; ces potentiels se propagent via la voie corticospinale directement ou indirectement (interneurones spinaux) aux motoneurones. Ces derniers les intègrent et émettent des potentiels d'action qui permettent l'activation des unités motrices (UM) du muscle cible. La sommation des potentiels d'UM (PUM) est identifiée au niveau du muscle par le recueil de son activité électromyographique (EMG) généralement grâce à des électrodes de surface. Ce potentiel composite porte le nom de potentiel évoqué moteur (PEM) (Rothwell, 2004).

3.1.1.1. Volées descendantes et recrutement motoneuronal

La compréhension des mécanismes d'action de la TMS découle de l'étude des effets de la stimulation électrique au niveau des neurones du cortex moteur. Patton et Amassian (1954) montrent, chez le chat et le singe craniectomisés, que la stimulation électrique du cortex moteur à une intensité seuil génère une activité (volée descendante) qui peut être enregistrée dans le faisceau corticospinal. A un niveau de puissance suffisant (intensité

supraliminaire) pour évoquer une contraction musculaire cette volée est suivie de nombreuses autres à un intervalle relativement fixe d'environ 1,5ms, temps nécessaire à la décharge synaptique. Ces ondes disparaissent après ablation de la substance grise et sont les premières affectées par le refroidissement du cortex (Amassian *et al.,* 1987). Les premières ondes de la volée efférente, de latence courte, nommées volées directes (D-waves), seraient liées à l'activation directe des neurones pyramidaux de la couche V au niveau du cône d'émergence de l'axone ; les volées suivantes, dites indirectes (I waves), naitraient de l'activation des neurones pyramidaux par l'intermédiaire d'interneurones intracorticaux (excitateurs et inhibiteurs) et de fibres d'association cortico-corticales (Patton et Amassian, 1954 ; Day *et al.,* 1987 ; Rothwell *et al.,* 1991 ; Di Lazzaro *et al.,* 2008c). Selon l'ordre d'enregistrement des décharges d'une unité motrice représentées dans un *post-stimulus time histogram*, ces volées indirectes sont classifiées selon leur ordre d'apparition en I1, I2 et I3, etc. (Day *et al.,* 1987 ; Rothwell *et al.,* 1991).

A la différence du courant électrique, l'application de la TMS, induit un courant qui, en traversant la surface corticale, active indirectement les neurones pyramidaux (Day *et al.,* 1989 ; Cracco *et al.,* 1999). La genèse chez l'humain de volées indirectes, à une intensité liminaire est confirmée par des études, enregistrant les volées descendantes grâce à des électrodes épidurales implantées pour prise en charge des douleurs chroniques (Kaneko *et al.,* 1996 ; Sakai *et al.,* 1997 ; Terao, 2000 ; Ziemann et Rothwell, 2000 ; Di Lazzaro *et al.,* 2004, 2012). A des intensités de stimulation plus élevées, l'activation de circuits complexes d'interneurones intracorticaux déclenche des décharges successives des cellules corticospinales qui sont enregistrées sous forme de volées indirectes tardives (Di Lazzaro *et al.,* 2008c). Un accroissement encore plus important de l'intensité de stimulation conduit, dans certaines conditions de direction de courant (postéro-antérieur avec une impulsion monophasique) à l'activation directe des axones des neurones corticospinaux. Ces volées sont enregistrées sous forme de volées directes et sont de même latence que les volées directes générées par la stimulation électrique (Day *et al.,* 1989 ; Kaneko *et al.,* 1996 ; Di Lazzaro *et al.,* 1998, 2012 ; Terao, 2000).

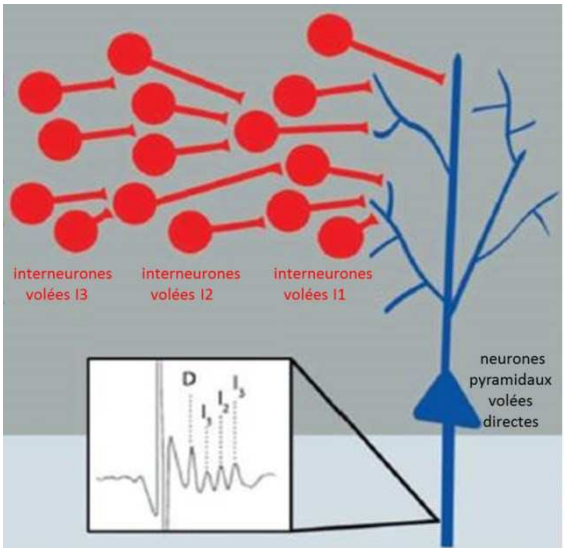


Figure n°11 : **Représentation schématique de l'activation des neurones pyramidaux par la TMS**

Les volées indirectes reflèteraient l'excitation des MN pyramidaux par les interneurones.Les numéros des volées (1, 2, 3) représentent le nombre d'interneurones activés par l'impulsion de TMS. Les volées directes naissent de l'activation directe des MN pyramidaux.

(Adapté d'après Cheeran *et al.*, 2010

Le PEM enregistré suite à la TMS découle principalement, au niveau cortical, de la production de volées indirectes ; il représente donc un marqueur très sensible de toute modification de l'excitabilité intracorticale (Di Lazzaro *et al.,* 2012). Au niveau spinal, le PEM est affecté par le niveau d'excitabilité des motoneurones qui détermine le nombre de neurones recrutés par les volées descendantes (Rothwell, 2004).

Les effets induits par la TMS sont également sensibles à des paramètres inhérents à la sonde utilisée, à la forme et à l'orientation du courant induit dans le cortex.

3.1.1.2. Mesure de l'excitabilité corticospinale

La réponse musculaire recueillie après chaque stimulation possède des caractéristiques qui participent à l'évaluation de l'excitabilité du faisceau corticospinal.

Le point optimal de stimulation ou *hotspot* représente le point du cortex moteur où la stimulation magnétique évoque pour le muscle étudié et pour une intensité donnée l'amplitude du PEM la plus grande par rapport aux sites adjacents.

A partir de ce point, deux valeurs sont établies par stimulation en impulsion unique : le seuil moteur (*motor threshold*, MT) de repos et le seuil moteur actif. Ces seuils, exprimés en pourcentage de la puissance maximale du stimulateur (% *maximum stimulator output*, MSO), sont définis par la plus petite intensité de stimulation nécessaire à la production, 5 fois sur 10 stimulations consécutives, d'un PEM d'une taille minimale définie.

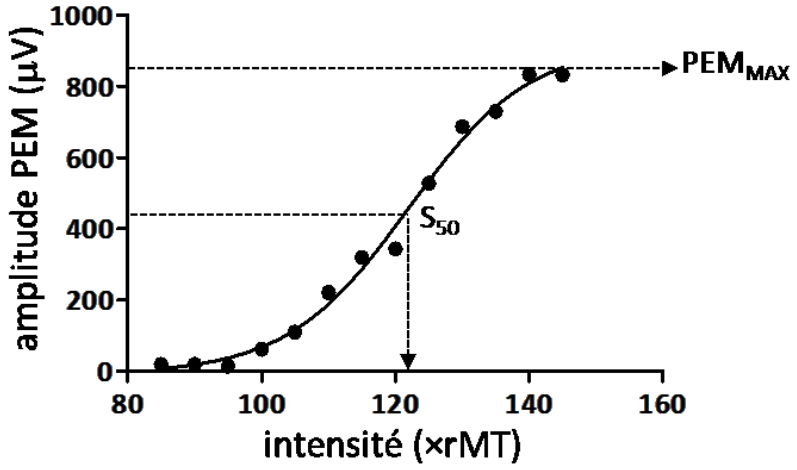
Le seuil au repos (*resting motor threshold*, rMT) représente la puissance minimale nécessaire à l'obtention d'un potentiel évoqué moteur de 50µV (Rossini *et al.,* 1994). Il s'agit d'un index complexe reflétant l'excitabilité membranaire des neurones, des axones intracorticaux et corticospinaux et des motoneurones (Chen *et al.,* 1998b ; Hallett, 2000) puisqu'il est augmenté par l'administration d'un antagoniste des canaux sodium voltage-dépendant mais n'est pas affecté par les modifications de la transmission glutamatergique ou GABAergique (Ziemann *et al.,* 1996a ; Liepert *et al.,* 1997).

Le seuil actif (*active motor threshold*, *aMT*), calculé lors d'une contraction volontaire isotonique d'environ 20% de la force de contraction maximale du muscle cible, est déterminé par la puissance minimale nécessaire à l'obtention d'un potentiel de 200µV. Ce seuil reflète essentiellement l'excitabilité cortico-corticale (Ziemann *et al.,* 1996a).

Le seuil moteur est d'autant plus bas que la représentation du muscle cible au sein de l'homonculus moteur est grande ; pour des muscles recevant une commande pyramidale forte, comme les muscles intrinsèques de la main, les valeurs de seuils sont plus basses que pour des muscles de la racine des membres ou du tronc (Brouwer et Ashby, 1990 ; Wassermann *et al.,* 1992).

3.1.1.3. Courbe de recrutement

Une autre façon d'étudier l'excitabilité de la voie corticospinale consiste à établir la relation entre l'intensité du stimulus TMS et la taille de la réponse évoquée depuis des niveaux de stimulation infraliminaires jusqu'à un maximum. Cette relation peut être modélisée selon une courbe sigmoïde. Dans ce tracé, nommé courbe de recrutement, la pente de la courbe reflète la force des projections corticospinales (Devanne *et al.,* 1997) ; la pente est ainsi généralement plus forte pour les muscles à forte représentation corticale possédant de fortes connexions cortico-motoneuronales (Devanne *et al.,* 1997 ; Abbruzzese *et al.,* 1999 ; Carroll *et al.,* 2001). Le plateau représente le niveau de stimulation pour lequel la taille des PEM est maximale ; il découle du recrutement maximal des neurones corticospinaux. Un autre point d'intérêt de cette courbe est la S50. Ce point représente l'intensité de stimulation pour laquelle la taille des PEM est égale à la moitié de l'amplitude maximale des PEM. Enfin, le seuil de la réponse représente l'intensité nécessaire à l'activation de la fraction de neurones corticaux et spinaux les plus excitables (Devanne *et al.,* 1997).



$$\mathrm{PEM} = \frac{a}{1 + e^{\left(\frac{x0-x}{b}\right)}}$$

Figure n°12 : **Figure représentative d'une courbe de recrutement construire à partir des PEM du diaphragme.**
L'équation permettant de construire la courbe de recrutement repose sur plusieurs paramètres :
a : valeur maximale de l'amplitude du PEM, représente le plateau de la courbe ;
x0 : représente l'intensité nécessaire à l'obtention d'un PEM de la moitié de la valeur maximale (S50) ;
b : pente de la droite de régression
x : intensité de la stimulation

Baser l'intensité de la simulation sur la S50 en construisant la courbe de recrutement et non en la fixant sur un pourcentage fixe du seuil moteur (par exemple 120%) permet de s'assurer que la même proportion de neurones (corticaux et spinaux) est activée. Cette technique (utilisée pour l'étude n°3) permet de limiter l'influence des propriétés non linéaires des MN (Kernell et Hultborn, 1990).

La construction de cette courbe permet d'obtenir un reflet fiable et sensible des modifications de l'excitabilité du faisceau corticospinal que ce soit pour les muscles de la main ou des muscles plus proximaux (Ridding et Rothwell, 1997 ; Boroojerdi *et al.,* 2001 ; Carroll *et al.,* 2001 ;Malcolm *et al.,* 2006 ; Carson *et al.,* 2013).

3.1.2 Stimulation magnétique transcrânienne répétitive

La TMS en impulsion unique est utilisée pour explorer l'excitabilité de la voie corticospinale mais elle offre, lorsque les impulsions sont délivrées de façon répétée, un outil non douloureux et présentant un bon niveau de sécurité, pour modifier de façon transitoire, l'activité des réseaux neuronaux chez les sujets. La stimulation magnétique transcrânienne

prend alors le nom de stimulation magnétique transcrânienne répétitive (*repetitive TMS,* rTMS). Cette méthode permet, non seulement d'étudier la fonction de zones corticales à travers les modifications d'excitabilité induites mais aussi, en interférant avec un comportement en cours, de comprendre le rôle fonctionnel précis de la région corticale stimulée. Cette interférence est souvent qualifiée de lésion focale virtuelle transitoire (Hallett, 2000). Elle peut induire des modifications d'activité d'aires impliquées dans des processus cognitifs ou moteurs. Cependant, seule l'application des protocoles de rTMS aux aires motrices sera évoquée dans cette thèse.

Ces changements peuvent être observés directement au niveau de la région stimulée ou à partir d'aires interconnectées (Ridding et Rothwell, 2007 ; Càrdenas-Morales *et al.*, 2010). L'importance des effets et la durée d'action de ces protocoles rTMS au niveau des aires motrices peuvent être évaluées en électrophysiologie par la comparaison de la taille des potentiels moteurs (PEM) évoqués en TMS avant et après rTMS sous réserve de contrôler l'activité tonique sous jacente (pour revues, Fitzgerald *et al.,* 2006 ; Ziemann *et al.,* 2008 ; Huang *et al.* 2009b ; Hoogendam *et al.,* 2010 ; Pell *et al.,* 2011). Les paramètres de stimulation choisis permettent de faire varier la direction des effets, l'amplitude et le temps de persistance des post-effets (Ziemann *et al.,* 2008).

Les modifications induites par une session unique peuvent durer de plusieurs minutes à plusieurs dizaines de minutes (pour revue, Càrdenas-Morales *et al.*, 2010), elles sont transitoires et totalement réversibles en une durée moyenne de 30 à 60 minutes (Hallett, 2000 ; Rossi *et al.,* 2009).

Les protocoles de rTMS sont différenciés en deux grandes catégories, les protocoles conventionnels délivrés généralement à des fréquences allant de 1 à 20Hz et des protocoles plus récents, dits « en patron », dans lesquels les impulsions sont délivrées à 50Hz.

3.1.2.1. Protocoles conventionnels

La fréquence à laquelle sont délivrées les stimulations détermine le sens des effets enregistrés ; ainsi, une augmentation de l'excitabilité corticale est enregistrée suite à l'application d'impulsions à des fréquences régulières supérieures ou égales à 5Hz alors que des effets inverses sont évoqués avec des fréquences basses (0,1 à 1Hz).

L'intensité des stimulus est un facteur important ; elle est généralement rapportée en termes de pourcentage du seuil moteur de repos ou actif. De nombreuses combinaisons de fréquence et d'intensité de stimulation sont utilisées dans les études et il en ressort que pour les fréquences basses (1Hz), les protocoles délivrés à 85-90% du seuil de repos (rMT) ou 90% du seuil actif (aMT) ont peu d'effets et que de meilleurs résultats sont obtenus pour une intensité à 110% du rMT (Ziemann *et al.,* 2008).

Un troisième facteur influant sur les post-effets enregistrés et le nombre d'impulsions. Un minimum de 150 impulsions semble requis pour voir se développer des effets post-stimulation (Maeda *et al.,* 2000 **;** Touge *et al.,* 2001) et l'intensité de ces effets augmente avec le nombre de stimulus délivrés (Gangitano *et al.,* 2002 ; Quartarone *et al.,* 2005).

3.1.2.2. Protocoles en « patron »

Les protocoles en « patron » font référence à l'application de trains de stimulation à haute fréquence. Parmi les paradigmes en patron ceux basés sur la fréquence thêta sont les plus utilisés. Cette technique, nommée stimulation par thêta-burst (*thetaburst stimulation*, TBS), est développée à partir de travaux sur le modèle murin. Le cerveau est organisé en réseaux capables de coder une information sous forme de synchronisation des activités neuronales à une certaine fréquence. Lors de l'exploration spatiale d'un nouvel environnement, de brèves décharges synchrones à un rythme thêta (5 à 7Hz, nomenclature EEG) apparaissent dans des réseaux impliquant le cortex entorhinal et l'hippocampe du rat. Ces oscillations sont associées à l'apparition rapide d'une potentialisation à long terme de la transmission synaptique dans les réseaux actifs (Larson et Lynch, 1988). Chez le rat, la stimulation de tranches d'hippocampe selon des patrons de fréquence qui miment le rythme thêta (i.e. 5Hz) induit une plasticité à long terme (Larson *et al.,* 1986). Chez l'humain, Huang et collaborateurs (2005) montrent que des trains de 3 impulsions à 50Hz répétés à 5Hz, mimant le rythme thêta, induisent une potentialisation à long terme lorsqu'ils sont appliqués sur le cortex moteur.

Cette technique de stimulation répétitive consiste à délivrer 600 impulsions à une fréquence de 50Hz. Ces impulsions sont contenues en des trains répétés à une fréquence de 5Hz (1 train toutes les 200ms), chaque train comportant 3 impulsions.

Pour ces protocoles, ce n'est pas la fréquence de stimulation qui détermine la direction des effets post-stimulation mais la présence ou non de courtes interruptions entre les trains de stimulation (Huang *et al.,* 2005).

Alors que 100 ou 200 trains respectivement de 20 ou 40 secondes sans arrêt (*continuous TBS*, cTBS, cTBS300 ou cTBS600) induisent une diminution de l'excitabilité corticospinale, l'interruption de 20 trains (2 secondes) par 8 secondes de pause pendant 190 secondes (*intermittent TBS, iTBS, total 600 impulsions*) se traduit par une facilitation de la réponse (Di Lazzaro *et al.,* 2005, 2008a ; Huang *et al.,* 2005 ; pour revues, Huang *et al.,* 2009b *;* Cárdenas-Morales *et al.,* 2010 ; Oberman *et al.,* 2011).

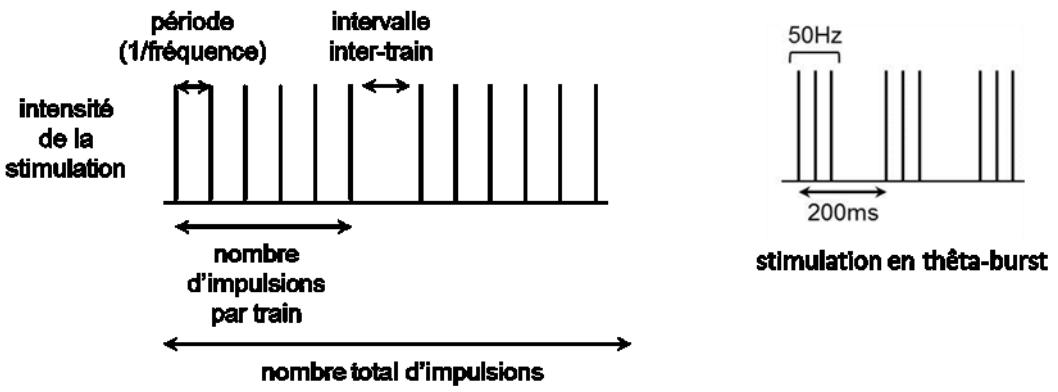


Figure n°13 : **Représentation schématique de la stimulation transcrânienne répétitive**.

Figure de Gauche : Représentation des différents paramètres influençant les effets post stimulation (intensité de stimulation, fréquence, intervalle inter-train et nombre total d'impulsion).

Figure de droite : représentation de la stimulation en thêta-burst. Trois impulsions à 50Hz sont délivrées en un train toutes les 200ms. Pour la stimulation facilitatrice (intermittent thetaburst), 10 trains sont groupés et délivrés toutes les 10s pour un total de 191,84 s. Dans la stimulation inhibitrice (continuous thetabust) 200 trains sont délivrés sont délivrés sans interruption pendant 40,04 s. Dans les deux conditions, le nombre total d'impulsion s'élève à 600.

(Adapté d'après Chen *et al.*, 1997et Huang *et al.*, 2005).

La TBS est généralement employée à des intensités infraliminaires (80% de l'aMT de l'interosseux dorsal) avec un courant biphasique (Huang *et al.,* 2005 ; pour revue, Cárdenas-Morales *et al.,* 2010).

Les travaux initiaux portant sur la TBS appliquée sur le cortex moteur primaire montrent que la cTBS induit une importante diminution des PEM durant 60 minutes post-stimulation alors que l'effet maximal de l'iTBS s'exprime pendant plus de 15 minutes après l'arrêt du protocole (Di Lazzaro *et al.,* 2005 ; Huang *et al.,* 2005). Depuis, plusieurs études ont rapporté une durée des effets après protocole cTBS maximale aux environs de la 10ème minute après l'arrêt de la stimulation (Talelli *et al.,* 2007 ; Gentner *et al.,* 2008 ; Zafar *et al.,* 2008 ; Todd *et al.,* 2009 ; Di Lazzaro *et al.,* 2011 ; McAllister *et al.,* 2011, 2013).

3.1.3 rTMS et voie corticophrénique

Avant cette thèse (cf. Résultats, Étude n°2), une seule étude a porté sur l'étude des PEM du diaphragme suite à l'application de protocoles de stimulation répétitive de l'aire motrice supplémentaire (Raux *et al.,* 2010). Chez 9 sujets, avec un protocole facilitateur à 5Hz (110% aMT du doigt), les auteurs montrent une facilitation significative de la réponse motrice entre 11 et 15 minutes après l'arrêt de la stimulation mais ils ne mettent en évidence aucun effet significatif de protocoles à 10Hz ou à 1Hz. Dans cette étude, le seuil de repos et la

latence des PEM du diaphragme ne sont pas modifiés par les effets facilitateurs du protocole 5Hz.

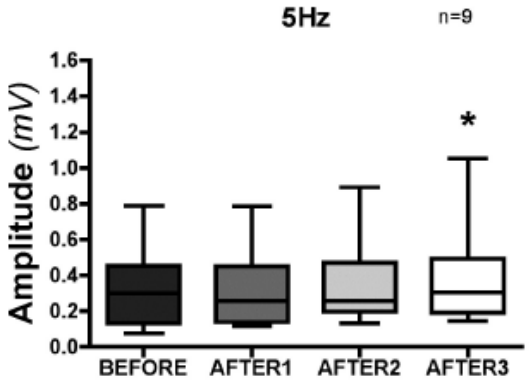


Figure n°14 : **Effets sur les PEM du diaphragme d'un conditionnement en rTMS à 5Hz délivré sur l'AMS**

Amplitudes des PEM du diaphragme avant (BEFORE), et après (de 1 à 6min : AFTER1 ; de 6 à 11min : AFTER 2 ; de 11 à 16min : AFTER 3) l'arrêt d'un conditionnement rTMS à 5Hz appliqué en regard de l'AMS.

(Tiré de Raux *et al.,* 2010 après autorisation)

3.1.4 Effets de la rTMS sur les comportements moteurs

Les effets de la rTMS sur l'excitabilité de la voie corticospinale ont conduit à l'étude des effets de ces protocoles sur les actions motrices. Ces travaux, rapportés ci-dessous chez le sujet sain, visent à décrire les conséquences des modifications d'excitabilité induites par la rTMS sur les paramètres d'un geste en termes de vitesse d'exécution, de précision, de temps de réaction, de coordination ou d'interférence avec un apprentissage moteur (pour revues, Chouinard et Paus, 2010 ; Fang *et al.,* 2010). Si les effets des protocoles sur l'excitabilité motrice sont assez bien reconnus et classifiés selon les types de protocoles (fréquences rTMS ≈ 1Hz et cTBS, inhibition ; rTMS ≥ 5Hz et iTBS, facilitation), les effets comportementaux sont moins clairement différenciés.

3.1.4.1. Effets de la rTMS inhibitrice sur les comportements moteurs

Appliquée sur M1 au niveau de la représentation du doigt cette stimulation augmente ou diminue la vitesse de frappe de l'index controlatéral à la stimulation (Wassermann *et al.,* 1996a ; Jäncke *et al.,* 2004). Pour une tache similaire, d'autres auteurs montrent une augmentation de la vitesse de frappe de l'index homolatéral, mais non de l'index controlatéral (Kobayashi *et al.,* 2004 ; Dafotakis *et al.,* 2008).

Une détérioration ou une amélioration de la précision de geste pouce-index sont rapportées suite respectivement à un protocole en patron et à un protocole conventionnel (Stefan *et al.,* 2008 ; Buetefisch *et al.,* 2011).
Quel que soit le type de protocole, deux études rapportent un allongement des temps de réaction à une tache simple (Huang *et al.,* 2005 **;** Kobayashi *et al.,* 2004).
Les mécanismes d'apprentissage sont altérés par ces protocoles. L'augmentation de la vitesse d'exécution de séquences de mouvements notée suite à un conditionnement sham n'est pas retrouvée après un protocole actif que la stimulation soit appliquée sur M1 ou en regard de l'AMS (Verwey *et al.,* 2002 ; Kobayashi *et al.,* 2009).

3.1.4.2. Effets de la rTMS facilitatrice sur les comportements moteurs

Les protocoles facilitateurs induisent également des modifications variables des composantes du geste.
Une augmentation de la vitesse d'exécution d'un mouvement d'un doigt controlatéral à la stimulation est rapportée avec des protocoles conventionnel et iTBS (Wassermann *et al.,* 1996a ; Teo *et al.,* 2011). Une amélioration est notée pour des séquences complexes demandant l'enchaînement de mouvements des différents doigts suite à une stimulation à en regard de la représentation de la main au niveau de M1 (Yoo *et al.,* 2008) alors qu'une dégradation est décrite lorsque la stimulation est appliquée sur l'AMS (Gerloff *et al.,* 1997).
Une étude met en évidence une détérioration des performances à un test de dextérité manuelle (*pegboard test*) (Pascual-Leone *et al.,* 1994).).
Une analyse des effets d'un protocole de iTBS appliqué sur M1 montre une diminution des temps de réaction dans une tache de choix manuel pour la main controlatérale à la stimulation (Cárdenas-Morales *et al.,* 2011).
L'application de la rTMS sur l'AMS se traduit par une perturbation de l'estimation de la force nécessaire à l'exécution d'un mouvement de saisie pouce-index (diminution du temps d'atteinte de la prise de la cible) (White *et al.,* 2013) et par une détérioration de la coordination bimanuelle, notamment lors de mouvements en antiphase (Serrien *et al.,* 2002 ; Steyvers *et al.,* 2003).

Ces résultats montrant la présence d'effets de la rTMS sur le comportement moteur sont néanmoins nuancés par d'autres études qui ne retrouvent pas de modification des performances motrices avec des protocoles conventionnels ou en patron qu'ils soient appliqués sur M1 ou l'AMS.
Des études avec une stimulation à basse fréquence de M1 notent l'absence de changement de vitesse d'exécution d'un mouvement ou de la production de force pour un geste (Chen *et al.,* 1997 ; Muellbacher *et al.,* 2000, 2002 ; Rossi *et al.,* 2000 ; Noh *et al.,* 2012). Des résultat

négatifs sont aussi rapportés suite à des protocoles facilitateurs (Agostino *et al.,* 2007, 2008).

La variabilité entre études peut certainement s'expliquer par la complexité des réseaux neuronaux impliqués dans les mouvements, par la diversité des effets locaux ou à distance induits par la rTMS, par la disparité des paramètres des protocoles de stimulation utilisés (fréquence, intensité et nombre d'impulsions délivrées) et enfin par la taille des populations étudiées.

3.1.5 Site d'induction de la plasticité par la rTMS

Les effets de protocoles rTMS sur la plasticité de la voie corticospinale sont évalués par l'enregistrement des volées épidurales évoquées par la TMS chez un petit nombre de patients porteurs d'un système de stimulation épidural implanté (dans le cadre de douleurs réfractaires au traitement). Ces études permettent de préciser la nature des effets des protocoles rTMS et d'inférer la localisation des modulations induites.

L'application sur le cortex moteur d'un protocole rTMS (5Hz) est marquée, parallèlement à l'augmentation de la taille des PEM, par une augmentation progressive du nombre et de la taille des volées descendantes. Plus précisément, ce sont les volées indirectes tardives et les volées directes qui sont augmentées alors que les premières volées indirectes (I1) ne sont pas affectées (Di Lazzaro *et al.,* 2002).

Un protocole inhibiteur de type 1Hz produit une diminution de la taille des volées indirectes tardives sans modification des volées indirectes I1 (Di Lazzaro *et al.,* 2008b). La iTBS (facilitatrice) est responsable d'une augmentation des volées indirectes tardives mais n'affecte pas les volées indirectes I1 alors que la cTBS (inhibitrice) est associée à une inhibition marquée des volées I1 (Di Lazzaro *et al.,* 2005). Les modifications de l'amplitude des PEM induites par la TBS sont donc liées à des changements de l'excitabilité des voies excitatrices qui produisent les volées indirectes (Di Lazzaro *et al.,* 2005, 2010 ; Huang *et al.,* 2005 ; Huang, 2010). En résumé, les protocoles rTMS agissent en modulant les réseaux intracorticaux (Di Lazzaro *et al.,* 2005).

Si l'action principale de la rTMS porte sur le cortex et ces circuits intracorticaux, des résultats discordants sont rapportés sur les changements de l'excitabilité spinale. Deux études avec des protocoles en rTMS à 1Hz et à 5Hz appliqués sur M1 à 90% du seuil moteur (600 ou 1500 impulsions) montrent une modification de l'excitabilité des motoneurones spinaux (Valero-Cabré *et al.,* 2001 ; Quartarone *et al.,* 2005) et deux études indiquent une diminution du réflexe H (du fléchisseur radial du carpe au membre supérieur et du soléaire au membre inférieur) suite à la rTMS facilitatrice (130% et 75 à 120% rMT) (Berardelli *et al.,* 1998 ; Perez

et al., 2005). A l'inverse, aucun changement spinal n'est retrouvé dans d'autres études quelles portent sur le cortex moteur ou l'AMS (Modugno *et al.,* 2001 ; Touge *et al.* 2001 ; Matsunaga *et al.,* 2005). Cette différence semble liée au nombre d'impulsions délivrées ou de l'intensité de la rTMS (Siebner et Rothwell, 2003 ; Quartarone *et al.,* 2005) et Perez et collaborateurs (2005) rapporte une relation linéaire entre l'intensité de la stimulation rTMS et l'importance de l'inhibition du réflexe H.

Les effets de la TBS ont principalement pour origine les neurones corticaux et intracorticaux puisque les études en cTBS (300 stimulus, cTBS300) ne montrent pas de modification de l'excitabilité spinale quel que soit le lieu cortical de stimulation (Huang *et al.,* 2005, 2009b ; Huang, 2010). Huang et collaborateurs (2009a) montrent une altération du composant tardif de l'inhibition réciproque suite à un protocole cTBS (100 trains) appliqué sur le cortex prémoteur mais devant l'absence de modification du réflexe H, ils suggèrent l'absence de modulation des étages spinaux.

3.1.6 Mécanismes d'action de la rTMS

La rTMS est une technique qui induit des mécanismes de plasticité analogues à ceux évoqués par des stimulations tétaniques d'une voie afférente et l'étude des mécanismes d'action sous-tendant la rTMS les associe avec l'induction de plasticité synaptique de type LTP/ LTD (Di Lazzaro *et al.,* 2008a ; pour revue, Cárdenas-Morales *et al.,* 2010).

Les effets post-stimulation dépendent du nombre d'impulsions délivrées (seuil d'induction) et de la fréquence de stimulation.

Les effets de la rTMS ressemblent ainsi aux effets des stimulations à haute ou basse fréquence décrits au niveau de l'hippocampe (pour revues, Huang *et al.,* 2009b ; Cárdenas-Morales *et al.,* 2010 ; Hoogendam *et al.,* 2010).

Les effets perdurent après l'application du protocole de stimulation qui se traduit, au niveau du cortex moteur, non seulement par des changements de l'excitabilité du faisceau corticospinal mais aussi par des modifications de l'exécution de tâches motrices.

Cette plasticité est sensible aux antécédents d'activité dans les réseaux neuronaux qu'elle concerne (cf. État de la question, Chapitre 1, paragraphe 3.3 Techniques non invasives et métaplasticité).

Les études pharmacologiques chez l'humain montrent la dépendance de l'émergence des post-effets de la TBS à l'activité des récepteurs NMDA (Huang *et al.,* 2007 ; Teo *et al.,* 2007). Dans une étude en double aveugle, Huang et collaborateurs (2007) montrent qu'un antagoniste des récepteurs NMDA (mémantine) bloque les modifications de l'excitabilité corticospinale induites par les protocoles de TBS.

Des modifications des circuits GABAergiques sont induites par la TBS ; ces protocoles agiraient selon un mélange d'excitation et d'inhibition dont la balance dépend du schéma de stimulation (intermittent ou continuous) (Huang *et al.,* 2005, 2008 ; Stagg *et al.,* 2009 ; pour revue, Thickbroom, 2007). En revanche, l'absence de modification de l'inhibition intracorticale GABAergique suite aux protocoles inhibiteurs classiques conforte l'hypothèse de leur action via une diminution d'efficacité des synapses excitatrices glutamatergiques (modification des récepteurs AMPA) plutôt que par altération de l'efficacité des influx inhibiteurs (Heide *et al.,* 2006 ; pour revue, Fitzgerald *et al.,* 2006).

La plasticité induite par la rTMS diffère néanmoins par ses caractéristiques des formes décrites dans les études in vivo et in vitro car la rTMS active un grand nombre d'axones, excitateurs ou inhibiteurs, en des sites pré et post synaptiques de façon simultanée. Elle ne peut donc être qualifiée de spécifique d'une voie (Bestmann *et al.,* 2003 ; pour revues, Ziemann et Siebner, 2008 ; Pell *et al.,* 2011). A partir de ces différents éléments il est habituel de conclure que la rTMS agit via un mécanisme mimant la plasticité synaptique dit plasticité « *LTP/LTD-like* » (pour revues, Di Lazzaro *et al.,* 2010 ; Pell *et al.* 2011).

Les effets de la rTMS ne sont cependant pas purement synaptiques mais impliquent des modifications de l'excitabilité intrinsèque des neurones.
Avec des protocoles conventionnels (1Hz, 90%rMT ; 20Hz, 115%) Houdayer et collaborateurs (2008) notent, suite au protocole à basse fréquence, une augmentation de la pente de la courbe, indiquant une augmentation de l'excitabilité corticospinale, et une augmentation du seuil moteur de repos, qui représente une diminution de l'excitabilité intrinsèque des neurones. Avec le protocole à haute fréquence, les auteurs rapportent également une augmentation de la pente mais un déplacement de la courbe vers la gauche qui se traduit par une diminution de la S50 et du plateau.

3.2 Stimulation par courant continu

3.2.1 Généralités sur la plasticité induite par courant continu

La stimulation par courant continu est une technique très ancienne qui a fait l'objet de quelques études dans les années 1950 (Fuortes, 1954) puis d'un regain d'intérêt à la fin des années 1980, en parallèle avec l'augmentation des champs d'utilisation de la rTMS (pour revue, Priori, 2003).

Les premières expérimentations sur les rats et les chats montrent que l'application d'un faible courant anodal ou cathodal au niveau du scalp influence respectivement le seuil tonique de décharge des neurones vers l'augmentation ou la diminution ; ces études rapportent aussi des effets durables suite à la prolongation de l'administration du courant

pendant plusieurs minutes (pour revue, Priori, 2003). Chez l'humain, Priori et collaborateurs (1998) confirment les effets de courants de très faible intensité (<0,5mA, <7sec) sur l'excitabilité du cortex moteur, en montrant qu'un courant anodal immédiatement suivi d'un courant cathodal induit, juste après l'arrêt de la stimulation, une diminution de la taille des PEM. Par la suite, Nitsche et Paulus (2001) observent que le temps de rémanence des post-effets de la stimulation transcrânienne par courant continu (*transcranial direct current stimulation, TDCS*) est directement proportionnel à l'intensité et la durée de la stimulation.

3.2.2 Stimulation transcutanée spinale par courant continu

Alors qu'il existe de nombreuses techniques pour moduler l'activité du cortex (TMS, TDCS,…), seules quelques techniques permettent d'induire des modifications de l'excitabilité des motoneurones de la moelle spinale chez l'humain. Parmi celles-ci, la stimulation transcutanée spinale par courant continu (transcutaneous spinal direct current stimulation, tsDCS), technique dérivée de la TDCS, fait l'objet de recherche depuis les années 2000.

A l'instar de la TDCS, le courant continu est appliqué directement à travers des éponges trempées dans une solution saline via un stimulateur à courant constant mais les électrodes sont placées en regard de la moelle lombaire ou cervicale, selon les études.

Les effets de la tsDCS sur les propriétés de conduction de la moelle spinale dépendent de l'intensité du courant (Ahmed, 2011) et sont mis en évidence, chez l'humain et l'animal, par des modifications électrophysiologiques mais aussi fonctionnelles.

3.2.2.1. tsDCS et modulation des propriétés de conduction des voies ascendantes

En 2008, Cogiamanian et collaborateurs rapportent, chez 12 volontaires sains, qu'un courant anodal (2,5mA, 15min) appliquée en regard de la moelle lombaire (Th10, référence sur l'épaule droite) diminue l'amplitude du potentiel cervico-médullaire P30 pour une durée d'au moins 2 minutes après l'arrêt de la stimulation. Ceci traduit une diminution de la conduction dans la voie lemniscale liée à une hyperpolarisation des axones.

Une étude chez 17 sujets sains, selon le même protocole, *(*2,5mA, 20min) montre que le courant anodal diminue l'amplitude des réponses N1 et N2 induites par des potentiels évoqués laser au niveau du pied pendant l'application du courant continu. Cette atténuation de la perception de stimulus douloureux au niveau du pied est à mettre en relation avec une diminution de la transmission dans la voie spinothalamique (Truini *et al.,* 2011).

Une autre étude met en évidence une altération de la conduction des afférences nociceptives chez les sujets sains avec une diminution de la composante RIII du réflexe polysynaptique de flexion évoquée au niveau du membre inférieur pendant et jusqu'à 30

minutes après l'arrêt du courant anodal (électrode active au niveau du processus épineux de Th10, référence sur l'épaule droite ; 2mA, 15min) (Cogiamanian *et al.,* 2011).

Des modulations similaires des voies afférentes sont obtenus chez le rat avec un montage dorso-ventral (électrode active dorsale épidurale en regard des vertèbres Th9-Th10, référence au niveau de l'abdomen ; 1mA, 15min). Le courant anodal diminue l'amplitude de la réponse à une stimulation électrique de la patte enregistrée au niveau du noyau gracile dans le bulbe alors que le courant cathodal induit un effet inverse. Ces modulations de la voie lemniscale persistent pendant environ 10 minutes post-stimulation (Aguilar *et al.,* 2011).

3.2.2.2. tsDCS et modulation de la transmission des voies descendantes

En plaçant les électrodes en regard des métamères cervicaux (électrode active placée au-dessus de C7, référence sous l'angle cervico-mentonnier en position sagittale ; 2mA, 20min), Lim et Shin (2011) montrent, chez 12 volontaires sains, que le courant continu engendre une augmentation de l'amplitude des potentiels évoqués moteurs d'un muscle de l'avant-bras (flexor carpi radialis) évoquée par TMS. Cette modulation persiste pendant au moins 2h après l'arrêt de la stimulation, que le courant soit anodal ou cathodal.

La stimulation appliquée au niveau au thoraco-lombaire (électrode active couvrant Th10-L1, référence placée latéralement sur l'abdomen ; 3mA, 3min) modifie les réponses du triceps sural évoquées par stimulation du cortex moteur chez le rat. Les deux polarités de courants modulent les PEM de façon opposée pendant la stimulation et jusqu'à 20 minutes après l'arrêt du courant. Durant le passage du courant en polarité anodale, les réponses décroissent puis augmentent dans la phase post-stimulation et inversement pour le courant cathodal (Ahmed, 2011).

3.2.2.3. tsDCS et modulation des réseaux neuronaux spinaux lombaires

Deux études portent sur la modulation de réflexes spinaux chez l'humain.

Chez 10 sujets sains, en plaçant les électrodes en regard de la moelle lombaire (électrode active en regard de Th11, référence dans la région infra-claviculaire gauche ; 2,5mA, 15min), Winkler et collaborateurs (2010) montrent que la dépression homosynaptique du réflexe H est modulée jusqu'à 15min après l'arrêt de la stimulation. Le courant anodal induit une diminution de la dépression homosynaptique correspondant à une augmentation de l'amplitude du réflexe H et l'effet est inverse pour le courant cathodal.

Selon le même protocole (électrode active en regard de Th11, référence sur l'épaule droite ; 2,5mA, 15min), Lamy et collaborateurs (2012) mettent en évidence une augmentation de

l'amplitude du réflexe H, un déplacement de la courbe de recrutement de ce réflexe vers la gauche durant et après la tsDCS anodale, une diminution du seuil moteur et de la S50. Ces résultats traduisent une augmentation de l'excitabilité du circuit monosynaptique Ia.

La présence de modification de ces réflexes spinaux a permis de préciser l'action de la tsDCS directement au niveau des étages spinaux. La possibilité de la participation de modulations de voies afférentes venant influencer les étages médullaires ne peut cependant être totalement exclue.

3.2.2.4. tsDCS et comportement moteur

Une étude rapporte une augmentation de l'amplitude de mouvements monoarticulaires et plurirarticulaires de la patte évoqués par stimulation corticale chez le rat pendant un courant cathodal (électrode active couvrant les métamères lombaires, référence sur l'abdomen ; 0,8mA, 8sec) (Ahmed, 2013b). L'amplitude du mouvement généré au niveau cortical est amplifiée pendant la stimulation par la potentialisation de l'activité des motoneurones des étages médullaires.

3.2.3 Mécanismes d'action de la stimulation par courant continu

Les mécanismes d'action d'effets du courant continu au niveau des étages spinaux sont encore peu connus alors que ceux de la tDCS sont mieux décrits bien qu'encore débattus.

Pendant la stimulation, la tDCS agit en générant un changement du potentiel de repos de la membrane dépendant de la polarité de stimulation. Au niveau du cortex moteur, le courant anodal génère une diminution du potentiel membranaire de repos qui se traduit par une augmentation de l'excitabilité corticale alors que le courant cathodal induit une hyperpolarisation de la membrane et donc une diminution de l'excitabilité neuronale (Nitsche et Paulus, 2000 ; Bindman *et al.,* 1964). Ces modifications sont liées à des altérations de conductance des canaux sodiques et calciques. En effet, l'administration d'un antagoniste des canaux sodiques voltage dépendant (carbamazepine) et d'un antagoniste des canaux calciques voltage dépendant abolit, pour le premier, et diminue, pour le second, les effets du courant pendant la stimulation (Liebetanz *et al.,* 2002 ; Nitsche *et al.,* 2003a).

Mais ces modulations de potentiels ne peuvent être les seuls mécanismes puisqu'ils n'expliquent pas la persistance des effets de la tDCS jusqu'à une heure après l'arrêt du courant (Nitsche et Paulus, 2001 ; pour revue, Nitsche *et al.,* 2003b).
La sensibilité des récepteurs NMDA aux neurotransmetteurs est altérée. Les études pharmacologiques montrent, à travers les effets d'antagonistes des récepteurs NMDA (dextromethorphan), l'implication de ces récepteurs ionotropiques dans l'apparition des effets et ce quelle que soit la polarité du courant (Liebetanz *et al.,* 2002 ; Nitsche *et al.,* 2003a).

Ces changements synaptiques s'accompagnent également de modifications des concentrations en neurotransmetteurs. L'augmentation d'excitabilité suite à une stimulation anodale s'accompagne d'une diminution de la concentration intracorticale en GABA alors que le courant cathodal n'induit pas de modification de la concentration de ce neurotransmetteur mais une diminution du glutamate (Nitsche *et al.,* 2004 ; Stagg *et al.,* 2009 ; Krause *et al.,* 2013). De plus, les effets des protocoles tDCS sur la plasticité corticale chez l'humain sain sont altérés par la prise d'un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (citalopram). Suite à une prise unique, les effets facilitateurs du courant anodal sont renforcés et les effets inhibiteurs du courant cathodal sont annulés et renversés vers la facilitation la sérotonine (Nitsche *et al.,* 2009).
Au-delà de ces effets synaptiques, la TDCS agit aussi sur l'excitabilité corticale par des altérations des propriétés de la membrane contribuant à des modifications non synaptiques de la propagation de l'influx au niveau des neurones corticaux et intracorticaux (Ardolino *et al.,* 2005 ; Nitsche *et al.,* 2005).

Au total, les mécanismes sous tendant les effets post-stimulation reposeraient sur une modification des modifications du potentiel de repos des membranes neuronales, de la sensibilité des récepteurs NMDA, des changements de concentrations en neurotransmetteurs et des mécanismes non-synaptiques ce qui permet de les apparenter à des phénomènes de plasticité de type LTP/LTD (Liebetanz *et al.,* 2002; Nitsche *et al.,* 2003a, 2008 ; Priori *et al.,* 2009).

3.3 Techniques non invasives et métaplasticité

Le sens des effets induits par ces techniques dépendent du niveau d'activation synaptique préalable à la stimulation. Divers protocoles de tDCS ou de rTMS appliqués avant un protocole de rTMS sur M1 modulent les effets du second. Ainsi, l'application d'un courant continu cathodal (inhibiteur) avant un protocole rTMS inhibiteur (1Hz) conduit à une inversion des effets ; appliqué avant un protocole facilitateur (iTBS), il conduit à un renforcement de la LTP (Iyer *et al.*, 2003 ; Lang *et al.*, 2004 ; Siebner *et al*,. 2004; Hasan *et al.*, 2012). De même, l'application d'un protocole facilitateur (iTBS) avant un protocole inhibiteur (cTBS) accroît les effets de LTD (Todd *et al.*, 2009).

D'autres études montrent que les effets des protocoles rTMS sont modulés par une autre forme de modification de l'activité synaptique, la contraction musculaire.
Deux études rapportent une inversion des effets des protocoles TBS lorsqu'ils sont appliqués après des contractions isométriques ou de courtes périodes de contractions phasiques de muscles du doigt (Gentner *et al.,* 2008 ; Iezzi *et al.,* 2008). 5 minutes de contraction isométrique d'un muscle du pouce suivi de 2 minutes de repos préalablement à la rTMS sont

nécessaires selon Gentner et collaborateurs (2008) à l'évocation d'une inhibition par un protocole de cTBS (cTBS300, 70%rMT). De brèves contractions phasiques (30 mouvements) pratiquées avant l'application du protocole inversent leurs effets de la facilitation vers l'inhibition pour la iTBS et inversement pour la cTBS pour une durée d'au moins 30 minutes (Iezzi *et al.,* 2008). De même, une autre étude indique qu'une contraction tonique (20% de la force maximale, durée 1min) effectuée immédiatement après le conditionnement inverse les effets de la cTBS de l'inhibition vers la facilitation et renforce la facilitation induite par le protocole iTBS (Huang *et al.,* 2008).
L'activation de l'aire motrice cible (contraction du muscle) pendant la stimulation cTBS empêche le développement de phénomènes de plasticité (Huang *et al.,* 2008). Par ailleurs, l'intensité de la plasticité engendrée par les protocoles de TBS est réduite si la stimulation est appliquée sur le cortex moteur alors que le muscle cible controlatéral est en contraction (Huang *et al.,* 2008).
Ces résultats sont à mettre en lien avec la régulation homéosynaptique de la plasticité ou métaplasticité (pour revue, Thickbroom, 2007).

Une absence de régulation de la plasticité pourrait conduire à un emballement des réseaux c'est-à-dire à une potentiation accrue conduisant à une plasticité aberrante ou à une dépression excessive et à une non fonctionnalité des réseaux. Pour éviter les phénomènes d'emballement, un système d'autorégulation du niveau d'activité des réseaux neuronaux tend à maintenir en équilibre la balance entre stabilité et capacité d'induction de plasticité et ce quel que soit le mécanisme responsable de la plasticité (Turrigiano *et al.,* 1998).

Le terme de métaplasticité ajoute une notion de flexibilité du seuil d'induction de la plasticité. Un cadre conceptuel pour expliquer la métaplasticité homéostatique des modifications de l'excitabilité synaptique est posé avec la théorie de Bienenstock–Cooper–Munro (BCM) au niveau du cortex visuel puis étendue à d'autres aires du cerveau (Bienenstock *et al.,* 1982). Selon ces auteurs, le maintien à des niveaux élevés de genèse de potentiels d'action d'une cellule postsynaptique est compensé par un déplacement du seuil d'évocation de la LTP la rendant plus difficile à obtenir et par un abaissement du seuil d'induction de la LTD la rendant plus probable (pour revue, Abraham, 2008). Cette théorie est retenue également pour expliquer la régulation homéostasique de la plasticité induite par les protocoles thêta-burst (Fung et Robinson, 2014).

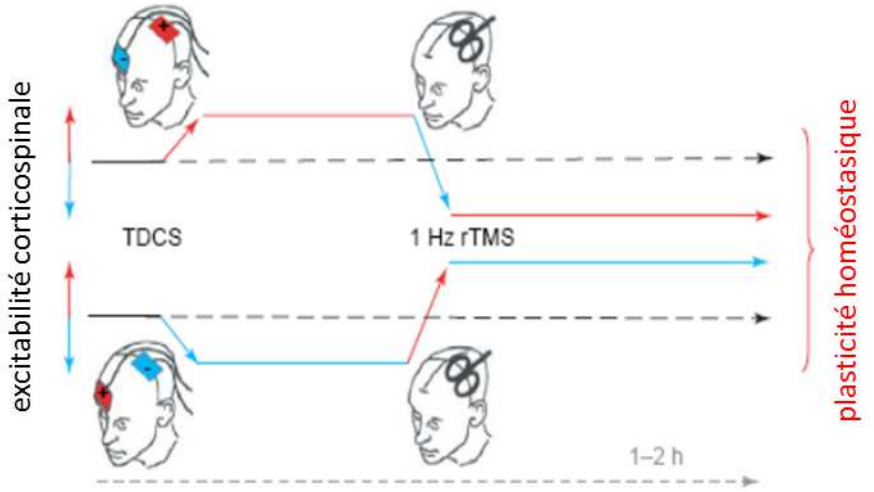


Figure n°15 : **Schématisation des effets de la plasticité synaptique bidirectionnelle selon la théorie de Bienenstock-Cooper-Munro**

Suite à l'induction d'une LTP, le seuil pour l'induction d'une LTP ultérieure est augmenté alors que celui pour une LTD est diminué.
Inversement, suite à l'induction d'une LTD, le seuil pour l'induction d'une LTD ultérieure est augmenté alors que celui pour l'induction d'une LTP sera diminué.
Suite à l'application d'une stimulation transcrânienne par courant continu (tDCS) facilitatrice (en polarité anodale), l'excitabilité corticospinale est augmentée ; une stimulation en rTMS inhibitrice appliquée ensuite induit une inhibition.
En revanche, l'application du même type de protocole rTMS inhibiteur suite à protocole tDCS inhibiteur (en polarité cathodal) se traduit par une inversion des effets de ce dernier et conduit à une facilitation de l'excitabilité corticospinale.

(Adapté d'après Quartaronne *et al.*, 2006)

La notion de plasticité homéostatique fait ainsi référence à ces ajustements qui visent au maintien de la stabilité de l'excitabilité des neurones alors qu'ils sont soumis à une augmentation ou une diminution prolongée de leur activité. Ce mécanisme repose sur des modifications pré et postsynaptiques et sur des modifications des propriétés intrinsèques des MN (Turrigiano *et al.,* 1998 ; pour revue, Davis, 2013).

Des évolutions de la fusion des vésicules contenant les neurotransmetteurs en réponse à des changements de l'activité synaptique sont enregistrés au niveau de la jonction neuromusculaire chez la drosophile. Suite à des manipulations génétiques altérant la fonction des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques, l'innervation ou l'excitabilité musculaire, une augmentation de la libération de neurotransmetteurs compense la diminution de l'excitabilité postsynaptique (pour revue, Davis, 2013). Des modifications similaires de la libération de neurotransmetteurs sont présents chez l'humain (Cull-Candy *et al.,* 1980 ; pour revue, Davis, 2013). Ces adaptations homéostasiques présynaptiques sont aussi présentent, in vitro, sur des neurones centraux (hippocampiques) de mammifères (Burrone *et al.,* 2002 ; pour revue, Davis, 2013).

En réponse à une augmentation ou une diminution rapide et prolongée des influx excitateurs, les récepteurs AMPA de la membrane postsynaptique sont l'objet de modifications plastiques qui les amènent réciproquement à diminuer ou à augmenter leur activité et donc à diminuer ou augmenter les effets du neurotransmetteur. L'expression de ces modifications sur l'excitabilité synaptique requièrent des heures voire des jours puisqu'elles reposent sur des modifications protéiques et des remaniements au niveau des synapses (Turrigiano *et al.,* 1998)

Des adaptations de la conductance des canaux voltage dépendant (Na^+, K^+ et Ca^{2+}) qui contrôlent les propriétés de décharge des neurones sont montrées chez les mammifères. Par exemple, suite à la suppression de gènes codant pour des canaux ioniques sodiques, la fréquence de décharge de la cellule est transitoirement altérée mais rapidement, d'autres canaux ioniques, sensibles à d'autres ions et présentant un fonctionnement normal, augmentent leur activité et restaurent la fréquence spécifique au neurone en compensant l'absence de courant sodique (Van Wart et Matthews, 2006). Pour un même influx, la sensibilité des neurones postsynaptiques est ainsi modifiée vers une diminution ou une augmentation de la fréquence de décharge (Turrigiano et Nelson, 2000).

La plasticité synaptique est ainsi étroitement maintenue dans une amplitude physiologique limitée. Cette forme de plasticité repose sur de rapides modifications des récepteurs NMDA et non NMDA (Hulme *et al.,* 2013). Ces changements ont une expression hétérosynaptique, ils s'appliquent donc aux synapses directement impliquées mais aussi aux synapses environnantes (Bienenstock *et al.,* 1982).

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Les échanges gazeux indispensables à la vie sont rendus possibles par la contraction de muscles respiratoires. Cette activité musculaire doit être maintenue tout au long de l'existence, y compris pendant les phases de sommeil. Sa commande est à la fois homéostatique (automatismes neuronaux au niveau du tronc cérébral) et non homéostatique (par exemple, modification émotionnelle de l'activité ventilatoire, d'origine limbique ; commande volontaire d'origine corticale à visée ventilatoire ou non [parole]).

Cette organisation permet, par un jeu d'interaction permanente entre ces deux sources, l'adaptation optimale des commandes envoyées aux motoneurones spinaux des muscles respiratoires selon les demandes du système. Ces différents réseaux neuronaux ne sont pas immuables mais sont capables de modifier de leur réponse en réponse à des changements intrinsèques (grossesse, pathologie pulmonaire, lésion neurale) ou extrinsèques (modification environnementale, apprentissage).

Les phénomènes de plasticité qui ont été décrits dans la première partie de cette thèse existent à tous les niveaux du système de contrôle de la ventilation (pour revues, Johnson et Mitchell, 2002 ; Mitchell et Johnson, 2003). Une puissante plasticité ventilatoire a ainsi été décrite, chez le chat, en réponse à la stimulation électrique d'une voie afférente (Millhorn *et al.*, 1980a), à l'hypoxie chez l'humain sain éveillé (Harris *et al.,* 2006 ; Wadwha *et al.,* 2008 ; Lee *et al.,* 2009 ; Syed *et al.,* 2013 ; pour revue, Mateika et Sandhu 2011) et lors d'apprentissages chez l'animal et l'humain (Demoule *et al.*, 2008 ; Raux *et al.*, 2013 ; pour revue, Gallego *et al.*, 2001).

Pour autant, l'induction d'une plasticité du contrôle ventilatoire par des techniques magnétiques ou électriques n'a fait l'objet que de très peu de travaux.

Avant la présente thèse, une seule étude a montré que la rTMS pouvait modifier l'excitabilité de la voie corticophrénique (Raux *et al.*, 2010). Dans cette étude, une rTMS facilitatrice délivrée en regard de l'AMS entrainait une augmentation de la taille des PEM diaphragmatiques qui persistait après l'arrêt de la stimulation. Ce résultat permet de proposer que cette technique évoque au niveau de la commande corticophrénique des mécanismes similaires à ceux de la LTP. L'hypothèse explicative principale de cette observation était une augmentation d'excitabilité de la représentation du diaphragme au niveau des neurones du cortex moteur primaire via une connexion AMS-M1. Une modification de l'excitabilité spinale via la voie directe de l'AMS vers les motoneurones phréniques était considérée comme possible mais peu vraisemblable. Aucun effet inhibiteur n'était mis en évidence avec un protocole en rTMS à 1Hz.

Par ailleurs, une étude utilisant une technique de stimulation transcrânienne par courant continu a montré la possibilité de modifier l'excitabilité de la voie corticophrénique à partir de la représentation du diaphragme au sein de M1. Les auteurs notaient une diminution persistante (≥ 10min après l'arrêt de la stimulation) de l'amplitude des PEM du diaphragme suite à l'application d'un courant en polarité anodale ou cathodale (Azabou *et al.*, 2013).

Ces deux études (Raux *et al.*, 2010 ; Azabou *et al.*, 2013) montrent que les techniques non invasives utilisées pour induire de la plasticité au niveau des aires motrices corticales peuvent être appliquées à la commande ventilatoire.

De nombreuses questions restent posées : (i) quels sont les effets de la spécificité du contrôle neural du diaphragme par rapport à celui des muscles des membres (interaction permanente des commandes homéostasiques et non-homéostasiques), (ii) en quels sites est-il possible d'induire une plasticité (cortex, tronc cérébral, moelle épinière), (iii) quels sont les effets correspondant sur la modification du profil ventilatoire et (iv) quels sont les effets perceptuels (modifications des sensations respiratoires en situation de contrainte) résultants de l'induction de plasticité de la commande ventilatoire.

Dans ce contexte, les trois études présentées dans cette thèse, visent à vérifier les hypothèses suivantes :

- Une stimulation par rTMS délivrée en regard de l'AMS peut induire une plasticité non seulement excitatrice mais encore inhibitrice (étude n°1) ; un tel résultat démontrerait la participation de structures corticales dans le phénomène de « *wakefulness drive to breathe* » ;
- Une stimulation par rTMS délivrée en regard de l'AMS modifie le profil ventilatoire en réponse à une contrainte mécanique inspiratoire (étude n2) ; un tel résultat viendrait renforcer la conception actuelle du rôle majeur de l'AMS dans la compensation d'une contrainte inspiratoire et ouvrirait la voie à des études sur la dyspnée ;
- Une stimulation par tsDCS appliquée en regard des métamères cervicaux contenant les motoneurones phréniques induit une plasticité de la commande ventilatoire au niveau spinal. Cette plasticité se traduit par des modifications du profil ventilatoire indépendants des influx bulbospinaux et corticospinaux (étude n°3) ; ces résultats ouvriraient la voie à l'utilisation de la tsDCS (seule ou en association avec des approches pharmacologiques) pour modifier la ventilation dans le cadre de pathologies qui en affectent la commande.

Cette thèse a donc pour objectif de poser les fondations d'un programme de recherche translationnel ayant pour objectif l'identification de la plus-value de techniques non-invasives

d'induction d'une plasticité neurale dans le traitement d'affections respiratoires et de leurs symptômes.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Ce chapitre expose les méthodes expérimentales utilisées dans le cadre de notre recherche.

Conformément à la loi Huriet, les expérimentations ont été conduites après réception de l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VI, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France (Annexes I et II). Celles-ci ont été effectuées au sein du Laboratoire de Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, affilié à INSERM, UMR_S 1158 et dans le Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière.

Aucun sujet n'avait de connaissances sur les fondements physiologiques des expérimentations menées. Il leur a systématiquement été demandé de ne pas être en situation de privation de sommeil et d'éviter la consommation d'alcool ou de substances psychotropes pendant les 24 heures précédant la séance expérimentale.

Lors de la visite d'inclusion, les sujets ont reçu une information détaillée et ont donné leur consentement éclairé par écrit. Ils ont perçu une rémunération pour leur participation.

CHAPITRE 1 : MOYENS D'ÉTUDE DE LA COMMANDE VENTILATOIRE

La commande ventilatoire peut être étudiée dans sa traduction mécanique par l'enregistrement de diverses grandeurs ventilatoires. Elle peut aussi être quantifiée par l'étude de l'excitabilité de la voie corticophrénique via des mesures électrophysiologiques qui reposent sur la technique de stimulation magnétique transcrânienne (TMS).

1. Principe des méthodes de mesure de la commande ventilatoire

Les explorations *in vivo* du contrôle ventilatoire reposent sur la caractérisation des signaux efférents transmis par les différents niveaux de contrôle depuis la commande jusqu'à l'effecteur ventilatoire. La commande ventilatoire est explorée au travers de l'enregistrement des débits, pressions et volumes d'air entrant et sortant des poumons, soit en ventilation de repos, soit en réponse à des stimulations variées (hypoxie, hypercapnie, exercice, charges additionnelles).

Les grandeurs ventilatoires enregistrées comportent des données volumétrique (volume courant, V_T), temporelles (fréquence respiratoire (f), durée du cycle respiratoire (T_T), temps inspiratoire et expiratoire (Ti, Te), rapport T_I/ T_T, temps pour atteindre la pression maximale (*time to peak pressure*)) et débimétriques (débit inspiratoire moyen V_T/T_I, reflet de l'intensité de la commande inspiratoire) (Milic-Emili, 1982).

La ventilation représente le produit du volume courant (V_T) par la fréquence (f)

$$Ve = V_T * f$$

La fréquence peut être écrite comme l'inverse de la période du cycle ventilatoire (T_T) ; l'équation s'écrit comme

$$Ve = V_T * \frac{1}{T_T}$$

En faisant intervenir la durée de l'inspiration (Ti), l'équation devient:

$$Ve = \left(\frac{VT}{Ti}\right) * \left(\frac{Ti}{T_T}\right)$$

Selon cette équation, la ventilation est caractérisée par ces deux éléments : la composante V_T/Ti correspond à l'intensité de la commande inspiratoire et représente le débit moyen inspiratoire. Il est la traduction mécanique de la commande neuronale centrale produite par les centres inspiratoires. C'est donc un index de cette activité (Milic-Emili, 1982) ; le rapport T_I/T_T exprime la durée relative de l'inspiration par rapport à la totalité du cycle ventilatoire.

Nommé temps de consigne, il renseigne sur le temps de décharge des neurones inspiratoires.

L'analyse du profil ventilatoire selon ses différents éléments représente ainsi la traduction mécanique de la commande centrale et ne permet qu'une approche indirecte de l'activité neuronale.

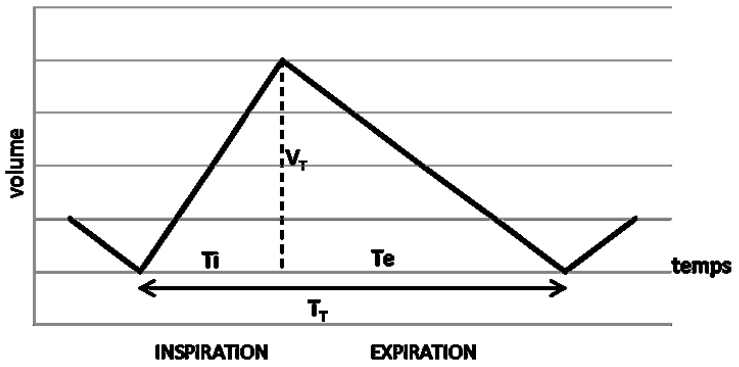


Figure n°16 : **Représentation schématique d'un spirogramme**

Le schéma du spirogramme permet de décomposer le profil ventilatoire selon ses différentes grandeurs. La ventilation en volume courant (V_T). la durée de l'inspiration (Ti) et de l'expiration (Te). Le temps total représente la somme du Ti et Te. Le rapport Ti/T_T exprime la durée relative de l'inspiration au cours du cycle ventilatoire. Le V_T/Ti représente le débit inspiratoire moyen. Il correspond à la transformation mécanique des efférences du système de contrôle de la ventilation. Chez un sujet sain, il représente l'intensité de cette commande.

(Adapté d'après Similowski 1996c).

Le volume courant V_T est l'intégrale du débit moyen en fonction du temps. Inversement, le débit moyen peut être calculé en dérivant ce signal de volume

2. Techniques d'analyse du profil ventilatoire

Plusieurs méthodes ont été employées dans la littérature pour l'étude du profil ventilatoire. Nous en avons utilisé deux au cours de cette thèse. L'une implique l'utilisation d'une pièce buccale, d'un pince-nez et d'un pneumotachographe. L'autre, une mesure non invasive du patron ventilatoire grâce à un gilet de pléthysmographie.

2.1 Mesures de débit et pression

Le pneumotachographe (3700A series, 0-160 $l.min^{-1}$, Hans Rudolf, Kansas City, MO, USA) est un capteur de débit qui dispose d'une faible résistance (< 1cm $H_2O.L^{-1}.s^{-1}$) et d'un espace mort limité (~ 40ml). Le pneumotachographe est relié à un capteur de pression différentielle

(± 5cm H_2O, DP45-18, Validyne, Northridge, CA, USA) et couplé à un amplificateur de signal analogique (Spirometer, ADInstruments, Sydney, Australie) qui permet de transformer un débit en une pression différentielle linéaire. Le volume courant a été reconstitué en calculant l'intégrale du signal de débit au cours d'un cycle ventilatoire. Le temps inspiratoire (T_I), expiratoire (T_E), le temps total (T_T), la fréquence respiratoire (f), le débit inspiratoire moyen (V_T/T_I) et le temps de consigne (T_I/T_T) ont été obtenu à partir d'un logiciel d'analyse des signaux respiratoires (Chart 7.3, AD Instruments, Castle Hill, Australia). La ventilation minute a été calculée à partir du rapport V_T x f.

La pression inspiratoire est mesurée avec un capteur de pression différentielle (± 100cm H_2O, DP15-34, Validyne, Northridge, CA, USA) connecté à un port sur la pièce buccale.

La pression partielle en CO_2 du gaz expiré ($P_{ET}CO_2$) a été mesurée à l'aide d'un analyseur de gaz à infrarouge (IR1505, Servomex, Plaine Saint Denis, France), connecté sur la pièce buccale reliant le sujet au dispositif ventilatoire. Les chiffres de $P_{ET}CO_2$ retenus correspondaient à la valeur de fin d'expiration.

2.2 Pléthysmographie respiratoire d'induction

La méthode d'évaluation directe par pièce buccale et pneumotachographe est la plus communément utilisée dans les études respiratoires. Cependant en modifiant la respiration naturelle, naso-nasale, ce dispositif altère le profil ventilatoire spontané. Ces modifications sont ainsi marquées par une augmentation du volume courant et de la ventilation et une diminution de la fréquence respiratoire (Perez et Tobin, 1985).

L'étude du profil ventilatoire de façon non invasive peut être réalisée par l'utilisation de la pléthysmographie respiratoire d'induction (*respiratory inductive plethysmography, RIP*). Cette méthode permet le calcul du volume pulmonaire à partir de l'analyse des variations de conformation de l'abdomen et du thorax. Les sujets sont revêtus d'un gilet, élastique dans le sens transversal et inextensible dans le sens vertical, pourvu de capteurs sous forme de deux spires d'inductance munies chacune d'un oscillateur. Ces fils de cuivre conducteurs, isolés, sont cousus en zigzag sur une bande de tissu extensible entourant le thorax et l'abdomen. La modification de la conformation du thorax et de l'abdomen conduit à un étirement des bobines et induit des variations de fréquence d'oscillation dans le système. Ces modulations sont analysées par un boîtier de traitement qui numérise et traite les signaux en temps réel grâce au logiciel du Visuresp® (RBI, France). Ce signal a été également dérivé vers un convertisseur analogique-digital et enregistré à une fréquence d'échantillonnage de de 40Hz (Maclab 16S, Powerlab System, AD Instruments, Castle Hill, Australia) et transféré sur un ordinateur portable permettant une analyse a postériori (Chart v5.2 software, AD Instruments, Castle Hill, Australia).

Le calcul du signal de volume pulmonaire est établi à partir de la combinaison des variations de surface de sections du thorax et de l'abdomen. Le signal de débit est calculé en dérivant le signal de volume obtenu en fonction du temps.

Une correspondance satisfaisante est montrée entre le signal obtenu en ventilation de repos par RIP et celui recueilli avec un pneumotachographe dans différentes positions (assis, décubitus) (Eberhardt *et al.,* 2001).

Cette méthode de mesure de la ventilation permet également d'évaluer de façon fiable la complexité ventilatoire (Fiamma *et al.*, 2007a).

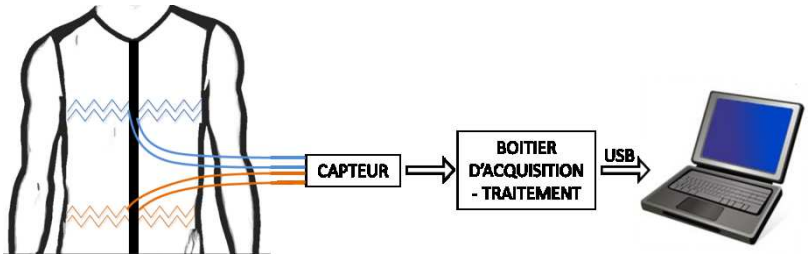


Figure n°17 : **Représentation schématique du système d'acquisition du profil ventilatoire par la technique de la pléthysmographie respiratoire d'induction**

Les capteurs insérés dans le gilet sont reliés à un boîtier d'acquisition et de traitement du signal. Un câble USB assure la connexion à un PC qui permet d'enregistrer et d'analyser les données.

3. Évaluation de la complexité du signal respiratoire

La régulation du système de contrôle de la ventilation repose sur des boucles de rétroaction notamment issues de chémorécepteurs, par des influx efférents issus de la commande supraspinale mais aussi par l'intégration de ces commandes au niveau des motoneurones respiratoires. Le signal mécanique qui résulte de cette commande n'est pas régulier mais il adopte une allure de type chaotique, reflet de la complexité dont fait preuve ce système dynamique (Fiamma *et al.,* 2007a ; Wysocki *et al.,* 2006 ; Schmidt *et al.,* 2010 ; Teulier *et al.,* 2013).

De façon schématique, il est possible de concevoir un système dynamique d'allure chaotique selon trois de ses propriétés essentielles. Il est sensible aux conditions initiales et peut faire preuve d'un comportement hautement désordonné mais il est déterministe en ce sens qu'il obéit à des lois qui décrivent complètement son mouvement (Rapp, 1993). Ces caractéristiques expliquent que le système de contrôle de la ventilation soit capable de s'adapter très rapidement aux circonstances et/ou de changer rapidement d'état.

Une méthode robuste et fiable pour affirmer la présence d'un comportement d'allure chaotique dans le signal ventilatoire repose sur la titration de bruit (Poon et Barahona, 2001). Ce processus d'analyse peut être comparé à la titration chimique dans laquelle la concentration en acide (chaos) de la solution (données) est révélée par la quantité de base ajoutée (noise) pour neutraliser la solution. En résumé, cette technique permet de déterminer si les données étudiées sont statistiquement mieux décrites par un modèle non linéaire que linéaire. La détermination de la non-linéarité repose sur le calcul, en référence aux données, d'un modèle linéaire optimal et d'un modèle non linéaire. Les modèles sont ajustés à partir de deux variables, le degré de non-linéarités (d) et la dimension de plongement (Kappa). Lorsque les analyses statistiques montrent, avec un risque alpha de 1% (Poon et Barahona, 2001) que le modèle non linéaire créé avec les variables d (valeur de 3 à 6) et Kappa (valeur de 4 à 6) fixées décrit mieux les données qu'un modèle linéaire, la titration de bruit peut commencer. Du bruit blanc est progressivement ajouté aux données jusqu'à un niveau où le processus de détection de non linéarité ne parvient plus à détecter la présence de non-linéarité dans les données. La *noise limit* (NL) représente la moyenne des valeurs de déviation standard du bruit injecté puisque pour chacun des signaux, elle est calculée 5 fois avec les mêmes valeurs de d et de k (Roulin *et al.,* 2011).

Dans notre travail, nous avons utilisé la titration de bruit pour détecter d'éventuels changements d'état du système de contrôle homéostasique de la ventilation (activité bulbospinale) en réponse à une induction de plasticité ventilatoire (étude n°3).

Pour le calcul de la NL, les signaux de volume courant ont été sous-échantillonnés à 5Hz. Cette fréquence de sous-échantillonnage est la fréquence optimale de détection d'une dynamique de type chaotique au sein du signal ventilatoire (Wysocki *et al.*, 2006). Les signaux ont été ensuite analysés avec une routine spécifiquement élaborée (MathWorks Inc, Natick, MA 01760-2098, USA). Une NL égale à zéro indique que les données étudiées ne sont pas d'allure chaotique, en revanche une NL supérieure à zéro caractérise un comportement chaotique et ce pourcentage est une estimation de l'intensité du chaos (Roulin *et al.,* 2011). Un changement de niveau de titration entre deux états du système, séparés dans le temps, est un moyen d'étudier une modification de la complexité ventilatoire et donc une évolution du système selon les conditions physiologiques auquel il a été confronté.

L'origine de l'allure chaotique de la ventilation est établie à partir des résultats de plusieurs études.

Les afférences mécaniques du système respiratoire ne sont pas suffisante à sa genèse puisqu'aucun marqueur de chaos n'est détectable alors que les patients sont passivement ventilés (ventilation assistée contrôlée) ; l'allure chaotique est en revanche détectée dès lors

que les patients ont une inspiration active (aide ventilatoire) (Mangin *et al.,* 2008). Les efférences (comportementales et volontaires) ne sont pas non plus à l'origine de l'allure chaotique de la ventilation puisqu'elles peuvent tout aussi bien modifier le chaos ventilatoire vers l'augmentation chez les patients atteints de trouble panique (Yeragani *et al.,* 2002) ou la diminution lorsque la ventilation est contrôlée volontairement (Fortrat *et al.,* 1997) avec ou sans charge (Samara *et al.,* 2009).
Les études chez le rat et la grenouille post-métamorphique montrent que les oscillateurs du bulbe semblent être la source de ce comportement chaotique (Del Negro *et al.,* 2002 ; Straus *et al.,* 2011). L'implication de la commande automatique est étayée par des travaux démontrant des modifications du comportement chaotique de la ventilation en fonction du niveau d'activité des générateurs du tronc (hypo ou hypercapnie). En hypocapnie, la dynamique du débit ventilatoire est toujours chaotique mais moins irrégulière qu'en normocapnie ; à l'inverse l'excitation des générateurs par hypercapnie tend à augmenter la complexité du signal (Fiamma *et al.,* 2007b).

4. Réponse ventilatoire aux contraintes mécaniques

Au quotidien, le système respiratoire doit s'adapter à des contraintes et résistances pour produire la pression nécessaire aux mouvements d'air dans les poumons. Tout changement aigu, qu'il soit lié à des modifications intrinsèques (propriétés mécaniques de la cage thoracique, des poumons ou des muscles) ou extrinsèque (application d'une charge mécanique externe), se traduit par une adaptation du système qui permet le maintien d'une ventilation alvéolaire normale.

Différents types de charge mécaniques sont classiquement utilisées dans les études de physiologie respiratoire, des charges élastiques, résistives ou à seuil. La réponse du système à la charge porte le nom de « compensation de charge ». L'application d'une charge à seuil chez l'humain éveillé impose une adaptation du système qui se caractérise globalement, selon l'importance de la charge, par une préservation de la ventilation voire par une surcompensation marquée par une hyperventilation (Yanos *et al.,* 1990).

4.1 Charge élastique

L'impédance induite par ce type de charge est fonction du volume généré. La pression opposée est donc la plus forte à la fin de l'inspiration quand le volume mobilisé est maximal. Le profil d'adaptation lors d'application prolongée de la charge consiste en une diminution du volume courant et une augmentation de la fréquence respiratoire pour maintenir la ventilation (Axen *et al.,* 1983 ; Younes, 1995).

Ce type de charge mime les effets secondaires de pathologies pulmonaires restrictives (Younes, 1995).

4.2 Charge résistive

Avec une charge résistive inspiratoire ou expiratoire, la pression que doivent générer les muscles respiratoires augmente avec le débit. La résistance est donc maximale au milieu de l'inspiration lorsque le débit est le plus élevé. Les changements des grandeurs ventilatoires sont marquées par un allongement du temps inspiratoire, une diminution de la fréquence, peu ou pas de modification du volume courant, d'où une légère diminution de la ventilation (Axen *et al.,* 1983 ; Younes, 1995)

En termes de pathologie, les charges résistives tendent à reproduire les limitations de débit ressenties par les patients présentant un asthme ou un bronchopneumopathie chronique obstructive (**Younes, 1990**).

4.3 Charge à seuil

La charge à seuil consiste en une chambre fermée et rigide dans laquelle est placée une valve qui ne laisse entrer l'air que lorsque le sujet développe et maintient une pression inspiratoire égale ou supérieur à la charge. Une fois ouverte, la valve offre peu de résistance à l'écoulement de l'air. La charge imposée aux muscles étant constante et indépendante du débit et du volume générés, les charges à seuil représentent un bon outil pour l'étude de la commande ventilatoire.

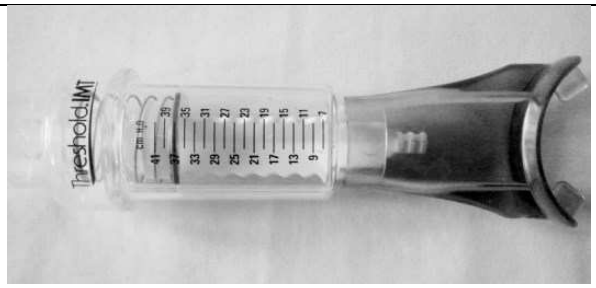


Figure n°18 : **Charge mécanique externe munie d'un embout buccal**
Charge inspiratoire à seuil permettant d'imposer 0 à 41cm H_2O.

Pour des valeurs de seuil basses (< 20cm H_2O), l'accroissement du temps inspiratoire s'accompagne, dans une étude, d'une augmentation du temps de consigne (Ti/T_T) et d'une baisse de la fréquence (Raux *et al.,* 2013). Les grandeurs volume courant (V_T), la ventilation minute (Ve) et pression télé-expiratoire en CO_2 ($P_{ET}CO_2$) évoluent conjointement et

inversement (augmentation de la Ve, diminution de la $P_{ET}CO_2$) (Yanos *et al.,* 1990) ou ne sont pas modifiées dans le cas de charges à seuil minimes (≤ 12cm H_2O) (Raux *et al.,* 2013).

Pour des seuils d'ouverture élevés (≥ 20% de la pression inspiratoire maximale), les études rapportent des modifications différentes du patron ventilatoire. Toutes les études s'accordent sur une augmentation du temps inspiratoire (Yanos *et al.,* 1990 ; Raux *et al.,* 2007b ; Trémoureux *et al.,* 2010). Cette dernière se fait sans changement Ti/T_T (Yanos *et al.,* 1990 ; Trémoureux *et al.,* 2010). Une hyperventilation reflétant une augmentation du débit inspiratoire moyen (V_T/Ti) et se traduisant par une augmentation du volume courant (V_T) est rapportée dans une étude (Yanos *et al.,* 1990).

charge à seuil vs ventialtion spontanée		Ti	T_T	Ti/T_T	f	V_T	Ve	V_T/Ti	$P_{ET}CO_2$
Yanos *et al.*, 1990	< 20cm H_2O	↗		→	→	↗	↗	↗	↘
Raux *et al.*, 2013		↗	↗	↗	↘	→	→	↘	→
Raux *et al.*, 2007	≥ 20cm H_2O	↗	↗	↗	ns	ns	→	ns	ns
Trémoureux *et al.*, 2010		↗		ns	↘	ns	ns	ns	ns

Tableau A : **Comportement ventilatoire en compensation de charge à seuil selon le niveau de contrainte**.

TI : temps inspiratoire ; T_T : temps total du cycle ventilatoire ; TI/T_T : temps de consigne ; f : fréquence ventilatoire ; V_T : volume courant ; V_T/TI : débit inspiratoire ; $P_{ET}CO_2$: pression partielle en CO_2 télé-expiratoire.

L'adaptation du système respiratoire se traduit non seulement par des modifications en fonction de l'importance de l'effort à fournir mais aussi par des modifications au cours du temps de compensation. Ainsi, lors d'une première présentation de charges à seuil de faible niveau, les sujets réduisent leur volume courant jusqu'au 6ème cycle ventilatoire puis ils le normalisent. Les épisodes de compensation suivants sont marqués par un retour plus rapide à une valeur normale de volume courant (Freedman et Weinstein, 1965). La compensation est aussi sujette à un mécanisme d'apprentissage lors d'épisodes répétés de présentation de la charge qui se traduit par une moindre variabilité sur les premiers cycles respiratoires (Younes, 1995).

La présence de mécanismes d'adaptation d'origine suprapontique associée à l'absence de modifications métaboliques pendant la compensation permet d'écarter un rôle majeur de la

commande bulbaire aux modifications du profil ventilatoire (Yanos *et al.,* 1990 ; Younes, 1995 ; Raux *et al.,* 2013).

CHAPITRE 2 : MOYENS D'ÉTUDE DE L'EXCITABILITÉ DE LA VOIE CORTICOPHRENIQUE

1. Stimulation magnétique transcrânienne

1.1 Sondes de TMS, forme et orientation du courant induit

Les sondes de stimulation magnétique transcrânienne (*transcranial magnetic stimulation*, TMS) ont des formes différentes en fonction de l'utilisation souhaitée et délivrent un champ magnétique plus ou moins focal. Les sondes rondes, d'un diamètre d'une dizaine de centimètres, sont souvent utilisées pour stimuler les muscles représentés au niveau du vertex. Elles sont peu focales puisque la zone de stimulation est placée grossièrement sous l'anneau. Les sondes « figure-en-huit » sont formées de deux bobines circulaires d'un diamètre chacune de 25 à 70mm jointes l'une à l'autre et situées dans le même plan. Le courant engendré par l'addition des courants parcourant chacun des anneaux est maximal au centre de la sonde. Grâce au champ plus focal qu'elles délivrent (1,5–2cm^2) ces sondes sont souvent utilisées pour stimuler les muscles intrinsèques de la main (Ruohonen et Ilmoniemi, 2005). De larges sondes figure-en-huit avec les anneaux inclinés selon un angle de 90 à 110° nommées sondes coniques sont spécialement conçues pour délivrer un champ puissant et relativement focal et permettent d'atteindre les régions corticales profondes comme la partie du cortex moteur contenant les représentations des muscles du tronc et du membre inférieur (Terao et Ugawa, 2002).

La forme du courant utilisé influe également sur la réponse enregistrée. Les stimulateurs magnétiques produisent des courants monophasiques ou biphasiques, c'est-à-dire des impulsions de forme sinusoïdale comprenant respectivement une ou deux oscillations principales. Pour les zones de représentation du tronc et du membre inférieur, la réponse la plus importante pour évoquer une réponse focale avec l'intensité la plus basse est obtenue avec un courant de forme monophasique, délivré perpendiculairement au gyrus précentral et dont l'orientation dans le cortex est postéro-antérieure (Brasil-Neto *et al.,* 1992 ; Mills *et al.,* 1992 ; Priori *et al.,* 1993 ; Kammer *et al.,* 2001). Cette direction permet d'évoquer des volées I1 alors qu'un courant antéro-postérieur produit principalement des volées indirectes tardives de type I3 (Day *et al.,* 1989).

Au niveau de la représentation corticale de la main, en comparaison avec un courant monophasique, un courant de forme biphasique est plus approprié pour générer des PEM de plus grande amplitude avec une intensité de stimulation moindre (Niehaus *et al.,* 2000 ; Kammer *et al.,* 2001). Contrairement à la stimulation monophasique de la région du vertex, la partie initiale du courant doit être antéro-postérieur et la seconde phase postéro-antérieure (AP-PA) pour obtenir la meilleure amplitude de réponse (Day *et al.,* 1989 ; Brasil Neto *et al.,* 1992 ; Niehaus *et al.,* 2000 ; Kammer *et al.,* 2001 ; Pell *et al.,* 2011).

Afin de respecter la forme du gyrus et d'induire le courant perpendiculaire au cortex, la sonde doit être placée suivant un angle de 45° en bas et en arrière (Brasil Neto *et al.,* 1992 ; Sakai *et al.,* 1997).

En rTMS, la majorité des stimulateurs disponibles sur le marché, ne permettent que l'utilisation d'un courant biphasique (Magstim, Super rapid^2). C'est donc le courant le plus souvent utilisé dans les études.

1.2 Matériel TMS utilisé lors des études présentées dans cette thèse

Une sonde conique (étude n°1, 8 sujets ; étude n°2, 17 sujets) ou une sonde en huit (étude n°1, 2 sujets) positionnées au niveau ou proche du vertex ont été utilisées pour évoquer un PEM du diaphragme. Les sondes ont été reliées à un stimulateur monophasique (Magstim Bistim^2 ou 200^2, Magstim Company, Whitland, Wales, UK). Le courant a été induit dans un sens postéro-antérieur dans le cortex.

Pour évoquer un PEM du muscle du doigt, la sonde en huit a été placée selon l'orientation décrite ci-dessus et un stimulateur biphasique a été utilisé (Magstim, Super-rapid^2 stimulator, Magstim Company, Whitland, Wales, UK).

Une sonde en huit et un stimulateur biphasique (Magstim, Super rapid^2) ont été choisis pour conditionner l'AMS.

1.3 Neuronavigation

Une limite de la TMS est la faible résolution spatiale du champ magnétique induit. Le champ induit dépend du type de sonde utilisée et les sondes en huit présentent l'avantage de délivrer un champ plus focal. Cependant, l'utilisation d'un appareil de neuronavigation, permettant un repérage précis et une reproductibilité optimale de la zone corticale à stimuler, offre un moyen de pallier cette limite (Julkunen *et al.*, 2009).

Pour chaque étude, un système de neuronavigation (Nexstim Ltd., Nexstim Oy, Helsinki, Finlande ; Visor2, ANT Neuro B.V., Enschede, The Netherlands) à guidage stéréotaxique couplé à la TMS a été utilisé.

La neuronavigation nécessite le recalage de la tête du sujet avec l'image reconstruite à partir de son IRM anatomique (images anatomiques 3D, de haute résolution, pondérées en T1). Celui-ci a été réalisé grâce à un repérage cutané de trois points saillants à l'aide d'un stylet de numérisation. Le nasion (point médian situé à la jonction de la racine du nez avec le front) et les tragus auriculaires droit et gauche sont repérés sur le sujet et mis en lien avec le point de repère manuellement sélectionné sur l'IRM. La précision du positionnement relatif de la sonde magnétique par rapport à l'imagerie est augmentée en numérisant d'autres points sur le crâne.

Cette méthode de neuronavigation permet l'obtention d'informations sur la localisation de la sonde par rapport au cortex, la reproductibilité des points de stimulation et l'enregistrement du site optimal de stimulation de chaque muscle (diaphragme, interosseux dorsal, abducteur de l'hallux) ou zone (AMS) ciblés. Ce point peut être visualisé en direct puis marqué sur l'IRM du sujet et enregistré pour chacune des sessions. Les stimulations sont ainsi faites avec une précision topographique d'environ 2mm.

1.4 Repérage de la position de l'AMS

La localisation de l'AMS a été faite selon la méthodologie décrite dans deux articles précédents (Matsunaga *et al.,* 2005 ; Raux *et al.,* 2010). Le point de stimulation a été enregistré sur le système de neuronavigation comme étant 1cm en avant du dernier lieu permettant d'évoquer une réponse du muscle abducteur de l'hallux. Pour cela, les stimulations ont été délivrées à 120% de l'aMT du muscle cible alors que le sujet maintenait une contraction d'une intensité de 20% de la contraction maximale. Le repérage de l'AMS a été fait en déplaçant la sonde vers l'avant et en veillant à rester sur la ligne sagittale du sujet.

2. Recueil et mesure de l'excitabilité corticospinale

2.1 Recueil de l'activité électromyographique

L'activité électromyographique des muscles cibles est recueillie en surface, sur le côté dominant (droit) du sujet, à l'aide de paires d'électrodes (self adhesive hydrogel, Comepa, St-Denis, France) placées sur une peau préalablement abrasée et dégraissée. Une électrode de terre a été placée, selon les études, sur l'acromion ou l'épine iliaque.

Pour le recueil de l'activité du diaphragme, les électrodes ont été placées selon un montage permettant de limiter la contamination de l'enregistrement par l'activité de muscles proches en réponse à la TMS en simple choc (Demoule *et al.,* 2003a). Une électrode a été placée dans le dernier espace intercostal sur la ligne mi-claviculaire, l'autre électrode étant placée sur la côte sus-jacente à une distance inférieure à 2cm.

L'enregistrement de l'activité électrique d'un muscle du doigt, le premier interosseux dorsal (first dorsal interosseus, FDI), a été réalisé selon un montage corps-tendon et utilisé comme contrôle. L'EMG de l'abducteur de l'hallux (AH) a été recueilli suivant un montage similaire.

Les signaux EMG ont été amplifiés (1000x pour le diaphragme et 10000x pour le FDI et l'AH) et filtrés (bande passante 10Hz – 1kHz) puis numérisés à une fréquence d'échantillonnage de 10kHz à l'aide d'un dispositif de recueil du signal (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK). Enfin ce signal a été stocké sous forme de fichier informatique permettant une analyse a postériori (Signal 5.00, Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, UK).

Pour être retenus pour analyse, les signaux EMG devaient répondre à certains critères dont l'absence de contamination du signal EMG par un artéfact cardiaque et la présence d'une protrusion abdominale accompagnant la réponse EMG, le diaphragme étant le seul muscle dont la contraction provoque une augmentation de la circonférence abdominale (Mead et Loring, 1982). Pour cela, les déplacements abdominaux ont été mesurés à l'aide d'une sangle abdominale placée juste au-dessus de l'ombilic, munie d'un accéléromètre en série (ADinstrument/Pneumotrace II, UFI, Morro Bay, CA).

2.2 Grandeurs des potentiels évoqués moteurs

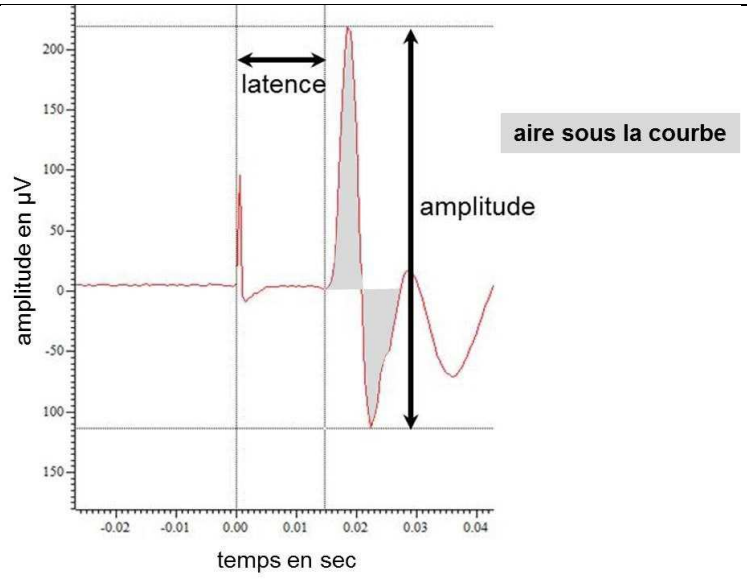


Figure n°19 : **Grandeurs des potentiels évoqués moteurs.**

La latence du PEM représente le délai séparant l'impulsion magnétique du début de l'apparition du PEM L'amplitude est souvent calculée par la valeur en µV de pic à pic.
L'aire sous la courbe du PEM est calculée en choisissant un intervalle fixe encadrant le début et la fin du PEM. L'amplitude ou l'aire moyenne des PEM a été exprimée en pourcentage de l'amplitude ou de l'aire moyenne des PEM avant conditionnement.

La latence de la réponse motrice correspond au délai séparant l'envoi de l'impulsion magnétique du début de l'apparition du PEM. Elle représente la somme des temps nécessaires à l'influx pour parvenir aux motoneurones spinaux (temps de conduction central) puis au muscle cible (temps de conduction périphérique). Elle varie selon la distance séparant le muscle cible et le cortex mais aussi selon le niveau d'excitabilité des neurones.

L'amplitude est classiquement mesurée par le calcul de l'amplitude de pic à pic du PEM et/ou de l'aire sous la courbe du signal rectifié (AUC). Les modifications de cette grandeur permettent d'évaluer, à intensité de stimulation fixe, les changements de l'excitabilité de la voie corticospinale. Les caractéristiques de ces PEM sont variables et moyenner 10 à 20 réponses à une intensité déterminée permet d'obtenir une plus grande précision de la mesure (Kiers *et al.*, 1993).

L'amplitude de la réponse étant affectée par la décharge d'unités motrices du muscle cible, il est nécessaire pour comparer deux conditions de s'assurer que l'activité de fond est comparable. Ceci est effectué en évaluant l'intensité de la contraction musculaire dans les 100ms précédent l'impulsion magnétique. Cette grandeur, nommée pré-stimulus EMG, est estimée partir du calcul de la racine carré de la variance du signal de pré-stimulus EMG (*pre stimulus root mean square, pre stimulus rms*).

2.3 Étude de l'excitabilité de la voie corticophrénique

2.3.1 Généralités

Par une technique de stimulation électrique transcrânienne, Gandevia et Rothwell (1987) font la preuve de l'existence d'une voie motrice oligosynaptique allant du cortex moteur aux motoneurones phréniques. Depuis de nombreuses études en TMS confirment l'existence de cette voie (Murphy *et al.,* 1990 ; Maskill *et al.,* 1991 ; Lissens *et al.,* 1994 ; Davey *et al.,* 1996 ; Similowski *et al.,* 1996a, 1996d ; Zifko *et al.,* 1996 ; Corfield *et al.,* 1998 ; Khedr et Trakhan, 2001 ; Lefaucheur et Lofaso*,* 2002 ; Demoule *et al.,* 2003a, b, 2008 ; Sharshar *et al.,* 2003, 2004b, 2005 ; Straus *et al.,* 2004 ; Duguet *et al.,* 2006 ; Locher *et al.,* 2006 ; Méhiri *et al.,* 2006 ; Wang *et al.,* 2007 ; Raux *et al.,* 2010 ; Azabou *et al.,* 2013).

Parmi les travaux portant sur la voie corticospinale destinée aux motoneurones phréniques, beaucoup utilisent une sonde circulaire (Murphy *et al.,* 1990 ; Lissens *et al.,* 1994 ; Davey *et al.,* 1996 ; Similowski *et al.,* 1996a, 1996d ; Zifko *et al.,* 1996 ; Corfield *et al.,* 1998 ; Lefaucheur et Lofaso*,* 2002 ; Demoule *et al.,* 2003a, b, 2008 ; Straus *et al.,* 2004 ; Duguet *et al.,* 2006 ; Locher *et al.,* 2006 ; Méhiri *et al.,* 2006).

Cependant, d'autres études montrent qu'il est possible de stimuler le diaphragme avec des sondes plus focales comme la sonde en huit ou la sonde conique (*double cone coil*) (Maskill

et al., 1991 ; Zifko *et al.,* 1996 ; Khedr et Trakhan*,* 2001 ; Sharshar *et al.,* 2003, 2004a,b, 2005 ; Wang *et al.,* 2007 ; Demoule *et al.,* 2008 ; Raux *et al.,* 2010).

2.3.2 Particularités de la voie corticophrénique

Les modifications d'excitabilité de cette voie peuvent être caractérisés au travers des variations des grandeurs descritptives des PEM (cf. Méthodes expérimentales, Chapitre 2, paragraphe 2.2 Grandeurs des potentiels évoqués moteurs) et se traduire par des variations de la taille, la latence ou les deux. Elles peuvent procéder de mécanismes corticaux, spinaux, ou mixtes (

Ainsi, en comparaison à une impulsion délivrée en situation de repos c'est-à-dire au moment du cycle ventilatoire où les motoneurones phréniques reçoivent un influx bulbospinal minimal (voire sont activement inhibés dans certaines espèces), l'amplitude des PEM du diaphragme est augmentée lorsque l'impulsion de TMS est délivrée pendant l'inspiration que celle-ci soit d'origine automatique stimulée par le CO_2 (Murphy *et al.,* 1990 ; Davey *et al.,* 1996 ; Straus *et al.*, 1997). Ce type de facilitation de la réponse diaphragmatique, qui n'est pas associée à un changement d'activité corticale mais uniquement à un changement de l'activité ventilatoire automatique, procède très probablement d'une composante spinale (Davey et al., 1996). L'amplitude et la latence des PEM du diaphragme sont également respectivement augmentée et diminuée en présence d'une contraction diaphragmatique volontaire sous-jacente (Similowski *et al.,* 1996b ; Sharshar *et al.,* 2003 ; Locher *et al.*, 2006).

Comme pour le système corticospinal en général, l'amplitude de la réponse dépend également du niveau d'excitabilité globale du système nerveux au moment où l'impulsion est délivrée. Ainsi, pendant le sommeil, comme pour un muscle squelettique (Avesani *et al.*, 2008) l'excitabilité de la voie corticophénique est diminuée ; une impulsion délivrée au même temps du cycle ventilatoire pendant le sommeil entraîne une réponse plus faible pendant le sommeil qu'à l'éveil (Méhiri *et al.*, 1996). A l'inverse, on constate qu'en présence d'une stimulation de la commande ventilatoire par le CO2, la réponse du diaphragme à la TMS est augmentée y compris pendant l'expiration (Staus *et al.*, 2004), ce qui illustre la particularité de « double commande » caractéristique de ce muscle.

3. Techniques de mesure de l'excitabilité intracorticale

Un influx efférent sur le faisceau corticospinal est le résultat de l'excitation des neurones corticospinaux modulée par les multiples réseaux excitateurs et inhibiteurs intracorticaux. Les paradigmes de stimulation magnétique en double choc offrent la possibilité d'étudier la facilitation (*intracortical facilitation, ICF*) et l'inhibition intracorticale de courte ou longue latence (*short-latency intracortical inhibition, sICI* ; *long-latency intracortical inhibition, LICI*).

Ces techniques sont basées sur la délivrance d'un stimulus conditionnant précédent un stimulus test avec des paramètres particuliers (Kujirai *et al.,* 1993). Les valeurs de l'intensité des stimulus conditionnant et test et l'intervalle interstimulus (interstimulus interval, ISI) modulent l'excitabilité des réseaux intracorticaux qui influencent l'excitabilité du faisceau corticospinal (Kujirai *et al.,* 1993 ; Ziemann *et al.,* 1996c ; Berardelli *et al.,* 2008 ; Chen *et al.,* 2008 ; Paulus *et al.,* 2008 ; pour revues, Chen, 2004 ; Reis *et al.,* 2008 ; Di Lazzaro et Ziemann, 2013).

3.1 Inhibition intracorticale

Lorsque l'impulsion test, fixée à une intensité qui génère un PEM (> rMT), est précédée, dans un intervalle de temps court (1 à 5ms), d'un stimulus plus faible, la réponse au stimulus test est diminuée. Cette inhibition apparait pour des intensités de stimulus conditionnant (*conditioning stimulus*, CS) comprise entre 50 et 90% du seuil moteur.

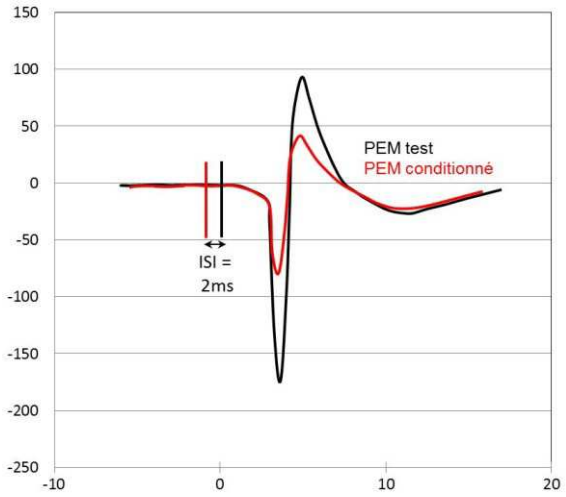


Figure n°20 : **Représentation schématique d'un protocole en double choc à un intervalle interstimulus évoquant une inhibition intracorticale de courte latence (sICI).**

Pour un intervalle interstimulus d'environ 2ms, la réponse évoquée suite au double choc est d'une taille inférieure au PEM test. Cette diminution, exprimée en % du stimulus test, traduit une inhibition trans-synaptique de la réponse des MN pyramidaux.

L'importance de l'inhibition en fonction de l'intensité du stimulus conditionné suit une courbe en U : en deçà ou au-dessous de 0,8 fois le seuil moteur de repos, l'inhibition induite est moins forte et l'effet peut même s'inverser conduisant à une facilitation de la réponse conditionnée (Kujirai *et al.,* 1993 ; Chen *et al.,* 1998b). L'intensité du stimulus test (*test stimulus*, TS) influence également la modulation induite et Roshan et collaborateurs (2003)

montrent, sur un muscle de la main, que l'importance de l'inhibition augmente avec la taille du PEM test.

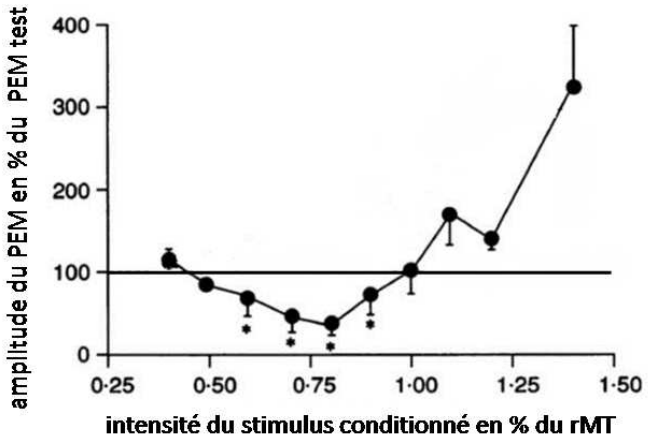


Figure n°21 : **Évolution de l'amplitude des PEM selon l'intensité du stimulus conditionné dans le paradigme expérimental décrit par Kujirai *et al.*, 1993.**

Les réponses EMG d'un muscle du doigt dans un paradigme de stimulation en double choc avec un intervalle interstimulus de 2ms. Le maximum d'inhibition est rapporté pour un stimulus conditionné (SC) de 0,8 fois le seuil moteur de repos. De part et d'autre de cette valeur, l'inhibition induite est moins forte. Une facilitation de la réponse conditionnée apparait pour des valeurs de SC supérieures au rMT.

(Adapté d'après Kujirai *et al.*, 1993)

Les mécanismes régissant la sICI sont bien étudiés et plusieurs éléments sont en faveur d'un mécanisme purement intracortical.

Le premier argument vient des travaux princeps de Kujirai et collaborateurs (1993) qui montrent une abolition de l'inhibition du PEM si l'un ou l'autre des stimulus (conditionné ou test) est évoqué par une stimulation électrique transcrânienne (TES). Alors que la TMS implique la sommation d'influx intracorticaux (excitateurs ou inhibiteurs) pour amener les neurones pyramidaux au seuil de dépolarisation, la TES active directement les axones des neurones pyramidaux sans impliquer d'interneurones corticaux (Day *et al.,* 1989 ; Rothwell*,* 1997).

Une deuxième indication vient de l'observation d'un effet suppressif fort sur les volées tardives (*late I waves, I3*) et suivantes lorsque le stimulus test est évoqué après le stimulus conditionnant alors que les volées indirectes de type I1 sont peu affectées (Nakamura *et al.,* 1997 ; Di Lazzaro *et al.,* 1998 ; Hanajima *et al.,* 1998).

Un troisième élément est issu des études pharmacologiques. Les effets du GABA libéré par les synapses présynaptiques des interneurones inhibiteurs dépendent du type de récepteur situés sur la membrane postsynaptique. L'action des récepteurs $GABA_A$, ionotropiques, via des canaux chlore (Cl^-), induit une inhibition de courte durée alors que de l'activation des

récepteurs de type $GABA_B$, métabotropiques, nait une inhibition de longue durée via une augmentation des conductances des canaux potassium (K^+) (McCormick, 1992). L'administration de benzodiazépines (lorazepam, diazepam), qui agissent en augmentant la fréquence d'ouverture des canaux chlore, se traduit par un renforcement de la sICI et une diminution des volées descendantes indirectes tardives (*late I waves*, I3) évoquées par le stimulus test alors que les premières volées indirectes (I1) ne sont pas affectées (Ziemann *et al.,* 1996c; Ilic *et al.,* 2002 ; Di Lazzaro *et al.,* 2000, 2005, 2007). Ces études suggèrent que ces molécules qui ont pour cible les récepteurs $GABA_A$ augmentent l'excitabilité des circuits inhibiteurs intracorticaux (Ziemann *et al.,* 1996b*, c* ; Di Lazzaro *et al.,* 2000 ; Ilic *et al.,* 2002). Le stimulus conditionnant aurait pour effet d'activer des interneurones inhibiteurs GABAergiques ($GABA_A$) qui modifieraient de façon trans-synaptique la réponse des cellules pyramidales au stimulus test ; le GABA favorisant l'ouverture du canal chlore postsynaptique, les cellules seraient hyperpolarisées et la somme des influx excitateurs serait diminuée (Ziemann *et al., 1*998a ; Chen *et al.,* 1998b ; Hanajima *et al.,* 1998 ; Ilic *et al.,* 2002 ; Di Lazzaro *et al.,* 2000, 2005 ; Paulus *et al.,* 2008).

Deux phases sont classiquement distinguées dans le phénomène de sICI à des intervalles stimulus de 1 à 2,5ms ; la première (1ms) serait plus le reflet de la période réfractaire des axones (Fisher *et al.,* 2002 ; Chan *et al.,* 2002), la seconde (2,5ms) serait directement en lien avec un mécanisme d'inhibition synaptique (Strafella et Paus, 2001 ; Fisher *et al.,* 2002 ; Roshan *et al.,* 2003). Cette hypothèse est appuyée par une étude en tomographie par émission de position (PET) qui montre, à des intervalles interstimulus de 3ms, une corrélation positive entre l'importance de l'inhibition des PEM et l'augmentation du flux sanguin au niveau du cortex moteur, ce qui suggère une modification de la transmission synaptique (Strafella et Paus, 2001).

L'ensemble de ces résultats suggère que le stimulus conditionnant, sous liminaire, produirait une facilitation à court terme de la transmission $GABA_A$ergique au niveau des connexions horizontales cortico-corticales (Strafella et Paus, 2001 ; Di Lazzaro et Ziemann*,* 2013).

La fonction de cette inhibition intracorticale est encore mal connue mais il est proposé que le rôle de ces circuits inhibiteurs au niveau des muscles de la main serait de limiter la diffusion de l'influx à des muscles non pertinents pour le mouvement programmé (Ridding *et al.,* 1995 ; Abbruzzese *et al.,* 1999 ; Zoghi *et al.,* 2003). Cette hypothèse est renforcée par le constat d'une diminution de l'inhibition intracorticale avant et pendant la contraction volontaire du muscle cible (Ridding *et al.,* 1995 ; Reynolds et Ashby, 1999 ; Nikolova *et al.,* 2006).

Beaucoup de travaux portent sur les muscles intrinsèques de la main, mais cette inhibition est aussi évoquée à partir de la représentation corticale motrice d'autres muscles (Chen *et al.,* 1998b ; Abbruzzese *et al.,* 1999 ; Paradiso *et al.,* 2005) dont le diaphragme (Demoule *et al.,* 2003a ; Hopkinson *et al.*, 2004 ; Sharshar *et al.,* 2004b, 2005). Ces études chez le sujet sain concluent à un patron de réponse du diaphragme comparable à celui d'autres muscles squelettiques (Demoule *et al.,* 2003a ; Sharshar *et al.,* 2004b, 2005).

L'inhibition intracorticale présente une grande variabilité d'un individu à l'autre. Les résultats sont donc généralement rapportés en valeur relative par rapport au PEM test :
[taux d'inhibition = [(amplitude du PEM conditionné / amplitude du PEM test) x 100] (Kujirai *et al.,* 1993).

La sICI se révèle être une mesure couramment utilisée (Rothwell *et al.,* 2009) et utile pour mettre en évidence des modifications de l'excitabilité intracorticale mêmes minimes (Bagnato *et al.,* 2005 ; Chen *et al.,* 2008).

3.2 Autres mesures de l'excitabilité intracorticale

D'autres caractéristiques de l'excitabilité intracorticale peuvent être étudiées par un paradigme de double choc mais avec des intervalles interstimulus ou des intensités de stimulus conditionnant différents.

	FACILITATION		**INHIBITION**
	short-interval intracortical facilitation (SICF)	*intracortical facilitation* (ICF)	*long interval intracortical inhibition* (LICI)
intervalle interstimulus	**1,3ms, 2,5ms, ou 4,3ms**	**8 à 30ms**	**50 à 200ms**
intensité du stimulus conditionné (SC)	SC ≈ 100% rMT ou SC > rMT	SC < rMT	SC > rMT
neurotransmetteurs impliqués	**↘ GABA ↗ glutamate**		**↗ $GABA_B$**

Tableau B : **Récapitulatif des effets des conditionnements en double choc sur la taille du PEM conditionné selon l'intervalle interstimulus et l'intensité des stimulus test et conditionné**.

Les effets de la facilitation sont à mettre en lien avec des diminution de la transmission GABA ou une augmentation de la libération de glutamate. La facilitation de l'activité des interneurones intracorticaux excitateurs se traduit par un accroissement du nombre de volées I2 et I3.

Avec des intervalles interstimulus d'environ 1,3ms, 2,5ms, ou 4,3ms et en fixant l'intensité des deux stimulus (CS et TS) à une intensité proche du seuil moteur (Tokimura *et al.,* 1996 ; Ilic *et al.,* 2002) ou supérieure pour le CS et inférieure pour le TS (Ziemann *et al.,* 1998d ; Hanajima *et al.,* 2002) la réponse test est caractérisée par une facilitation appelée « short-interval intracortical facilitation » (SICF). Pour des intervalles plus longs (8 à 30ms) et un SC d'une intensité inférieure au seuil, une facilitation du TS est obtenue. Cet effet facilitateur est appelée « *intracortical facilitation »* (ICF) (Kujirai *et al.,* 1993 ; Ziemann *et al.,* 1996c ; Chen *et al.,* 1998b).

Les effets de ces deux formes de facilitation sont diminués suite à la prise de drogues augmentant l'activité $GABA_B$ (baclofène) ou $GABA_A$ (diazepam) et de substances à action antiglutamatergique (riluzole) ; ceci met en évidence la dépendance de cette facilitation à ces deux systèmes (Ziemann *et al.,* 1996a ; Liepert *et al.,* 1997 ; Ilic *et al.,* 2002). L'ICF reflète des processus intracorticaux glutamatergiques faisant intervenir les récepteurs NMDA (Ziemann *et al.,* 1998a ; Liepert *et al.,* 1997 ; Ilic *et al.,* 2002). Les études portant sur l'enregistrements épidural des volées descendantes ne font apparaitre aucune modification des volées indirectes (Di Lazzaro *et al.*, 2006 ; Ni *et al.*, 2011).

Comme dans le cas de la sICI, une ICF peut être évoquée pour le diaphragme (Demoule *et al.,* 2003a ; Hopkinson *et al.*, 2004 ; Sharshar *et al.,* 2004b, 2005).

A des intervalles interstimulus encore plus longs (50 à 200ms) et pour un stimulus conditionné d'intensité supérieur au seuil de repos, une inhibition dite "*long interval intracortical inhibition*" (LICI) est évoquée (Valls-Solé *et al.,* 1992 ;Wassermann *et al.,* 1996b ; Nakamura *et al.,* 1997) Les études pharmacologiques permettent de proposer l'implication des récepteurs $GABA_B$ dans cette inhibition (Werhahn *et al.,* 1999 ; pour revues, Chen, 2004 ; Di Lazzaro et Ziemann, 2013).

3.3 Période de silence

Lorsque la stimulation magnétique transcrânienne est appliquée alors que le muscle cible est contracté, le signal EMG disparait pendant une brève durée appelée période de silence (Calancie *et al.,* 1987 ; Roick *et al.* 1993). Cette suppression de l'activité volontaire résulterait du recrutement d'interneurones inhibiteurs moteurs $GABA_B$ergiques (Inghilleri *et al.,* 1996 ; Chen *et al.,* 1999 ; Werhahn *et al.,* 1999)

Ce mécanisme d'inhibition est rapporté pour le diaphragme (Lefaucheur et Lofaso, 2002). Les auteurs montrent que la durée de la période de silence dépend de l'intensité de la contraction (évaluée par la pression transdiaphragmatique). La corrélation entre ces deux variables suggère que la régulation de l'inhibition intracorticale serait associée à un

mécanisme de contrôle en rétroaction de la force exercée par le muscle (Lefaucheur et Lofaso, 2002).

4. Sécurité d'application des techniques de stimulation magnétique et de stimulation par courant continu

Ces techniques, bien que considérées comme sûres, modifient l'excitabilité neuronale et sont donc associées, par essence, à de potentiels risques qui requièrent le suivi des règles de sécurité et recommandations internationales ou françaises dont elles font l'objet (pour la TMS-rTMS (pour revues, Rossi *et al.,* 2009 ; Lefaucheur *et al.,* 2011), pour la TBS (pour revues, Lefaucheur *et al.,* 2011 ; Oberman *et al.,* 2011), pour la tDCS-tsDCS (Nitsche *et al.,* 2003c ; Liebetanz *et al.,* 2009 ; pour revue, Priori, 2003).
Les sujets ne doivent être porteur d'aucun implant cochléaire et ne pas avoir d'antécédents personnels et familiaux d'épilepsie (Lefaucheur *et al.,* 2011). Pour ces techniques, l'événement indésirable le plus important pouvant survenir pendant ou immédiatement après la rTMS est la survenue d'une crise d'épilepsie. L'intensité et la fréquence des protocoles sont des éléments à considérer puisque, trop hautes, elles peuvent amener un risque potentiel d'épilepsie (pour revues, Lefaucheur *et al.,* 2011 ; Oberman *et al.,* 2011). La prévention d'une augmentation anormale de l'excitabilité cérébrale peut être assurée simplement par un monitorage EMG afin de repérer des manifestations de post-décharge. Quelques sujets peuvent souffrir de céphalées, après une session de TMS, qu'un simple antalgique en vente libre suffit à combattre.

Les risques d'application du courant continu reposent surtout sur l'induction de dommages du tissu neuronal. Pour éviter ce risque, l'intensité et le temps d'application du courant ainsi que la taille des électrodes sont les variables à prendre en compte (Nitsche *et al.,* 2003c) pour calculer la densité de courant, en termes d'intensité par rapport à la taille des électrodes (A/cm^2) ainsi que la charge totale délivrée (densité de courant x durée totale de stimulation (s) mC/cm^2). Les données de la littérature sur la tDCS chez l'animal montrent la présence de lésions tissulaires à partir de $216C/cm^2$ (Yuen *et al.,* 1981) mais décrivent une absence de risque pour une densité de courant maintenue en deçà de $25mA/cm^2$ (McCreery *et al.,* 1990). Les densités de courant communément utilisées dans la recherche sont environ mille fois inférieures à cette limite.

Les données pour la tsDCS sont encore rares mais l'innocuité de la stimulation est montrée chez l'humain sain par des dosages sanguins d'un marqueur de dommage neuronal, la « *neuron specific enolase* » (NSE) avant et après application de la tsDCS (Cogiamanian *et al.,* 2008). Par correspondance avec la tDCS, le calcul de la charge totale délivrée est le critère généralement retenu pour ces études. Chez l'humain, les intensités sont fixées entre

1 et 2,5mA, la durée est de 15 à 20min et la taille des électrodes est généralement de 35cm^2 pour les aires corticales motrices.

Au début et à la fin de la stimulation transcrânienne ou transcutanée spinale, les sujets rapportent souvent une sensation de picotement sous les électrodes. Pour limiter cette stimulation sensitive, au début et à la fin de la stimulation, le courant est progressivement augmenté et diminué sur une période de 10 secondes.

5. Conditions d'utilisation de la tsDCS pour l'étude n°3 de cette thèse

Le courant continu de 2,5mA a été appliqué avec des électrodes de 35cm^2 pour une durée de 15min (Cogiamanian *et al.*, 2008 ; Winkler *et al.*, 2010 ; Lamy *et al.*, 2012) ce qui représente une densité de courant de 0,071mA/cm² et une charge totale délivrée de 64mC/cm².

Afin de diminuer les sensations cutanées, l'intensité du courant a été augmentée et diminuée progressivement sur 10 secondes au début et à la fin de la stimulation.

La sensation du courant n'étant présente que sur les premières dizaines de secondes d'application du courant, la stimulation sham consistait à délivrer le courant sur une durée totale de 90 secondes. Cette procédure est reconnue comme fiable pour tromper des sujets sains naïfs (Gandiga *et al.*, 2006 ; Lamy *et al.* 2012).

RÉSULTATS

Les résultats présentés dans cette partie sont issus de 3 études expérimentales. Tous ces travaux ont été conduits chez des sujets volontaires sains, après recueil de leur consentement libre et éclairé par écrit.

L'étude n°1 a fait l'objet d'une publication dans la revue Plos one
Laviolette L*, Niérat M-C*, Hudson AL, Raux M, Allard E, Similowski T (2013) The Supplementary motor area exerts a tonic excitatory influence on corticospinal projections to phrenic motoneurons in awake humans. Plos one 8:e62258.

L'article relatif à l'étude n°2 est écrit.

L'article relatif à l'étude n°3 a été soumis à la revue J Neurosci ; il a fait l'objet de critiques mais assorties d'une autorisation de révision.

Dans la suite de ce mémoire, chaque étude est présentée sous la forme de l'article en anglais qu'il soit publié (étude n°1), en révision (étude n°3) ou à soumettre (étude n°2).

Un résumé en français comportant l'objectif, la méthodologie et les résultats principaux précède chacun des articles

ÉTUDE n°1

Cette étude a fait l'objet d'une publication :

Laviolette L*, Niérat M-C*, Hudson AL, Raux M, Allard E, Similowski T (2013) The Supplementary motor area exerts a tonic excitatory influence on corticospinal projections to phrenic motoneurons in awake humans. Plos one 8:e62258.

* égale contribution des auteurs

Cet article est accessible à l'adresse url suivante :

http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0062258

RÉSUMÉ ÉTUDE N°1

Bases théoriques

A l'éveil, la ventilation est préservée en présence de contraintes mécaniques. Cette compensation est marquée au niveau EEG par une activation du cortex prémoteur et particulièrement de l'AMS dont l'activation pourrait refléter une influence excitatrice sur les influx corticospinaux assurant la production des mouvements respiratoires. Cette hypothèse d'un rôle des structures corticales à l'éveil est renforcée par la mise en évidence d'une moindre excitabilité de la voie corticophrénique au sommeil par rapport à l'éveil en normocapnie (Méhiri *et al.*, 2006). L'origine de cette facilitation de la commande ventilatoire à l'éveil n'est pas connue mais l'AMS pourrait participer à ce phénomène dit du « wakefulness drive to breathe » (Fink, 1961, Fink *et al.*, 1963).

Hypothèses et objectif de l'étude

Il s'agissait de caractériser la réponse diaphragmatique à la TMS suite à l'application d'un protocole rTMS inhibiteur sur l'AMS. En effet, si l'AMS exerce une influence excitatrice sur la voie corticospinale, le conditionnement rTMS inhibiteur de l'AMS se traduira par une diminution de la réponse du diaphragme à la stimulation de sa représentation au sein du cortex moteur primaire (M1dia) et inversement pour un conditionnement facilitateur.

Méthodologie

10 sujets sains (âge 25 ± 4 ans, moyenne ± écart type) ont participé à ce protocole randomisé, en simple aveugle. Les potentiels évoqués moteur du diaphragme (DiMEPs) ont été évoqués par TMS en impulsion unique à partir de la représentation du diaphragme au sein du cortex moteur primaire (M1dia) et recueillis par électromyographie de surface.
Les DiMEPs ont été enregistrés avant (*baseline*, BL) puis dans les 5, 10 et 15 premières minutes (Post1, Post2, et Post3, respectivement) après l'application d'un protocole inhibiteur en patron de type thêta-burst continu (cTBS).
Un protocole facilitateur conventionnel (rTMS à 5Hz) a été utilisé à titre de contrôle méthodologique (Raux *et al.*, 2010).
Les deux sessions expérimentales (cTBS, 5Hz) ont été espacées d'au moins 3 jours pour éviter toute éventuelle rémanence des effets.

Résultats

En réponse au protocole rTMS inhibiteur, l'amplitude des DiMEPs est diminuée à Post 1, Post 2 et Post 3 ($F_{3,39}$ = 6,341, $p < 0,002$ vs baseline) et en Post 3 après le protocole rTMS à

5Hz ($F_{3,35}$ = 4,844, p = 0,009). Le seuil moteur au repos (rMT) et la latence des DiMEPs n'étaient affectés par aucun de ces 2 protocoles.

Conclusion

La diminution de l'excitabilité des DiPEMs est progressive et le maximum des effets est noté entre la 6ème et la 11ème minute suite au protocole cTBS. Ce décours temporel est en accord avec les résultats d'autres études en cTBS portant sur M1 (Talelli *et al.,* 2007 ; Gentner *et al.*, 2008 ; Zafar *et al.,* 2008 ; Todd *et al.,* 2009 ; Di Lazzaro *et al.,* 2011 ; McAllister *et al.,* 2011, 2013). Cet élément est en faveur de mécanismes de plasticité à long terme au niveau de l'AMS comparables à ceux de la LTP/LTD.

L'absence de modification de la latence des DiPEMs et les connaissances sur les mécanismes d'action de la rTMS permettent d'émettre l'hypothèse que ces protocoles ont induit une modulation de l'activité de l'AMS et/ou des fibres cortico-corticales unissant l'AMS à M1.

L'hypothèse de la participation de l'AMS à la ventilation de repos à travers le *wakefulness drive to breathe* est donc validée.

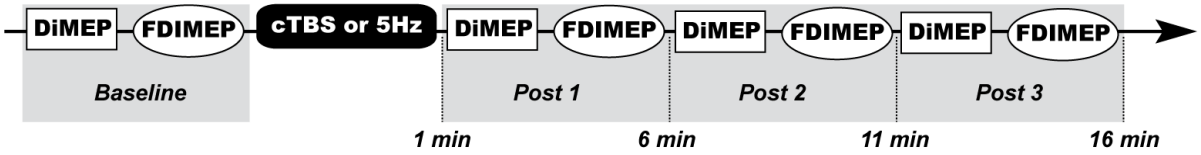


Figure n°22 **: Schéma expérimental de l'étude n°1.**

20 PEM ont été évoqués à partir de la représentation du diaphragme (DiMEPS) et d'un muscle du doigt (flexor dorsalis interosseus, FDI) (FDIMEP) sur le cortex moteur primaire avant (Baseline) puis à trois temps (Post 1, Post 2 et Post 3) après l'application d'un protocole inhibiteur (cTBS) ou facilitateur (rTMS à 5Hz) en regard de l'AMS.

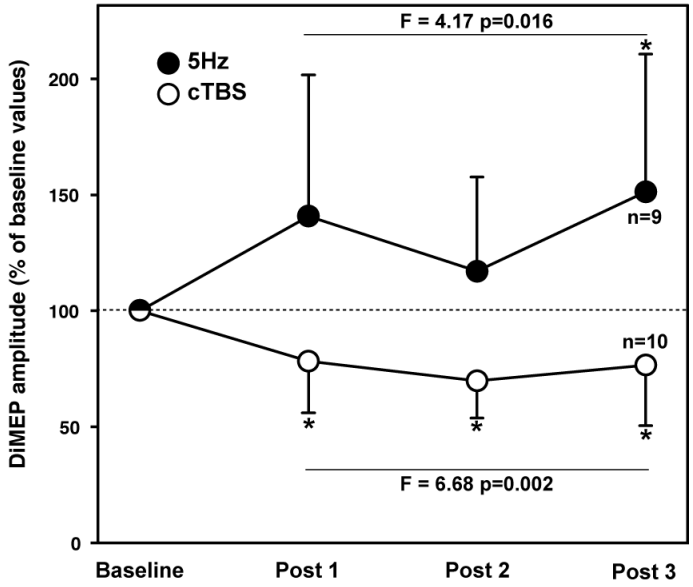


Figure n°23 : **Effet d'un conditionnement de l'AMS par un protocole cTBS et rTMS à 5Hz sur la taille des PEM du diaphragme.**

Amplitudes moyennes des potentiels évoqués du diaphragme (DiPEM) pour tous les sujets avant (Baseline) puis à trois temps après l'application d'un conditionnement inhibiteur (cTBS, rond blanc) ou facilitateur (rTMS à 5Hz, rond noir) en regard de l'AMS.
Les valeurs sont présentées en % de la valeur obtenue avant conditionnement (Baseline) sous forme de moyenne ± écart type.

L'astérisque indique une différence significative ($p \leq 0,05$) par rapport à la valeur obtenue avant conditionnement. (test post-hoc : Tukey).

The Supplementary Motor Area Exerts a Tonic Excitatory Influence on Corticospinal Projections to Phrenic Motoneurons in Awake Humans

Louis Laviolette[1-], Marie-Cécile Niérat[1-], Anna L. Hudson[1,2], Mathieu Raux[1], Étienne Allard[1], Thomas Similowski[1,3]*

1 Université Paris 6, ER10UPMC, Paris, France, 2 Neuroscience Research Australia and University of New South Wales, Sydney, Australia, 3 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Pneumologie et Réanimation Médicale, Paris, France

Abstract

Introduction: In humans, cortical mechanisms can interfere with autonomic breathing. Respiratory-related activation of the supplementary motor area (SMA) has been documented during voluntary breathing and in response to inspiratory constraints. The SMA could therefore participate in the increased resting state of the respiratory motor system during wake (i.e. "wakefulness drive to breathe").

Methods: The SMA was conditioned by continuous theta burst magnetic stimulation (cTBS, inhibitory) and 5 Hz conventional rTMS (5 Hz, excitatory). The ensuing effects were described in terms of the diaphragm motor evoked response (DiMEPs) to single-pulse transcranial magnetic stimulation over the motor cortex. DiMEPs were recorded at baseline, and at 3 time-points ("post1", "post2", "post3") up to 15 minutes following conditioning of the SMA.

Results: cTBS reduced the amplitude of DiMEPs from 327.5±159.8 mV at baseline to 243.3±118.7 mV, 217.8±102.9 mV and 240.6±123.9 mV at post 1, post 2 and post 3, respectively ($F = 6.341$, $p = 0.002$). 5 Hz conditioning increased the amplitude of DiMEPs from 184.7±96.5 mV at baseline to 270.7±135.4 mV at post 3 ($F = 4.844$, $p = 0.009$).

Conclusions: The corticospinal pathway to the diaphragm can be modulated in both directions by conditioning the SMA. This suggests that the baseline respiratory activity of the SMA represents an equipoise from which it is possible to move in either direction. The resting corticofugal outflow from the SMA to phrenic motoneurones that this study evidences could putatively contribute to the wakefulness drive to breathe.

Citation: Laviolette L, Niérat M-C, Hudson AL, Raux M, Allard É, et al. (2013) The Supplementary Motor Area Exerts a Tonic Excitatory Influence on Corticospinal Projections to Phrenic Motoneurons in Awake Humans. PLoS ONE 8(4): e62258. doi:10.1371/journal.pone.0062258

Editor: Isaac Yang, UCLA, United States of America

Received October 18, 2012; Accepted March 19, 2013; Published April 16, 2013

Copyright: 2013 Laviolette, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was supported by Chancellerie de l'Université de Paris, "Legs Poix", Paris, France; and the "Association pour le Développement et l'Organisation de la Recherche en Pneumologie et sur le Sommeil", Paris, France and the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06 of the French Government. Louis Laviolette was supported by Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Québec (IUCPQ) foundation, Québec, Canada (2010–2011); a long-term research fellowship from the European Respiratory Society (LTRF fellowship nu39-2011; 2011–2012); and post-doctoral research fellowship from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ, 2012). Anna Hudson was supported by a National Health and Medical Research Council (NHMRC; Australia) early career fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: thomas.similowski@psl.aphp.fr

- These authors contributed equally to this work.

Introduction

Breathing is the only autonomic function that depends on an extrinsic motor command. Ventilation of the lungs to ensure gas exchange indeed involves contractions of respiratory muscles driven by the motor outflow of spinal motoneurons. In this context, contractions of the diaphragm, the main inspiratory muscle during resting breathing in humans, depend on the firing of phrenic motoneurons. This phrenic activity is the net result of the various inputs received by phrenic motoneurons, including the rhythmic ventilatory drive produced by brainstem central pattern generators responsible for automatic ventilation and its adaptation to the body's metabolic needs via chemosensory feedback [1,2]. In addition to this bulbospinal input, phrenic motoneurons also receive corticobulbospinal motor inputs from limbic structures [3–5] that probably account in part for emotional modulations of breathing [6–9]. Higher cortical circuits are a third source of inputs to phrenic motoneurones [10–16] that allow voluntary breathing control and interplay between respiration and cortical non-respiratory processes, primarily speech. The respiratory behaviour observed at a given point in time consequently reflects integration of voluntary and involuntary, rhythmic and non-rhythmic central drives, further modulated by various respiratory and non-respiratory afferents [17,18]; see review in [19].

The importance of this integration is illustrated by the so-called "wakefulness drive to breathe" phenomenon [20–23]; review in [19]. During sleep, a decrease in the partial pressure of carbon dioxide in arterial blood induced by hyperventilation (hyperven-

tilation-induced hypocapnia) is associated with apnoea [23,24]. This phenomenon reflects the "conditional" nature of the respiratory central pattern generator that becomes inactive in the absence of chemical drive to breathe. In contrast, in awake healthy humans, hypocapnia generally fails to induce apnoea [20,23,25]. The exact neurophysiological substrates of this phenomenon have not been fully elucidated. The observation of hypocapnia-induced apnoea in an awake patient with locked-in syndrome after bilateral infarction of the ventral pons, and therefore deprived of corticospinal and corticobulbar projections [26], suggests a cortical origin of the "wakefulness drive to breathe". However, it is unknown whether or not and to what extent the putative cortical structures and/or circuits responsible for sustained breathing during hypocapnia exert an influence on normocapnic resting breathing.

Cortical motor neurons projecting onto phrenic motoneurons have been identified in the primary motor cortex (M1) [10,12,27,28] by observation of diaphragm contractions in response to electrical or magnetic stimulation of the brain. Diaphragm responses to transcranial magnetic stimulation over a cortical area anterior to M1 have also been described [29], considered to be evidence of connections between the supplementary motor area (SMA) and phrenic motoneurons [29]. The SMA plays a major role in the planning and execution of movements (review in [30]). It also has a major inhibitory role, particularly in situations involving renouncing a planned motor sequence, stopping this sequence after it has started, or switching to a different sequence [31–34]; review in [30]. Electroencephalographic and functional imaging studies indicate that like locomotor movements, voluntary respiratory movements involve the SMA [35–39]. There is also evidence that the SMA belongs to cortical circuits engaged in the physiological reaction to inspiratory constraints. When breathing is made experimentally laborious by application of inspiratory resistance, electroencephalographic signs of SMA activation can be observed in the form of slow negativity preceding inspiration in the EEG derivations overlying the vertex [37–39]. In particular, a relationship has been reported between SMA activity and unpleasant respiratory sensations (dyspnoea) [37,38].

The SMA therefore appears to exert an excitatory influence on the production of particular respiratory movements such as voluntary inspirations and constrained inspirations. We hypothezised that the SMA could be a putative source of a resting, "tonic", corticospinal drive to breathe. We therefore set out to test this hypothesis by assuming that, if this were the case, inhibitory conditioning of the SMA by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) would result in a depressed response of the diaphragm to stimulation of its primary motor representation (M1dia).

Materials and Methods

Subjects

With the approval of the appropriate French ethics and regulatory authorities (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VI, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France), we recruited 12 healthy subjects (5 men) with no history of pulmonary or neuromuscular disease (age: 25±4 years; height: 174.7±11.7 cm; weight: 73.7 ±15.0 kg; mean±SD). They had no previous experience whatsoever with physiology experiments. All volunteers received detailed information and gave their written informed consent.

Experimental set-up

The subjects were seated in a comfortable chair. EMG recordings were obtained using pairs of surface electrodes (self-adhesive hydrogel, diameter 20 mm, Comepa, St-Denis, France) placed on cleaned and abraded skin. A ground electrode was placed on one acromion.

For the diaphragm, one electrode was placed in the last palpable right intercostal space between the costochondral junction and the midclavicular line, while the other electrode was placed on the overlying rib at a distance of no more than 2 cm. This electrode placement minimizes the risk of contamination of the signal by the electrical activity of extradiaphragmatic muscles coactivated by TMS [40]. The mechanical response of the diaphragm was assessed by changes in abdominal circumference monitored by means of a piezo respiratory belt transducer (ADinstrument/ Pneumotrace II, UFI, Morro Bay, CA) attached to an elastic belt placed at the level of the umbilicus. An increase in abdominal circumference in response to TMS was considered to indicate diaphragm contraction.

Surface EMG of the dominant (right side in all subjects) first dorsal interosseous (FDI) was recorded as a non-respiratory control with a belly-belly arrangement and EMG activity of the dominant (right side in all subjects) abductor hallucis (AH) was recorded with a tendon-belly arrangement.

EMG signals were amplified (10000× for diaphragm and 1000× for FDI and AH) and filtered (band-pass 10 Hz – 1 kHz) using a 1902 signal conditioner (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK), digitized at 10 kHz using a CED Power 1401 MkII data acquisition interface (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK) and stored on a personal computer for offline analysis using Signal software (Signal 5.00, Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, UK).

Transcranial magnetic stimulation (TMS)

A neuronavigation system (eXimia 2.2.0, Nextim Ltd., Helsinki, Finland) was used during all single-pulse TMS (spTMS) and repetitive TMS (rTMS) acquisitions. This system allowed real-time tracking for reliable and precise positioning of the simulation coil over each hot spot, according to individual anatomical MRIs.

Motor hot spots. The motor hot spot (M1) was determined for the diaphragm, FDI and AH muscles in a relaxed state (i.e. no pre-stimulus EMG activity observed online) as the spTMS coil position that elicited the largest MEP from the target muscle.

For the diaphragm, DiMEPs were elicited at the end of tidal expiration using either a double-cone coil (90 mm; Magstim Company, Whitland, Wales, UK) positioned perpendicular to the scalp near or over the vertex with induced current flowing in an anterior direction (n = 8) or a figure-of-eight coil (loop diameter of 70 mm; Magstim Company, Whitland, Wales, UK) with the handle pointing to the left (n = 2). The cone coil was used when DiMEPs could not be elicited using the figure-of-eight coil. For each subject, the same coil was used at each visit for all diaphragm spTMS acquisitions.

Both coils were connected to a Magstim Bistim^2 200 (Magstim Company, Whitland, Wales, UK), which delivered a monophasic pulse waveform.

The FDI hot spot was stimulated using a figure-of-eight coil connected to a Magstim Bistim^2 super-rapid stimulator. The coil was placed tangentially over the scalp with the handle pointing backwards with a 45u angle to the mid-sagittal plane. This arrangement induced posteroanterior current flow almost perpendicular to the central sulcus [41].

The AH was stimulated using a figure-of-eight coil connected to a Magstim Bistim^2 200. The coil was placed along the sagittal midline with the handle pointing to the right.

Motor thresholds. The resting motor threshold (RMT) was defined as the minimum stimulation intensity (% of maximum stimulator output) that elicited an MEP of at least 50 mV for 5 out of 10 successive stimuli [42]. The RMT was determined for the FDI at rest and for the diaphragm at end-expiration.

Active motor threshold (AMT), determined for the FDI and the AH during muscle contraction (20% of maximum voluntary activity, monitored with EMG), corresponded to the stimulation intensity (% of maximum stimulator output) that elicited an MEP $\geq$ 200 mV for 5 out of 10 successive stimuli.

For RMT and AMT measurements, the stimulator output was decreased by 5% increments until an estimation of the threshold was obtained and then by 1% increments to obtain precise measurement of the threshold. Motor thresholds were measured at each visit.

The RMT of both the FDI and the diaphragm were used to elicit the FDIMEPs and DiMEPs. The AMT of the FDI was used to determine the stimulation intensity of the rTMS protocols and the AMT of the AH was used to locate the SMA [43].

In 3 subjects, the effects of cTBS on RMT and AMT of the diaphragm, FDI and AH were evaluated during a separate session.

SMA localization and conditioning. The SMA was identified as being 1 cm anterior to the last point that elicited an MEP from the AH during contraction (20% of maximum voluntary activity) with a stimulation intensity of 120% of the AH AMT [43]. The last point was determined by moving the stimulation coil anteriorly from the AH hot spot over the midsagittal line. Anatomical MRI for each subject was analyzed retrospectively to validate the positioning of stimulation coil over the SMA [44].

The SMA was conditioned by using:

- an inhibitory theta-burst rTMS protocol, cTBS. Three 50 Hz pulses repeated every 200 ms (i.e. at 5 Hz) continuously for 40 s (for a total of 600 pulses) were delivered at 80% of the AMT of the FDI over the SMA [45].
- a facilitatory 5 Hz rTMS protocol. Ten second 5-Hz trains, separated by 50 s inter-train, repeated 10 times (for a total of 500 pulses) were delivered over the SMA at 110% of the AMT of the FDI. This facilitatory protocol was selected as it has been previously shown to increase DiMEPS after SMA conditioning [46].

A biphasic waveform stimulator (Magstim Bistim^2 super-rapid stimulator) with a figure-of-eight coil (loop diameter: 70 mm) was used to deliver the two stimulation protocols. The coil was placed tangentially to the scalp with the handle pointing to the left.

As an increase in FDI EMG activity during SMA conditioning could be due to spread of stimulation over M1, suggestive impending seizure [47,48], the FDI electromyogram was therefore monitored during rTMS sessions as a precaution.

Experimental protocol

The study consisted of 3 visits. The preliminary visit consisted of an anatomical MRI (3D T1-weighted images), while the neurophysiological recordings were performed at the second and third visits. These visits started with RMT assessment for the diaphragm followed by acquisition of 20 DiMEPs at an intensity of 120% of the DIA RMT delivered at the end of tidal expiration. The FDI RMT was then measured, followed by acquisition of 20 FDIMEPs at 120% of the FDI RMT and measurement of the FDI AMT. The AH AMT was then determined, followed by localization of the SMA, over which the rTMS protocol was then administered. DiMEPs and FDIMEPs were measured at 3 time-points following rTMS: 1–5 min (post 1), 6–10 min (post 2) and 11–15 min (post 3) post-rTMS using the same stimulator intensity as at baseline (Figure 1). The rTMS protocols (cTBS and 5 Hz) were administered in a randomized order. An interval of at least 1 week was observed between protocols to avoid carry-over effects.

Data analysis

The DiMEPs were included in the analysis when they met the following criteria: (1) absence of obvious electrical interference, reflected by clear return of the EMG signal to baseline after the stimulation artefact and before the muscle response; (2) absence of contamination from electrocardiographic signal; (3) concomitant response with abdominal expansion measured by abdominal strain gauge. FDIMEPs for which EMG activity was present before stimulation were excluded from the analysis. For the DiMEPs and FDIMEPs included in the analysis, the level of pre-stimulus EMG was measured as the root mean square (RMS) amplitude over 100 ms prior to stimulation.

MEP amplitudes were measured from peak to peak. All recordings were analysed independently by two observers (LL and MCN) and a third observer resolved any discrepancies (AH). MEP latencies were measured as the time interval between the stimulation pulse and the first excursion of the EMG signal from baseline. For each subject,

MEP amplitude, latency and pre-stimulus EMG were averaged across trials for each muscle and each time-point.

Statistical analysis

Normal data distribution was checked by Shapiro-Wilk test. As motor threshold intensities (resting motor threshold, RMT and active motor threshold, AMT) presented a non-normal distribution, a Friedman repeated measure analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* tests were used to analyze differences between cTBS and 5 Hz conditioning sessions. DiMEP amplitude (mV and% of baseline), pre-stimulus EMG (mV) and latencies (ms) had a normal distribution; one-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) followed by Holm-Sudak *post hoc* tests were used to test differences between baseline and values at the 3 time-points. FDIMEP amplitude (mV and% of baseline) and pre-stimulus EMG (mV) presented a non-normal distribution; a Friedman repeated measure analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* tests were used to analyze differences between baseline and values at the 3 time-points. FDIMEPs latencies (ms) were distributed normally and a Friedman repeated measure analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* tests were used to analyze differences between baseline and values at the 3 time-points. Effect size was computed according to Cohen [49].

Values of $p > 0.05$ were considered statistically significant. Data are expressed as both percentage of baseline MEP, with baseline corresponding to 100%, and absolute values. Values are shown as mean$\pm$SD (DiMEPs) or median [Q1–Q3] (FDIMEPs) depending on the distribution. Statistical analyses were performed using SPSS v11.5 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Two of the 12 subjects withdrew their consent (one before the initial experimental session without giving a reason and the other during the first session because of discomfort during spTMS). A third subject only attended the preliminary visit and the first experimental visit (cTBS protocol) and subsequently withdrew from the study because of an unrelated medical reason. The results

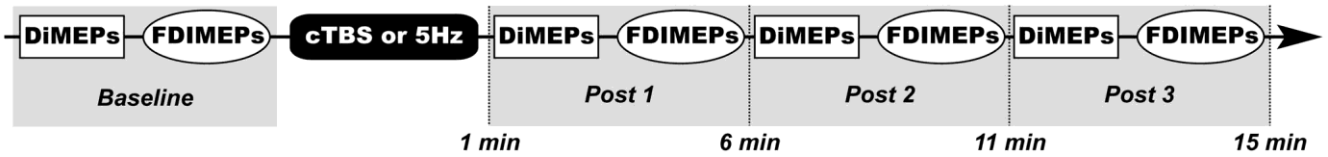


Figure 1. Experimental design. Twenty motor-evoked potentials were recorded for both the diaphragm (DiMEPs) and the first dorsal interosseous (FDIMEPs) at baseline and at three time points (Post 1, Post 2 and Post 3) after the rTMS protocols (cTBS or 5 Hz) over the supplementary motor area (SMA). The time indicates time after the end of rTMS.
doi:10.1371/journal.pone.0062258.g001

therefore concern 10 subjects for cTBS data and 9 subjects for 5 Hz data.

Safety

The subjects did not report any side effects during or after any of the experimental sessions. FDI monitoring during rTMS never revealed EMG patterns suggestive of spread of the rTMS stimulation over SMA to the primary motor cortex.

Stimulation localization

In all the subjects, extensive motor mapping of the diaphragm response to spTMS identified a M1 hotspot in the vertex region, with neuronavigation coordinates fully compatible with previously provided descriptions [15,28,46]. Also, in all the subjects, the SMA hot spot was located approximately 3 cm anteriorly to the vertex, which corresponds to data previously reported in several other studies [43,46,50] (See figure 1. in [46]). Post-hoc MRI localization according to Picard and Strick [44] consistently confirmed that the SMA hot spots corresponded to the anatomical SMA region.

Resting and active motor thresholds

RMT of the diaphragm and FDI and AMT of FDI and AH are shown in Table 1. They did not vary significantly between visits. In another 3 subjects, we tested whether the conditioning protocols over the SMA altered the DIA and FDI RMT and the FDI and AH AMT. No changes were observed throughout the session.

Diaphragm corticospinal excitability following SMA conditioning

Following inhibitory conditioning (cTBS), a significant decrease in DiMEPs amplitude ($F = 6.341$, $p = 0.002$ when expressed in mV) was observed from baseline to post 1, post 2 and post 3 (see Figure 2, Figure 3 and Table 2). These decreases corresponded to moderate effect-size values [49] of 20.53, 20.69 and 20.54 for post 1, post 2 and post 3, respectively. The decrease in DiMEP amplitude was observed in 80%, 100% and 70% of subjects at post 1, post 2 and post 3 time-points, respectively.

Excitatory conditioning of the SMA (5 Hz) increased DiMEP amplitude ($F = 4.844$, $p = 0.009$) compared to baseline, at post 3 only (see Figure 3 and Table 2). This increase corresponded to a large effect-size of 0.89 [49]. The increase in DiMEP amplitude was observed in 89% of subjects for the post 3 time-points.

Pre-stimulus EMG for DiMEPs was similar at all time-points for both the cTBS and the 5 Hz conditioning protocols (see Table 2). DiMEP latency was not affected by the rTMS protocols.

FDI corticospinal excitability following SMA conditioning

Neither inhibitory (cTBS) nor excitatory (5 Hz) conditioning protocols significantly altered FDIMEP amplitude. ($x2 = 4.2$, $df = 3$, $p = 0.241$ for cTBS and $x2 = 3.400$, $df = 3$, $p = 0.334$ for 5 Hz) (Table 3).

Pre-stimulus EMG for FDIMEPs remained unchanged at all time-points for the inhibitory (cTBS) protocol, but was higher at post 2 and post 3 compared to baseline ($x2 = 21.4$, $df = 3$, $p > 0,001$) for the excitatory protocol (5 Hz). FDIMEP latency was not affected by the rTMS protocols.

Discussion

This study shows that conditioning the SMA with an inhibitory rTMS paradigm depresses the response of the diaphragm to the corticospinal inputs induced by spTMS over M1dia. In addition, it confirms that conditioning the SMA with an excitatory protocol (5 Hz stimulation) enhances the response of the diaphragm to spTMS [46]. These results corroborate the demonstration of a functional connectivity between the SMA and M1dia [46] and

Table 1. Resting (RMT) and active (AMT) motor thresholds for the diaphragm, first dorsal interosseous (FDI) and abductor hallucis (AH).

	cTBS				5 Hz			
	RMT		AMT		RMT		AMT	
Diaphragm								
Figure-of-8 coil	78	[74–80]			72	[72–72]		
(n = 3 for cTBS and n = 2 for 5 Hz)								
Cone coil	60	[50–67]			55	[46–72]		
(n = 7)								
FDI	54	[52–64]	46	[40–51]	56	[49–67]	44	[36–56]
AH			63	[51–84]			67	[50–86]

Values shown are% of maximum stimulator output and expressed as median [range]. Definition of abbreviations: FDI = first dorsal interosseous, AH = abductor hallucis.
doi:10.1371/journal.pone.0062258.t001

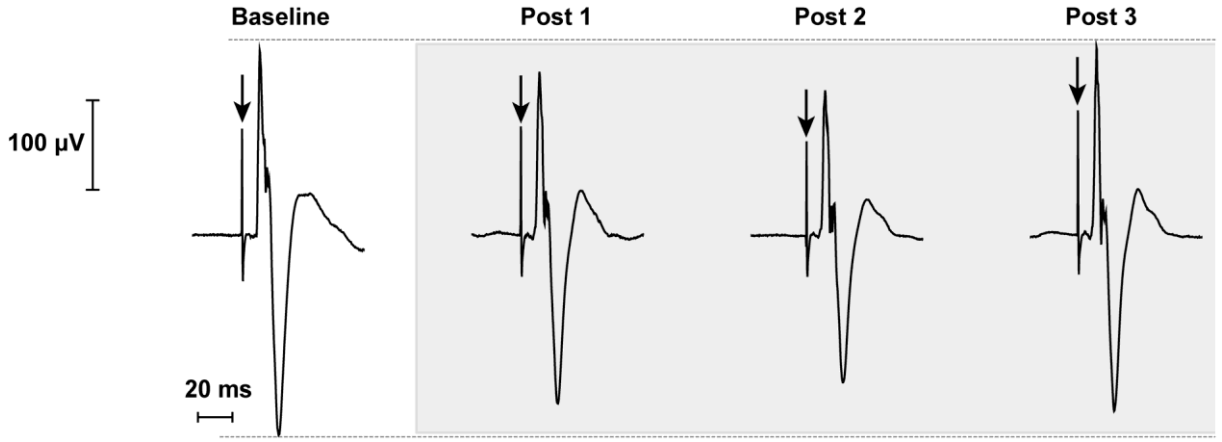


Figure 2. Average waveform of diaphragm motor-evoked potentials (DiMEPs) for a single subject evoked by single-pulse TMS over the motor cortex at baseline and at 3 time-points following the inhibitory protocol (cTBS) over the SMA. Arrows indicate the time of stimulation.
doi:10.1371/journal.pone.0062258.g002

complement the description of this connectivity. The present results also suggest that the SMA exerts a "tonic" excitatory influence on the corticospinal drive to phrenic motoneurons during normocapnic resting breathing in healthy, awake humans. This baseline respiratory activity of the SMA probably represents an equipoise from which it is easy to move in either direction (facilitation or inhibition). This might have a particular relevance to respiratory control during speech.

Methodological considerations

EMG recordings. Surface recordings of diaphragm EMG can be contaminated by the activity of adjacent muscles. To limit this possible interpretation bias, we included abdominal expansion in response to spTMS —indicative of an actual diaphragm contraction—as a quality criterion to analyse DiMEPs and we positioned the chest surface electrodes according to a contamination-minimised montage [40].

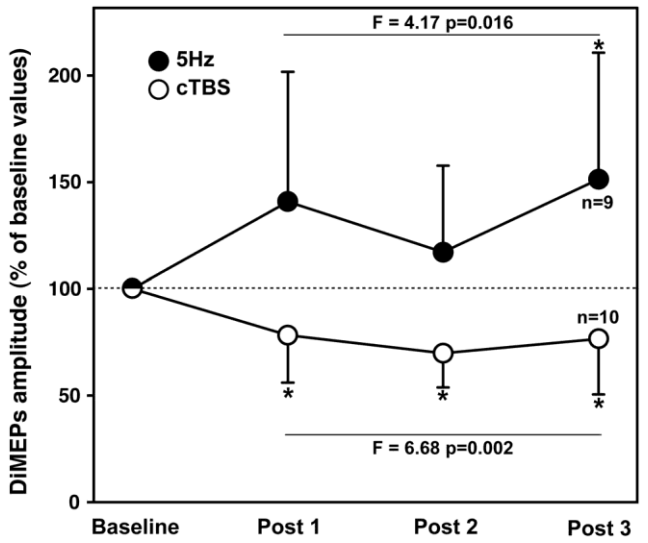


Figure 3. Average amplitude of diaphragm motor-evoked potentials (DiMEPs) for all subjects evoked at baseline and at 3 time-points following inhibitory (cTBS, white circles) and excitatory (5 Hz, black circles) conditioning of the SMA. Values are expressed as% of baseline and as mean6SD. * = p ≥ 0.05 vs. baseline following post hoc tests.
doi:10.1371/journal.pone.0062258.g003

Underlying contractions enhance motoneuron responsiveness to TMS and increase the amplitude of MEPs of either voluntary origin [51,52] or, in the case of the diaphragm, driven by automatic breathing control [53,54]. In our subjects, spTMS was delivered at the end of tidal expiration, when the inspiratory bulbospinal drive to the phrenic motoneurons is absent or minimal [55]. The diaphragm hotspot and RMT were verified during each visit and were reproducible. In addition, the pre-stimulus RMS amplitudes for a given subject were stable during the sessions and reproducible between sessions. We are therefore confident that our recording technique minimized the impact of confounding factors on the results.

Conditioning stimulation of the SMA. The SMA hot spot in our subjects was located according to a previously described methodology and its position validated by post hoc MRI analysis (see results). We are therefore confident that conditioning stimulations actually reached the SMA, and, at any rate, the supplementary motor complex (SMC). We are also confident that spread of the conditioning stimulation during the experimental sessions was minimal based on continuous use of MRI-guided neuronavigation for coil positioning. Moreover, a spread to M1 was unlikely to have occurred: low stimulation intensities and use of a focal coil should have been responsible for a rapid decay of the magnetic field outside the targeted spot. This is supported by the lack of FDI EMG activity during SMA conditioning. For greater safety [47,48], the intensity of conditioning stimulations was calibrated according to the FDI AMT (80% and 110% for the cTBS and 5 Hz protocols, respectively) and not according to the diaphragm AMT, which is systematically higher [56–58]. Of notice, we chose to monitor FDI activity as an indicator of the spread toward M1 rather than the AH activity. Indeed, even though the AH M1 representation is closer to the site of SMA stimulation, the FDI threshold is lower than that of the AH.

A trend in FDIMEP response was observed after cTBS and 5 Hz conditioning that resembled the diaphragm responses (decreased MEP in response to cTBS, increased MEP in response to 5 Hz). These trends are in line with previous results [46]. However, these results did not reach the limit of statistical significance, possibly because FDIMEP amplitudes were much more variable between subjects than DiMEP amplitudes. This

Table 2. Amplitude, latencies and 100 ms pre-stimulus RMS EMG of diaphragm motor-evoked potentials (DiMEPs) before/after SMA inhibitory (cTBS) and facilitatory (5 Hz) conditioning protocols.

	cTBS			5 Hz		
	Amplitude (mV)	Latencies (ms)	Pre-stimulus (100 ms) EMG (mV)	Amplitude (mV)	Latencies (ms)	Pre-stimulus (100 ms) EMG (mV)
Baseline	327.5 6 159.8{	15.9 6 1.7	3.1 6 1.1	184.7 6 96.5{	16.1 6 1. 6	3.3 6 0.7
Post 1	243.3 6 118.7*	15.9 6 1.7	3.4 6 1.2	244.9 6 111.3	16.2 6 1.4	3.6 6 1.1
Post 2	217.8 6 102.9*	16.1 6 1.7	2.8 6 0.5	207.5 6 99.9	16.4 6 1.1	3.5 6 1.2
Post 3	240.6 6 123.9*	16.1 6 1.6	2.9 6 0.5	270.7 6 135.4*	16.1 6 1.6	3.6 6 0.6

DiMEP values had a normal distribution and are therefore presented as mean6SD. * = p , 0.05 vs. baseline values following post hoc tests. { = p , 0.05 between cTBS and 5 Hz conditions. The baseline values were statistically different (F = 5.39, p , 0.05). This difference was entirely accounted for by the one subject who dropped out of the study before participating in the 5 Hz part of the experiment. When this subject was removed from the analysis, the difference between baselines disappeared, but the cTBS-related inhibition did persist (F = 4.508, p , 0.012).

doi:10.1371/journal.pone.0062258.t002

may be the result of insufficient control of FDI muscle activity during the experiments [59–62]. Small but significant increases in FDI pre-stimulus EMG were indeed observed between MEPs evoked at baseline and at two time-points following 5 Hz stimulation (Table 3).

Neurophysiological considerations

Connections between the SMA and phrenic motoneurons. Sharshar et al. [29] established the likely existence of SMA-phrenic connections by describing DiMEPs in response to TMS applied over two distinct cortical spots, one located at the vertex, the other 3 cm anteriorly. They argued that the vertex spot corresponded to the diaphragm representation within the primary motor cortex (M1dia) and that the more anterior spot corresponded to the SMA. The two cortical areas from which diaphragm responses could be elicited exhibited significant differences in terms of their intracortical inhibitory/excitatory balance and their facilitatory output during voluntary inspiratory efforts. The authors concluded that the SMA likely exerted a predominantly excitatory effect on phrenic motoneurons [29]. They also postulated that they had described a direct SMA-phrenic projection rather than a SMA-M1 relay to the phrenic motoneurons. The main argument supporting this contention was the short latency of the diaphragm response to SMA stimulation and the lack of notable difference between the MEP latencies at the two stimulation spots (16.4 6 2.7 ms vs. 16.7 6 2.4 ms under relaxed conditions). However, these findings do not formally rule out a SMA-M1 relay to the phrenic motoneurons that would resemble known functional SMA-M1 connections described for non-respiratory muscles [43,50,63–67]. Consequently, our observations could reflect modulation of either a direct corticophrenic pathway arising in the SMA or an indirect pathway featuring intracortical SMA-M1dia connections (Figure 4). In the present study, as in a previous study [46], we observed that 5 Hz conditioning stimulation facilitated the diaphragm response to spTMS. DiMEP amplitudes increased, but no latency effect was observed. This pattern of MEP changes is suggestive of cortical facilitation, as opposed to spinal facilitation that involves combined spatial and temporal motor unit recruitment and is associated with both increased amplitude and decreased latency of the facilitated MEPs [68]; see detailed discussion in [54]. In addition, available data indicate that rTMS delivered over the primary motor cortex and over the premotor cortex does not modify spinal motoneuron excitability as assessed by the H-reflex [43,45,69,70]; review in [71]. Other data indicate that rTMS conditioning protocols exert their effects via cortico-cortical mechanisms [45,72–75]. All in all, we therefore propose that the DiMEP changes observed after SMA conditioning in our subjects resulted not from modulation of direct SMA-phrenic projections, but from modulation of SMA-M1-phrenic connections. However, formal proof of this contention is currently lacking. This proof could be obtained by studying the effects of SMA conditioning on the diaphragmatic response to paired-pulse TMS [16]. It is also important to consider that the SMA most likely operates as a node from a larger motor-control network of subcortical structures, including the basal ganglia, thalamus, cerebellum and pons [30,76–78].

Influence of the SMA on the M1Dia-phrenic projections. The fact that inhibitory conditioning of the SMA

Table 3. Amplitude, latencies and 100 ms pre-stimulus RMS EMG of first dorsal interosseous motor-evoked potentials (FDIMEPs) before/after SMA inhibitory (cTBS) and facilitatory (5 Hz) conditioning protocols.

	cTBS			5 Hz		
	Amplitude (mV)	Latencies (ms)	Pre-stimulus (100 ms) EMG (mV)	Amplitude (mV)	Latencies (ms)	Pre-stimulus (100 ms) EMG (mV)
Baseline	899.7 [525.8–1582.0]	23.4 [22.0–25.0]	9.8 [8.8–11.3]	1060.7 [704.1–1603.5]	23.1 [21.5–24.3]	9.4 [8.4–11.0]
Post 1	495.3 [273.0–1899.0]	23.4 [21.4–24.8]	9.9 [9.2–11.3]	1278.6 [788.7–2227.6]	23.2 [21.5–24.4]	10.2 [9.4–11.9]
Post 2	461.6 [149.1–1431.0]	23.1 [21.4–24.6]	10.6 [9.2–11.4]	1595.6 [699.2–2411.1]	23.3 [21.7–24.1]	9.9 [9.5–12.0]*
Post 3	821.9 [364.1–1899.7]	23.4 [21.5–24.9]	10.8 [9.3–11.5]	1245.9 [787.3–2323.7]	22.7 [21.8–24.0]	10.9 [9.6–12.0]*

FDIMEP values had a non-normal distribution and are therefore presented as median and [Q1–Q3]. * = p , 0.05 vs. baseline values following post hoc tests.

doi:10.1371/journal.pone.0062258.t003

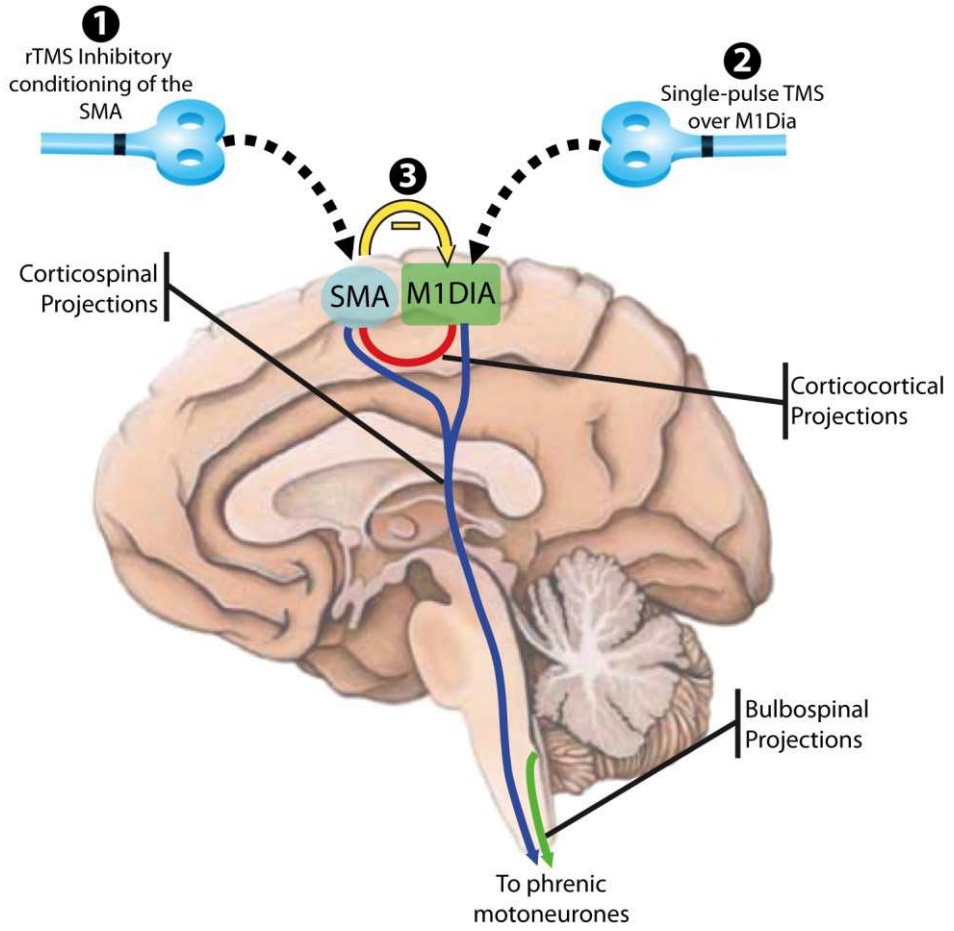


Figure 4. Schematic representations of descending projections to the phrenic motoneurones and corticocortical projections between the SMA and diaphragm primary motor representation (M1Dia). We showed that inhibitory conditioning of the SMA by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS, ''1'') results in a depressed response of the diaphragm to stimulation of M1dia (''2''). We hypothesise that this is due to inhibition of the corticocortical connections between the SMA and MIdia (''3'') and this suggests that there is a resting facilitatory tonic projection between these areas (shown in red). There are other descending pathways to the phrenic motoneurones that are not shown for clarity (i.e. from the limbic cortex).
doi:10.1371/journal.pone.0062258.g004

resulted in a decreased diaphragm response to TMS implies the existence of a resting corticofugal outflow from the SMA to phrenic motoneurons. It is indeed unlikely that an inhibitory effect following an inhibitory conditioning could be observed in the absence of a prior tonic facilitatory drive.

Our observations contrast with those of a previous study by Raux et al. [46], in which facilitatory conditioning of the SMA (5 Hz rTMS) enhanced the response of the diaphragm to spTMS over M1dia, but an inhibitory rTMS protocol (i.e. 1 Hz rTMS) failed to induce any reduction in the amplitude of DiMEPs. The difference between the two studies is probably related to differences in inhibitory efficiency between the two conditioning paradigms, namely 1 Hz rTMS vs. cTBS [45,79]. Our observations are somewhat reminiscent of the demonstration of effective facilitatory connectivity between the SMA and M1 in the absence of movement [67]. They are also compatible with the observation that mechanical ventilation, which applies a positive pressure to the airway and unloads the respiratory muscles from their ventilatory task, depresses the excitability of the corticophrenic pathway in awake humans [80]. Sharshar et al [80] observed that the institution of isocapnic mechanical ventilation through a face mask in normal individuals reduced the amplitude of DiMEPs. As paired TMS stimulation concomitantly showed that mechanical ventilation was associated with an enhanced response to paired TMS at facilitatory interstimulation intervals. The authors concluded that the observed inhibition occurred at a cortical site. As no such changes were observed for the quadriceps, they concluded that the observed phenomenon was specific to the diaphragm. Sharshar et al. [80] postulated that the SMA could be among the cortical regions involved in breathing control, as inhibition of the SMA would explain their results. However, it is known that inspiratory efforts giving rise to negative airway pressure —the opposite of what occurs during mechanical ventilation— evoke cortical potentials indicating respiratory-related brain activation [81]. Source dipole analysis of the early components of these potentials demonstrated involvement of the SMA [82]. It can therefore be hypothesized that afferent feedback from the respiratory system provides permanent excitatory input to the SMA, which would in turn correspond to the excitatory efferent outflow documented in the present study. By silencing this afferent feedback, mechanical ventilation would therefore result in the intracortical inhibition described by Sharshar et al. [80].

Implications for breathing control and conclusions. If, as our data suggest, the SMA does exert a resting facilitatory

influence on phrenic motoneurons, and if this influence depends on SMA-M1 intracortical connections, then the sleep-related loss of intracortical connectivity [83] could reasonably be hypothetized to contribute to the sleep-related reduction in ventilatory activity and the reduced diaphragm response to spTMS during sleep [54]. We may therefore have identified one of the neurophysiological substrates of the increased resting state of the respiratory motor system that characterizes wakefulness (the the so-called "wakefulness drive to breathe"). While we acknowledge that our observations do not prove that the SMA participates to the wakefulness drive to breathe, we however think that they provide a sufficient rationale to devise specific experiments with this objective. For example, one would expect that inhibiting the SMA before inducing hypocapnia in awake subjects would result in an increased occurrence of post-hyperventilation apneas.

This study adds to the current body of knowledge suggesting that the SMA plays a significant role in breathing control. Given the role of the SMA in movement preparation and inhibition (review in [30]), it can be postulated that it plays a fundamental role in the production of the voluntary inspirations that intersperse speech and in the inhibition of prepared speech-related breaths during adaptations to conversational environment [84]. Our demonstration that the SMA can be both facilitated (5 Hz protocol) and inhibited (cTBS protocol) in the present study goes in this direction. The SMA could also participate in inhibition of the activity of the central pattern generators [85] that is essential to ensure that speech is not disrupted by "metabolic" breaths. In this regard, the SMA does belong to a cortico-subcortical network that is activated during voluntary breath-holding [86]. Finally, the SMA is involved in the physiological response induced by experimental respiratory constraints [37]. Such constraints elicit unpleasant respiratory sensations [37]. The present observations therefore provide a preliminary rationale to study rTMS as a method to alleviate certain forms of dyspnea, in the same manner as it is used to relieve certain forms of pain [87].

Acknowledgments

We would like to thank the Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épiniere (CRICM), the Plateforme de neurophysiologie de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) for their help in conducting this study and Laurence Jacquenod, TICEMED, Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, Paris, France for her help with figure 4.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LL MCN AH MR TS. Performed the experiments: LL MCN AH EA. Analyzed the data: LL MCN AH MR EA TS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MR TS. Wrote the paper: LL MCN AH MR EA TS.

References

1. Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. Science 254: 726–729.
2. Onimaru H, Homma I (2006) Point:Counterpoint: The parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. Point: the PFRG is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. J Appl Physiol 100: 2094–2095.
3. Mesulam MM, Mufson EJ (1982) Insula of the old world monkey. III: Efferent cortical output and comments on function. J Comp Neurol 212: 38–52.
4. Mesulam MM, Mufson EJ (1982) Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. J Comp Neurol 212: 1–22.
5. Augustine JR (1996) Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. Brain Res Brain Res Rev 22: 229–244.
6. Pool JL, Ransohoff J (1949) Autonomic effects on stimulating rostral portion of cingulate gyri in man. J Neurophysiol 12: 385–392.
7. Munschauer FE, Mador MJ, Ahuja A, Jacobs L (1991) Selective paralysis of voluntary but not limbically influenced automatic respiration. Arch Neurol 48: 1190–1192.
8. Masaoka Y, Homma I (2000) The source generator of respiratory-related anxiety potential in the human brain. Neurosci Lett 283: 21–24.
9. Evans KC (2010) Cortico-limbic circuitry and the airways: insights from functional neuroimaging of respiratory afferents and efferents. Biol Psychol 84: 13–25.
10. Gandevia SC, Rothwell JC (1987) Activation of the human diaphragm from the motor cortex. J Physiol 384: 109–118.
11. Murphy K, Mier A, Adams L, Guz A (1990) Putative cerebral cortical involvement in the ventilatory response to inhaled CO2 in conscious man. J Physiol 420: 1–18.
12. Similowski T, Catala M, Rancurel G, Derenne JP (1996) Impairment of central motor conduction to the diaphragm in stroke. Am J Respir Crit Care Med 154: 436–441.
13. Similowski T, Straus C, Coic L, Derenne JP (1996) Facilitation-independent response of the diaphragm to cortical magnetic stimulation. Am J Respir Crit Care Med 154: 1771–1777.
14. Zifko UA, Slomka PJ, Reid RH, Young GB, Remtulla H et al. (1996) The cortical representation of somatosensory evoked potentials of the phrenic nerve. J Neurol Sci 139: 197–202.
15. Sharshar T, Ross E, Hopkinson NS, Dayer M, Nickol A et al. (2003) Effect of voluntary facilitation on the diaphragmatic response to transcranial magnetic stimulation. J Appl Physiol 95: 26–34.
16. Demoule A, Verin E, Ross E, Moxham J, Derenne JP et al. (2003) Intracortical inhibition and facilitation of the response of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation. J Clin Neurophysiol 20: 59–64.
17. Aminoff MJ, Sears TA (1970) Segmental integration of converging inputs to thoracic respiratory motoneurones. J Physiol 208: 76P-77P.
18. Aminoff MJ, Sears TA (1971) Spinal integration of segmental, cortical and breathing inputs to thoracic respiratory motoneurones. J Physiol 215: 557–575.
19. Shea SA (1996) Behavioural and arousal-related influences on breathing in humans. Exp Physiol 81: 1–26.
20. Fink BR (1961) Influence of cerebral activity in wakefulness on regulation of breathing. J Appl Physiol 16: 15–20.
21. Bulow K (1963) Respiration and wakefulness in man. Acta Physiol Scand Suppl 209: 1–110.
22. Asmussen E (1977) Regulation of respiration: "The Black Box". Acta Physiol Scand 99: 85–90.
23. Datta AK, Shea SA, Horner RL, Guz A (1991) The influence of induced hypocapnia and sleep on the endogenous respiratory rhythm in humans. J Physiol 440: 17–33.
24. Skatrud JB, Dempsey JA (1983) Interaction of sleep state and chemical stimuli in sustaining rhythmic ventilation. J Appl Physiol 55: 813–822.
25. Fink BR, Hanks EC, Ngai SH, Papper EM (1963) Central regulation of respiration during anesthesia and wakefulness. Ann NY Acad Sci 109: 892–900.
26. Heywood P, Murphy K, Corfield DR, Morrell MJ, Howard RS et al. (1996) Control of breathing in man; insights from the 'locked-in' syndrome. Respir Physiol 106: 13–20.
27. Foerster O (1936) Motorische Felder und Bahen. In: Bunke O, Foerster O, editors. Handbook der Neurologie, Vol. 6.Berlin: Springer.50–51.
28. Maskill D, Murphy K, Mier A, Owen M, Guz A (1991) Motor cortical representation of the diaphragm in man. J Physiol 443: 105–121.
29. Sharshar T, Hopkinson NS, Jonville S, Prigent H, Carlier R et al. (2004) Demonstration of a second rapidly conducting cortico-diaphragmatic pathway in humans. J Physiol 560: 897–908.
30. Nachev P, Kennard C, Husain M (2008) Functional role of the supplementary and pre-supplementary motor areas. Nat Rev Neurosci 9: 856–869.
31. Sumner P, Nachev P, Morris P, Peters AM, Jackson SR et al. (2007) Human medial frontal cortex mediates unconscious inhibition of voluntary action. Neuron 54: 697–711.
32. Kasess CH, Windischberger C, Cunnington R, Lanzenberger R, Pezawas L et al. (2008) The suppressive influence of SMA on M1 in motor imagery revealed by fMRI and dynamic causal modeling. Neuroimage 40: 828–837.
33. Dinomais M, Minassian AT, Tuilier T, Delion M, Wilke M et al. (2009) Functional MRI comparison of passive and active movement: possible inhibitory role of supplementary motor area. Neuroreport 20: 1351–1355.
34. Boy F, Husain M, Singh KD, Sumner P (2010) Supplementary motor area activations in unconscious inhibition of voluntary action. Exp Brain Res 206: 441–448.
35. Macefield G, Gandevia SC (1991) The cortical drive to human respiratory muscles in the awake state assessed by premotor cerebral potentials. J Physiol 439: 545–558.
36. Colebatch JG, Adams L, Murphy K, Martin AJ, Lammertsma AA et al. (1991) Regional cerebral blood flow during volitional breathing in man. J Physiol 443: 91–103.

37. Raux M, Straus C, Redolfi S, Morelot-Panzini C, Couturier A et al. (2007) Electroencephalographic evidence for pre-motor cortex activation during inspiratory loading in humans. J Physiol 578: 569–578.
38. Raux M, Ray P, Prella M, Duguet A, Demoule A et al. (2007) Cerebral cortex activation during experimentally induced ventilator fighting in normal humans receiving noninvasive mechanical ventilation. Anesthesiology 107: 746–755.
39. Tremoureux L, Raux M, Jutand L, Similowski T (2010) Sustained preinspiratory cortical potentials during prolonged inspiratory threshold loading in humans. J Appl Physiol 108: 1127–1133.
40. Demoule A, Verin E, Locher C, Derenne JP, Similowski T (2003) Validation of surface recordings of the diaphragm response to transcranial magnetic stimulation in humans. J Appl Physiol 94: 453–461.
41. Brasil-Neto JP, Cohen LG, Panizza M, Nilsson J, Roth BJ et al. (1992) Optimal focal transcranial magnetic activation of the human motor cortex: effects of coil orientation, shape of the induced current pulse, and stimulus intensity. J Clin Neurophysiol 9: 132–136.
42. Rossini PM, Barker AT, Berardelli A, Caramia MD, Caruso G et al. (1994) Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 91: 79–92.
43. Matsunaga K, Maruyama A, Fujiwara T, Nakanishi R, Tsuji S et al. (2005) Increased corticospinal excitability after 5 Hz rTMS over the human supplementary motor area. J Physiol 562: 295–306.
44. Picard N, Strick PL (2001) Imaging the premotor areas. Curr Opin Neurobiol 11: 663–672.
45. Huang YZ, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC (2005) Theta burst stimulation of the human motor cortex. Neuron 45: 201–206.
46. Raux M, Xie H, Similowski T, Koski L (2010) Facilitatory conditioning of the supplementary motor area in humans enhances the corticophrenic responsive-ness to transcranial magnetic stimulation. J Appl Physiol 108: 39–46.
47. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A (2009) Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. Clin Neurophysiol 120: 2008–2039.
48. Lefaucheur JP, Andre-Obadia N, Poulet E, Devanne H, Haffen E et al. (2011) [French guidelines on the use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): safety and therapeutic indications]. Neurophysiol Clin 41: 221–295.
49. Cohen J (1988) Statistical power analysis for the behavioral sciences, Second edition. NJ: Lawrence Erlbaum associates. 567 p.
50. Hamada M, Hanajima R, Terao Y, Okabe S, Nakatani-Enomoto S et al. (2009) Primary motor cortical metaplasticity induced by priming over the supplemen- tary motor area. J Physiol 587: 4845–4862.
51. Day BL, Rothwell JC, Thompson PD, Dick JP, Cowan JM et al. (1987) Motor cortex stimulation in intact man. 2. Multiple descending volleys. Brain 110: 1191–1209.
52. Maertens de Noordhout A, Pepin JL, Gerard P, Delwaide PJ (1992) Facilitation of responses to motor cortex stimulation: effects of isometric voluntary contraction. Ann Neurol 32: 365–370.
53. Straus C, Locher C, Zelter M, Derenne JP, Similowski T (2004) Facilitation of the diaphragm response to transcranial magnetic stimulation by increases in human respiratory drive. J Appl Physiol 97: 902–912.
54. Mehiri S, Straus C, Arnulf I, Attali V, Zelter M et al. (2006) Responses of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation during wake and sleep in humans. Respir Physiol Neurobiol 154: 406–418.
55. Berger AJ (1979) Phrenic motoneurons in the cat: subpopulations and nature of respiratory drive potentials. J Neurophysiol 42: 76–90.
56. Brouwer B, Ashby P (1990) Corticospinal projections to upper and lower limb spinal motoneurons in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 76: 509–519.
57. Wassermann EM, McShane LM, Hallett M, Cohen LG (1992) Noninvasive mapping of muscle representations in human motor cortex. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 85: 1–8.
58. Chen R, Tam A, Butefisch C, Corwell B, Ziemann U et al. (1998) Intracortical inhibition and facilitation in different representations of the human motor cortex. J Neurophysiol 80: 2870–2881.
59. Hess CW, Mills KR, Murray NM (1986) Magnetic stimulation of the human brain: facilitation of motor responses by voluntary contraction of ipsilateral and contralateral muscles with additional observations on an amputee. Neurosci Lett 71: 235–240.
60. Chiappa KH, Cros D, Day B, Fang JJ, Macdonell R et al. (1991) Magnetic stimulation of the human motor cortex: ipsilateral and contralateral facilitation effects. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 43: 186–201.
61. Izumi S, Findley TW, Ikai T, Andrews J, Daum M et al. (1995) Facilitatory effect of thinking about movement on motor-evoked potentials to transcranial magnetic stimulation of the brain. Am J Phys Med Rehabil 74: 207–213.
62. Kiers L, Fernando B, Tomkins D (1997) Facilitatory effect of thinking about movement on magnetic motor-evoked potentials. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 105: 262–268.
63. Gerloff C, Corwell B, Chen R, Hallett M, Cohen LG (1997) Stimulation over the human supplementary motor area interferes with the organization of future elements in complex motor sequences. Brain 120: 1587–1602.
64. Civardi C, Cantello R, Asselman P, Rothwell JC (2001) Transcranial magnetic stimulation can be used to test connections to primary motor areas from frontal and medial cortex in humans. Neuroimage 14: 1444–1453.
65. Serrien DJ, Strens LH, Oliviero A, Brown P (2002) Repetitive transcranial magnetic stimulation of the supplementary motor area (SMA) degrades bimanual movement control in humans. Neurosci Lett 328: 89–92.
66. Johansen-Berg H, Behrens TE, Robson MD, Drobnjak I, Rushworth MF et al. (2004) Changes in connectivity profiles define functionally distinct regions in human medial frontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 13335–13340.
67. Arai N, Lu MK, Ugawa Y, Ziemann U (2012) Effective connectivity between human supplementary motor area and primary motor cortex: a paired-coil TMS study. Exp Brain Res 220: 79–87.
68. Di Lazzaro V, Restuccia D, Oliviero A, Profice P, Ferrara L et al. (1998) Effects of voluntary contraction on descending volleys evoked by transcranial stimulation in conscious humans. J Physiol 508: 625–633.
69. Berardelli A, Inghilleri M, Rothwell JC, Romeo S, Curra A et al. (1998) Facilitation of muscle evoked responses after repetitive cortical stimulation in man. Exp Brain Res 122: 79–84.
70. Huang YZ, Rothwell JC, Lu CS, Wang J, Weng YH et al. (2009) The effect of continuous theta burst stimulation over premotor cortex on circuits in primary motor cortex and spinal cord. Clin Neurophysiol 120: 796–801.
71. Di Lazzaro V, Ziemann U, Lemon RN (2008) State of the art: Physiology of transcranial motor cortex stimulation. Brain Stimul 1: 345–362.
72. Di Lazzaro V, Pilato F, Saturno E, Oliviero A, Dileone M et al. (2005) Theta- burst repetitive transcranial magnetic stimulation suppresses specific excitatory circuits in the human motor cortex. J Physiol 565: 945–950.
73. Gentner R, Wankerl K, Reinsberger C, Zeller D, Classen J (2008) Depression of human corticospinal excitability induced by magnetic theta-burst stimulation: evidence of rapid polarity-reversing metaplasticity. Cereb Cortex 18: 2046–2053.
74. Ziemann U, Paulus W, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Byblow WD et al. (2008) Consensus: Motor cortex plasticity protocols. Brain Stimul 1: 164–182.
75. Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Oliviero A et al. (2010) The effects of motor cortex rTMS on corticospinal descending activity. Clin Neurophysiol 121: 464–473.
76. Fink GR, Corfield DR, Murphy K, Kobayashi I, Dettmers C et al. (1996) Human cerebral activity with increasing inspiratory force: a study using

positron emission tomography. J Appl Physiol 81: 1295–1305.
77. Schmahmann JD, Ko R, MacMore J (2004) The human basis pontis: motor syndromes and topographic organization. Brain 127: 1269–1291.
78. Hanakawa T, Dimyan MA, Hallett M (2008) Motor planning, imagery, and execution in the distributed motor network: a time-course study with functional MRI. Cereb Cortex 18: 2775–2788.
79. Di Lazzaro V, Dileone M, Pilato F, Capone F, Musumeci G et al. (2011) Modulation of motor cortex neuronal networks by rTMS: comparison of local and remote effects of six different protocols of stimulation. J Neurophysiol 105: 2150–2156.
80. Sharshar T, Ross ET, Hopkinson NS, Porcher R, Nickol AH et al. (2004) Depression of diaphragm motor cortex excitability during mechanical ventilation. J Appl Physiol 97: 3–10.
81. Davenport PW, Friedman WA, Thompson FJ, Franzen O (1986) Respiratory- related cortical potentials evoked by inspiratory occlusion in humans. J Appl Physiol 60: 1843–1848.
82. Logie ST, Colrain IM, Webster KE (1998) Source dipole analysis of the early components of the RREP. Brain Topogr 11: 153–164.
83. Massimini M, Ferrarelli F, Huber R, Esser SK, Singh H et al. (2005) Breakdown of cortical effective connectivity during sleep. Science 309: 2228–2232.
84. McFarland DH (2001) Respiratory markers of conversational interaction. J Speech Lang Hear Res 44: 128–143.
85. Ramsay SC, Adams L, Murphy K, Corfield DR, Grootoonk S et al. (1993) Regional cerebral blood flow during volitional expiration in man: a comparison with volitional inspiration. J Physiol 461: 85–101.
86. McKay LC, Evans KC, Frackowiak RS, Corfield DR (2003) Neural correlates of voluntary breathing in humans. J Appl Physiol 95: 1170–1178.
87. Cruccu G, Aziz TZ, Garcia-Larrea L, Hansson P, Jensen TS et al. (2007) EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. Eur J Neurol 14: 952–970.

ÉTUDE n°2

Niérat M-C, Hudson AL, Chaskalovic J, Similowski T*, Laviolette L*

*co derniers auteurs

RÉSUMÉ ÉTUDE N°2

Bases théoriques

L'AMS, au travers de ses connexions, joue un rôle dans la commande ventilatoire d'éveil (1ère étude de cette thèse). Les données obtenues en conditions de ventilation contrainte montrent que l'AMS est également impliquée dans la compensation de charges inspiratoires (Raux *et al.*, 2007a, b, 2013). Par analogie avec le contrôle locomoteur, l'AMS participerait à la préparation du mouvement lorsque la ventilation est contrainte à travers la programmation temporelle de l'inspiration (Macar *et al.*, 2006), à l'exécution réelle du mouvement moteur (pour revue, Nachev *et al.*, 2008) et au contrôle de la ventilation en contribuant à la génération et au traitement de la copie d'efférence (Wolpert et Flanagan, 2001 ; Feldman, 2009 ; Shadmehr *et al.*, 2010)

Les protocoles de rTMS offrent non seulement la possibilité de moduler durablement l'excitabilité corticospinale mais aussi d'induire des modifications comportementales (pour revues, Chouinard et Paus, 2010 ; Fang *et al.,* 2010).

Hypothèses et objectif

Le but de cette étude a été de caractériser les conséquences ventilatoires de l'induction de plasticité de la commande corticale de la ventilation à partir du conditionnement de l'AMS selon trois protocoles (cTBS, 5Hz et sham) alors que la ventilation était expérimentalement rendue difficile par l'addition d'une charge à seuil. En effet, si l'AMS exerce une influence excitatrice sur la préparation du mouvement, sa réalisation et la génération d'une copie d'efférence, le conditionnement rTMS de l'AMS se traduira par un changement de l'influx transmis aux muscles respiratoires (V_T/Ti) mais aussi par une modification des paramètres temporels (Ti et Ti/T_T) vers l'augmentation suite au protocole rTMS à 5Hz et la diminution après un protocole en cTBS. Le protocole rTMS s'accompagnera d'une diminution de la perception d'effort respiratoire alors que suite au protocole en cTBS, les cotations seront supérieures

Méthodologie

Sept volontaires sains (3 hommes, âge : 25 ± 4 ans, moyenne ± écart type) ont participé à cette étude randomisée, contrôlée, en simple aveugle. Ils ont été reliés par une pièce buccale à un dispositif ventilatoire comportant une valve bidirectionnelle séparant le circuit inspiratoire du circuit expiratoire et un pneumotachographe permettant la mesure de différentes grandeurs respiratoires. Le dispositif ventilatoire a été également connecté à un capteur différentiel de pression et à un analyseur de gaz pour la mesure de la $P_{ET}CO_2$. Une

charge mécanique à seuil, réglée à 20% de la pression inspiratoire maximale du sujet, a été raccordée au port inspiratoire.
Les grandeurs temporelles (Ti, Te, T_T, Ti/T_T), débimétriques (Ve) ainsi que les valeurs de la capnie ont été recueillies au cours de chaque expérimentation. La sensation de dyspnée de chaque sujet a été évaluée à chaque minute au cours de la séance expérimentale par une échelle visuelle analogique (EVA) graduée de 0 (aucune sensation d'effort respiratoire) à 10 (sensation d'effort respiratoire intolérable).
La séquence expérimentale a comporté une ligne de base (BL) incluant deux périodes de 15 minutes de ventilation (avec puis sans charge), suivie d'un conditionnement de l'AMS puis de 15 minutes de ventilation avec charge.
Le conditionnement de l'AMS a été réalisé selon la même méthodologie que pour l'étude n°1. Une condition de stimulation sham a été ajoutée pour contrôler la présence d'effets ventilatoires non liés aux effets des conditionnements actifs.

Chaque sujet suivait trois sessions expérimentales (cTBS, rTMS à 5Hz ou sham) espacées d'au moins trois jours.

Résultats

La valeur moyenne des grandeurs ventilatoires a été calculée en BL à partir des 10 dernières minutes de ventilation en charge. Les cinq premières minutes de ventilation avec charge ont été considérées comme une période d'habituation à la compensation de charge et de stabilisation du profil ventilatoire et retirées de l'analyse. Les 15 minutes de ventilation en charge post conditionnement, actif ou sham, ont été analysées suivant le schéma retenu pour l'étude n°1, par période de 5 minutes (Post 1, Post 2, Post 3).

Les modifications du profil ventilatoire consécutives à un conditionnement de l'AMS par un protocole rTMS facilitateur (rTMS à 5Hz) sont marquées par une diminution du temps inspiratoire en valeur absolue (Ti) et rapporté à la période (temps de consigne, Ti/T_T) (respectivement p = 0,01 et p= 0,021 vs BL) et une diminution de la fréquence respiratoire (p = 0,059) n'atteignant pas le seuil de significativité statistique. Une augmentation du volume courant à Post 2 est également notée (p = 0,016). Ces éléments se traduisent par une diminution de la ventilation aux trois temps (p = 0,003) et une diminution de l'hypocapnie à Post 1 et Post 2 (p = 0,013).

En réponse au protocole cTBS seules les grandeurs temporelles s'avèrent être modifiées avec une diminution significative du temps de consigne à Post 2 et Post 3 (p = 0,012). Ceci est lié à diminution du temps inspiratoire (p = 0,063) et une augmentation du temps expiratoire (p = 0,031) à Post 2.

Aucune modification du profil ventilatoire n'est notée suite au conditionnement sham.

Aucun protocole n'a induit de modification de la dyspnée (cTBS, p = 0,308 ; rTMS à 5Hz, p = 0,352 ; sham, p = 0,223).

Conclusion

L'application de protocoles rTMS sur l'AMS lors de compensation de charge induit une modification durable du profil ventilatoire sans modification perceptuelle.
L'hypothèse de la participation de l'AMS à la production et au traitement de la copie d'efférence dans le cadre de la ventilation est validée puisque l'altération de l'activité de l'AMS ne se traduit pas par un changement de la perception de l'effort respiratoire.

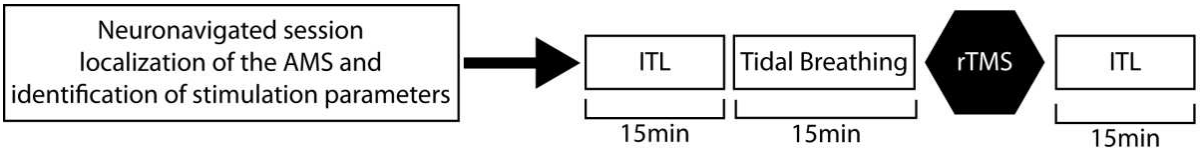


Figure n°24 **: Schéma expérimental de l'étude n°2**

Chaque session expérimentale a débuté par un repérage de l'aire motrice supplémentaire et par un calcul des paramètres de conditionnement. Les grandeurs du profil ventilatoire, la pression partielle en CO_2 du gaz expiré et la dyspnée ont été mesurées pendant 15 minutes de ventilation en charge (inspiratory threshold loading, ITL) puis pendant 15 minutes de ventilation de repos. Le conditionnement (rTMS à 5Hz, cTBS ou sham) en regard de l'AMS a été délivré selon un ordre randomisé. Une seconde période de 15 minutes de ventilation en charge a été enregistrée. Cette période a été divisée en trois périodes de 5 minutes et nommées Post 1 (1 à 5min), Post 2 (6 à 10min) et Post 3 (11à 15min).

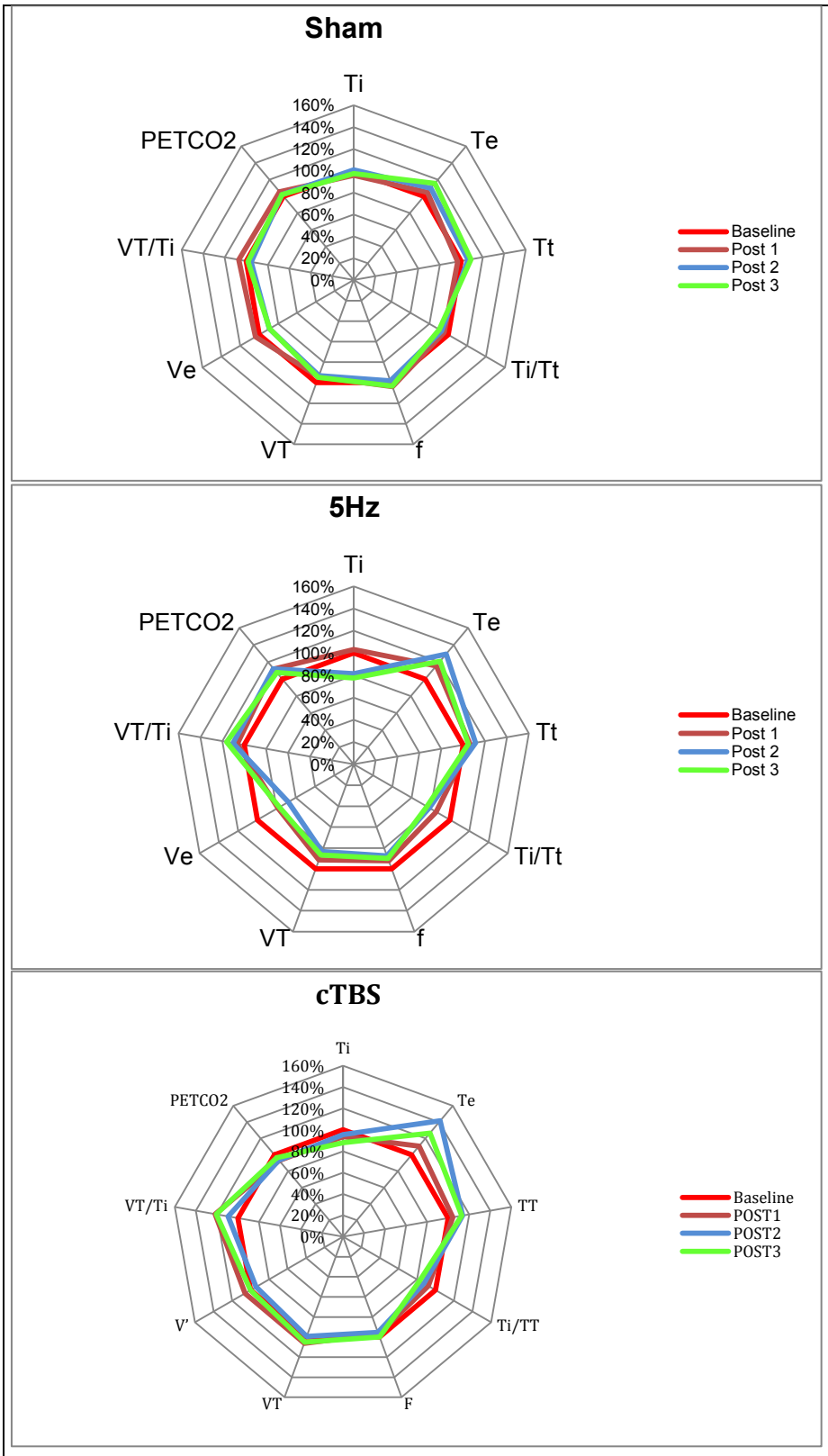


Figure n°25 : **effet d'un conditionnement sham, rTMS à 5Hz et cTBS en regard de l'AMS sur les grandeurs du profil ventilatoire et la pression partielle en CO2 télé-expiratoire pendant la ventilation en charge** avant conditionnement (Baseline, trait rouge), à Post 1 (trait bleu), à Post 2 (trait gris) et à Post 3 (trait vert)**.** Chaque valeur pour chaque grandeur est calculée en % de la ligne de base.

	5 Hz excitatory rTMS conditioning			
	BL	**P1**	**P2**	**P3**
TI	2.32 [2.17-2.60]	1.93 [1.75 - 4.24]	**1.89** **[1.60-1.92]** ↘	**1.73** **[1.61-1.97]** ↘
TE	4.76 (0.77)	5.50 (0.90)	6.16 (1.06)	5.76 (0.81)
TT	7.59 (0.86)	8.05 (0.79)	8.45 (0.87)	7.95 (0.65)
TI/TT	38.51 (4.88)	32.93 (7.37)	**30.22** **(6.90)** ↘	**29.29** **(6.07)** ↘
f	8.73 (1.03)	8.06 (0.99)	7.63 (1.10)	7.86 (0.88)
VT	1.61 [1.15-2.18]	1.70 [0.74-2.25]	**1.36** **0.79-2.01]** ↘	1.51 [0.89-2.17]
VT/TI	0.65 [0.37-0.89]	0.43 [0.31-1.63]	0.48 [0.29-1.75]	0.53 [0.30-1.87]
V'E	15.75 (3.14)	**12.37** **(2.71)** ↘	**10.68** **(2.11)** ↘	**12.15** **(2.97)** ↘
PETCO2	35.20 [30.94 - 37.50]	**38.34** **[36.06-42.37]** ↗	**38.41** **[36.84-41.42]** ↗	36.06 [33.39 - 41.37]
EVA	2.09 (0.52)	1.46 (0.32)	1.78 (0.32)	2.15 (0.50)

Tableau C : Effet d'un conditionnement cTBS sur le temps inspiratoire (TI), le temps expiratoire (TE), le temps total du cycle respiratoire (TT), le temps de consigne (Ti/TT), le volume courant (VT), la ventilation minute (V'E) et la pression partielle en C02 télé-expiratoire (PETCO2) et l'évaluation de la dyspnée (EVA) avant et aux trois temps après conditionnement (Post1, Post2 et Post3).

Les valeurs brutes sont présentées en moyenne (erreur moyenne) ou médiane et interquartile, selon la normalité de la distribution des données. L'indication $p<0.05$ indique une différence significative par rapport à la valeur obtenue avant conditionnement (test post-hoc : Dunnett ou Tukey selon la normalité de la distribution ; correction pour comparaison multiple : Benjamini-Hochberg) et la flèche signale la direction du changement.

	cTBS inhibitory rTMS conditioning			
	BL	**P1**	**P2**	**P3**
TI	2.22 (0.22)	2.08 (0.24)	2.12 (0.26)	1.95 (0.20)
TE	4.02 (0.48)	4.45 (0.65)	**5.69** **(0.53)** ↗	4.76 (0.77)
TT	6.79 [4.94-7.36]	5.83 [5.10-8.54]	6.47 [5?84-9.11]	6.29 [5.52-9.62]
TI/TT	37.45 (3.62)	34.54 (4.03)	**32.76** **(3.97)** ↘	**30.99** **(3.44)** ↘
f	10.33 (1.11)	10.03 (1.37)	9.84 (1.81)	10.31 (2.24)
VT	1.58 (0.34)	1.68 (0.33)	1.57 (0.29)	1.66 (0.30)
VT/TI	0.49 [0.28-0.92]	0.66 0.46-1.18]	0.58 [0.55-1.10]	0.71 [0.57-1.13]
V'E	14.43 (2.52)	15.30 (3.15)	13.57 (2.39)	14.44 (2.46)
PETCO2	34.37 [31.88-38.36]	35.82 [32.14-36.90]	34.02 [29.53-35.39]	34.05 [31.46-34.58]
EVA	1.82 [1.23-4.25]	2.09 [0.10-4.72]	1.71 [0.76-3.62]	2.08 [1.62-4.56]

Tableau D : **Effet d'un conditionnement rTMS à 5Hz sur le temps inspiratoire (TI), le temps expiratoire (TE), le temps total du cycle respiratoire (TT), le temps de consigne (Ti/TT), le volume courant (VT), la ventilation minute (V'E) et la pression partielle en C02 télé-expiratoire (PETCO2) et l'évaluation de la dyspnée (EVA) avant et aux trois temps après conditionnement (Post1, Post2 et Post3).**

Les valeurs brutes sont présentées en moyenne (erreur moyenne) ou médiane et interquartile, selon la normalité de la distribution des données. L'indication $p<0.05$ indique une différence significative par rapport à la valeur obtenue avant conditionnement (test post-hoc : Dunnett ou Tukey selon la normalité de la distribution ; correction pour comparaison multiple : Benjamini-Hochberg) et la flèche signale la direction du changement.

Repetitive transcranial magnetic stimulation over the supplementary motor area interferes with inspiratory loading compensation in normal humans

Marie-Cécile NIERAT (1,2), Anna L. HUDSON (1,2,3), Joël CHASKALOVIC (4,5)
Thomas SIMILOWSKI* (1,2,6), Louis LAVIOLETTE* (1,2,7)
* equal contributions

1-Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1158 "*Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique*", F-75005, Paris, France

2-INSERM, UMR_S 1158 "*Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique*", F-75005, Paris, France

3-Neuroscience Research Australia and University of New South Wales, Sydney, Australia

4-Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut Jean Le Rond D'Alembert, Paris, France

5-Ariel University Center, 40700 Ariel, Israel

6-AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Service de Pneumologie et Réanimation Médicale (*Département "R3S"*), F-75013, Paris, France

7-Centre de recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (CRIUCPQ), Québec, Canada

Running head

rTMS and inspiratory threshold loading

Funding

This study was funded by a "*Contrat de recherche Legs Poix de la Chancellerie de l'Université de Paris*", by the Association pour le Développement et l'Organisation de la Recherche en Pneumologie et sur le Sommeil (ADOREPS), Paris, France and by the program "Investissement d'Avenir ANR-10-AIHU 06" of the French Government.

Anna Hudson was supported by a National Health and Medical Research Council (NHMRC; Australia) early career fellowship.

Louis Laviolette was supported by the Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Quebec (IUCPQ) foundation, Quebec, Canada; a long-term research fellowship from the European Respiratory Society; and a post-doctoral research fellowship from the Fond de la Recherche en Santé du Quebec.

Correspondence

Pr Thomas SIMILOWSKI

Service de Pneumologie et de Réanimation Médicale

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Site Salpêtrière

47-83 Bd de l'Hôpital 75651 Paris Cedex 13 France

Telephone: 33 1 42 16 77 97

Fac-simile: 33 1 70 24 72 82

E-mail: thomas.similowski@psl.aphp.fr

Abstract

Background. In awake humans, breathing depends on homeostatic automatic neural activities arising in brainstem pattern generators. In addition, it is heavily influenced by cortical networks. The supplementary motor area (SMA) has respiratory connections and exert a tonic facilitatory influence on breathing. It is also engaged in response to inspiratory mechanical constraints, as part of the inspiratory load compensation phenonmenon that is often associated with respiratory discomfort. We hypothesized that manipulating the SMA excitability with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) would modify the breathing pattern response to inspiratory threshold loading (ITL) and possibly respiratory discomfort.

Material and methods. Seven healty subjects (3 men, age 25±4) naive to physiology experiments were studied. Their breathing pattern and respiratory discomfort was described during ITL and unloaded breathing before and after conditioning the SMA with rTMS, using an excitatory paradigm (5Hz stimulation), an inhibitory paradigm (continuous theta-burst stimulation —cTBS—), or sham stimulation.

Results. rTMS conditioning of the SMA was well tolerated. No significant change in breathing pattern during ITL was observed after sham conditioning. Excitatory conditioning (5Hz stimulation) resulted in shortened inspiratory time ($p = 0.01$), decreased tidal volume ($p = 0.016$), and decreased ventilation ($p = 0.003$) corroborated by increased end-tidal expired carbon dioxide ($p = 0.013$). Inhibitory conditioning (continous theta-burst stimulation) did not affect ventilation, but lengthened expiratory time. Respiratory discomfort was mild under baseline conditions, and unchanged after SMA conditioning.

Conclusions. rTMS conditioning of the SMA can alter breathing pattern during ITL, ascertaining the role of this cortical area in breathing control. A 5 Hz SMA conditioning protocol, known to enhance corticophrenic excitability, reduces the amount of hyperventilation induced by inspiratory threshold loading. Further studied are needed to determine whether, and in what condition, rTMS can also have an effect on dyspnea.

Keywords

control of breathing; inspiratory loading; cerebral cortex; repetitive transcranial magnetic stimulation; dyspnea

Introduction

In awake humans at rest, lung ventilation depends on the homeostatically regulated cyclical activity of brainstem pattern generators. Ventilation decreases during sleep, attesting to the existence of a "*wakefulness drive to breathe*". This phenomenon is called upon, for example, to explain why hypocapnia is not associated to apnea during wakefulness while it is during sleep [Fink 1961; Datta 1991; Corfield 1995]. The neurophysiological determinants of the wakefulness drive to breathe in humans have not been fully elucidated, but they include a cortical component [Fink 1961; Shea 1996; Mehiri 2006]}. We have recently shown that applying an inhibitory stimulation paradigm to the supplementary motor area (SMA) using repetitive magnetic stimulation (rTMS) in normal humans depressed the excitability of the corticospinal pathway to the diaphragm studied with single pulse transcranial magnetic stimulation (spTMS) over the diaphragm representation in the primary motor cortex (M1) [Laviolette 2013]. We interpreted this finding as supporting the existence of tonic excitatory respiratory inputs originating in the SMA through SMA-M1 connections, and therefore as substantiating a cortical contribution to the wakefulness drive to breathe. This contention was subsequently corroborated by the observation that patients suffering from congenital central alveolar hypoventilation — Ondine's curse syndrome— (in whom central respiratory pattern generators are deficient) exhibited a respiratory-related cortical activity during resting breathing that was not observed in control individuals [Tremoureux 2014]. From these data, we hypothesized a contribution of the SMA to breathing during wakefulness because electroencephalographic recordings evidenced premotor potentials preceding inspiration (pre-inspiratory potentials), the production of which involves the SMA and other premotor cortical regions [Ball 1999].

Human functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies [Raux 2013] and electroencephalographic (EEG) studies have shown that the SMA and more generally the cortical areas contributing to premotor potentials [Raux 2007; Raux 2007] belong to cortical networks engaged during inspiratory load compensation, broadly defined as the physiological phenomena that occur when inspiration is impeded by a mechanical constraint (e.g. threshold loading or resistive loading). In awake humans, inspiratory loads are compensated or overcompensated [Freedman 1965; Yanos 1990]. Load compensation is generally accompanied by breathing discomfort [Raux 2007; Raux 2013].

In light of the above, we hypothesized that manipulating the SMA excitability with rTMS would modify the breathing pattern response to inspiratory threshold loading, and possibly the corresponding respiratory sensations. Because the effects of rTMS on motor behaviours are complex and influenced by many factors, we investigated both the effects of

an excitatory protocol (5 Hz stimulation) and of an inhibitory protocol (continuous theta burst stimulation) on breathing pattern and respiratory discomfort during inspiratory threshold loading. A sham stimulation sequence was used as control.

Material and Methods

Subjects

After approval by the appropriate French ethics and regulatory authorities (*Comité de Protection des Personnes Ile-de*-France VI Pitié-Salpêtrière, Paris, France), 7 healthy subjects (3 men; age: 25 ± 4 years; height: 174.7 ± 11.7 cm; weight: 73.7 ±15.0 kg) participated in the study. They had no history of respiratory or neuromuscular disease. They had no previous experience whatsoever with physiology experiments. They were all right-handed. They received detailed information and gave written informed consent.

Experimental design

Figure 1 summarizes the experimental design of the study. Each subject participated in three sessions (excitatory rTMS, see below; inhibitory rTMS, see below; sham stimulation), with at least 3 days between two consecutive sessions. A simple-blind design was used and the order of the stimulation was randomized in each subject. Each session consisted in 1) a fifteen-minute epoch of inspiratory threshold loading (ITL; a 7-41 cm H2O spring threshold inspiratory muscle trainer —Health Scan, NJ, USA— was attached to the inspiratory arm of the breathing circuit ; it was set to 25% of maximal inspiratory pressure and thus ranged between 20 and 35 cmH2O); for the purpose of data analysis this baseline 15' bout was segmented in three 5' epochs (BL1, BL2, and BL3); 2) fifteen minutes of unloaded free breathing to let the subject recover; 3) rTMS conditioning of the supplementary motor area (SMA), excitatory, inhibitory or sham; 4) a second fifteen-minute bout of ITL (segmented in three 5' epochs (POST1, POST2, POST3). During the entire experiments, the subjects sat in a comfortable chair with the head supported, and were kept distracted from experimental cues by watching a movie projected on a television screen in front of them.

Respiratory measurements

The subjects breathed through a mouthpiece connected in series with a heated pneumotachograph (3700 series, linearity range 0–160 $L*min^{-1}$; Hans Rudolph, Kansas City, MO) and a two-way valve (Hans Rudolph 2600 medium, Kansas City, MO). The experimental apparatus had a resistance <1 $cmH_2O*L^{-1}*s^{-1}$ and its dead space was ~ 40 mL. Ventilatory airflow (V') was measured by connecting the pneumotachograph to a linear differential pressure transducer (± 5 cmH_2O, DP45-18, Validyne, Northridge, CA). Tidal volume (V_T) was obtained by electrical integration of flow. Inspiratory time (T_I), expiratory time (T_E), and total time (T_T), breathing frequency (f), mean inspiratory flow (V_T/T_I) and duty cycle (T_I/T_T) were obtained by offline signal analysis (Chart^{tm} software, AD Instruments,

Castle Hill, Australia).

Inspiratory airway opening pressure was measured by a differential pressure transducer (±100 cmH_2O, DP15-34, Validyne, Northridge, CA) connected to a lateral port of the mouthpiece; peak negative values for each respiratory cycle were used in the analysis. End-tidal carbon dioxide tension ($P_{ET}CO_2$) was measured at a lateral port of mouthpiece with an infrared CO_2 analyzer (Servomex 1505, Plaine Seine Saint-Denis, France). All respiratory signals were recorded through a analog-digital converter (Maclab 16S, Powerlab System, AD Instruments, Castle Hill, Australia ; sampling rate 2000 Hz) and Chart^{tm} software (Chart 5.0, AD Instruments, Castle Hill, Australia). The degree of "respiratory discomfort" was self-assessed by the subjects on a visual analog scale (VAS). The subjects were asked to set the cursor on a 10 cm horizontal line, between the descriptions ""no respiratory discomfort"" on the left and ""intolerable respiratory discomfort"" on the right.

Electromyographic recordings

Electromyographic recordings (EMG) were obtained using pairs of surface electrodes (self-adhesive hydrogel, diameter 20 mm, Comepa, St-Denis, France) placed on cleaned and abraded skin. A reference electrode was placed on one acromion. Surface EMG of the right first dorsal interosseous (FDI) and right abductor hallucis (AH) were recorded with a tendon-belly arrangements. The FDI recording was used to determine the intensity of rTMS during conditioning, and with a safety purpose: an increase in FDI activity during rTMS suggests spreading of the stimulus to M1, with a potential risk of seizure [Rossi 2009; Lefaucheur 2011]. The AH recording was used to locate the SMA [Matsunaga 2005]. EMG signals were amplified (x 1000) and filtered (band-pass 10 Hz – 1 kHz) using a 1902 signal conditioner (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK), digitized at 10 kHz using a CED Power 1401 MkII data acquisition interface (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK) and stored on a personal computer for offline analysis using Signal software (Signal 5.00, Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, UK).

Repeated transcranial magnetic stimulation (rTMS)

The procedures used to determine the position of the SMA and to condition it were generally similar to those described in a previous publication of our group [Laviolette 2013]. A neuronavigation system (eXimia 2.2.0, Nextim Ltd., Helsinki, Finland) was used to localize hotspots (see below) and the SMA, according to individual anatomical magnetic resonance imaging (MRI) scans of the subjects' brains.

MOTOR HOT SPOTS. The motor hot spot (M1 cortical area) was determined for the relaxed FDI and AH (i.e. no pre-stimulus EMG activity observed online) as the single-pulse TMS (spTMS) coil position that elicited the largest MEP from the target muscle. The FDI hot spot was located and stimulated using a figure-of-eight coil connected to a Magstim Bistim^2

super-rapid stimulator (Magstim, Whitland, UK). The coil was placed tangentially over the scalp with the handle pointing backwards with a 45° angle to the mid-sagittal plane [Brasil-Neto 1992].The AH was stimulated using the same coil connected to a Magstim 200 stimulator (Magstim, Whitland, UK). The coil was placed along the sagittal midline with the handle pointing to the right.

MOTOR THRESHOLDS. The active motor threshold (AMT), determined for the FDI and the AH during muscle contraction (20% of maximum voluntary activity, monitored with EMG), corresponded to the stimulation intensity (% of maximum stimulator output) that elicited an MEP ≥ 200 µV for 5 out of 10 successive stimuli. Motor thresholds were determined at each visit.

SMA LOCALIZATION AND CONDITIONING. The SMA was identified as being 1 cm anterior to the most anterior point from which an AH MEP could be elicited under active contraction conditions (20% of maximum voluntary activity), with a stimulation intensity of 120% of the AH AMT [Matsunaga 2005]. This was determined by moving the stimulation coil anteriorly from the AH hotspot over the midsagittal line. Anatomical MRI for each subject was analyzed retrospectively to validate the positioning of stimulation coil over the SMA [Picard 2001].

The SMA was conditioned with a biphasic waveform stimulator (Magstim Bistim^2 super-rapid stimulator, Magstim, Whitland, UK) connected to a figure-of-eight coil (loop diameter: 70 mm). Three protocols were used, as follows :

1) inhibitory theta-burst stimulation, cTBS. Three 50 Hz pulses repeated every 200 ms (i.e. at 5 Hz) continuously for 40 s (for a total of 600 pulses) were delivered at 80% of the AMT of the FDI over the SMA [Di Lazzaro 2005; Huang 2005; Laviolette 2013].

2) facilitatory 5Hz stimulation. Ten second 5-Hz trains, separated by 50 s inter-train intervals, repeated 10 times (for a total of 500 pulses) were delivered over the SMA at 110% of the AMT of the FDI. This facilitatory protocol was selected as it has been previously shown to increase the response of the diaphragm to corticospinal inputs after SMA conditioning [Raux 2010; Laviolette 2013].

3) sham stimulation. The figure of eight coil was positioned on the scalp in the same way as during the active stimulations, but it was not connected to the stimulator. A 2nd coil connected to the stimulator but kept at least 5cm above the scalp was used to reproduce the stimulation related noises.

Statistical analysis and data management

For each data set, the normality of the distribution (Shapiro-Wilk test) and the equality of variance (Levene's test) were checked. Normal data were described as mean values ± SEM, non-normal ones as median and interquartile range. Subsequent statistical analyses were performed using one-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) for normal

data, or Friedman non-parametric ANOVA for non-normal ones. Post-hoc pairwise comparisons were conducted conditional on a significant F value (ANOVA) or on a significant χ^2 value (Frieman). The last 10 minutes of BL (namely after discovery of the load and habituation to it) were used as reference for comparison with POST1, POST2, POST3. In this analysis, POST1, POST2 and POST3 were compared to BL when appropriate, but not to each other. Statistical significance was assumed if $P < 0.05$, with Hochberg-Benjamini correction for multiplicity [Hochberg 1990]. All calculations were performed using Sigmaplot (Systat Software, San Jose, CA), except for the multiplicity correction that was performed with a custom Microsof Excel® spreadsheet.

Results

Tolerance and safety

None of the subjects reported discomfort or abnormal sensations during or after the rTMS conditioning of the SMA. In no occasion was the monitoring of the FDI electromyogram during the rTMS sessions suggestive of stimulus spreading to the primary motor cortex.

Motor Thresholds

No change in the AMT of the FDI and AH were observed between visits.

Breathing pattern

Median resting ventilation, measured during the five last minutes of the unloaded breathing period (Figure 1), was 6.95 [6.42-10.64] $L.min^{-1}$, with a $P_{ET}CO_2$ of 38.03 ± 1.63 mmHg. Expectedly, ITL was associated with increased ventilation (Table 1 and Table 2) [Yanos 1990].

No significant change in breathing pattern during ITL was observed after sham conditioning of the SMA (Figure 2A). In contrast, both the excitatory (5Hz) and the inhibitory (cTBS) SMA conditioning paradigms resulted in significant breathing pattern alterations (Figure 2B, Figure 2C).

In response to the 5 Hz excitatory rTMS conditioning of the SMA, the inspiratory time T_I and the duty cycle T_I/T_T were significantly decreased as compared to BL (χ^2 =15.857, p=0.01 for T_I ; F = 4.177, P = 0.021 for T_I/T_T). These differences were present at POST2 and POST3 (Table 1). A reduction in breathing frequency was observed, but did not reach statistical significance (F = 2.975, p = 0.059). Tidal volume was significantly smaller after 5Hz conditioning (χ^2 = 10.371, p = 0.016), the difference being significant at POST2 only. Overall, these changes translated into a significantly decreased ventilation (F = 6.82, p = 0.003) at POST1, POST2 and POST3 (Table 1) that was corroborated by a significant rise in $P_{ET}CO_2$ (χ^2 = 10.714, p = 0.013) at POST1 and POST2 (Table 1).

In response to the cTBS inhibitory rTMS conditioning of the SMA, inspiratory time,

tidal volume, breathing frequency, ventilation and $P_{ET}CO_2$ were unaffected (Table 2). Expiratory time Te was significantly lengthened (χ^2= 3.718, p = 0.031); difference present at POST2), hence a decrease in T_I/T_T (F = 4.808, p= 0.012) at POST2 and POST3.

Breathing discomfort

During BL, the intensity of breathing discomfort as evaluated by the VAS was 2.09 ± 0.52 (from 0 to 4.37). There was no change whatsoever after SMA conditioning (5Hz rTMS: F = 1,160 p=0.352; cTBS: χ^2 = 3.6, p = 0.306; sham: F = 1,606 p=0,223)(Table 3).

Discussion

This study shows that manipulating the SMA excitability with repetitive transcranial magnetic stimulation in healthy subjects can alter breathing pattern during inspiratory threshold loading. This is in line with previous results by Raux et al. [Raux 2010] and by Laviolette et al. [Laviolette 2013] showing that rTMS over the SMA can change the excitability of the corticophrenic pathway. While we observed some changes in breathing pattern with both the rTMS paradigms that we used, the most salient of our findings is the sustained decreased in ventilation that was evidenced after the 5 Hz rTMS protocol.

The study was intended as proof of concept and involved a small number of subjects: it therefore lacks power. However, we used a sham-controlled design, and we did observe significant differences in breathing pattern that resisted a validated correction for multiplicity [Hochberg 1990]. In addition, although we tried to control for factors liable to influence cortical excitability and plasticity (e.g. we asked the subjects not to be sleep deprived on the day of the experiments [Civardi 2001] and we had them watch a movie during the experiments to prevent them focusing their attention on their breathing, because attention can alter certain types of neural plasticity [Conte 2008]), we did not control for all such factors (e.g. cortisol level [Sale 2008], ovarian hormonal levels [Inghilleri 2004], or BDNF polymorphism [Cheeran 2008]). Some degree of interindividual variability in cortical excitability and the cortical response to plasticity inducing maneuvers must have been present: this reinforces the interest of finding significant differences in a small study population. Finallly on this, the sustained reduction in ventilation that was present after 5 Hz rTMS (at POST1, POST2 and POST3) was accompanied by a significant rise in $P_{ET}CO_2$. These concomitant changes are physiologically expected and therefore corroborate one another, all the more so that the V'_E and the $P_{ET}CO_2$ measurements were technically independent. We are thus confident that the changes in breathing pattern that we measured up to 15 minutes after rTMS conditioning can actually be interpreted in terms rTMS induced plasticity.

The effects of cTBS that we observed went in the expected —inhibitory— direction, but were minimal. This contrasts with the ~30% reduction in the amplitude of diaphragmatic motor evoked potentials that was described by Laviolette et al. with a similar conditioning protocol [Laviolette 2013]. Yet theta-burst stimulation pattern have complex effects, notably when they are applied to the study of cortically controlled movements [Huang 2005]. cTBS induced plasticity is sensitive to the history of muscle activation immediately after conditioning [Huang 2008; Iezzi 2008]. For instance, phasic voluntary movements of the target muscle can fully reverse the effects of cTBS [Iezzi 2008], in the frame of a phenomenon referred to as metaplasticity. In our study, strong phasic breathing movements

were by definition present during ITL after conditioning. Although these movements were not voluntary as in finger movements studies, they are known to be in part cortically driven [Raux 2007; Raux 2013], making the occurrence of metaplasticity possible. This was not the case in the study by Laviolette et al. [Laviolette 2013], where post-conditioning diaphragm motor evoked potentials were obtained during unloaded spontaneous breathing (not cortically driven).

The effects of 5 Hz conditioning were strongly inhibitory in terms of ventilation (Table 1). This comes in marked contrast with the excitatory nature of this protocol regarding electrophysiological outcomes measured in hand muscles [Matsunaga 2005] or in the diaphragm [Raux 2010; Laviolette 2013]. Of note, we did not measure corticophrenic excitability concomitantly with breathing pattern in this study and we can therefore not rule out the hypothesis that our 5 Hz conditioning did not reproduce our previous observations. We however do not consider this likely. Indeed, divergence between the electrophysiological and motor effects of rTMS conditioning has been reported before [review in Chouinard 2010]. For example, Gerloff et al. [Gerloff 1997] reported that 5 Hz conditioning over the SMA induced inaccurracies in sequences of finger movements. One interpretation of such divergence lies in the fact that rTMS not only modifies the excitability of the cortical area stimulated (which would account, in the case of 5 Hz stimulation, for increased diaphragmatic motor evoked potentials [Raux 2010; Laviolette 2013]) but also interferes with the cortico-cortical connections involving this area ("network effect") [Civardi 2001; Matsunaga 2005; Hamada 2009; Lu 2012], at times quite distantly form the stimulation site [Bestmann 2004]. Of notice, rTMS conditioning of the dorsal premotor cortex have been shown to have dissociated effects on a given finger movement depending on its initiation (externally cued vs. self-initiated) [Lu 2012]. Inspiratory load compensation engages not only the SMA, but a complex cortico-subcortical network comprising several areas [Raux 2013] that, in addition, drives an intricate ensemble of inspiratory muscles rather than the sole diaphragm. It can be hypothesized that 5 Hz rTMS over the SMA modified synaptic connectivity within this network and resulted in an altered response to loading that in turn led to decreased ventilation. Alternatively, the conjunction of ITL-induced SMA activity and of an excitatory conditioning protocol could have triggered mechanisms of homeostatic modulation of plasticity resulting in disfacilitation of long term plasticity and/or facilitation of long term depression [seeAbraham 2008].

The SMA has multiple roles in movement planning, the execution of complex movements, movement reprogrammation and movement inhibition [review in Nachev 2008]. It contributes to the prediction of sensory consequences of movement before movement onset [Makoshi 2011] and is the source of efferent signals used by other brain areas to

modulate somatosensory activity during motor actions [Haggard 2004] and therefore to fine tune these actions through response evaluation [Stock 2013]. Motor control models posit that this efference copy contains an anticipation of the sensory consequences of movement that is compared in a feed forward manner to the actual afferences produced by the movement [Wolpert 2001; Shadmehr 2010]. This comparison leads to dynamical adaptation in the event of a discrepancy. This process can be disrupted by conditioning the SMA prior to the execution of a movement [Haggard 2004; Makoshi 2011; White 2013]. Within this frame, one hypothesis to explain our present results — inhibitory effects of 5 Hz SMA conditionning in terms of breathing pattern— in the perspective of our previous observations —excitatory effects of 5 Hz SMA conditioning in terms of corticophrenic excitability— [Raux 2010; Laviolette 2013] would be a differential effect of SMA conditioning on the neuronal populations directly involved in movement production and those involved in the production of the efference copy.

Of note, current theories on the pathogenesis of dyspnea derive from movement control theories and postulate that dyspnea arises from a discordance between the efference copy of ventilatory drive and the actual afferent traffic from the respiratory system [Parshall 2012]. The ITL-induced SMA activity [Raux 2007; Raux 2013] is associated with dyspneic sensations [Raux 2007; Raux 2013]. This makes the SMA a likely contributor to the type of dyspnea that is induced by ITL. This is all the more so that the SMA receives afferent messages generated by inspiratory efforts [Logie 1998] and could therefore be an actual efference-afference "comparison" site. Within this frame, the reduction in ITL-induced hyperventilation (Table 1) that was observed after 5 Hz SMA conditioning in our study would be expected to decrease ITL-induced breathing discomfort. This was not the case, as we did not observe a significant reduction of respiratory discomfort (Table 1). This discrepancy —or disappointment— might be due to the fact that the level of loading imposed on our subjects only induced mild respiratory discomfort, leaving little place for improvement. The natural dispersion of the measurements provided by a psychophysiological dyspnea evaluation tool like the VAS in a small population may also have obscured a putative effect. Indeed, respiratory discomfort ratings at POST1 were numerically lower than during BL (Table 3), while this was absolutly not the case with the cTBS protocol that had no effect on ventilation (Table 2) or after sham stimulation. Observing an effect of rTMS on respiratory sensations might require experimental designs inducing more intense respiratory sensations. Of notice for future research, opioids depress the cortical networks involved in volitional breathing [Pattinson 2009]. This could mediate, at least in part, their beneficial effects on dyspnea. If rTMS alone proves insufficient to alleviate dyspnea, it would be interesting to study whether, and to what extent, it can be used to this aim in conjunction with opioids (noting that rTMS-

induced analgesia involves endogenous opioids [Taylor 2012]) A mere opioid sparing effect of ventilatory plasticity inducing approaches would be a relevant progress in the field.

References

Abraham, W. C. (2008). "Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity." Nature reviews. Neuroscience 9(5): 387.

Ball, T., A. Schreiber, et al. (1999). "The role of higher-order motor areas in voluntary movement as revealed by high-resolution EEG and fMRI." NeuroImage 10(6): 682-694.

Bestmann, S., J. Baudewig, et al. (2004). "Functional MRI of the immediate impact of transcranial magnetic stimulation on cortical and subcortical motor circuits." The European journal of neuroscience 19(7): 1950-1962.

Brasil-Neto, J. P., L. G. Cohen, et al. (1992). "Optimal focal transcranial magnetic activation of the human motor cortex: effects of coil orientation, shape of the induced current pulse, and stimulus intensity." Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society 9(1): 132-136.

Cheeran, B., P. Talelli, et al. (2008). "A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS." The Journal of physiology 586(Pt 23): 5717-5725.

Chouinard, P. A. and T. Paus (2010). "What have We Learned from "Perturbing" the Human Cortical Motor System with Transcranial Magnetic Stimulation?" Frontiers in human neuroscience 4: 173.

Civardi, C., C. Boccagni, et al. (2001). "Cortical excitability and sleep deprivation: a transcranial magnetic stimulation study." Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 71(6): 809-812.

Civardi, C., R. Cantello, et al. (2001). "Transcranial magnetic stimulation can be used to test connections to primary motor areas from frontal and medial cortex in humans." NeuroImage 14(6): 1444-1453.

Conte, A., D. Belvisi, et al. (2008). "Effects of attention on inhibitory and facilitatory phenomena elicited by paired-pulse transcranial magnetic stimulation in healthy subjects." Experimental brain research 186(3): 393-399.

Corfield, D. R., M. J. Morrell, et al. (1995). "The nature of breathing during hypocapnia in awake man." Respiration physiology 101(2): 145-159.

Datta, A. K., S. A. Shea, et al. (1991). "The influence of induced hypocapnia and sleep on the endogenous respiratory rhythm in humans." The Journal of physiology 440: 17-33.

Di Lazzaro, V., F. Pilato, et al. (2005). "Theta-burst repetitive transcranial magnetic stimulation suppresses specific excitatory circuits in the human motor cortex." The Journal of physiology 565(Pt 3): 945-950.

Fink, B. R. (1961). "Influence of cerebral activity in wakefulness on regulation of breathing." Journal of applied physiology 16: 15-20.

Fink, B. R. (1961). "The stimulant effect of wakefulness on respiration: clinical aspects." British journal of anaesthesia 33: 97-101.

Freedman, S. and S. A. Weinstein (1965). "Effects of external elastic and threshold loading on breathing in man." Journal of applied physiology 20(3): 469-472.

Gerloff, C., B. Corwell, et al. (1997). "Stimulation over the human supplementary motor area interferes with the organization of future elements in complex motor sequences." Brain : a journal of neurology 120 (Pt 9): 1587-1602.

Haggard, P. and B. Whitford (2004). "Supplementary motor area provides an efferent signal for sensory suppression." Brain research. Cognitive brain research 19(1): 52-58.

Hamada, M., R. Hanajima, et al. (2009). "Primary motor cortical metaplasticity induced by priming over the supplementary motor area." The Journal of physiology 587(Pt 20): 4845-4862.

Hochberg, Y. and Y. Benjamini (1990). "More powerful procedures for multiple significance testing." Statistics in medicine 9(7): 811-818.

Huang, Y. Z., M. J. Edwards, et al. (2005). "Theta burst stimulation of the human motor cortex." Neuron 45(2): 201-206.

Huang, Y. Z., J. C. Rothwell, et al. (2008). "Effect of physiological activity on an NMDA-dependent form of cortical plasticity in human." Cerebral cortex 18(3): 563-570.

Iezzi, E., A. Conte, et al. (2008). "Phasic voluntary movements reverse the aftereffects of subsequent theta-burst stimulation in humans." Journal of neurophysiology 100(4): 2070-2076.

Inghilleri, M., A. Conte, et al. (2004). "Ovarian hormones and cortical excitability. An rTMS study in humans." Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology 115(5): 1063-1068.

Laviolette, L., M. C. Nierat, et al. (2013). "The supplementary motor area exerts a tonic excitatory influence on corticospinal projections to phrenic motoneurons in awake humans." PloS one 8(4): e62258.

Lefaucheur, J. P., N. Andre-Obadia, et al. (2011). "[French guidelines on the use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): safety and therapeutic indications]." Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology 41(5-6): 221-295.

Logie, S. T., I. M. Colrain, et al. (1998). "Source dipole analysis of the early components of the RREP." Brain topography 11(2): 153-164.

Lu, M. K., N. Arai, et al. (2012). "Movement related cortical potentials of cued versus self-initiated movements: double dissociated modulation by dorsal premotor cortex versus supplementary motor area rTMS." Human brain mapping 33(4): 824-839.

Makoshi, Z., G. Kroliczak, et al. (2011). "Human supplementary motor area contribution to predictive motor planning." Journal of motor behavior 43(4): 303-309.

Matsunaga, K., A. Maruyama, et al. (2005). "Increased corticospinal excitability after 5 Hz rTMS over the human supplementary motor area." The Journal of physiology 562(Pt 1): 295-306.

Mehiri, S., C. Straus, et al. (2006). "Responses of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation during wake and sleep in humans." Respiratory physiology & neurobiology 154(3): 406-418.

Nachev, P., C. Kennard, et al. (2008). "Functional role of the supplementary and pre-supplementary motor areas." Nature reviews. Neuroscience 9(11): 856-869.

Parshall, M. B., R. M. Schwartzstein, et al. (2012). "An official American Thoracic Society statement: update on the mechanisms, assessment, and management of dyspnea." American journal of respiratory and critical care medicine 185(4): 435-452.

Pattinson, K. T., R. J. Governo, et al. (2009). "Opioids depress cortical centers responsible for the volitional control of respiration." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29(25): 8177-8186.

Picard, N. and P. L. Strick (2001). "Imaging the premotor areas." Current opinion in neurobiology 11(6): 663-672.

Raux, M., P. Ray, et al. (2007). "Cerebral cortex activation during experimentally induced ventilator fighting in normal humans receiving noninvasive mechanical ventilation." Anesthesiology 107(5): 746-755.

Raux, M., C. Straus, et al. (2007). "Electroencephalographic evidence for pre-motor cortex activation during inspiratory loading in humans." The Journal of physiology 578(Pt 2): 569-578.

Raux, M., L. Tyvaert, et al. (2013). "Functional magnetic resonance imaging suggests automatization of the cortical response to inspiratory threshold loading in humans." Respiratory physiology & neurobiology 189(3): 571-580.

Raux, M., H. Xie, et al. (2010). "Facilitatory conditioning of the supplementary motor area in humans enhances the corticophrenic responsiveness to transcranial magnetic stimulation." Journal of applied physiology 108(1): 39-46.

Rossi, S., M. Hallett, et al. (2009). "Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research." Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology 120(12): 2008-2039.

Sale, M. V., M. C. Ridding, et al. (2008). "Cortisol inhibits neuroplasticity induction in human motor cortex." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28(33): 8285-8293.

Shadmehr, R., M. A. Smith, et al. (2010). "Error correction, sensory prediction, and adaptation in motor control." Annual review of neuroscience 33: 89-108.

Shea, S. A. (1996). "Behavioural and arousal-related influences on breathing in humans." Experimental physiology 81(1): 1-26.

Stock, A. K., E. Wascher, et al. (2013). "Differential effects of motor efference copies and proprioceptive information on response evaluation processes." PloS one 8(4): e62335.

Taylor, J. J., J. J. Borckardt, et al. (2012). "Endogenous opioids mediate left dorsolateral prefrontal cortex rTMS-induced analgesia." Pain 153(6): 1219-1225.

Tremoureux, L., M. Raux, et al. (2014). "Does the supplementary motor area keep patients with Ondine's curse syndrome breathing while awake?" PloS one 9(1): e84534.

White, O., M. Davare, et al. (2013). "The role of left supplementary motor area in grip force scaling." PloS one 8(12): e83812.

Wolpert, D. M. and J. R. Flanagan (2001). "Motor prediction." Current biology : CB 11(18): R729-732.

Yanos, J., A. Banner, et al. (1990). "Ventilatory responses to inspiratory threshold loading in humans." Journal of applied physiology 68(6): 2511-2520.

Table 1. Effects of 5Hz excitatory rTMS conditioning of the supplementary motor area (SMA) on breathing pattern and respiratory discomfort.

	5 Hz excitatory rTMS conditioning			
	BL	**P1**	**P2**	**P3**
T_I	2.32 [2.17-2.60]	1.93 [1.75 - 4.24]	**1.89** **[1.60-1.92]** ↘	**1.73** **[1.61-1.97]** ↘
T_E	4.76 (0.77)	5.50 (0.90)	6.16 (1.06)	5.76 (0.81)
T_T	7.59 (0.86)	8.05 (0.79)	8.45 (0.87)	7.95 (0.65)
T_I/T_T	38.51 (4.88)	32.93 (7.37)	**30.22** **(6.90)** ↘	**29.29** **(6.07)** ↘
f	8.73 (1.03)	8.06 (0.99)	7.63 (1.10)	7.86 (0.88)
V_T	1.61 [1.15-2.18]	1.70 [0.74-2.25]	**1.36** **[0.79-2.01]** ↘	1.51 [0.89-2.17]
V_T/T_I	0.49 [0.28-0.92]	0.66 0.46-1.18]	0.58 [0.55-1.10]	0.71 [0.57-1.13]
V'_E	15.75 (3.14)	**12.37** **(2.71)** ↘	**10.68** **(2.11)** ↘	**12.15** **(2.97)** ↘
$P_{ET}CO_2$	35.20 [30.94 - 37.50]	38.34 [36.06-42.37] ↗	**38.41** **[36.84-41.42]** ↗	36.06 [33.39 - 41.37]

BL, baseline ; POST1, mean (SEM) or median [interquartile] over the first 5 minutes post-conditioning; POST2, over the second 5 minutes epoch; POST3, over the third 5 minutes epoch. T_I, inspiratory time (s); T_E, expiratory time (s); T_T, total cycle time (s); T_I/T_T, duty cycle (%); V_T, tidal volume (L); V_T/T_I, mean inspiratory flow ($L.min^{-1}$); V'_E, ventilation ($L.min^{-1}$); $P_{ET}CO_2$, end-tidal expired carbon dioxide (mmHg); VAS, visual analog scale of respiratory discomfort (cm). The arrows indicate significant differences against BL (values in bold)($p < 0.05$).

Table 2. Effects of cTBS inhibitory rTMS conditioning of the supplementary motor area (SMA) on breathing pattern and respiratory discomfort.

	cTBS inhibitory rTMS conditioning			
	BL	**P1**	**P2**	**P3**
T_I	2.22 (0.22)	2.08 (0.24)	2.12 (0.26)	1.95 (0.20)
T_E	4.02 (0.48)	4.45 (0.65)	**5.69 (0.53)** ↗	4.76 (0.77)
T_T	6.79 [4.94-7.36]	5.83 [5.10-8.54]	6.47 [5?84-9.11]	6.29 [5.52-9.62]
T_I/T_T	37.45 (3.62)	34.54 (4.03)	**32.76 (3.97)** ↘	**30.99 (3.44)** ↘
f	10.33 ± 1.11	10.03 ± 1.37	9.84 ± 1.81	10.31 ± 2.24
V_T	1.58 (0.34)	1.68 (0.33)	1.57 (0.29)	1.66 (0.30)
V_T/T_I	0.65 [0.37-0.89]	0.43 [0.31-1.63]	0.48 [0.29-1.75]	0.53 [0.30-1.87]
V'_E	14.43 (2.52)	15.30 (3.15)	13.57 (2.39)	14.44 (2.46)
$P_{ET}CO_2$	34.37 [31.88-38.36]	35.82 [32.14-36.90]	34.02 [29.53-35.39]	34.05 [31.46-34.58]

BL, baseline ; POST1, mean (SEM) or median [interquartile] over the first 5 minutes post-conditioning; POST2, over the second 5 minutes epoch; POST3, over the third 5 minutes epoch. T_I, inspiratory time (s); T_E, expiratory time (s); T_T, total cycle time (s); T_I/T_T, duty cycle (%); V_T, tidal volume (L); V_T/T_I, mean inspiratory flow ($L.min^{-1}$); V'_E, ventilation ($L.min^{-1}$); $P_{ET}CO_2$, end-tidal expired carbon dioxide (mmHg); VAS, visual analog scale of respiratory discomfort (cm). The arrows indicate significant differences against BL ($p < 0.05$).

Table 3. Effects of sham stimulation, 5 Hz conditioning, and cTBS conditioning of the supplementary motor area (SMA) on discomfort evaluated with VAS (cm)

	BL	POST1	POST2	POST3
sham	2.17 (0.69)	2.07 (0.52)	2.54 (0.71)	2.66 (0.63)
5 Hz	2.09 (0.52)	1.46 (0.32)	1.78 (0.32)	2.15 (0.50)
cTBS	1.82 [1.23 - 4.25]	2.09 [0.10-4.72]	1.71 [0.76-3.62]	2.08 [1.62-4.56]

BL, baseline ; POST1, mean (SEM) or median [interquartile] over the first 5 minutes post-conditioning; POST2, over the second 5 minutes epoch; POST3, over the third 5 minutes epoch.

Legends to the figures

Figure 1. Schematic representation of the experimental sessions. Each session began by neuronavigated localisation of the supplementary motor area (SMA) and by the identification of stimulation parameters. Breathing pattern variables and respiratory discomfort were measured during a first 15 minutes inspiratory threshold loading (ITL) session, followed by 15 minutes of rest. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) was then applied to the SMA using an excitatory protocol (5 Hz continous stimulation), an inhibitory protocol (continuous theta-burst stimulation) or sham stimulation (in random order) and a second ITL period was started (see Methods for details).

Figure 2. Breathing pattern variables at baseline (red), during the "POST1" period (blue), POST 2 (grey), and POST 3 (green). T_I, inspiratory time; T_E, expiratory time; T_T, total cycle time; T_I/T_T, duty cycle; V_T, tidal volume; f, breathing frequency; V'_E, ventilation ; $P_{ET}CO_2$, end-tidal expired carbon dioxide; all values in percentage of baseline.

Figure 1.

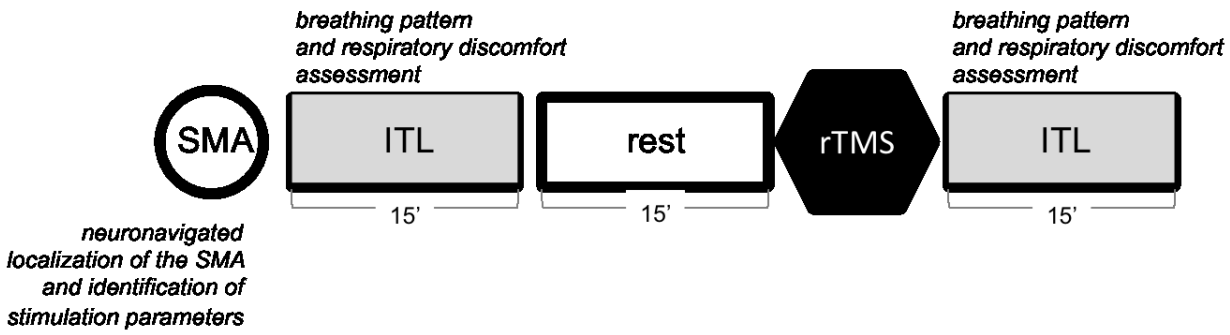
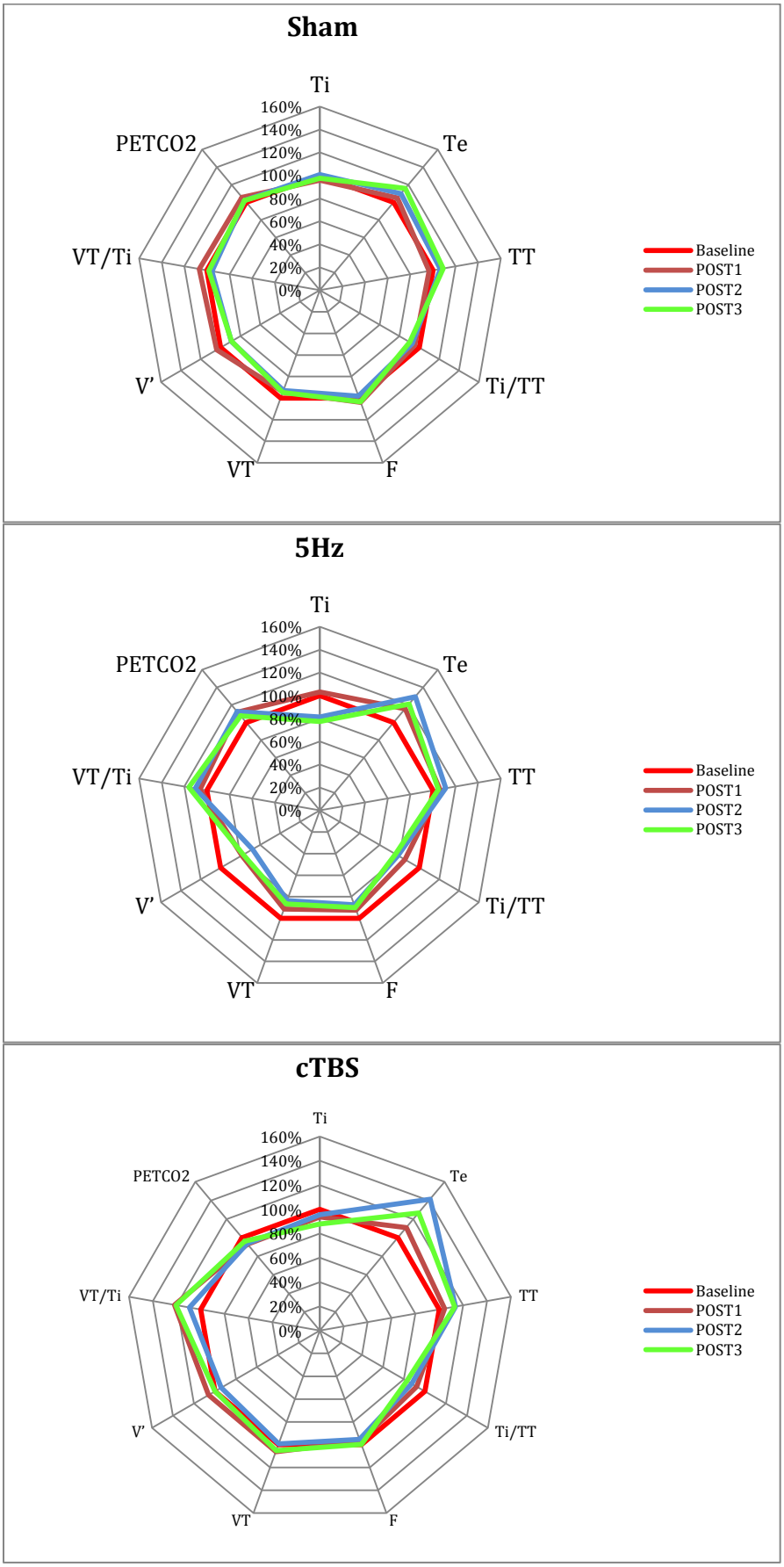

breathing pattern
and respiratory discomfort
assessment
breathing pattern
and respiratory discomfort
assessment
SMA
ITL
rest
rTMS
ITL
15'
15'
15'
neuronavigated
localization of the SMA
and identification of
stimulation parameters

Figure 2.


Sham
Ti
Te
TT
Ti/TT
F
VT
V'
VT/Ti
PETCO2
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Baseline
POST1
POST2
POST3
5Hz
Ti
Te
TT
Ti/TT
F
VT
V'
VT/Ti
PETCO2
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Baseline
POST1
POST2
POST3
cTBS
Ti
Te
TT
Ti/TT
F
VT
V'
VT/Ti
PETCO2
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Baseline
POST1
POST2
POST3

ÉTUDE n°3

Niérat M-C, Similowski T, Lamy JC.

Does spinal DC stimulation enhance synaptic inputs to phrenic motoneurons in humans? a double-blind, sham controlled, randomized crossover study.

Accepté pour révision à J Neurosci

RÉSUMÉ ÉTUDE N°3

Bases théoriques

Les motoneurones phréniques, situés dans les colonnes ventrales des métamères C3 à C5 chez l'humain (Vérin *et al.*, 2011) reçoivent et intègrent l'ensemble des influx efférents (bulbaires et suprabulbaires) et afférents respiratoires. Ils sont le lieu d'importants mécanismes de plasticité respiratoire qu'elle soit induite par stimulation électrique ou chimique (Mitchell *et al.*, 2003).

La stimulation transcutanée spinale par courant continu (tsDCS) est une technique non invasive de modulation persistante des propriétés de conduction et de transmission de l'influx au niveau médullaire. Un conditionnement tsDCS en courant anodal en regard des métamères lombaires induit une diminution de l'amplitude du potentiel cervico-médullaire P30 (Cogiamanian *et al.*, 2008) et une réduction de la composante RIII du réflexe polysynaptique de flexion (Cogiamanian *et al.,* 2011). Ces résultats traduisent une altération de la conduction des afférences proprioceptives et nociceptives réciproquement par les voies lemniscale et voie spinothalamique. Des modifications des propriétés trans-synaptiques des motoneurones spinaux sont également notées d'une part par une modulation de la dépression homosynaptique du réflexe H (Winkler *et al.*, 2010) et d'autre part, en réponse à un courant en polarité anodal, par une augmentation de l'excitabilité du circuit monosynaptique Ia (Lamy *et al.*, 2012).
Au niveau des voies descendantes, une étude montre la possibilité de moduler l'excitabilité de la voie corticospinale destinée à un muscle du poignet en appliquant le courant continu au niveau cervical selon un montage antéro-postérieur (Lim et Shin, 2011).

Hypothèses et objectifs

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier la possibilité d'induire une modulation persistante de l'excitabilité de la voie corticophrénique par une technique de tsDCS cervicale. Le second objectif a été d'évaluer les conséquences ventilatoires de cette plasticité à travers l'analyse du profil ventilatoire en ventilation de repos.

Méthodes

Suivant un protocole randomisé, contrôlé, en double aveugle, nous avons examiné, dans une 1ère session les effets d'un courant tsDCS (anodal, cathodal et sham) (2.5mA, 15 min) délivré au niveau des métamères C3-C5 sur l'excitabilité de la voie corticophrénique évaluée par TMS en simple impulsion avant (T0), pendant (Per1, Per2), immédiatement (T1) et 15

minutes après l'arrêt de la stimulation (T2). Dans une 2ème session, contrôle, nous avons cherché à déterminer le lieu des effets de la tsDCS en étudiant les modifications de l'inhibition intracorticale. Dans une 3ème session nous avons étudié la traduction électromécanique de cette modulation d'excitabilité en enregistrant le profil ventilatoire en ventilation de repos pendant 3 périodes de 15 minutes (T0, Per, T1) par une méthode de pléthysmographie respiratoire par induction.
17 sujets sains naïfs ont participé à la 1ère partie de l'étude, l'inhibition intracorticale a été évaluée chez 7 sujets et le profil ventilatoire a été enregistré chez 12 sujets sains.

Résultats

La taille (aire sous la courbe, AUC) des PEM du diaphragme est significativement augmentée après le courant anodal et cathodal (respectivement $F_{4,64} = 4,46$; $p < 0,004$ et $F_{4,64} = 5,68$; $p < 0,001$). Aucune modification n'est notée en réponse à la stimulation sham ($F_{4,64} = 0,95$; $p = 0,44$).
Le seuil moteur de repos est significativement diminué après les conditions actives ($F_{1,13} = 15$; $p = 0,008$ et $F_{1,13} = 18,62$; $p = 0,005$).
Cette modulation de l'excitabilité corticophrénique ne s'accompagne pas d'une modification de l'excitabilité intracorticale testée par la sICI ($F_{2,41} = 0,224$; $p = 0,803$).
La ventilation est significativement augmentée après l'application d'un courant cathodal en Per et à T1 ($F_{2,35} = 2,902$; $P < 0,05$). Aucune modification de la ventilation n'est notée suite à un courant anodal ou sham (respectivement $F_{2,35} = 0.986$; $p = 0,389$; $F_{2,35} = 1,336$; $p = 0,283$).

Conclusion

Une augmentation progressive de l'excitabilité corticophrénique est notée pendant l'application du courant continu au niveau cervical et jusqu'au moins 15 min après son arrêt et ce quel que soit la polarité du courant. La polarité cathodale induit de plus un accroissement du volume courant.
L'absence de modification significative de la valeur de la titration de bruit et de la fréquence respiratoire est en faveur de l'absence de changement d'état du système de contrôle homéostasique de la ventilation (activité bulbospinale) en réponse l'induction de plasticité par les protocoles en tsDCS. La valeur de la sICI, reflet de l'inhibition intracorticale, n'est pas significativement modifiée. Ce résultat n'est en faveur de la participation de modulations de l'excitabilité intracorticale venant influencer la voie corticophrénique et les étages médullaires. Cette possibilité ne peut être totalement exclue puisque seuls les changements d'inhibition intracorticale ont été évalués. Les modifications persistantes de l'excitabilité

corticophrénique et de la ventilation résulteraient plutôt d'une modulation de l'excitabilité des motoneurones phréniques.

Quel que soit le mécanisme impliqué, il apparait donc possible, par cette technique de tsDCS, de modifier la ventilation indépendamment de toute nécessité homéostasique.

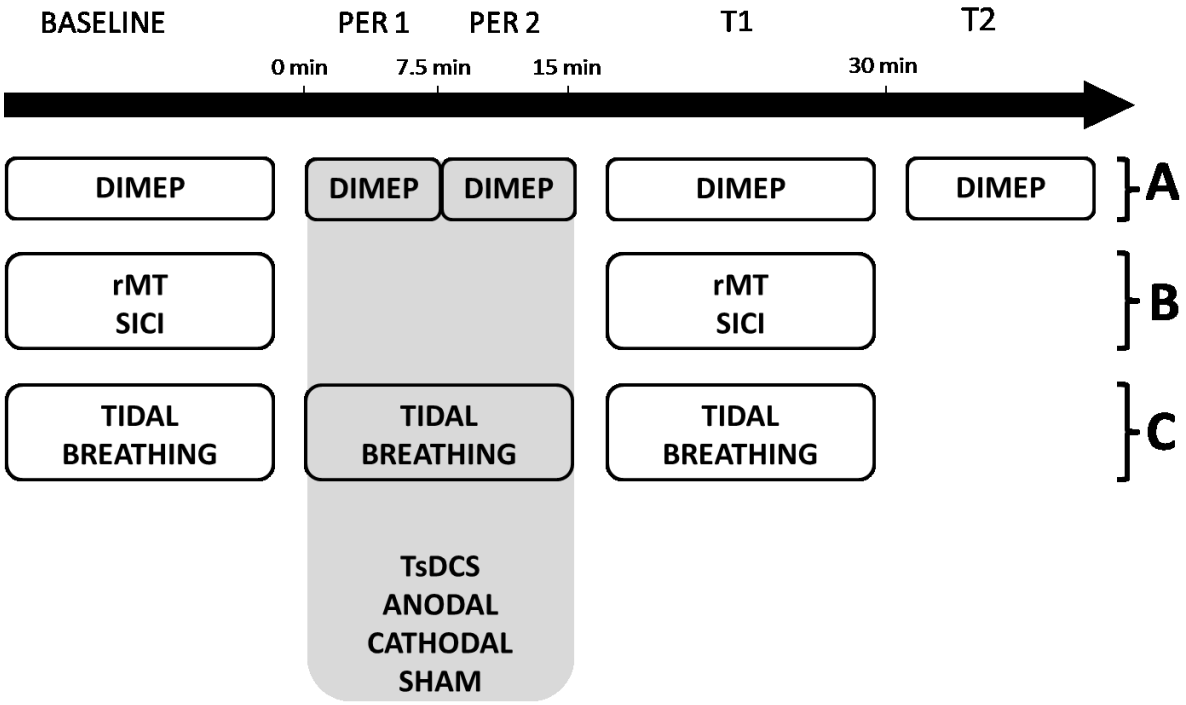


Figure n°26: **Schéma expérimental de l'étude n°3.**

Le schéma expérimental comporte trois études : une expérimentation principale (A), une expérimentation contrôle (B) et une expérimentation « ventilatoire » portant sur l'enregistrement du profil ventilatoire (C). Il s'agit d'une étude basée sur l'application d'un conditionnement par stimulation transcutanée spinale en courant continu (tsDCS) en polarité anodale, cathodale ou sham apliqué en regard des métamères C3-C5. Cette étude est randomisée, contrôlée et en double aveugle.

Lors de l'expérimentation principale (A), 40 PEM ont été évoqués à partir de la représentation du diaphragme (DiMEP) au sein du cortex moteur primaire avant (BASELINE) puis à deux temps pendant (Per 1, Per2) et à 2 temps après l'arrêt du courant (Post 1, de 1 à 15min et Post 2 à partir de 15min après l'arrêt du courant).

L'expérimentation B a consisté en l'évaluation du seuil moteur de repos (rMT) du diaphragme et de l'inhibition intracorticale avant puis après conditionnement tsDCS.

L'expérimentation C a comporté un enregistrement du profil ventilatoire de trois périodes de 15 minutes avant (BASELINE), pendant (PER) et après POST) un conditionnement tsDCS.

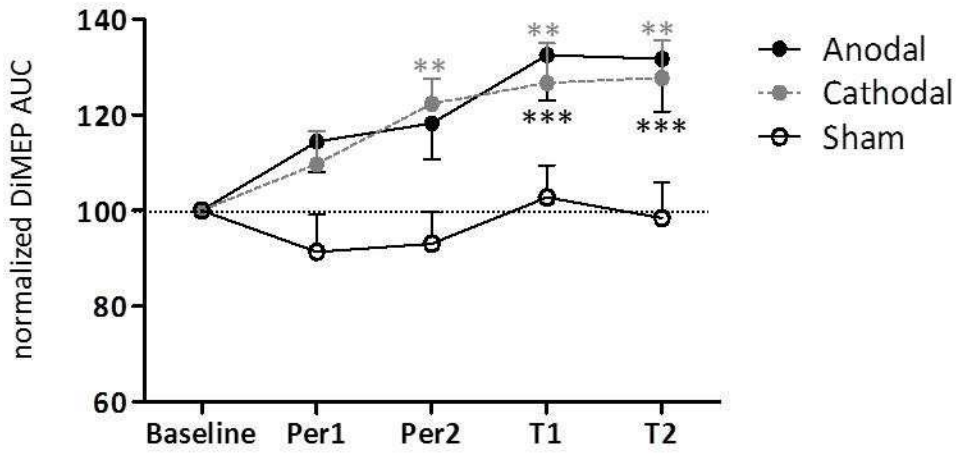


Figure n°27 : **Graphique présentant l'évolution de la taille des PEM du diaphragme suite à un conditionnement tsDCS en polarité anodale, cathodale ou sham.**

Schéma représentant les changements normalisés par rapport à la ligne de base de l'aire sous la courbe des PEM du diaphragme (DiMEP AUC) chez 17 sujets avant (T0), pendant (0 à 7,5min : Per 1, 7,5 à 15min : Per 2) et dans les 20min suivant après l'arrêt (immédiatement après : T1 ; à partir de la 15ème minute après : T2) un conditionnement par stimulation transcutanée spinale par courant continu en polarité anodale (ronds noirs), cathodale (ronds gris) et sham (ronds blancs) appliqué au niveau cervical. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ; l'astérisque indique une augmentation significative de la taille des DiMEPs par rapport à la ligne de base (test post-hoc : Dunnett ; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

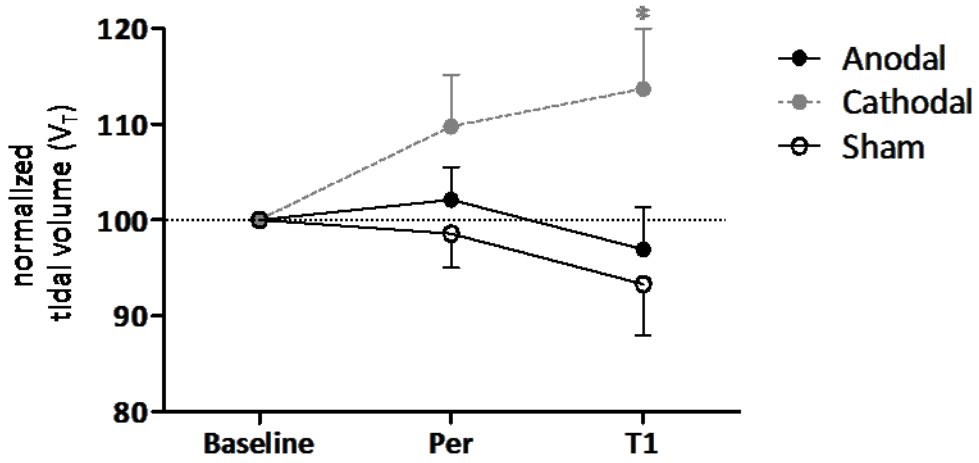


Figure n°28 : **Graphique présentant l'évolution du volume courant suite à un conditionnement tsDCS en polarité anodale, cathodale ou sham.**

Changement du volume courant (V_T), normalisé par rapport à la ligne de base chez 12 sujets avant (T0), pendant (PER) et 15 minutes après l'arrêt (T1) un conditionnement par stimulation transcutanée spinale par courant continu en polarité anodale (ronds noirs), cathodale (ronds gris) et sham (ronds blancs) appliqué au niveau cervical. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ; l'astérisque indique une augmentation significative du V_T par rapport à la ligne de base (test post-hoc : Dunnett ; * $p < 0.05$).

The Journal of Neuroscience

http://jneurosci.msubmit.net

JN-RM-1288-14

Does spinal DC stimulation enhance synaptic inputs to phrenic motoneurons in humans ? a double-blind, sham controlled, randomized crossover study

Jean-Charles Lamy, CRICM CENIR Hopital Pitié Salpêtrière
Marie Cécile Niérat, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1158 Thomas SIMILOWSKI, Université Paris 6

Commercial
Interest: No

This is a confidential document and must not be discussed with others, forwarded in any form, or posted on websites without the express written consent of The Journal for Neuroscience.

Does spinal DC stimulation enhance synaptic inputs to phrenic motoneurons in humans ?

a double-blind, sham controlled, randomized crossover study

Abbreviated title: tsDCS induces respiratory plasticity

Marie-Cécile Niérat[1,2], Thomas Similowski[1,2,3], Jean-Charles Lamy[4,5]

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005, Paris, France
[2] INSERM, UMR_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005, Paris, France
[3] AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Service de Pneumologie et Réanimation Médicale (département R3S), F-75013, Paris, France
[4] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, UM 75, U 1127, UMR 7225, ICM, F-75013, Paris, France
[5] Centre de Neuro-imagerie de Recherche (CENIR), Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, F-75013, Paris, France

Corresponding author:
Jean-Charles Lamy, PhD
CRICM INSERM U975, CNRS UMR 7225, UPMC UMR_S 975, ICM building, Room 3.028
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière
47-83, boulevard de l'Hôpital
75651 Paris Cedex 13
e-mail: jeancharles.lamy@gmail.com - Phone: +33 (0)1 57.27.43.54.

Number of pages: 25
Numbers of figures: 4; number of tables: 4
Number of words: Abstract: 249; Introduction: 467; Discussion: 1499

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests

Acknowledgments: This work was supported by a "Legs Poix" grant from the "Chancellerie de l'Université de Paris", Paris, France; a support grant from "Association pour le Développement et l'Organisation de la Recherche en Pneumologie et sur le Sommeil", Paris, France; and by the French Government (IHU-A-ICM) "Investissement d'avenir" ANR-10-IAIHU-06 program. The authors would like to thank Christian Straus for suggesting the noise titration approach and Nicolas Wattiez for carrying out the corresponding analysis.

ABSTRACT

Although compelling evidence has demonstrated considerable neuroplasticity in the respiratory control system, few studies have explored the possibility of altering corticospinal projections to phrenic motoneurons (PMNs) using noninvasive stimulation protocols. The present study was designed to investigate the immediate and long-lasting effects of a single session of transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS), a promising technique for modulating spinal cord functions, on corticophrenic excitability in healthy humans. Using a double-blind, controlled, randomized crossover approach, we examined the effects of anodal, cathodal, and sham tsDCS delivered to the C3-C5 level on (i) diaphragm motor-evoked potentials (DiMEP) elicited by transcranial magnetic stimulation (TMS), (ii) resting motor threshold (rMT) of the diaphragm and short interval intracortical inhibition (sICI) thought to reflect GABAergic inhibition in the motor cortex and, (iii) spontaneous ventilation, as measured by respiratory inductance plethysmography and ventilatory chaos. Both anodal and cathodal tsDCS induced a progressive increase of DiMEP amplitude during stimulation that persisted for at least 15 min after current offset and reduced rMT. sICI and ventilatory chaos were unchanged by tsDCS, suggesting that enhanced corticophrenic excitability did not occur at either the cortical level or at the brainstem, but rather at the spinal level. Interestingly, cathodal, but not anodal tsDCS, induced a persistent increase in tidal volume. This form of artificially enhanced synaptic input to PMNs can therefore result in polarity-dependent breathing pattern changes, which opens up the perspective of harnessing respiratory plasticity as a therapeutic tool in disorders altering the central ventilatory command or its spinal transmission

INTRODUCTION

Respiratory motor output emerges from complex network interactions involving neurons distributed throughout the central nervous system. It is controlled during acute changes in metabolic demand via bulbospinal respiratory projections and is modulated by non-homeostatic influences via corticospinal respiratory projections. Phrenic motoneurons (PMNs) located in the ventral horn of cervical spinal segments C3-C4-C5 (Verin et al., 2011) provide a synaptic relay between the bulbospinal and corticospinal respiratory pathways and the diaphragm. Evidence has accumulated in recent years demonstrating that the respiratory rhythm-generating network exhibits potent plasticity. Respiratory neuroplasticity can be induced by hypoxia, learning, training, hypercapnia, injury, stress, and pharmacological interventions (see Mitchell and Johnson, 2003; Demoule et al., 2008; Dale-Nagle et al., 2010; Mitchell and Terada, 2011). For example, hypoxia-induced respiratory plasticity has been extensively studied, as sustained exposure to intermittent hypoxia induces a windup of respiratory activity visible during normoxic intervals, reflecting the development of ventilatory long-term facilitation (vLTF). This vLTF is expressed as a persistent increase of respiratory motor output that outlasts the stimulation period by several minutes to several hours and has been described in animals, healthy humans and in patients with obstructive sleep apnea syndrome (Mitchell et al., 2001; Mateika and Syed, 2013). There is evidence that phrenic motor plasticity is the key mechanism underlying the induction of vLTF, likely via enhanced synaptic inputs to PMNs (Fuller et al., 2000; Johnson and Mitchell, 2013).

In humans, corticophrenic excitability can be altered using noninvasive brain stimulation protocols, and the observed changes persist for several minutes beyond the conditioning protocol. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) applied at 5Hz over the supplementary motor area increased the amplitude of diaphragm motor evoked potentials (DiMEPs) (Raux et al., 2010), whereas continuous theta-burst stimulation reduced DiMEP amplitude (Laviolette et al., 2013). Azabou et al.

90 (2013) described reduced DiMEPs after both cathodal and anodal transcranial direct current
91 stimulation (tDCS) encompassing the primary motor cortical representation of the diaphragm.
92 Transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS) is a noninvasive neuromodulatory technique
93 eliciting long-lasting changes in spinal cord excitability in animals (Ahmed, 2011; 2013; Aguilar et al.,
94 2011; Ahmed and Wieraszko, 2012) and humans (Cogiamanian et al., 2008; 2011; Truini et al., 2011;
95 Lamy et al., 2012) that may be a promising new treatment modality for a number of neuropsychiatric
96 conditions (Cogiamanian et al., 2012; Lamy and Boakye, 2013). Recently, Lim and Shin (2011)
97 pioneered the application of tsDCS at the cervical level in healthy humans. They demonstrated that
98 both anodal and cathodal conditions enhanced MEP amplitude in the flexor carpi radialis muscle,
99 proving that tsDCS may be an effective tool to promote corticospinal plasticity.
100 In the present double-blind, sham controlled, randomized crossover approach, we tested the
101 hypotheses that cervical tsDCS (i) can induce long-lasting plastic changes of corticophrenic excitability
102 and, (ii) that these putative changes would be associated with modified breathing pattern.

103 **METHODS**

104 **Subjects**

105 Experiments were performed on twenty two healthy participants, naïve to DC stimulation protocols,
106 with no history of pulmonary or neuromuscular disease (13 females, aged 21 to 45, mean age ± SD:
107 28.26 ± 6.6 yr). However, not all subjects participated in every experiment. The study was approved
108 by the appropriate legal and ethical authority (CPP Ile de France VI – Pitié-Salpêtrière, Paris, France)
109 and was conducted according to the guidelines of the World Medical Association (Declaration of
110 Helsinki). Written informed consent was obtained from all participants. For each experiment, the
111 subjects were comfortably seated in a reclining chair with their eyes open.

112 **EMG recording**

113 Surface electromyography (EMG) was recorded from the right hemidiaphragm using disposable Ag-
114 AgCl electrodes (Kendall, Chicopee, MA, USA). One electrode was placed in the eighth intercostal

115 space, between the costochondral junction and the midclavicular line and the other electrode was
116 placed on the overlying rib at a distance of no more than 2 cm. This montage corresponds to a
117 modified technique validated to minimize the risk of signal contamination by EMG activities from
118 extradiaphragmatic muscles coactivated by TMS (Demoule et al., 2003a). A ground electrode was
119 placed on the iliac spine. EMG signals were amplified (× 1000), filtered with a band-pass of 10-
120 1000Hz (1902 isolated amplifier, Cambridge Electronic Design [CED], Cambridge, UK), digitized at
121 2kHz using a Power 1401 data acquisition interface (CED, Cambridge, UK), and stored on a personal
122 computer for off-line analysis (Signal Software version 5.05a, CED, Cambridge, UK). As a quality
123 criterion, the mechanical response of the diaphragm to TMS was assessed in terms of the induced
124 changes in abdominal circumference, with a piezoelectric belt-mounted transducer attached to an
125 elastic belt placed at the level of the umbilicus (ADinstrument/Pneumotrace II, UFI, Morro Bay, CA).
126 As the diaphragm is the only muscle of which the contraction increases abdominal circumference,
127 EMG responses to TMS were considered to have a diaphragmatic origin if and only if they were
128 concomitant to such an increase.

129 **Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) procedure**

130 Diaphragm motor evoked potentials (DiMEPs) were elicited in a relaxed state, i.e., at the end of tidal
131 expiration using a Magstim Bistim^2 200 (Magstim Company, Whitland, Wales, UK) connected to a
132 double-cone coil (90 mm; Magstim Company, Whitland, Wales, UK) positioned perpendicular to the
133 scalp near or over the vertex and oriented to deliver anterior-posterior directed current. The optimal
134 stimulus site was determined as the site at which TMS, at a slightly suprathreshold intensity,
135 consistently induced the largest amplitude DiMEPs. A neuronavigation system (Visor2, ANT Neuro
136 B.V., Enschede, The Netherlands) was used to ensure reliable and constant placement of the coil
137 throughout the experiment. Resting motor threshold (rMT) was defined to the nearest 1% stimulator
138 output as the lowest stimulus intensity that elicited MEPs > 50μV in least 5 of 10 consecutive TMS
139 (Rossini et al., 2004). The intensity of the stimulus was then set to evoke DiMEPs corresponding to

140 50% of maximum DiMEP amplitude ($DiMEP_{MAX}$) (see Figure 1). Short intracortical inhibition (sICI) was
141 evoked using a paired-pulse technique with a subthreshold conditioning stimulus delivered 2ms
142 before a suprathreshold test stimulus of TMS, adjusted to evoke DiMEPs corresponding to 50% of
143 $DiMEP_{MAX}$ (Kujirai et al., 1993). To avoid any ceiling effect, we first created an intensity curve for sICI
144 by using intensities of 0.8, 0.7, 0.6, 0.5 × rMT (Stinear and Byblow, 2004). During experiments, the
145 intensity of the conditioning stimulus was adjusted in each subject according to the intensity curve at
146 the highest intensity evoking inhibition.

147 **Breathing pattern assessment**

148 Respiratory pattern was measured using a respiratory inductance plethysmography vest (Visuresp,
149 RBI, Meylan, France). The rib cage and abdominal signals related to breathing activity were amplified,
150 filtered, analog-to-digital converted at a 40Hz sampling rate (Maclab 16S, Powerlab System, AD
151 Instruments, Castle Hill, Australia) and stored on a personal computer for subsequent analysis (Chart
152 v5.2 software, AD Instruments, Castle Hill, Australia).

153 **Spinal DC stimulation procedure**

154 tsDCS was delivered by a battery-driven direct current stimulator (Eldith DC stimulator, Neuroconn
155 GmbH, Ilmenau, Germany) connected to a pair of saline-soaked sponge electrodes (35cm²) covered
156 with electrolyte gel. Prior to positioning the electrodes with rubber pads, the skin was cleaned with
157 an abrasive skin prep and alcohol to lower impedance. One electrode was placed on the midline of
158 the posterior part of the neck to cover cervical spinal segments C3-C5, and the other electrode was
159 placed on the midline of the anterior part of the neck, just below the cervicomental angle (Lim and
160 Shin, 2011). Polarity of stimulation refers to the spinal electrode. The stimulus intensity was set at
161 2.5mA and was applied over a 15-min period (Cogiamanian et al., 2008; Winkler et al., 2010; Lamy et
162 al., 2012) resulting in a current density of 0.071 mA/cm² and a delivered total charge of 64mC/cm².
163 The current was ramped up to 2.5mA over a 10-sec period and similarly ramped down at the end of

164 stimulation. Sham condition was achieved by delivering a 2.5mA current over a 90-sec period (Lamy
165 et al., 2012).

166 **Experimental design**

167 Each subject participated in three sessions (anodal, cathodal and sham), with an interval of at least 3
168 days between two consecutive sessions. A double-blind approach was used by shielding the
169 stimulator control panel from the view of both the participants and the investigator performing the
170 stimulation (MCN). The stimulation sequence was randomized for each subject by the unblinded
171 investigator (JCL). The experimental design is described in Figure 2.
172 For the main experiment (experiment A, Fig 2A), performed in 17 healthy subjects, about forty
173 DiMEPs were collected at five time-points: before applying tsDCS (T0), during tsDCS delivery starting
174 immediately after current onset (Per1), during tsDCS delivery starting 7.5 min after current onset
175 (Per2), immediately after current offset (T1) and 15 min after current offset (T2). For this set of
176 experiments, the intensity of stimulation, expressed as a percentage of maximal stimulator output
177 (MSO), was maintained constant across all time-points.
178 A control experiment (experiment B, Fig 2B) was performed in 7 subjects who had previously
179 participated in the main experiment. sICI (obtained by randomly alternating 25 unconditioned and 25
180 conditioned DiMEPs) and rMT were recorded before applying anodal, cathodal or sham tsDCS (T0)
181 and immediately after current offset (T1). Given that both anodal and cathodal tsDCS enhanced
182 DiMEP amplitude and reduced DiMEP threshold (see results), the intensity of the test stimulus was
183 carefully adjusted to maintain a constant amplitude of the unconditioned DiMEP throughout the
184 experiment. At T1, the intensity of conditioned DiMEP was also adjusted to the same percentage of
185 rMT prerecorded at T0.
186 The effects of tsDCS on breathing pattern (experiment C, Fig 2C) were studied in 12 subjects, 7 of
187 whom had participated in the main study. Subjects were instructed to relax, stay quiet and keep their
188 eyes open and every precaution was taken to maintain a silent experimental area. Breathing pattern

189 was studied during three 15-minute epochs: before applying tsDCS (T0), during tsDCS delivery (PER)
190 and immediately after current offset (T1). The first minute of each epoch was discarded from analysis
191 to allow stabilization of the breathing pattern.

192 **Data analysis**

193 DiMEPs were included in the analysis when they met the following three criteria: (1) absence of
194 contamination by electrocardiographic complexes; (2) absence of pre-stimulus EMG activity
195 measured as the root mean square (RMS) amplitude over 100ms prior to stimulation; (3)
196 concomitant abdominal expansion (see above). The area under the curve (AUC) of DiMEPs was
197 measured on the rectified EMG responses. DiMEP latency was measured on the non-rectified EMG
198 responses as the time elapsed between the stimulus and the first observable deflection of the EMG
199 signal from baseline. For each subject, DiMEP AUC, latency and pre-stimulus EMG were averaged
200 across trials for each time-point and normalized to percentage baseline (T0). sICI was calculated as
201 the ratio of the mean conditioned DiMEPs over the mean unconditioned test DiMEPs.
202 The following parameters were extracted from breathing pattern recordings (experiment C): tidal
203 volume (V_T), inspiratory time (T_i), total cycle time (T_T), respiratory frequency (f), and derived variable
204 mean inspiratory flow (V_T/T_i). For each subject, V_T, T_i, T_T, f, and V_T /T_i ratio were averaged across trials
205 for each 15-min epoch and normalized to percentage baseline (T0).
206 The tidal volume signal derived from the respiratory inductance plethysmography jacket was tested
207 for nonlinear complexity using the noise titration method (see Poon and Barahona, 2001; Fiamma et
208 al., 2007). Briefly, this approach consists of fitting the analyzed data with an array of linear and
209 nonlinear models. If the data is best fitted by a nonlinear model (complexity), noise is added to the
210 signal (noise titration) until the resulting signal becomes best fitted by a linear model. The amount of
211 noise required to obtain this result is the "noise limit" (NL): NL>0 indicates complexity within the
212 signal; the higher the NL value, the more complex the signal (Wysocki et al., 2006). As ventilatory
213 complexity is considered to originate in the brainstem respiratory pattern generators in animals and

214 humans (Mangin et al., 2008; Straus et al., 2011; Hess et al., 2013), we hypothesized that a putative
215 effect of tsDCS at this level would result in NL variations. Tidal volume data were subsampled at 5Hz
216 and examined with a custom written noise titration routine (MathWorks Inc, Natick, MA 01760-2098,
217 USA) derived from the original Poon and Barahona routine (2001) and modified for multiple
218 dimension testing and repeated assessment (Roulin et al., 2011).

219 **Statistics**

220 Parametric analyses were used, as all data sets successfully passed the Shapiro-Wilk test for
221 normality and Levene's test for equality of variance. One-way repeated-measures ANOVAs were
222 computed on raw data to test for baseline differences across tsDCS conditions (Table 1). Two-way
223 ANOVAs with INTERVENTION factor (3 levels: anodal, cathodal or sham) and TIME factor (see results
224 section and legends to tables for details regarding the number of levels) were first performed to
225 identify differences between tsDCS conditions at different time-points for (i) DiMEP AUC and latency
226 (experiment A), (ii) rMT and sICI (experiment B) and, (iii) tidal volume (V_T), inspiratory time (T_i), total
227 cycle time (T_t), frequency (f) and NL (for trials with NL>0) (experiment C). Conditional on a significant
228 F value, subsequent one-way repeated-measures ANOVAs were performed to detect significant
229 changes in the time-course within each condition, using Dunnett's multiple comparison *post hoc* test
230 (experiments A and C). Paired t tests were used as *post hoc* tests for experiment B. In all tests,
231 statistical significance was assumed if $P < 0.05$. All calculations were performed using Sigmaplot
232 (Systat Software, San Jose, CA).

233 **RESULTS**

234 tsDCS was well tolerated by all subjects and no adverse effects were encountered. Most participants
235 reported local itching or a slight tingling sensation that resolved after a few seconds. No subject was
236 able to differentiate active conditions from sham stimulation.

237 *Experiment A* (Fig 2A): To test for potential baseline bias among tsDCS conditions, one-way repeated
238 measures ANOVAs were first performed on raw data for each DiMEP parameter (rMT, TMS intensity,

239 AUC, latency, pre-stimulus RMS EMG). No significant *a priori* differences between baseline values
240 were detected (Table 1). To test for differences between tsDCS conditions at different time-points,
241 two-way repeated-measures ANOVAs were performed for each DiMEP parameter (Table 2) and
242 revealed a significant "INTERVENTION" × "TIME" interaction ($F_{8,128}$ = 2.102; P = 0.04) for DiMEP AUC.
243 No other significant difference was detected (Table 2). One-way repeated-measures ANOVAs were
244 then computed to investigate changes from baseline at each time-point within each tsDCS conditions
245 and showed a significant effect for both anodal ($F_{4,64}$ = 4.455; P < 0.004) and cathodal ($F_{4,64}$ = 5.679; P
246 < 0.001) conditions, but not for sham intervention ($F_{4,64}$ = 0.952; P = 0.44). Dunnett's *post hoc* tests
247 showed that both anodal and cathodal tsDCS induced a progressive increase of DiMEP AUC over time
248 that persisted for at least 15 min after current offset (Figure 3).
249 *Experiment B* (Fig 2B): To gain knowledge about tsDCS-induced corticophrenic plasticity (experiment
250 A), we determined both rMT and sICI before (T0) and after (T1) anodal, cathodal or sham tsDCS. No *a*
251 *priori* differences between baseline values were detected for either rMT ($F_{2,20}$ = 0.51; P = 0.61) or sICI
252 ($F_{2,20}$ = 3.136; P = 0.08). Two-way repeated-measures ANOVAs revealed a significant "INTERVENTION"
253 × "TIME" interaction for rMT ($F_{2,41}$ = 4.453; P < 0.04) (Table 3). *Post hoc* paired t tests showed that
254 rMT decreased significantly after both anodal (T0: 49 ± 0.03% MSO; T1: 46 ± 0.03% MSO; P < 0.009)
255 and cathodal (T0: 49 ± 0.03% MSO; T1: 45 ± 0.02% MSO; P < 0.006) stimulations, but remained
256 unchanged after sham intervention (T0: 50 ± 0.03% MSO; T1: 49 ± 0.03% MSO; P = 0.08). In contrast,
257 tsDCS failed to modulate sICI ($F_{2,41}$ = 0.224; P = 0.8) (Table 3).
258 *Experiment C* (Fig 2C): One-way repeated-measures ANOVAs failed to detect baseline differences
259 across tsDCS sessions for tidal volume (V_T) ($F_{2,35}$ = 1.29; p = 0.294), inspiratory time (T_i) ($F_{2,35}$ = 0.442; p
260 = 0.648), total cycle time (T_t) ($F_{2,35}$ = 0.492; p = 0.618), frequency (f) ($F_{2,35}$ = 0.654; p = 0.530) and noise
261 limit ($F_{2,35}$ = 0.372; p = 0.695). To test for differences between tsDCS conditions at different time-
262 points, two-way repeated-measures ANOVAs were computed for each respiratory parameter (Table
263 4) and revealed a significant "INTERVENTION" × "TIME" interaction ($F_{4,107}$ = 2.902 ; P < 0.04) for tidal
264 volume (V_T). No other significant difference was detected (Table 4). Subsequent one-way repeated-

265 measures ANOVAs were then computed to investigate changes in V_T from baseline at each time-
266 point in each tsDCS condition and showed a significant effect for cathodal ($F_{2,35}$ = 2.902 ; P < 0.05) but
267 not for anodal ($F_{2,35}$ = 0.986; P = 0.389) stimulation or sham intervention ($F_{2,35}$ = 1.336; P=0.283).
268 Dunnett's *post hoc* tests showed that cathodal tsDCS induced a progressive increase in V_T over time
269 that persisted for at least 15 min after current offset (Figure 4).
270 The noise limit (NL) value was greater than 0 in 32 / 36 trials (i.e., 12 subjects, 3 time-points). Two-
271 way repeated-measures ANOVA showed that ventilatory complexity remained unchanged across
272 tsDCS conditions ($F_{4,80}$ = 0.506; P = 0.732) (Table 4).

273 **DISCUSSION**

274 The present study provides first-time evidence that both anodal and cathodal tsDCS applied over C3-
275 C5 spinal segments is capable of inducing a persistent increase in the excitability of the
276 corticophrenic pathway that outlasts the stimulation period by at least 15 min. The augmented
277 response of the diaphragm to corticospinal inputs was associated with a polarity-dependent increase
278 in the bulbospinal respiratory neuromechanical throughput, as as cathodal but not anodal tsDCS
279 increased tidal volume.
280 When DC stimulation is applied over the diaphragmatic motor cortex, both anodal and cathodal tDCS
281 induced a persistent decrease in DiMEP amplitude (Azabou et al., 2013), whereas limb motor cortex
282 excitability is usually enhanced by anodal and reduced by cathodal tDCS (Nitsche and Paulus, 2000;
283 Nitsche et al., 2005) although this traditional view has recently been challenged (Batsikadze et al.,
284 2013). However, it must be stressed that the geometry of the induced electrical fields in the
285 underlying tissue differ considerably between montages, as it is influenced by several factors such as
286 the distance between electrodes, the current density reaching the target tissue, the biophysical
287 properties of neuronal membranes and the neural circuits involved. Consequently, tDCS and tsDCS
288 results cannot be readily transposed (Lamy and Boakye, 2013), and the differences between our
289 observations and those of Azabou et al. (2013) are therefore not surprising.

290 In humans, lung ventilation stems from the rhythmic activity of brainstem central pattern generators
291 governing respiratory muscle contraction. Although oscillatory in nature, tidal ventilation exhibits
292 breath-by-breath variability (Bendixen et al., 1964) and features chaos-like mathematical complexity
293 (Wysocki et al., 2006). As a result, ventilation and the corresponding neural activity can be described
294 by nonlinear indicators (Del Negro et al., 2002; Schmidt et al., 2010). The complex nature of
295 breathing is thought to arise from intrinsic properties of the brainstem pattern generators that drive
296 ventilation (Straus et al., 2011; Hess et al., 2013). Both breathing complexity, as assessed by the noise
297 titration approach, and breathing frequency, which is intimately dependent on the activity of
298 brainstem respiratory pattern generators, were unaffected by tsDCS interventions. Consequently, it
299 is unlikely that tsDCS-induced enhanced DiMEPs are due to changes in brainstem excitability.
300 Another possibility is that tsDCS may also have interfered with cortical excitability, as tsDCS applied
301 to the thoracic level modulated the cervicomedullary P30 component of the posterior tibial nerve
302 somatosensory-evoked potential (Cogiamanian et al., 2008) and attenuated the spinal processing of
303 nociceptive inputs (Truini et al., 2011; Cogiamanian et al., 2011), suggesting that tsDCS influences
304 conduction along ascending (lemniscal / spinothalamic) tracts. To test this hypothesis, we measured
305 sICI, a common method used to investigate changes in GABA intracortical synapses in the motor
306 cortex (Rothwell et al., 2009), in the diaphragm (Demoule et al., 2003b; Sharshar et al., 2004). In our
307 subjects, sICI was unchanged by tsDCS, suggesting that reduced $GABA_A$-mediated intracortical
308 inhibition is not responsible for enhanced DiMEPs after tsDCS. However, as TMS evokes multiple
309 corticospinal volleys (I-waves) and as sICI has a greater effect on later I-waves than on early I-waves
310 (Di Lazzaro et al., 1998), we cannot exclude the possibility that tsDCS may preferentially affect early
311 volleys or impact on other intracortical circuits, such as glutamatergic or $GABA_B$-ergic connections
312 that were not tested in the present study. Finally, a long-term increase in phrenic motor output may
313 also involve strengthening of excitatory connections to PMN, which would ultimately result in
314 enhanced DiMEPs. This possibility is compatible with our current understanding of neuroplasticity in
315 respiratory motor control, in which changes in the efficacy of synaptic transmission to PMNs play a

316 key role (Mitchell et al., 2001; Feldman et al., 2003; Mitchell and Johnson, 2003). Moreover, the fact
317 that tsDCS-related plastic changes in corticophrenic excitability gradually increased over the course
318 of the intervention and outlasted the stimulation period by at least 15 minutes suggests complex
319 synaptic changes rather than just a membrane-polarizing effect (Stagg and Nitsche, 2011).
320 DC stimulation has mainly been investigated using a transcranial approach. Long-lasting effects after
321 brain polarization involve modulation of both glutamatergic and GABAergic synapses and changes in
322 N-methyl-D-Aspartate (NMDA) ionotropic receptor efficacy (Liebetanz et al., 2002; Nitsche et al.,
323 2003) resulting in increased intracellular Ca^{2+} in the post-synaptic neuron. For these reasons, DC
324 stimulation-induced after-effects are thought to arise from synaptic changes via long-term
325 potentiation / depression-like processes as well as non-synaptic mechanisms involving changes in
326 neural membrane function (Ardolino et al., 2005). In the light of our results, it is conceivable that the
327 mechanisms underlying enhanced DiMEPs after tsDCS could also involve changes in neurotransmitter
328 release, which would be in line with the fact that: (i) glutamate drives the pathway to the phrenic
329 motor nucleus during inspiration (McCrimmon et al., 1989; Chitravanshi and Sapru, 1996) and
330 modulates synaptic strength in the short and long-term via NMDA receptors (Rekling et al., 2000;
331 McGuire et al., 2008), (ii) GABA is intimately involved in respiratory motor control, as phrenic motor
332 neurons are inhibited by GABA-A receptors during the expiratory phase of respiration (Fedorko et al.,
333 1983; Merrill and Fedorko, 1984) and, (iii) PMN NMDA receptors also contribute to excitatory
334 synaptic transmission (Chitravanshi and Sapru, 1996) and are implicated in many models of plasticity
335 including phrenic LTF (Golder, 2009). This idea is also supported by recent arguments from animal
336 studies: (i) both anodal and cathodal tsDCS increased glutamate analog D-2,3-^{3}H-aspartic acid release
337 *in vitro* (Ahmed and Wieraszko, 2012) and, (ii) it has been proposed that cathodal tsDCS may act by
338 directly inhibiting the spinal GABAergic system or by exerting overexcitation of postsynaptic neurons
339 (Ahmed, 2013) likely through increased glutamate release (Ahmed and Wieraszko, 2012). The fact
340 that tsDCS can modulate firing rate, pattern and amplitude of the spontaneous activity of the tibial
341 nerve in mice (Ahmed, 2011) is also compatible with the idea that cervical tsDCS could affect the

342 intrinsic properties of PMNs. These changes may involve a shift in motoneuron firing threshold,
343 changes in afterhyperpolarization amplitude, changes in synaptic contact on motoneurons or
344 changes in firing threshold of the axon (see Wolpaw and Carp, 2006).
345 Given that DiMEPs were enhanced regardless of the polarity of stimulation, while only cathodal
346 tsDCS was associated with increased neuromechanical throughput, as assessed by increased tidal
347 volume, also supports the view that tsDCS enhances synaptic inputs to PMNs, as the diaphragm
348 exhibits a phasic activity (Saboisky et al., 2007), i.e., PMNs are mainly active during the inspiratory
349 phase of ventilation. PMNs can be classified according to their bursting patterns (Kong and Berger,
350 1986; Lee et al., 2009): early-inspiratory (Early-I) PMNs begin to discharge during the initial part of
351 inspiration, whereas late-inspiratory (Late-I) PMNs begin bursting after ~10-40% of the inspiratory
352 period has elapsed (Lee and Fuller, 2011). Burst onset differences between PMNs subtypes are likely
353 to reflect intrinsic motoneuron properties (Berger, 1979): early-I PMNs are high-resistant, small cells,
354 whereas late-I PMNs are low-resistant, large cells. Thus, during spontaneous ventilation, in which
355 respiratory-related discharges of PMNs are primarily driven by bulbospinal inputs, early-I PMNs
356 would be recruited before late-I PMNs according to Henneman's size principle of motoneuron
357 recruitment (Henneman et al., 1965). Enhanced tidal volume after cathodal tsDCS is in line with
358 previous reports demonstrating the potential of cathodal tsDCS stimulation to specifically facilitate
359 spinal excitability (Alanis et al., 1953; Aguilar et al., 2011; Ahmed et al., 2011). It is also consistent
360 with recent animal data showing the potential of cathodal polarization to increase the recruitment of
361 larger motor units (Ahmed and Wieraszko, 2012). Similarly, as a tentative view, we hypothesize that
362 cathodal tsDCS could facilitate the recruitment of Late-I PMNs, which in turn would result in
363 enhanced tidal volume. In contrast, DiMEPs were evoked at the end of tidal expiration, i.e., when
364 PMNs were not activated or even inhibited by brainstem inputs (Duffin et al., 2000). Consequently,
365 the excitability of PMNs differed markedly between electrophysiological and behavioral experiments.
366 Together with the fact that DiMEPs were enhanced after both anodal and cathodal tsDCS, our
367 findings concerning tidal volume could suggest that tsDCS is more effective to induce depolarization

368 of PMNs when they are in a resting steady-state (or hyperpolarized) than when the PMN pool is
369 already depolarized by bulbospinal inputs.
370 Finally, our results showing an increase of corticophrenic activity are also in concordance with
371 previous studies showing that DiMEP facilitation evoked by underlying voluntary contractions
372 (Murphy et al., 1990, Davey et al., 1996, Similowski 1996), corticospinal modulation (Mehiri et al.
373 2006) or bulbospinal commands (Straus et al., 2004), is usually interpreted to be the result of phrenic
374 motoneuron depolarization.
375 In conclusion, the present study is the first to demonstrate the possibility of enhancing connectivity
376 between suprasegmental structures and PMNs by using cervical tsDCS. Although the exact
377 mechanisms underlying our findings still need to be identified, a long-lasting increase in tidal volume
378 following cathodal tsDCS is of particular interest, as this finding paves the way for therapeutic studies
379 evaluating tsDCS, either alone or in combination with drugs known to modify motoneuronal
380 excitability (Richter et al., 2003), as a means to increase ventilation in patients with dysfunctional
381 ventilatory rhythmogenesis (i.e. congenital central alveolar syndrome) or certain forms of spinal cord
382 injury.

383

384

385 **LEGENDS TO TABLES AND FIGURES:**

386 **Table 1:** Comparison of the baseline characteristics of diaphragm motor evoked potentials (DiMEPs)
387 across transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS) conditions (mean ± SE; F and P values
388 pertain to one-way repeated measures analysis of variance).

389 **Table 2:** Results of two-way repeated measures analysis of variance (F and P values) assessing the
390 effects of the "INTERVENTION" factor (3 levels: anodal, cathodal, sham tsDCS) and the "TIME" factor
391 [5 levels: before applying tsDCS (T0), during tsDCS delivery starting immediately after current onset
392 (Per1), during tsDCS delivery starting 7.5 min after current onset (Per2), immediately after current
393 offset (T1) and 15 min after current offset (T2)] on the characteristics of diaphragm motor evoked
394 potentials (DiMEPs). DiMEP AUC: area under the curve (normalized to baseline values); RMS EMG:
395 root mean square of the pre-stimulus diaphragm EMG activity.

396 **Table 3:** Results of two-way repeated measures analysis of variance (F and P values) assessing the
397 effects of the "INTERVENTION" factor (3 levels: anodal, cathodal, sham tsDCS) and the "TIME" factor
398 [2 levels: before applying tsDCS (T0) and immediately after current offset (T1)] on short-latency
399 interval intracortical inhibition (sICI) and resting motor threshold (rMT). Values in bold indicate a
400 statistically significant difference ($P < 0.05$).

401 **Table 4:** Results of two-way repeated measures analysis of variance (F and P values) assessing the
402 effects of the "INTERVENTION" factor (3 levels: anodal, cathodal, sham tsDCS) and the "TIME" factor
403 [3 levels: before applying tsDCS (T0), during tsDCS application (PER) and after current offset (T1)] for
404 breathing pattern descriptors. Values in bold indicate a statistically significant difference ($P < 0.05$).
405 Tidal volume (V_T) was normalized as percentage of baseline.

406 **Figure 1:**

Example of the diaphragm motor evoked potential (DiMEPs) stimulus-response curve obtained in one subject. The curve was fitted using the following three-parameter sigmoid function:

$$\mathrm{Di}MEP(S) = \frac{\mathrm{DiMEPmax}}{1+e^{-k(S-S_{50})}}$$

where S is the stimulus intensity, DiMEP_{MAX} the maximum MEP evoked in the diaphragm, k the slope of the function and S_{50} the stimulation intensity required to induce 50% DiMEP_{MAX}. In all electrophysiological experiments, unconditioned DiMEPs were collected at S_{50}, i.e., the intensity required to induce DiMEPs corresponding to 50% of DiMEP_{MAX} (see arrow). Complete curves were not collected in all subjects, but DiMEP_{MAX} was determined at the beginning of each experiment by increasing the TMS intensity.

Figure 2: Experimental design of the main experiment (**A**), control experiment (**B**) and breathing pattern experiment (**C**). DiMEPs: diaphragm motor evoked potentials; rMT: resting motor threshold; sICI: short-latency intracortical inhibition; tsDCS: transcutaneous spinal direct current stimulation. T0: before applying tsDCS; Per1: during stimulation from current onset to 7.5 min; Per2: during stimulation from 7.5 to 15 minutes; T1: immediately after current offset; T2: 15 min after current offset.

Figure 3: Group results illustrating mean changes in the relative area under the curve of diaphragm motor evoked potentials (DiMEP AUC) following anodal (solid black circles, continuous line), cathodal (solid grey circles, dashed grey line) and sham (open circles, continuous line) cervical transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS) with respect to baseline AUC (black dashed line). Per1: during stimulation from current onset to 7.5 min; Per2: during stimulation from 7.5 to 15 minutes; T1: immediately after current offset; T2: 15 min after current offset. Error bars denote SEM (17 subjects). Asterisks indicate significant increases in DiMEPs compared to baseline (Dunnett's multiple comparison *post hoc* tests: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

430 **Figure 4:** Mean changes in tidal volume (V_T, after normalization to baseline) following anodal (solid
431 black circles, continuous line), cathodal (solid grey circles, dashed grey line) and sham (open circles,
432 continuous line) cervical transcutaneous spinal direct current stimulation (tsDCS) with respect to
433 baseline V_T (black dashed line). T0: before applying tsDCS; PER: during tsDCS application; T1: after
434 current offset. Error bars denote SEM (12 subjects). Asterisk indicates a significant increase in V_T
435 compared to baseline (Dunnett's multiple comparison *post hoc* tests: * $P < 0.05$).

436 **REFERENCES**

437

438

439

440 Aguilar J, Pulecchi F, Dilena R, Oliviero A, Priori A, Foffani G (2011) Spinal direct current stimulation
441 modulates the activity of gracile nucleus and primary somatosensory cortex in anaesthetized rats J
442 Physiol (Lond) 589:4981-4996.

443 Ahmed Z (2011) Trans-spinal direct current stimulation modulates motor cortex-induced muscle
444 contraction in mice. J Appl Physiol 110:1414-1424.

445 Ahmed Z (2013) Effects of Cathodal Trans-Spinal Direct Current Stimulation on Mouse Spinal Network
446 and Complex Multijoint Movements. J Neurosci 33:14949-14957.

447 Ahmed Z, Wieraszko A (2012) Trans-spinal direct current enhances corticospinal output and
448 stimulation-evoked release of glutamate analog, D-2,3-H-3-aspartic acid. J Appl Physiol 112:1576-
449 1592.

450 Alanis J (1953) Effects of direct current on motor neurones. J Physiol 120:569-578.

451 Ardolino G, Bossi B, Barbieri S, Priori A (2005) Non-synaptic mechanisms underlie the after-effects of
452 cathodal transcutaneous direct current stimulation of the human brain. J Physiol (Lond)568:653-663.

453 Azabou E, Roche N, Sharshar T, Bussel B, Lofaso F, Petitjean M (2013) Transcranial direct-current
454 stimulation reduced the excitability of diaphragmatic corticospinal pathways whatever the polarity
455 used. Respir Physiol Neurobiol 189:183-187.

456 Batsikadze G, Moliadze V, Paulus W, Kuo MF, Nitsche MA (2013) Partially non-linear stimulation
457 intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. J
458 Physiol (Lond) 591:1987-2000.

459 Bendixen HH, Smith GM, Mead J (1964) Pattern of ventilation in young adults. J Appl Physiol 19:195-
460 198.

461 Berger AJ (1979) Phrenic moto-neurons in the cat - sub-populations and nature of respiratory drive
462 potentials. J Neurophysiol 42:76-90.

463 Chitravanshi VC, Sapru HN (1996) NMDA as well as non-NMDA receptors mediate the
464 neurotransmission of inspiratory drive to phrenic motoneurons in the adult rat. Brain Res 715:104-
465 112.

466 Cogiamanian F, Ardolino G, Vergari M, Ferrucci R, Ciocca M, Scelzo E, Barbieri S, Priori A (2012)
467 Transcutaneous spinal direct current stimulation. Front Psychiatry 3:63.

468 Cogiamanian F, Vergari M, Pulecchi F, Marceglia S, Priori A (2008) Effect of spinal transcutaneous
469 direct current stimulation on somatosensory evoked potentials in humans. Clin Neurophysiol
470 119:2636-2640.

471 Cogiamanian F, Vergari M, Schiaffi E, Marceglia S, Ardolino G, Barbieri S, Priori A (2011)
472 Transcutaneous spinal cord direct current stimulation inhibits the lower limb nociceptive flexion
473 reflex in human beings. Pain 152:370-375.

474 Dale-Nagle EA, Hoffman MS, MacFarlane PM, Satriotomo L, Lovett-Barr MR, Vinit S, Mitchell GS
475 (2010) Spinal plasticity following intermittent hypoxia: implications for spinal injury. In: Neurons and

476 Networks in the Spinal Cord (Ziiskind-Conhaim L, Fetcho JR, Hochman S, MacDermott AB, Stein PSG,
477 eds), pp 252-259.

478 Davey NJ, Murphy K, Maskill DW, Guz A, Ellaway PH (1996) Site of facilitation of diaphragm EMG to
479 corticospinal stimulation during inspiration. Respir Physiol 106:127-135.

480 Del Negro C, Morgado-Valle C, Feldman J (2002) Respiratory rhythm: An emergent network
481 property? Neuron 34:821-830.

482 Demoule A, Verin E, Le Locher C, Derenne JP, Similowski T (2003a) Validation of surface recordings of
483 the diaphragm response to transcranial magnetic stimulation in humans. J Appl Physiol 94:453-461.

484 Demoule A, Verin E, Montcel ST, Similowski T (2008) Short-term training-dependent plasticity of the
485 corticospinal diaphragm control in normal humans. Respir Physiol Neurobiol 160:172-180.

486 Demoule A, Verin E, Ross E, Moxham J, Derenne JP, Polkey MI, Similowski T (2003b) Intracortical
487 inhibition and facilitation of the response of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation. J
488 Clin Neurophysiol 20:59-64.

489 Di Lazzaro V, Oliviero A, Profice P, Saturno E, Pilato F, Insola A, Mazzone P, Tonali P, Rothwell JC
490 (1998) Comparison of descending volleys evoked by transcranial magnetic and electric stimulation in
491 conscious humans. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 109:397-401.

492 Duffin J, Tian G, Peever J (2000) Functional synaptic connections among respiratory neurons. Respir
493 Physiol 122:237–246.

494 Fedorko L, Merrill EG, Lipski J (1983) Two descending medullary inspiratory pathways to phrenic
495 motoneurones. Neurosci lett 43:285-291.

496 Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. Annu
497 Rev Neurosci 26:239-266.

498 Fiamma M, Samara Z, Baconnier P, Similowski T, Straus C (2007) Respiratory inductive
499 plethysmography to assess respiratory variability and complexity in humans. Respir Physiol Neurobiol
500 156:234-239.

501 Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS (2000) Long term facilitation of phrenic motor
502 output. Respir Physiol 121:135-146

503 Golder FJ (2009) Spinal NMDA receptor activation is necessary for de novo, but not the maintenance
504 of, A2a receptor-mediated phrenic motor facilitation. J Appl Physiol 107:217-223.

505 Henneman E, Somjen G, Carpenter DO (1965) Functional significance of cell size in spinal
506 motoneurons. J Neurophysiol 28:560-580.

507 Hess A, Yu L, Klein I, De Mazancourt M, Jebrak G, Mal H, Brugiere O, Fournier M, Courbage M, Dauriat
508 G, Schouman-Clayes E, Clerici C, Mangin L (2013) Neural Mechanisms Underlying Breathing
509 Complexity. Plos One 8.

510 Johnson RA, Mitchell GS (2013) Common mechanisms of compensatory respiratory plasticity in spinal
511 neurological disorders. Respir Physiol Neurobiol 189:419-428.

512 Kong FJ, Berger AJ (1986) Firing properties and hypercapnic responses of single phrenic motor axons
513 in the rat. J Appl Physiol 61:1999-2004.

514 Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden
515 CD (1993) Corticocortical inhibition in human motor cortex. J Physiol (Lond) 471:501-519.

516 Lamy JC, Ho C, Badel A, Arrigo RT, Boakye M (2012) Modulation of soleus H reflex by spinal DC
517 stimulation in humans. J Neurophysiol 108:906-914.

518 Laviolette L, Nierat M-C, Hudson AL, Raux M, Allard E, Similowski T (2013) The Supplementary Motor
519 Area Exerts a Tonic Excitatory Influence on Corticospinal Projections to Phrenic Motoneurons in
520 Awake Humans. Plos One 8.

521 Lee KZ, Fuller DD (2011) Neural control of phrenic motoneuron discharge. Respir Physiol Neurobiol
522 179:71-79.

523 Lee KZ, Reier PJ, Fuller DD (2009) Phrenic Motoneuron Discharge Patterns During Hypoxia-Induced
524 Short-Term Potentiation in Rats. J Neurophysiol 102:2184-2193.

525 Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W (2002) Pharmacological approach to the mechanisms of
526 transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. Brain 125:2238-
527 2247.

528 Lim C-Y, Shin H-I (2011) Noninvasive DC stimulation on neck changes MEP. Neuroreport 22:819-823.

529 Mangin L, Fiamma M, Straus C, Derenne J, Zelter M, Clerici C, Similowski T (2008) Source of human
530 ventilatory chaos: Lessons from switching controlled mechanical ventilation to inspiratory pressure
531 support in critically ill patients. Respir Physiol Neurobiol 161:189-196.

532 Mateika JH, Syed Z (2013) Intermittent hypoxia, respiratory plasticity and sleep apnea in humans:
533 Present knowledge and future investigations. Respir Physiol Neurobiol 188:289-300.

534 McCrimmon DR, Smith JC, Feldman JL (1989) Involvement of excitatory amino-acids in
535 neurotransmission of inspiratory drive to spinal respiratory motoneurons. J Neurosci 9:1910-1921.

536 McGuire M, Liu C, Cao Y, Ling LM (2008) Formation and maintenance of ventilatory long-term
537 facilitation require NMDA but not non-NMDA receptors in awake rats. J Appl Physiol 105:942-950.

538 Mehiri S, Straus C, Arnulf I, Attali V, Zelter M, Derenne JP, Similowski T (2006b) Responses of the
539 diaphragm to transcranial magnetic stimulation during wake and sleep in humans. Respir Physiol
540 Neurobiol 154:406-418.

541 Merrill EG, Fedorko L (1984) Monosynaptic inhibition of phrenic motoneurons: a long descending
542 projection from Bötzinger neurons. J Neurosci 4:2350-2353.

543 Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA, Bavis RW, Mack KJ, Olson EB
544 (2001) Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia: Invited review: Intermittent
545 hypoxia and respiratory plasticity. J Appl Physiol 90:2466-2475.

546 Mitchell GS, Johnson SM (2003) Plasticity in respiratory motor control - Invited review:
547 Neuroplasticity in respiratory motor control. J Appl Physiol 94:358-374.

548 Mitchell GS, Terada J (2011) Should we standardize protocols and preparations used to study
549 respiratory plasticity? Respir Physiol Neurobiol 177:93-97.

550 Murphy K, Mier A, Adams L, Guz A (1990) Putative cerebral cortical involvement in the ventilatory
551 response to inhaled CO2 in conscious man. J Physiol (Lond) 420:1-18.

552 Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, Henning S, Tergau F, Paulus W
553 (2003) Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct
554 current stimulation in humans. J Physiol (Lond) 553:293-301.

555 Nitsche MA, Paulus W (2000) Excitability changes induced in the human motor cortex by weak
556 transcranial direct current stimulation. J Physiol (Lond) 527:633-639.

557 Nitsche MA, Seeber A, Frommann K, Mein CC, Rochford C, Nitsche MS, Fricke K, Liebetanz D, Lang N,
558 Antal A, Paulus W, Tergau F (2005) Modulating parameters of excitability during and after
559 transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. J Physiol (Lond) 568:291-303.

560 Poon CS, Barahona M (2001) Titration of chaos with added noise. Proc Natl Acad Sci USA 98:7107-
561 7112.

562 Raux M, Xie H, Similowski T, Koski L (2010) Facilitatory conditioning of the supplementary motor area
563 in humans enhances the corticophrenic responsiveness to transcranial magnetic stimulation. J Appl
564 Physiol 108:39-46.

565 Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000) Synaptic central of motoneuronal
566 excitability. Physiol Rev 80:767-852.

567 Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003) Serotonin receptors: guardians of stable
568 breathing. Trends Mol Med 9:542-548.

569 Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Kujirai T (2009) Short latency intracortical inhibition: one of the
570 most popular tools in human motor neurophysiology. J Physiol (Lond) 587:11-12.

571 Roulin E, Freitas US, Letellier C (2011) Working conditions for safe detection of nonlinearity and noise
572 titration. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2011 Apr;83(4 Pt 2):046225. Epub 2011 Apr 29.

573 Saboisky J, Gorman R, De Troyer A, Gandevia S, Butler J (2007a) Differential activation among five
574 human inspiratory motoneuron pools during tidal breathing. J Appl Physiol 102:772-780.

575 Schmidt M, Demoule A, Cracco C, Gharbi A, Fiamma M, Straus C, Duguet A, Gottfried S, Similowski T
576 (2010) Neurally Adjusted Ventilatory Assist Increases Respiratory Variability and Complexity in Acute
577 Respiratory Failure. Anesthesiology 112:670-681.

578 Sharshar T, Ross ET, Hopkinson NS, Porcher R, Nickol AH, Jonville S, Dayer MJ, Hart N, Moxham J,
579 Lofaso F, Polkey MI (2004) Depression of diaphragm motor cortex excitability during mechanical
580 ventilation. J Appl Physiol 97:3-10.

581 Similowski T, Straus C, Coïc L, Derenne JP (1996a) Facilitation-independent response of the
582 diaphragm to cortical magnetic stimulation. Am J Respir Crit Care Med 154:1771-1777.

583 Stagg CJ, Nitsche MA (2011) Physiological Basis of Transcranial Direct Current Stimulation.
584 Neuroscientist 17:37-53.

585 Stinear CM, Byblow WD (2004) Elevated threshold for intracortical inhibition in focal hand dystonia.
586 Mov Disord 19:1312-1317.

587 Straus C, Locher C, Zelter M, Derenne JP, Similowski T (2004) Facilitation of the diaphragm response
588 to transcranial magnetic stimulation by increases in human respiratory drive. J Appl Physiol 97:902-
589 912.

590 Straus C, Samara Z, Fiamma MN, Bautin N, Ranohavimparany A, Le Coz P, Golmard JL, Darré P, Zelter
591 M, Poon CS, Similowski T (2011) Effects of maturation and acidosis on the chaos-like complexity of
592 the neural respiratory output in the isolated brainstem of the tadpole, Rana esculenta. Am J Physiol
593 Regul Integr Comp Physiol 300:R1163-1174.

594 Truini A, Vergari M, Biasiotta A, La Cesa S, Gabriele M, Di Stefano G, Cambieri C, Cruccu G, Inghilleri
595 M, Priori A (2011) Transcutaneous spinal direct current stimulation inhibits nociceptive spinal
596 pathway conduction and increases pain tolerance in humans. Eur J Pain 15:1023-1027.

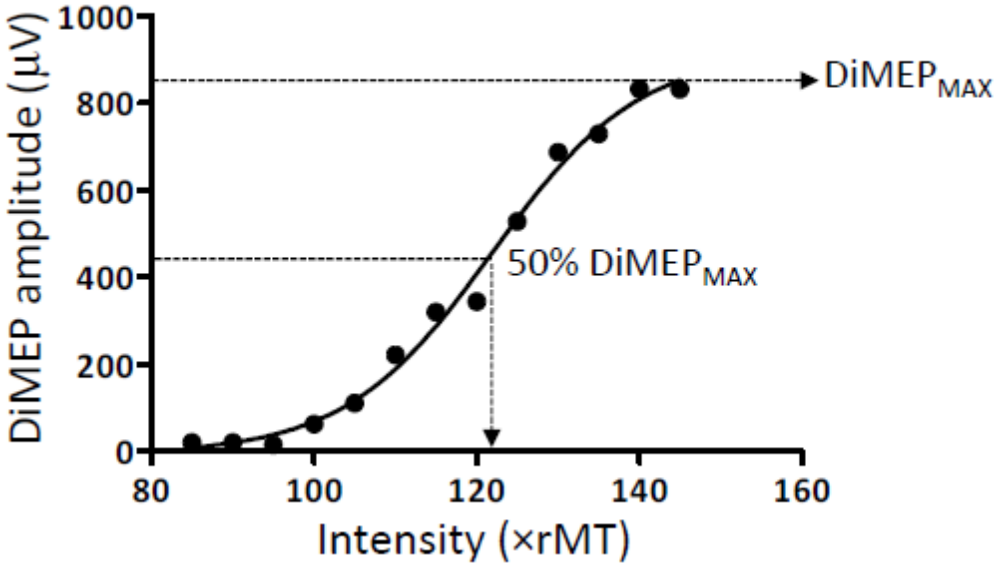
597 Verin E, Marie JP, Similowski T (2011) Cartography of human diaphragmatic innervation: preliminary
598 data. Respir Physiol Neurobiol 176:68-71.

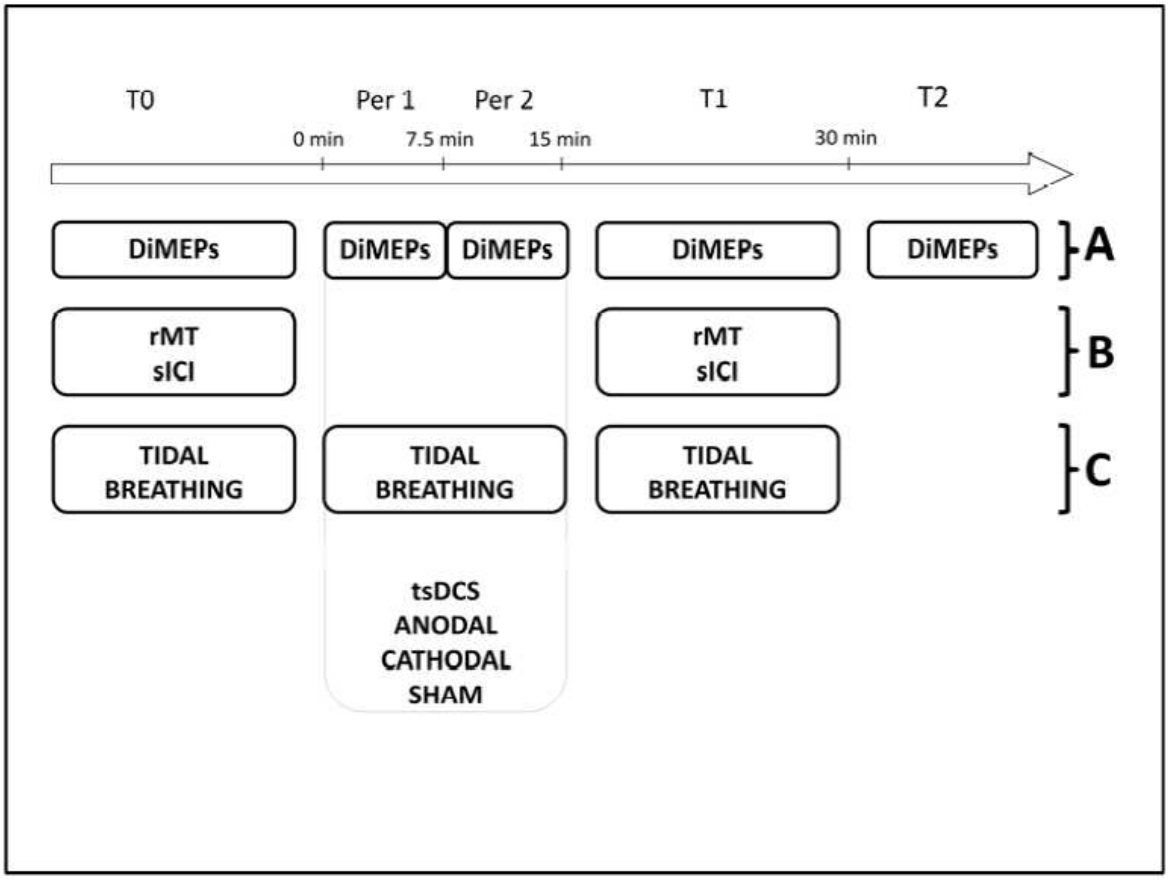
599 Winkler T, Hering P, Straube A (2010) Spinal DC stimulation in humans modulates post-activation
600 depression of the H-reflex depending on current polarity. Clin Neurophysiol 121:957-961.

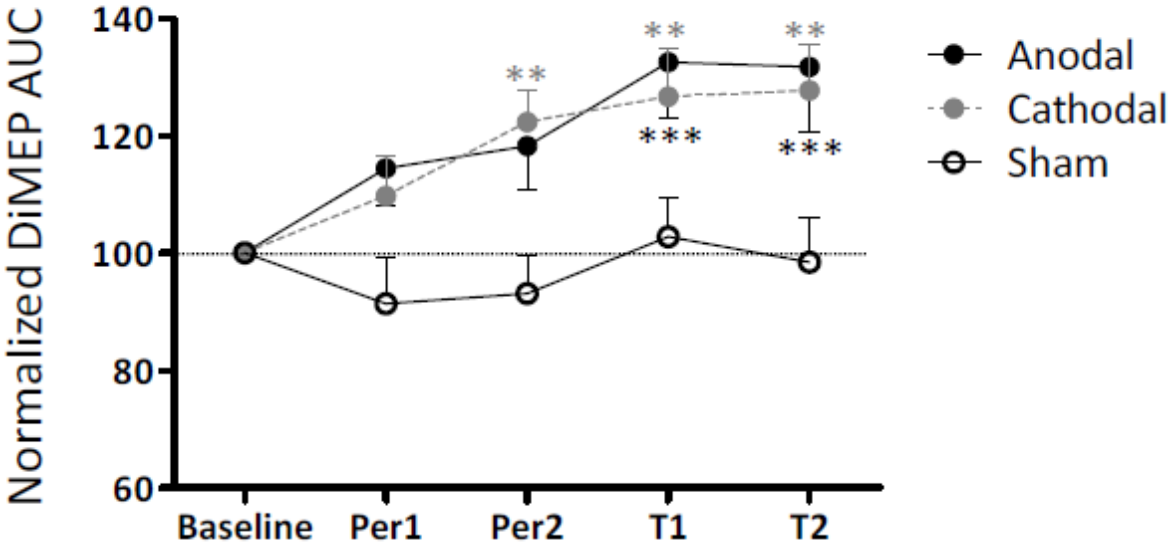
601 Wolpaw JR, Carp JS (2006) Plasticity from muscle to brain. Prog Neurobiol 78:233-263.

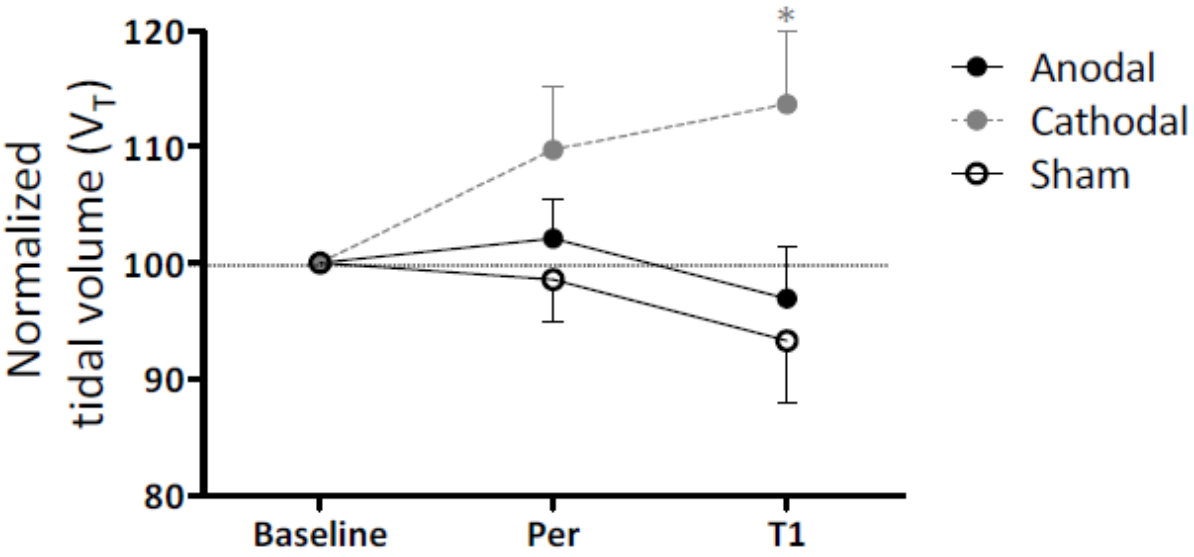
602 Wysocki M, Fiamma MN, Straus C, Poon C, Similowski T (2006) Chaotic dynamics of resting
603 ventilatory flow in humans assessed through noise titration. Respir Physiol Neurobiol 153:54-65.

604


DiMEP amplitude (µV)
1000
800
600
400
200
0
80
100
120
140
160
Intensity (×rMT)
DiMEP$_{MAX}$
50% DiMEP$_{MAX}$


T0
Per 1
Per 2
T1
T2
0 min
7.5 min
15 min
30 min
DiMEPs
DiMEPs
DiMEPs
DiMEPs
DiMEPs
A
rMT
sICI
rMT
sICI
B
TIDAL
BREATHING
TIDAL
BREATHING
TIDAL
BREATHING
C
tsDCS
ANODAL
CATHODAL
SHAM


Normalized DiMEP AUC
140
120
100
80
60
Baseline
Per1
Per2
T1
T2
**
**
**
***
***
Anodal
Cathodal
Sham


Normalized tidal volume (V_T)
120
110
100
90
80
Baseline
Per
T1
*
Anodal
Cathodal
Sham

	Anodal	Cathodal	Sham	$F_{2,50}$ value	P value
rMT (%MSO)	50.65 ± 2.79	52.24 ± 2.42	51.82 ± 2.67	1.234	0.305
TMS intensity (%MSO)	58.12 ± 2.8	59.24 ± 2.66	58.88 ± 3	0.662	0.523
AUC (µV.ms)	1.09 ± 0.19	1.51 ± 0.28	1.23 ± 0.17	1.198	0.315
Latency (ms)	15.85 ± 0.29	15.84 ± 0.32	15.89 ± 0.29	0.0462	0.955
Prestimulus RMS EMG	6.01 ± 0.25	6.19 ± 0.2	6.54 ± 0.18	1.696	0.199

TABLE 1

	INTERVENTION		TIME		INTERACTION	
	$F_{2,32}$ value	P value	$F_{4,64}$ value	P value	$F_{8,128}$ value	P value
Normalized AUC	6.193	**0.005**	6.423	**<0,001**	2.102	**0.04**
Latency	0.462	0.634	1.392	0.247	1.612	0.127
Prestimulus RMS EMG	1.093	0.347	1.5	0.213	0.377	0.931

TABLE 2

	INTERVENTION		TIME		INTERACTION	
	$F_{2.12}$ value	P value	$F_{1.6}$ value	P value	$F_{2.41}$ value	P value
sICI	1.265	0.317	2.491	0.166	0.224	0.803
rMT	1.859	**0.198**	26.708	**0.002**	4.453	**0.036**

TABLE 3

	INTERVENTION		TIME		INTERACTION	
	F value	P value	F value	P value	F value	P value
Normalized tidal volume V_T	$F_{2,22} = 3.48$	**0.049**	$F_{2,22} = 1.021$	0.377	$F_{4,107} = 2.902$	**0.032**
Inspiratory time T_i (s)	$F_{2,22} = 0.661$	0.526	$F_{2,22} = 2.593$	0.097	$F_{4,107} = 1.216$	0.318
Total respiratory cycle time T_t (s)	$F_{2,22} = 0.874$	0.431	$F_{2,22} = 2.519$	0.103	$F_{4,107} = 0.966$	0.436
Frequency f	$F_{2,22} = 1.820$	0.186	$F_{2,22} = 2.926$	0.075	$F_{4,107} = 0.729$	0.577
Normalized V_T/T_i	$F_{2,22} = 0.413$	0.666	$F_{2,22} = 1.039$	0.370	$F_{4,107} = 0.566$	0.688
Noise limit	$F_{2,16} = 0.26$	0.774	$F_{2,16} = 0.282$	0.758	$F_{4,80} = 0.506$	0.732

TABLE 4

Commentaires des Reviewers

Reviewer #1 :

The current study is interesting. The study shows a novel use of tsDCS (modulation of the respiratory system). This has potential in clinical practice. However, the study lacks many details. The concepts (framework), manuscript organization, and results' interpretation need to be thoroughly worked out. One major problem is the tsDCS electrode placement, which can have a significant effect on the cervical nerves, and muscles (see below for details). This should be recognized in data interpretation.

Detailed comments:

Title:

It should include the term trans-spinal DC stimulation for consistency. In addition, authors did not directly test the synaptic inputs to phrenic motor neurons. The study cannot exclusively conclude that synaptic inputs are the only change. So, this title must be modified to reflect what was exactly tested and fairly concluded.

Abstract

The conclusion in the abstract "This form of artificially enhanced synaptic input to PMNs can therefore result in polarity-dependent breathing pattern changes" implies that Cortico-spinal enhancement is the mechanism for tidal volume enhancement. This is not justified and needs to be corrected.

The term "ventilatory chaos" needs to be clearly defined early on in the manuscript to facilitate readability.

Also, the last statement in the abstract needs to be better formulated to focus only of tsDCS induced respiratory plasticity. The statement "central ventilator command" is not appropriate. MEP does not represent a central command.

Introduction

Large part of the introduction is spent on respiratory mechanisms (almost the whole first paragraph). The purpose of this section is to show that the system is plastic and synaptic inputs to PMN is the main mechanism underlining this plasticity. I think this message can be

concisely mentioned. This paragraph should be reduced. Similarly, the next section in the introduction from line 85 to 91 serves the same purpose. However, the noninvasive techniques are not strongly related to tsDCS. For example, the authors wrote the following "corticophrenic excitability can be altered using noninvasive brain stimulation protocols" then they site a study by Raux et al., 2010. This statement is not correct since the study by Raux et al, tested the connection between the SMA and M1. These experiments showed that TMS stimulation of SMA would strengthen SMA to M1 connections, which affected M1 to spinal cord connections. The level of enhancement was at the level of the cortex and not at the level

of the spinal cord as your introduction implies.

I suggest that the introduction be focused on tsDCS mechanism and background. Authors should also add a section about their hypothesis and its justification.

Page 4, lines 96 to 99, in the view of new studies (Ahmed, 2014 J. Neurosci, and Parazzini etal., in press Clinical Neurophysiology), the tsDCS protocol should be critically analyzed. The electrode placement, in my opinion, would be one of the study's major weaknesses. As these new studies showed, tsDCS can have significant effects on axonal excitability, which can change spinal output. The authors should change their interpretation of the data in a way that encompasses the understanding that spinal nerves probably are an important factor in their results. Placing the reference electrode on the front of the neck can cause changes in the cervical nerves. Some of these nerves are somatic (phrenic nerve) and some are autonomic (e.g. vagus nerves). Vagus nerve stimulation by tsDCS would have direct (tidal volume), or indirect (cortical excitability) on the respiratory system. Also in the neck are the sympathetic ganglions, which would also have an effect on the results. Also, placing

the reference electrode on the neck would affect smooth muscles on the trachea that may be produce unknown change. So, the protocol by Lim and Shin (2011) did not really consider all these factors. This may explain why they did not see polarity dependent effects as shown in all other studies. The authors of the current study need to show control experiments for the above-mentioned factors. One important measurement is to test for autonomic changes using for example galvanic skin response or heart rate or other methods.

Another important control study would be to test what happen if you place only the reference electrode on the front of the neck and no spinal electrode (put it somewhere on the body that not significant). Would that cause the same effects as reported in the current manuscript?

Methods

There is something missing in the following statement: "Experiments were performed on twenty two healthy participants, naïve to DC stimulation protocols, with no history of pulmonary or neuromuscular disease (13 females, aged 21 to 45, mean age {plus minus} SD: 28.26 {plus minus} 6.6 yr)."

Authors should show raw data (traces) to support the following statement: "As the diaphragm is the only muscle of which the contraction increases abdominal circumference, EMG responses to TMS were considered to have a diaphragmatic origin if and only if they were concomitant to such an increase."

Give the dimensional measurements of tsDCS electrode (width and length?). How its arranged on the skin relative to the spinal column.

Page 7, line 164, 90 seconds is a long duration for sham stimulation. This can cause a long-term change in nerves' excitability.

In page, line 172 and 173, please clarify this statement: "about forty DiMEPs were collected at five time-points" those 40 MEPs were collected in each time point or in all time points. You have 5 time points so it may be 8 MEPs in each set. What was the frequency of TMS during the production of these MEPs?

There is something missing in this statement: "Each subject participated in three sessions (anodal, cathodal and sham), with an interval of at least 3 days between two consecutive sessions." Authors have tested three parameters in three experiments (anodal, cathodal, and sham). But, they performed three experiments based on tests (A, B, and C). This is 3x3 design would make each subject (or some of the subjects) to participate in at least six experiments. Please clarify.

Results:

Please explain how tidal volume would change but not inspiratory time. This may be an indication of a change in the expiratory time. To change the tidal volume one of those times has to change. If expiratory time changed then the total respiratory cycle time has to change (which was not according to your experiments). There is something missing here. Please explain.

Discussion

Page 11, line 280 to 289, this whole argument is not justified. The authors are comparing two

different stimulation procedures (tsDCS versus tDCS). While tsDCS causes changes at the level of the spinal cord, tDCS causes changes at the level of the cortex. This comparison implies that the two techniques should cause the same effects. This not valid; please remove this argument.

Page 12, line 312, the authors stated: "a long-term increase in phrenic motor output may also involve strengthening of excitatory connections to PMN, which would ultimately result in enhanced DiMEPs." But also disinhibition of the respiratory center at the medulla can cause an enhanced as well.

The current understanding for the neural regulation of QUITE respiration is as follow:

The dorsal respiratory neurons (nucleus of the tractus solitarius) in the medulla controls inspiration and respiration rhythm. This group of neurons receives sensory inputs from the vagus and glossopharyngeal nerves. These sensory inputs are from chemoreceptors, baroreceptors and other receptors in the lungs (all these receptors can be affected by the front of the neck electrode).

The basic rhythm occurs as a form of a ramp of PMN activity. This activity ramp is initiated by the dorsal respiratory neurons in the medulla. The pneumotaxic center in the pons controls the ramp duration. Input from the pneumotaxic center would shorten the time of inspiration, therefore reducing the tidal volume. To lengthen the ramp duration and increase tidal volume you need to inhibit the pneumotaxic center. This would be accompanied by reduction in respiratory rate (cycle). Both inspiration and expiration time have to increase to cause a change in the tidal volume.

In quite respiration, the motor cortex has no role -as far as I know. Motor cortex plays a major role in voluntary respiration and during exercises.

The authors suggest that an increase in excitability of PMN at the spinal cord would be the main mechanism for the phenomenon they observed. I agree with their analogy however, other factors (not tested) can cause the similar changes (see above).

The vagus nerve stimulation can have direct effect on the respiration (see above) or indirect through cortical or subcortical connections. Vagus nerve stimulation causes activation of the nucleus of the solitary tract and its projections to the locus coeruleus and raphe nucleus (Henry 2002; Neurology). Vagus nerve stimulation has direct effects on motor cortex plasticity (Porter et al., 2012; cerebral cortex). I understand that the authors measured sICI and ventilatory chaos to rule out changes in the cortex or brain stem. However, these measures are not exclusive.

I believe that the tsDCS electrode arrangement used in the current study complicated the interpretation of the study. However, I believe the results are interesting.

Figures

Authors should combine figure 1 and two in one figure.

Also, they should combine figure 3 and 4 and add MEP and tidal volume traces of before, during, and after tsDCS.

Reviewer #2 :

In this interesting and timely study, the authors explore the impact of spinal DC stimulation on phrenic excitability, and breathing actions, and aim to identify the origin of the respective effects. The results show that stimulation with both polarities enhances phrenic excitability, and cathodal DC stimulation increases tidal volume. Intracortical excitability of the primary motor cortex, and ventilatory chaos were not altered by stimulation, arguing against a cortical or brainstem origin of the effects. The results of this study are important, because they show neuroplasticity in the human spinal cord. They show furthermore that alterations of excitability have functional effects, and the results might have future clinical implications. The experimental design is straightforward, and the paper is well written. Some issues remain to be resolved.

Major

1. Methods, experimental design: It is a pity that the after-effects were obtained only for 15 min, since the effects were still visible at this time point, and the usual critical timing for LTP-like plasticity are after-effects of at least 30 min duration. This should be mentioned as a limitation.

2. Methods, statistics: It would be important to compare sham and real DC conditions at single time points directly via post hoc tests for all variables, because this is the most direct proof for DC-specific effects.

Minor

1. Methods, page 6, TMS, and elsewhere: For SICI determination, can it be ruled out that the relatively large baseline inhibition resulted in a ceiling effect? Moreover, 7 subjects is a very small number which might not suffice to identify minor effects. This should be mentioned as a

limitation.

2. Methods, page 6, line 156: was "rubber bands", not pads, meant?

3. Methods, page 7, DC stimulation: please supply the reader with the average of interval duration between sessions.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La commande ventilatoire, qui est complexe et finement régulée, fait preuve d'une adaptabilité importante en réponse à de multiples stimulus endogènes (homéostasie) ou exogènes (comportement). Parallèlement à cette adaptabilité immédiate, des mécanismes de plasticité ventilatoire à long terme permettent l'émergence d'adaptations persistantes. L'une des expressions de cette plasticité est l'augmentation de l'activité ventilatoire en réponse par exemple à un stimulus hypoxique ou à un apprentissage. Les mécanismes de cette vLTF sont divers et prennent place à différents niveaux de la commande ventilatoire.

Les travaux présentés dans cette thèse montrent que les techniques non invasives d'induction de plasticité qui sont disponibles chez l'humain (rTMS, tsDCS) peuvent induire des mécanismes de type plasticité ventilatoire à long terme (études n°1, 2, 3). Cette plasticité s'exprime par une excitabilité accrue de la voie corticophrénique (études n°1 et 3) ainsi que par des modifications du profil ventilatoire au repos (étude n°3) ou lors de la compensation de contrainte inspiratoire (étude n°2). Ces modifications pourrait avoir comme source l'AMS (études n°1 et 2) ou l'étage médullaire (étude n°3).

Ces résultats sont interprétés en termes de compréhension du rôle de l'AMS dans le contrôle de la ventilation et de mécanismes de la plasticité au niveau des motoneurones phréniques. Ils justifient de poursuivre les recherches en vue de l'utilisation thérapeutique de ces techniques non-invasives dans le cadre de la plasticité ventilatoire, associées ou non à des traitements pharmacologiques.

DISCUSSION MÉTHODOLOGIQUE

1. Limites des techniques d'induction de plasticité

1.1 Stimulation répétitive transcrânienne

1.1.1 Résolution spatiale

La résolution spatiale de la TMS n'étant pas très élevée, les risques de diffusion du courant à des aires adjacentes ne peuvent être négligés. Pour réduire cette limitation inhérente à la technique, nous avons réalisé les études en prenant plusieurs précautions.

Le positionnement de la sonde de stimulation en regard de l'AMS (étude n°1 et 2) a été réalisé à l'aide d'un système de neuronavigation, calé sur l'IRM anatomique de chaque sujets. A partir de l'IRM, une validation a posteriori de la position du point de stimulation rTMS par rapport à la localisation de l'AMS a été faite en retraçant la ligne AC-PC (cf. État

de la question, Chapitre 1, paragraphe 3.3.2.2 Aire motrice supplémentaire). Cette analyse a permis de valider le bon positionnement de la sonde lors de la stimulation chez tous les sujets.

L'utilisation d'une sonde en huit a permis de délivrer un champ magnétique sur une zone assez focale. De plus, l'intensité du champ magnétique délivré diminue en fonction du carré de la distance au centre de la sonde (Thielscher et Kammer, 2002). Ainsi, une diffusion du courant affectant directement la représentation du diaphragme au sein de l'aire motrice primaire (M1) est peu probable puisque le point sur le scalp correspondant à l'AMS est situé environ 3cm en avant du vertex (Terao *et al.* 2001 ; Serrien *et al.* 2002 ; Verwey *et al.* 2002 ; Matsunaga *et al.*, 2005 ; Raux *et al.*, 2010).

Les risques de diffusion ont aussi été diminués en utilisant de faibles intensités de stimulation. Dans les études n°1 et 2, l'intensité de la rTMS a été fixée en fonction de l'aMT d'un muscle du doigt (80% pour le protocole cTBS, 110% rTMS à 5Hz) et non du diaphragme, qui a un seuil moteur plus élevé (Brouwer *et al.*, 1990 ; Similowski *et al.*, 1996b). Avec des intensités similaires (110% aMT d'un muscle du doigt) voire supérieures (110% du rMT du doigt), une étude précédente portant sur le conditionnement de l'AMS n'a pas mis en évidence de diffusion du courant au cortex moteur primaire (Raux *et al.*, 2010). Nous sommes donc assez confiants sur la focalité du champ délivré.

1.1.2 Variabilité des effets

1.1.2.1. Selon les sujets

Les études portant sur les effets des protocoles inhibiteurs (cTBS et 1Hz) ou facilitateurs (20Hz) sur l'excitabilité corticospinale indiquent qu'il existe une grande variabilité des réponses entre les sujets (Gangitano *et al.*, 2002 ; Huang *et al.,* 2005 ; Martin *et al.*, 2006 ; McAllister *et al.*, 2011 ; Goldsworthy *et al.,* 2012 ; Hamada *et al.,* 2013 ; Vernet *et al.,* 2013). Plusieurs facteurs peuvent y contribuer.

La facilitation induite par un protocole rTMS à 5Hz est augmentée si les sujets portent leur attention sur les muscles impliqués dans les mécanismes de plasticité sans que l'excitabilité intracorticale ne soit affectée (Conte *et al.*, 2008).

Chez la femme, les variations hormonales au cours du cycle ovarien modifient l'excitabilité intracorticale évaluée par des protocoles en double choc (Smith *et al.*, 2002). De la même façon, la plasticité induite par les protocoles rTMS est favorisée lorsque le taux d'œstradiol est élevé (Inghilleri *et al.*, 2004).

Des variations de l'excitabilité corticospinale en fonction du moment de la journée sont rapportées avec un protocole permettant l'induction de plasticité (*paired associative*

stimulation). Ces modulations sont mises en relation avec les niveaux de cortisol circulants (Sale *et al.*, 2008). Cependant, une étude en TMS montre que le moment de la journée n'influence ni l'excitabilité corticospinale ni l'excitabilité intracorticale (Doeltgen et Ridding, 2010).

Des variations génétiques structurelles ou fonctionnelles, impliquant le gène du BDNF par exemple, peuvent également contribuer à la variabilité individuelle de la réponse (pour revue, Cheeran *et al.*, 2009). A cet égard, une étude montre que les effets de la tsDCS sont directement influencés par le polymorphisme du BDNF (Lamy *et al.*, 2013).

Bien que ces différents facteurs de variations inter ou intra-individuelles n'ont pas tous été parfaitement contrôlés au cours des expérimentations, lors de l'étude n°1, la diminution des PEM du diaphragme suite au protocole cTBS est notée chez 80%, 100% et 70% des sujets, respectivement à Post 1, Post 2 et Post 3 et une augmentation après la rTMS à 5Hz est présente chez 89% des sujets à Post3. Dans l'étude n°2, le Ti/T_T est diminué chez 5 puis 6 sujets sur 7 respectivement à post 2 et post 3 suite aux deux protocoles.

1.1.2.2. Selon les protocoles et leurs caractéristiques

Les protocoles en cTBS (600 impulsions) (Huang *et al.*, 2005) présentent l'avantage d'induire une inhibition de l'excitabilité corticospinale un peu plus importante qu'un protocole 1Hz (110%aMT du doigt, 900 stimulus) (Di Lazzaro *et al.,* 2011). Ceci participe peut être de la différence des résultats de l'étude n°1 avec ceux de Raux et collaborateurs (2010). Alors que ces deux études reposent sur le même schéma expérimental (sonde et localisation de l'AMS similaires) ces auteurs ne mettent pas en évidence de dépression statistiquement significative de l'excitabilité corticospinale suite à un protocole 1Hz à 110% de l'aMT ou du rMT d'un muscle du doigt (FDI).

Les effets des protocoles rTMS en patron sur l'excitabilité corticospinale sont complexes. Cette caractéristique s'exprime notamment lorsque ces protocoles sont utilisés en association avec des mouvements volontaires. Huang et collaborateurs (2005) posent l'hypothèse que la iTBS et la cTBS pourraient induire des effets mixtes facilitateurs et inhibiteurs ; pour la cTBS les effets inhibiteurs de l'excitabilité corticospinale deviendraient progressivement prépondérants sur les effets facilitateurs. Ceci pourrait expliquer les importantes divergences relevées dans la littérature quant aux effets des différents protocoles de rTMS sur l'excitabilité corticospinale et les modifications du comportement (pour revues, Siebner et Rothwell, 2003 ; Chouinard et Paus, 2010 ; Fang *et al.*, 2010). L'induction de plasticité par des protocoles en rTMS et notamment en cTBS est très sensible à l'historique d'activation des réseaux synaptiques et à la contraction phasique ou tonique du muscle cible immédiatement après l'application de la stimulation (Iezzi *et al.,* 2008 ; Huang *et*

al., 2008). L'activation des aires corticales en agissant par des mécanismes de métaplasticité peut ainsi inverser les effets inhibiteurs de la cTBS (Iezzi *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2008). Une hypothèse pour expliquer les moindres effets du protocole cTBS sur le profil ventilatoire en charge par rapport au protocole facilitateur (étude n°2) serait la sensibilité de ce type de protocole aux phénomènes de métaplasticité.
L'activation de l'AMS juste après le conditionnement serait alors la cause d'un amoindrissement des effets de la cTBS en ventilation contrainte.

1.1.3 « Effet réseau »

Les effets de la TBS comme ceux de la rTMS conventionnelle doivent être interprétés en termes de modification locale de l'excitabilité de la zone corticale située sous la sonde de stimulation mais aussi de plasticité de zones ou d'aires fonctionnellement interconnectées. Ces effets sont sous-tendus par un mécanisme appelé « effet réseau » (Münchau *et al.*, 2002 ; Lefaucheur, 2009). La plasticité induite concerne donc les connexions synaptiques cortico-corticales dans lesquels l'aire ciblée est impliquée (Matsunaga *et al.*, 2005 ; Hamada *et al.*, 2009 ; pour revue, Huang *et al.*, 2009b). Outre le cortex prémoteur, de telles modulations sont aussi décrites suite à un conditionnement de l'AMS (Civardi *et al.*, 2001 ; Matsunaga *et al.*, 2005 ; Hamada *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2012). Les effets de la modulation de l'excitabilité corticospinale notée lors des études n°1 et 2 pourraient ainsi être liées à la modification directe de l'excitabilité des projections cortico-corticales entre l'AMS et M1 ou à des modifications secondaires de ces projections intracorticales induites par des modifications de l'excitabilité de l'AMS elle-même.

1.2 Stimulation transcutanée spinale par courant continu

Les études en courant continu rapportent des effets divergents selon que l'application est faite au niveau cortical, ou spinal et en tsDCS, selon les montages utilisés. Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs.

L'action des courants directs sur les propriétés neurales dépend de l'orientation des fibres par rapport au courant appliqué (Creutzfeldt *et al.,* 1962) or celle-ci diffère au niveau cortical et spinal (Lamy *et al.,* 2012). Cette différence entre les mécanismes mis en jeu par la tDCS et de la tsDCS participe à la compréhension des divergences concernant les effets induits sur l'excitabilité diaphragmatique entre l'étude de Azabou et collaborateurs (2013) et les nôtres. En effet, dans cette étude, la tDCS appliquée au vertex en regard de la représentation du diaphragme induit une diminution durable de l'excitabilité corticophrénique quelle que soit la polarité utilisée.
Les montages utilisés en tsDCS utilisent des placements d'électrodes différents ce qui influe certainement sur la diffusion du courant. Dans les montages thoraciques, chez l'humain, les

montages sont longitudinaux avec, généralement, la référence sur l'épaule (Cogiamanian *et al.*, 2008, 2011 ; Winkler *et al.*, 2010 ; Truini *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2012) alors qu'au niveau cervical, la seule étude publiée utilise un montage antéro-postérieure (Lim et Shin, 2011). Ceci participe certainement de la dissemblance entre les effets retrouvés dans l'étude n°3, conformes à ceux de Lim et Shin (2011) (résultats marqués par une augmentation de l'excitabilité corticospinale quelle que soit la polarité du courant délivré) et ceux mis en évidence par les études avec des montages thoraciques, dans lesquels les effets facilitateurs ou inhibiteurs dépendent généralement de la polarité du courant (Cogiamanian *et al.*, 2008, 2011 ; Winkler *et al.*, 2010 ; Truini *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2012).

Enfin la nature et le volume des tissus dans lequel le courant est diffusé participent aussi certainement à la dispersion du courant et à une possible réduction de sa densité dans les tissus excitables. Les modélisations de la diffusion du courant et la densité du courant parvenant aux tissus médullaires sont encore rares.

Si la comparaison des mécanismes d'action des techniques tDCS vs tsDCS est délicate, il est néanmoins possible de se référer aux travaux d'Ahmed chez la souris qui portent sur les mécanismes d'action du courant continu sur les étages médullaires (Ahmed, 2011 ; Ahmed et Wieraszko, 2012 ; Ahmed, 2013a,b).

Comme cela avait été montré par Creutzfeldt et collaborateurs (1962) au niveau cortical, les travaux d'Ahmed décrivent l'influence de la polarité des courants sur la fréquence de décharge des neurones déjà actifs et l'amplitude de décharge sous-liminaires spontanée des motoneurones pendant l'application du courant. Ce dernier élément reflète l'activation de nouveaux neurones. Les deux polarités ont des effets similaires, cependant les effets du courant anodal sont plus importants ce qui montre que ces deux courants affectent l'excitabilité des motoneurones via des mécanismes différents. Avec un montage postéro-latéral au niveau thoraco-lombaire (électrode active dorsale), Ahmed (2001) suggère que les modifications de l'excitabilité des neurones, le lieu d'action des courants et le type d'effets induits (augmentation ou diminution des réponses évoquées depuis un site cortical) serait déterminée par la relation entre la topographie des neurones et la direction de diffusion du courant. Ainsi, un courant cathodal dépolariserait les neurones les plus postérieurs et hyperpolariserait les éléments plus à distance de l'électrode active. Selon l'orientation de l'arbre dendritique et de l'axone des neurones, les motoneurones seraient ainsi plus ou moins susceptibles de décharger spontanément et en réponse à des influx corticospinaux (Ahmed, 2011).

Ces propositions sur les effets de la diffusion du courant au niveau spinal sont faites chez la souris. La différence de conformation de la région et de densité des tissus chez l'humain ne

permet pas de transposition directe de cette modélisation mais elle offre une base de réflexion.

2. Limites de l'évaluation de la modification de l'excitabilité corticale par la sICI

Des études en tsDCS rapportent la possibilité d'induire des modulations des voies ascendantes (lemniscales et spinothalamiques) (Cogiamanian *et al.*, 2008 ; Truini *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que cette technique a non seulement des effets locaux médullaires mais aussi peut être à l'étage cortical. Afin de tester cette hypothèse nous avons évalué, lors de l'étude n°3, les modifications de l'inhibition intracorticale de courte latence par une méthode de double choc (sICI).

L'évaluation de l'intensité de l'inhibition intracorticale est basée sur l'amplitude de la réponse à une impulsion de TMS c'est-à-dire sur l'importance du nombre de MN qui déchargent lors de l'arrivée de la volée descendante. La distribution des influx corticospinaux sur les MN cibles n'est pas linéaire mais suit une courbe sigmoïde (Devanne *et al.*, 1997) (cf. État de la question, Chapitre 1, paragraphe 3.1.1.3 Courbe de recrutement). Les résultats de l'étude principale ont montré une augmentation de la taille des PEM du diaphragme après conditionnement en polarité anodale ou cathodale. Nous avons donc recalculé l'intensité stimulus test pour obtenir une amplitude de réponse correspondant à la valeur de la S50 obtenue après conditionnement. Ce réajustement du stimulus test a permis de s'affranchir de ce biais et d'estimer l'intensité des effets de la tsDCS sur l'inhibition intracorticale (Lackmy et Marchand-Pauvert, 2010).

Les résultats ne montrent pas de modification de l'inhibition intracorticale testée à partir de la voie corticophrénique. Cependant, toute évolution de l'excitabilité des réseaux intracorticaux suite à la tsDCS n'est pas à exclure. La sICI ne permet l'évaluation que de circuits $GABA_A$ se traduisant par une altération des volées indirectes I3 (Hanajima *et al.*, 1998) ; l'étude de l'évolution de l'excitabilité d'autres circuits intracorticaux, sous dépendance de l'inhibition $GABA_B$ (LICI) ou de la facilitation glutamatergique (ICF) n'a pas été faite.

Seul un faible nombre de sujets (7) avaient des seuils moteurs assez bas pour que l'évaluation des modifications de l'inhibition intracorticale puisse être faite. Les résultats obtenus sur l'absence de changements induits par la tsDCS au niveau intracortical doivent donc être interprétés avec précaution.

3. Limites du conditionnement sham

L'éventuelle survenue de modifications non spécifiques du profil ventilatoire au cours des expérimentations n°2 et 3 a été prévenue en réalisant une condition sham.

Le déroulement de la session sham en rTMS a été identique aux autres sessions avec le calcul de l'aMT du muscle du doigt et le repérage du point de stimulation de l'AMS. La stimulation répétitive a été délivrée en plaçant une sonde inactive sur le point de stimulation déterminé et en connectant en parallèle une sonde active de façon à ce que la perception auditive soit identique à celle de la cTBS. Cette sonde a été orientée perpendiculairement à la sonde inactive de façon à diriger le champ loin de la tête du sujet. Les sensations tactiles au niveau du scalp étaient absentes dans cette condition. L'utilisation d'une sonde sham aurait permis de reproduire plus fidèlement les conditions des protocoles actifs.

Lors de l'étude n°3, la condition sham utilisée pour la tsDCS mimait parfaitement les conditions actives.

Pour chacune de ces deux études, aucun participant n'a cependant rapporté de différence de perception entre la stimulation factice et active.

4. Limites de l'analyse du profil ventilatoire

L'utilisation d'un pneumotachographe présente l'inconvénient de nécessiter l'emploi d'un embout buccal. Cette pièce fournit de nombreuses afférences sensitives et oblige à une respiration buccale qui induit une modification du patron ventilatoire (Askanazi *et al.*, 1980 ; Perez et Tobin, 1985). Pour l'étude n°2, nous avons choisi de l'utiliser malgré cette limitation. En revanche, pour l'étude n°3, le recueil du profil ventilatoire a été réalisé à l'aide d'un gilet de pléthysmographie qui représente une méthode validée pour recueillir les grandeurs ventilatoires de façon non-invasive (Eberhard *et al.*, 2001 ; Grossman *et al.*, 2010).

Lors de l'étude n°2, il était proposé aux sujets de regarder un film pour détourner leur attention de leur ventilation. Cette mesure n'a pas été prise lors de l'étude n°3 pour éviter que les images visionnées n'induisent des modulations émotionnelles du profil ventilatoire.
Pour ces deux études (n°2 et 3), il n'est pas possible d'exclure que certains sujets aient porté leur attention sur leur ventilation. Cependant, les sujets étaient naïfs de l'objectif des études et ces deux études ont été contrôlées en réalisant une session sham.

L'étude de la ventilation en charge vise à mimer certaines composantes des pathologies respiratoires. La charge à seuil reproduit les effets de la distension dynamique présente chez les patients présentant une obstruction bronchique lors de l'initiation de l'inspiration. La distension se caractérise par une absence de retour à la capacité résiduelle fonctionnelle à

la fin de l'expiration. Ceci impose une augmentation de la puissance de la commande ventilatoire pour générer une pression intrathoracique suffisante à la création d'un débit inspiratoire. Chez le sujet sain, l'effort imposé par la compensation de charge est un reflet imparfait des mécanismes physiopathologiques adaptatifs mis en jeu puisque ceux-ci évoluent au cours du temps et s'accompagnent d'un ensemble de sensations respiratoires désagréables qualifiées par le terme de dyspnée. Expérimentalement, la charge inspiratoire à seuil reste cependant le moyen le plus approprié pour reproduire ce mécanisme physiopathologique d'augmentation de la pression inspiratoire non récompensée par l'apparition d'un débit.

DISCUSSION FONCTIONNELLE

1. Études n°1 et n°2

Les protocoles rTMS (inhibiteur et facilitateur) appliqués sur l'AMS induisent une modulation durable (jusqu'à 15 minutes après l'arrêt de la stimulation) de l'excitabilité de la voie corticospinale en ventilation de repos et une modification des grandeurs du profil ventilatoire en ventilation en charge.

1.1 Modulation de l'excitabilité de la voie corticophrénique

Selon les connexions anatomiques et fonctionnelles de l'AMS avec l'aire motrice primaire et les motoneurones phréniques, deux hypothèses explicatives sont envisagées.

1.1.1 Connexions entre l'AMS et les MN phréniques

Chez le singe, les études anatomiques montrent une contribution des efférences de l'AMS au faisceau corticospinal pour environ 10% du total (He *et al.*, 1993 ; Wise, 1996) ; ces projections sont en partie directes au niveau des métamères cervicaux (Dum et Strick, 1996) et une voie directe corticospinale entre l'AMS et les muscles du tronc est montrée par microstimulation de l'AMS (Wu *et al.*, 2000).

Chez l'homme, une étude de Sharshar et collègues (2004a) montre qu'une réponse peut être évoquée depuis une zone située 3cm en avant du vertex (zone de représentation du diaphragme au sein du cortex). Ce constat permet de poser l'existence d'une voie directe entre l'AMS et les motoneurones phréniques. Cette réponse, évoquée au repos, a des caractéristiques similaires aux PEM générés depuis le cortex moteur primaire en termes d'excitabilité et de latence puisque ni la courbe de recrutement ni la latence (16,46 ± 2,7ms vs. 16,76 ± 2,4ms) ne diffèrent significativement.

La modification d'excitabilité de ces fibres directes par les protocoles rTMS est donc possible puisque l'AMS envoie directement des fibres aux MN phréniques. Cependant les PEM n'ont pas été évoqués depuis cette aire ; il n'est donc pas possible de conclure sur les effets de la modulation de cette voie. Les résultats des études sur les effets de la rTMS (conventionnelle ou en patron) appliquée en regard de M1, du cortex prémoteur ou de l'AMS sur l'excitabilité spinale sont controversés (Berardelli *et al.,* 1998 ; Modugno *et al.,* 2001 ; Touge *et al.* 2001 ; Valero-Cabré *et al.,* 2001 ; Perez *et al.,* 2005 ; Quartarone *et al.,* 2005 ; Matsunaga *et al.,* 2005 ; Huang *et al.*, 2009a). Toutefois, l'hypothèse de l'induction d'une plasticité des réseaux intra-corticaux est retenue pour expliquer les effets de ces techniques (Di Lazzaro *et al.,* 2005 ; Huang *et al.*, 2010). La participation d'une modulation de l'excitabilité des motoneurones phréniques recevant directement les influx de l'AMS est donc peu probable.

1.1.2 Connexions entre AMS et M1

Chez le singe, de denses connexions entre AMS et M1 sont montrées en microstimulation (Muakassa et Strick, 1979; Luppino *et al.*, 1993). Ces influx synaptiques, au repos, sont vraisemblablement de nature glutamatergiques puisque le blocage des récepteurs NMDA et non-NMDA diminue la réponse des neurones de M1 aux stimulations de l'AMS (Shima et Tanji, 1998).

L'existence de ces fibres est également mise en évidence chez l'humain par le recueil de potentiels évoqués cortico-corticaux évoqués par des stimulations électriques sous-durales chez des patients épileptiques implantés (Matsumoto *et al.*, 2007). La nature de ces fibres est évaluée dans deux études en TMS. Une première étude montre qu'un conditionnement facilitateur en double choc (ICF) appliqué sur l'AMS, se traduit par une augmentation de la réponse évoquée à partir de M1 au niveau de la représentation de la main alors que le muscle est au repos (Arai *et al.*, 2012). Les résultats d'une seconde étude, avec un protocole en impulsion simple délivré sur l'AMS, montrent une facilitation de la réponse à l'ICF évoquée depuis M1 (Shirota *et al.*, 2012). Ces deux études rapportent une absence de changement des circuits inhibiteurs et posent l'hypothèse de la nature excitatrice des fibres se projetant depuis l'AMS vers M1.

De même, au niveau du diaphragme, Sharshar et collaborateurs (2004b) suggèrent, de même, un effet excitateur des connexions synaptiques entre AMS et M1. En plaçant des sujets sains sous ventilation mécanique, les auteurs montrent une diminution de l'excitabilité de la voie corticospinale testée à partir de M1 ainsi qu'une augmentation de l'excitabilité intracorticale évoquée en double choc (ICF). Une origine périphérique des modifications enregistrées est écartée car les réponses évoquées en stimulation électrique à partir du nerf phrénique ne sont pas modifiées par la mise sous ventilation. La diminution de la taille des PEM serait liée à la suppression des afférences sensitives vers l'AMS (Logie *et al.*, 1988).

L'augmentation de l'ICF refléterait ainsi la modification compensatrice des influx excitateurs issus de l'AMS vers M1.

La présence d'une diminution de l'excitabilité de la voie corticophrénique suite à un protocole inhibiteur associée aux connaissances sur la nature des fibres d'association entre l'AMS et M1 et sur les mécanismes intracorticaux de la rTMS permettent de poser l'hypothèse de la participation d'un rôle excitateur de l'AMS en ventilation de repos à l'éveil et de son implication dans le phénomène nommé *wakefulness drive to breathe*.

1.2 Rôle de l'AMS dans le contrôle de la ventilation en charge

Les études en TMS montrent une influence excitatrice de l'AMS sur M1 (Sharshar *et al.*, 2004b ; Arai *et al.*, 2012). Néanmoins, cette excitation ne se traduit pas par une activité actuellement enregistrable en ventilation de repos en EEG ou en imagerie (PET, IRMf). En revanche, ces techniques mettent en évidence une activation au niveau du cortex prémoteur lors de la ventilation volontaire ou contrainte (Macefield et Gandevia 1991 ; Raux *et al.*, 2007a, 2007b, 2013 ; Trémoureux *et al.,* 2010, 2014) et la localisation de la source de cette activité suggère l'implication de l'AMS (Shibasaki, 2012).

Les résultats de l'étude n°2, montrent des évolutions du profil ventilatoire en charge suite aux protocoles actifs. Ces résultats sont en faveur de l'influence des protocoles rTMS sur l'excitabilité de l'AMS et/ou des fibres unissant l'AMS à M1.

Les effets d'un conditionnement rTMS de l'AMS en ventilation de repos sont marqués par une augmentation de l'excitabilité corticophrénique à post 3 suite à la rTMS à 5Hz et une diminution à Post 1, Post2 et Post 3 après la cTBS. En revanche, lorsque la ventilation est contrainte et que l'AMS est activement impliquée dans la production des mouvements respiratoires, suite à un protocole en rTMS à 5Hz, différentes grandeurs du profil ventilatoire (Ti, Ti/T_T, V_T, Ve et $P_{ET}CO_2$) sont modifiés notamment à Post 2 et ces effets perdurent en partie à Post 3 ; après le conditionnement en cTBS, ce sont les paramètres temporels (Te, Ti/ T_T) qui sont principalement modulés à Post 2.
Les résultats de l'étude n°1 sur la modulation de l'excitabilité de la voie corticophrénique au repos et ceux de l'étude n°2 portant sur les perturbations induites lors de mouvements respiratoires sous charge pourraient ne pas paraitre parfaitement concordants. Ceci n'est cependant pas en contradiction avec les données de la littérature et en particulier avec les résultats d'autres études en rTMS qui rapportent également des divergences entre les effets des protocoles rTMS sur les paramètres électrophysiologiques et comportementaux (pour revues, Chouinard et Paus, 2010 ; Fang *et al.,* 2010) (cf. État de la question, Chapitre 2, paragraphe 3.1.4 Effets de la rTMS sur les comportements moteurs).

En fonction des connaissances sur les différents rôles de l'AMS et sur les mécanismes de plasticité induits par les protocoles rTMS, plusieurs hypothèses sont discutées.

1.2.1 Plasticité homéostatique ou métaplasticité

Des mécanismes de type régulation homéostatique (cf. État de la question, Chapitre 2, paragraphe 3.3 Techniques non invasives et métaplasticité) pourraient intervenir en modifiant la force des connexions synaptiques de façon diffuse dans le système de contrôle cortical de la ventilation de façon à maintenir une commande constante (Hamada *et al.*, 2009 ; pour revue, Thickbroom, 2007).

Les modifications du profil ventilatoire suite au protocole rTMS à 5Hz montrant une diminution du temps inspiratoire, du temps de consigne, du volume courant et de la ventilation minute sont en faveur d'une diminution de l'influx corticophrénique. Ces résultats sont compatibles avec ceux de Gerloff et collaborateurs (1997) qui montrent une dégradation de mouvements complexes des doigts suite à un protocole à 5Hz.
L'inversion des effets de la rTMS à 5Hz n'a pas été rapportée comme cela a été fait pour les protocoles en TBS mais la possibilité d'un effet de type métaplasticité est envisageable.

La ventilation en charge se traduit par une activation de l'AMS. Suivant la théorie de la plasticité homéostatique de Bienenstock–Cooper–Munro (BCM) (Bienenstock *et al.*, 1982), les neurones et les réseaux reliant l'AMS à M1 étant soumis à une augmentation prolongée de leur activité, tout mécanisme induisant une potentiation serait compensé par une élévation du seuil d'évocation de plasticité de type LTP et par un abaissement du seuil d'induction de LTD (pour revue, Abraham, 2008). L'induction d'une facilitation de la réponse par un protocole rTMS facilitateur pourrait ainsi se traduire par une diminution de l'excitabilité corticospinale et par une réduction de certains paramètres du mouvement. Inversement, une technique visant à réduire l'excitabilité des circuits intracorticaux verrait ses effets augmentés.

Nos résultats qui montrent une réduction du temps inspiratoire suite au protocole en 5Hz sont compatibles avec l'hypothèse de mécanismes similaires à ceux de la métaplasticité.

Bien que techniquement difficile à réaliser, cette hypothèse pourrait être confirmée par une évaluation des modifications de l'excitabilité corticospinale induites par les protocoles rTMS lorsque les sujets sont en ventilation sous charge.

1.2.2 Rôle de l'AMS dans la coordination des activités motrices

L'AMS a de nombreux rôles dans la programmation du mouvement par exemple pour l'initiation et l'exécution (Nachev, 2008). La perturbation de son activité induite par TMS ou rTMS lors de la préparation ou de la réalisation d'un mouvement altère le déroulement du

geste ou les sensations qui l'accompagne (Haggard et Whitford, 2004 ; Makoshi *et al.*, 2011 ; White *et al.*, 2013).

Les résultats de ces études sont en accord avec les théories sur le contrôle cortical du geste qui suggèrent qu'une copie d'efférence, générée lors d'un mouvement, permet le contrôle du déroulement de l'action et des informations sensitives qu'elle génère (Wolpert et Flanagan, 2001 ; Feldman, 2009 ; Shadmehr *et al.*, 2010).

Cette théorie sur le contrôle moteur est étayée également par les études sur la stimulation électrique de l'AMS qui génère, chez certains patients implantés pour épilepsie non seulement un besoin intense de bouger mais aussi la sensation qu'un mouvement va se produire (Fried *et al.*, 1991) et par des études en rTMS qui montrent également des perturbations de l'estimation des conséquences sensitives du mouvement. Dans une étude, la stimulation répétitive de l'AMS (rTMS facilitatrice) induit une perturbation de l'estimation de la force nécessaire à l'exécution d'un mouvement de saisie (Gerloff *et al.*, 1997). Voss et collaborateurs (2007) utilisent une tâche qui consiste à reproduire activement une force passivement appliquée sur un doigt ; spontanément, les sujets produisent des forces bien supérieures à celles appliquées passivement sur leur doigt. Après l'application d'un protocole cTBS sur M1 l'écart entre ces forces est moindre. Les auteurs expliquent l'excès de force produit lors du mouvement actif avant le conditionnement par le fait que contrairement à l'appui passif, les forces activement exercées donnent lieu à une copie d'efférence ; les modulations induites par la cTBS conduiraient à une diminution de la concordance entre la copie d'efférence et les réafférences issues de la commande motrice générée et ainsi à une moindre production de force. Une autre étude, basée sur un paradigme semblable pose l'hypothèse d'une divergence entre la commande produite par M1, diminuée par le protocole inhibiteur et la copie d'efférence (Therrien *et al.*, 2011).

Les théories actuelles sur l'origine de la perception de la dyspnée sont tirées de la théorie de la copie d'efférence. Selon cette hypothèse, la dyspnée naitrait d'une différence entre la copie d'efférence de la commande destinées aux muscles respiratoires et le retour afférent lié à l'exécution du mouvement (Parshall et *al.*, 2012). L'activité de l'AMS est présente lorsque la respiration est artificiellement contrainte et elle s'associe à une sensation dyspnéiques (Raux *et al.*, 2007, 2013). L'AMS est un site d'intégration des messages afférents générés lors de la ventilation (Logie *et al.*, 1998). Dans ce cadre, l'AMS pourrait représenter un élément important dans la perception d'effort respiratoire excessif.

La perturbation de l'activité de l'AMS aurait donc pu s'accompagner d'une modification de l'évaluation de l'importance de la dyspnée induite mais l'inconfort généré par les niveaux de charge était certainement trop bas pour mettre en évidence une modification significative de la dyspnée induite.

Par ailleurs, à partir de nos résultats il n'est pas possible de déterminer les mécanismes exacts qui induisent, suite aux protocoles en rTMS à 5Hz, une facilitation de l'excitabilité corticophrénique en ventilation de repos et des modifications du profil ventilatoire en ventilation en charge. Une possibilité est que ce protocole affecte différemment les populations neuronales qui génèrent les efférences motrices et la copie d'efférence. L'AMS participerait à la production de la copie d'efférence en association à un large réseau comprenant le cortex prémoteur, le cervelet et les ganglions de la base. Ces différentes zones pourraient être différemment modulées par la rTMS (Okabe *et al.*, 2003 ; Bestmann *et al.*, 2004) ou compenser la plasticité induite au niveau de l'AMS ce qui influerait sur le signal émis. Cette hypothèse peut être mise en lien avec les modulations induites par un protocole cTBS sur les bandes de fréquence EEG. Une étude montre des modifications de la force des connexions cortico-corticale intra et interhémisphériques différentes selon les bandes étudiées (Shafi *et al.*, 2014).

Les modifications durables du profil ventilatoire notées dans l'étude n°2 suite au protocole rTMS en 5Hz pourraient être l'expression d'un point de vue moteur d'une perturbation de la production d'une copie d'efférence émise par l'AMS et/ou de la comparaison de cette copie aux réafférences issues du mouvement respiratoire.

2. Étude n°3

L'application d'un courant continu au niveau cervical induit une augmentation persistante de l'excitabilité du faisceau corticophrénique quelle que soit la polarité du courant et génère un accroissement du volume courant uniquement suite à l'application d'un courant cathodal.

De par la double nature de la commande ventilatoire (bulbospinale, homéostasique, et corticophrénique, non-homéostasique) les résultats obtenus peuvent avoir trois origines : corticale, bulbaire ou spinale.

2.1 Hypothèses d'une origine corticale ou bulbaire

Des études portant sur les effets de la tsDCS appliquée en regard des métamères lombaires sur la conduction des voies lemniscales et spinothalamiques suggèrent que la tsDCS induit non seulement une modulation de l'excitabilité à l'étage médullaire mais aussi au niveau cortical (Truini *et al.*, 2011 ; Cogiamanian *et al.*, 2011). L'hypothèse d'une modulation de l'excitabilité corticale est compatible avec nos résultats (augmentation de la taille des PEM, diminution du seuil moteur). Bien que cette étude ne permette pas de conclure sur une implication corticale dans les modifications de l'excitabilité corticophrénique, l'absence de modification de l'inhibition intracorticale (sICI) observée n'est pas en faveur de cette hypothèse.

Dans le cadre de la ventilation, l'augmentation du volume courant pourrait résulter d'une augmentation de l'excitabilité des neurones des réseaux bulbaires. En effet, la ventilation courante résulte de la traduction mécanique de l'activité des générateurs centraux du bulbe. Cette commande présente, par nature, un caractère pseudo-chaotique ce qui se traduit par une variabilité d'un cycle respiratoire au suivant (Bendixen *et al.*, 1964 ; Wysocki *et al.*, 2006). La nature complexe de la ventilation peut être décrite avec des indicateurs de non-linéarité comme la titration de bruit (cf. Méthodes expérimentales, Chapitre 1, paragraphe 3 Évaluation de la complexité du signal respiratoire). Cet indicateur, ainsi que la fréquence, sont sensibles aux modifications de l'activité des générateurs bulbaires (Fiamma *et al.,* 2007b ; Straus *et al.*, 2011; Hess *et al.*, 2013). L'absence de résultats montrant un changement d'état du système de contrôle homéostasique, pendant et suite à la stimulation, plaide contre une modification de l'activité des neurones bulbaires.

2.2 Hypothèse d'une origine motoneuronale

La tsDCS cervicale pourrait agir de façon progressive et durable sur l'excitabilité des MN phréniques. Cette hypothèse serait compatible avec les connaissances sur les mécanismes synaptiques et non synaptiques de la tsDCS et de la plasticité respiratoire. En effet, ceux-ci ont en commun d'impliquer des changements synaptiques et non synaptiques au niveau des motoneurones.

Les changements synaptiques se traduisent par des modulations de la libération de neurotransmetteurs par l'élément présynaptique. Pendant l'inspiration, le neurotransmetteur libéré au niveau des MN phréniques est le glutamate (McCrimmon *et al.*, 1989 ; Chitravanshi et Sapru, 1996). L'implication d'une modification de la quantité de neurotransmetteurs dans les effets enregistrés pendant la stimulation est rapportée in vitro. Sur des tranches de moelle, Ahmed et Wieraszko (2012) montrent une augmentation de la libération d'un analogue du glutamate (aspartate, D-2-3-^{3}H) dans la fente synaptique quelle que soit la polarité du courant délivré. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'élévation de la quantité de glutamate est la cause de l'augmentation des décharges spontanées enregistrées. La présence de mécanismes dépendant du glutamate est compatible avec des modifications synaptiques pendant la stimulation et elle est cohérente avec la persistance des effets enregistrés après l'arrêt de la stimulation.

L'action de ce neurotransmetteur se fait via des récepteurs NMDA. Or ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux mécanismes d'augmentation de l'excitabilité des MN (Rekling *et al.*, 2000) et le rôle de ces récepteurs ionotropiques est décrit dans les mécanismes de plasticité respiratoires à long terme (McGuire *et al.*, 2005, 2008).

Outre les modifications de la quantité de neurotransmetteur excitateur libéré, une inhibition de la transmission GABAergique au niveau des MN est proposée suite à l'application d'un

courant cathodal en tsDCS chez la souris (Ahmed, 2013a). Le GABA est impliqué dans la ventilation, lors de la transition de phase (Fedorko *et al.*, 1983 ; Merril et Fedorko, 1984 ; Tian *et al.,* 1998). Cette hypothèse est à mettre en lien avec l'implication du GABA dans la transition de phase (inspiration / expiration) chez le chat et dans les mécanismes de la plasticité respiratoire chez le chien (McCrimmon *et al.*, 1997).
L'implication de neuromodulateurs (sérotonine, adrénaline) est montrée dans les mécanismes de plasticité à long terme induits suite à l'application d'une stimulation transcrânienne par courant direct (Nitsche *et al.*, 2009) mais n'est pas encore étudiée suite à la tsDCS. En revanche, les effets de cette neuromodulation au niveau des MN phréniques est bien décrite dans le cadre de LTF respiratoire chez l'animal (Fuller *et al.*, 2001 ; Baker-Herman et Mitchell, 2002).
Ces modulations de libération de neurotransmetteurs et neuromodulateurs pourraient ainsi être impliquées dans la plasticité respiratoire induite par tsDCS.

La tsDCS induirait aussi des modulations des propriétés intrinsèques des MN. Ces modifications reposent, par exemple, sur des changements impliquant le seuil de décharge et l'amplitude de l'hyperpolarisation post-décharge des MN, des modifications du seuil de décharge des axones (Wolpaw et Carp, 2006).
Ceci est compatible avec les connaissances sur la plasticité respiratoire qui montrent que des modifications de la fréquence de décharge des MN phréniques (Lee *et al.,* 2009) et des changements de la phase de repolarisation (Hayashi *et al.*, 2003) pendant et après des épisodes d'hypoxie.

2.3 Différence des effets électrophysiologiques et ventilatoires

Alors que l'excitabilité corticophrénique était modulée de la même façon par les deux polarités de courant, seul le courant cathodal modifiait le volume courant. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que les MN n'étaient pas évalués à un niveau d'excitabilité identique par les deux expérimentations. En effet, l'étude de l'excitabilité de la voie corticophrénique repose sur des impulsions de TMS délivrées à la fin de l'expiration lorsque la membrane des MN phréniques est au potentiel de repos ou hyperpolarisée (Fedorko *et al.*, 1983 ; Merril et Fedorko, 1984). En revanche, l'étude des modifications du profil ventilatoire est la traduction mécanique des influx bulbaires reçus par les différents types de MN phréniques (*early I*, *late I*) au cours du cycle ventilatoire (Kong et Berger, 1986 ; Saboisky *et al.,* 2007 ; Lee *et al.,* 2009). Une seconde hypothèse, par analogie avec les modifications de type STP induite par hypoxie, est que l'activité des MN phréniques précoces (*early I*) est réduite puisque leur temps d'activation et de participation à l'inspiration est inchangé mais leur durée de décharge est diminuée alors que celui des MN d'activation

tardive (*late I*) est augmenté par la combinaison de l'accroissement de deux éléments : le temps d'activité global sur l'inspiration et le nombre de potentiel d'actions par inspiration (St John et Bartlett 1979 ; Lee *et al.*, 2009).

Par ailleurs, seul le courant cathodal induisait une augmentation du volume courant. Ahmed et Wierasko (2012) montrent chez la souris que la tsDCS a des effets différents selon la taille des MN. Ils rapportent ainsi une augmentation spécifique du recrutement des MN les plus larges suite à l'application d'un courant en polarité cathodale, mais pas anodale.

Au total, ces mécanismes de plasticité intrinsèque combinés aux mécanismes de la plasticité synaptiques pourraient concourir à la présence d'effets sur le profil ventilatoire en condition cathodale uniquement.

Les mécanismes sous-tendant ces résultats restent encore à démontrer. Néanmoins, la possibilité d'augmenter le volume courant par une stimulation cathodale ouvre des perspectives de recherches thérapeutiques importantes pour des patients présentant un déficit du contrôle automatique de la ventilation, comme par exemple lors du syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (SHACC).

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Les résultats des études présentées dans cette thèse mettent en évidence la possibilité d'induire une plasticité ventilatoire chez l'humain sain, au niveau de l'AMS et des étages spinaux contenant les MN phréniques, à l'aide de deux techniques non-invasives de stimulation. Cette plasticité s'exprime à la fois par des modifications persistantes de l'excitabilité corticophrénique mais aussi par des altérations du profil ventilatoire.

Dans les études n°1 et 2, nous montrons qu'une session de stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS) appliquée en regard de l'AMS permet très vraisemblablement d'induire une altération persistante des projections entre AMS et M1. Cette plasticité se traduit en ventilation de repos par une modification de l'excitabilité corticophrénique et en ventilation expérimentalement contrainte (charge inspiratoire) par des modifications du profil ventilatoire. Les recherches sur la plasticité ventilatoire induites par la rTMS pourraient constituer une approche novatrice pour atténuer certaines sensations de dyspnée. En effet, la théorie actuellement avancée pour expliquer la dyspnée de type « effort inspiratoire excessif » ressentie par les patients présentant une pathologie altérant la mécanique thoraco-pulmonaire ou diminuant la force des muscles inspiratoires met en avant une inadéquation entre l'intensité de la commande ventilatoire centrale et les retours afférents correspondants, inadéquation dont le traitement passe par la comparaison entre les réafférences et une copie d'efférence. Dans ce cadre, l'AMS, à travers son rôle connu dans l'initiation et l'exécution du mouvement d'une part et dans l'intégration des informations motrices et sensitives et de production et/ ou de traitement de la copie d'efférence, d'autre part, aurait un rôle majeur dans le contrôle moteur et sensoriel de la commande ventilatoire. La possibilité de manipuler artificiellement la production de force et /ou la copie d'efférence grâce à la rTMS pourrait permettre de soulager ce type de dyspnée. Cette question fera l'objet de la suite du programme de recherche "cortex et respiration" de l'UMR_S 1158.

Les résultats de l'étude n°3 montrent qu'une session unique de stimulation transcutanée spinale pour courant continu (tsDCS) augmente la sensibilité des étages médullaires contenant les motoneurones phréniques aux influx descendants. Le fait que ceci s'accompagne d'une augmentation non homéostasique du volume courant ouvre une voie de recherche nouvelle par exemple pour le traitement des hypoventilations, centrales, congénitales ou acquise ou congénitale. Ainsi, au cours du syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (SHACC ou syndrome d'Ondine), les patients souffrent d'une altération voire d'une disparition de la réponse respiratoire à l'hypercapnie. Une hypoventilation majeure est constatée pendant le sommeil et impose l'utilisation d'une

assistance ventilatoire. A l'éveil, la ventilation de repos est normale ou modérément diminuée. Une des explications de cette différence est que les motoneurones phréniques reçoivent à l'éveil de nombreux influx autres que les efférences bulbaires qui modifient leur sensibilité aux influx automatiques. Ceux-ci sont constitués d'afférences (proprioceptives ou nociceptives), inter-segmentaires (issus des MN contrôlant d'autres muscles participant à la ventilation ou à la locomotion) (Aminoff et Sears, 1971 ; Gozal *et al.*, 1996) et de projections efférentes suprapontiques provenant de structures limbiques et de structures corticales motrices et prémotrices (Trémoureux *et al.,* 2014). La possibilité d'augmenter la ventilation au travers d'une facilitation spinale à activité ventilatoire centrale constante pourrait participer à une correction partielle de l'hypoventilation diurne quand elle existe, voire l'hypoventilation nocturne.

La durée des effets post-stimulation rapportés dans la littérature est de quelques dizaines de minutes (confirmé par nos résultats). Ceci pourrait représenter une limite à l'utilisation de ces techniques dans un cadre thérapeutique. Toutefois des études en rTMS et en tDCS montrent que la répétition des sessions de stimulation accroît la durée, l'intensité des effets ainsi que le nombre de sujets répondeurs au conditionnement (Boggio *et al.*, 2007 ; Alonso *et al.*, 2012 ; Goldsworthy *et al.,* 2012 ; Galveza *et al.*, 2013).

Une première perspective de travail repose donc sur l'évaluation chez des sujets sains des effets de sessions répétées espacées de stimulation sur l'excitabilité corticophrénique et le profil ventilatoire.

Une autre piste repose sur l'étude des effets combinés de la rTMS et de la tsDCS avec des substances pharmacologiques. En effet, les modifications de la plasticité induite par différentes techniques non invasives ont fait l'objet de nombreuses études (pour revue, Cheeran *et al.*, 2010 ; Nitsche *et al.*, 2010 Ridding et Ziemann, 2010). Ces études rapportent des augmentations de la facilitation à long terme en réponse à la prise de certains médicaments agissant sur la libération de neurotransmetteurs et des neuromodulateurs (pour exemple, agonistes de récepteurs NMDA, inhibiteur de la recapture de la sérotonine). Enfin, la tsDCS pourrait s'intégrer à des approches multidirectionnelles. Des observations effectuées au sein de notre laboratoire suggère que certaines patientes atteintes de syndrome d'Ondine pourrait s'avérer "répondeuses", en termes de réponse ventilatoire au CO_2, suite à la prise d'un progestatif de synthèse (le désogestrel) (Straus *et al.*, 2010, 2011). Combiner progestatifs, tsDCS pourrait dans certains cas faire espérer une réduction des besoins d'assistance ventilatoire chez ces patients.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott LF, Regehr WG (2004) Synaptic computation. Nature 431:796–803.

Abbruzzese G, Assini A, Buccolieri A, Schieppati M, Trompetto C (1999) Comparison of intracortical inhibition and facilitation in distal and proximal arm muscles in humans. J Physiol (Lond) 514:895–903.

Aboubakr SE, Taylor A, Ford R, Siddiqi S, Badr MS (2001) Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. J Appl Physiol 91:2751–2757.

Abraham WC (2003) How long will long-term potentiation last? Phil Trans R Soc 358:735–744.

Abraham WC (2008) Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. Nat Rev Neurosci 9:387–399.

Abraham WC, Logan B, Greenwood JM, Dragunow M (2002) Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. J Neurosci 22:9626–9634.

Agostino R, Iezzi E, Dinapoli L, Gilio F, Conte A, Mari F, Berardelli A (2007) Effects of 5 Hz subthreshold magnetic stimulation of primary motor cortex on fast finger movements in normal subjects. Exp Brain Res 180:105–111.

Agostino R, Lezzi E, Dinapoli L, Suppa A, Conte A, Berardelli A (2008) Effects of intermittent theta-burst stimulation on practice-related changes in fast finger movements in healthy subjects. Eur J Neurosci 28:822–828.

Agostoni E, Sant'Ambrogio G, Del Portillo Carrasco H (1960). Electromyography of the diaphragm in man and transdiaphragmatic pressure. J Appl Physiol15:1093-1097.

Aguilar J, Pulecchi F, Dilena R, Oliviero A, Priori A, Foffani G (2011) Spinal direct current stimulation modulates the activity of gracile nucleus and primary somatosensory cortex in anaesthetized rats. J Physiol (Lond) 589:4981–4996.

Ahmed Z (2011) Trans-spinal direct current stimulation modulates motor cortex-induced muscle contraction in mice. J Appl Physiol 110:1414–1424.

Ahmed Z (2013a) Effects of Cathodal Trans-Spinal Direct Current Stimulation on Mouse Spinal Network and Complex Multijoint Movements. J Neurosci 33:14949–14957.

Ahmed Z (2013b) Electrophysiological Characterization of Spino-Sciatic and Cortico-Sciatic Associative Plasticity: Modulation by Trans-Spinal Direct Current and Effects on Recovery after Spinal Cord Injury in Mice. J Neurosci 33:4935–4946.

Ahmed Z, Wieraszko A (2012) Trans-spinal direct current enhances corticospinal output and stimulation-evoked release of glutamate analog, D-2,3-H-3-aspartic acid. J Appl Physiol 112:1576–1592.

Alheid GF, McCrimmon DR (2008) The chemical neuroanatomy of breathing. Respir Physiol Neurobiol 164:3–11.

Alonzo A, Brassil J, Taylor JL, Martin D, Loo CK. (2012) Daily transcranial direct current stimulation (tDCS) leads to greater increases in cortical excitability than second daily transcranial direct current stimulation. Brain Stimul 5:208–213.

Amassian VE, Cadwell J, Cracco RQ, Maccabee P (1987) Focal cerebral and peripheral-nerve stimulation in man with the magnetic coil. J Physiol (Lond) 390:P24–P24.

Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S (2003) Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. Nat Genet 33:459–461.

Aminoff MJ, Sears TA (1971) Spinal integration of segmental, cortical and breathing inputs to thoracic respiratory motoneurones. J Physiol (Lond) 215:557–575.

Arai N, Lu MK, Ugawa Y, Ziemann U (2012) Effective connectivity between human supplementary motor area and primary motor cortex: a paired-coil TMS study. Exp Brain Res 220:79–87.

Ardolino G, Bossi B, Barbieri S, Priori A (2005) Non-synaptic mechanisms underlie the after-effects of cathodal transcutaneous direct current stimulation of the human brain. J Physiol (Lond) 568:653–663.

Aroniadou VA, Keller A (1995) Mechanisms of ltp induction in rat motor cortex in-vitro. Cereb Cortex 5:353–362.

Askanazi J, Silverberg PA, Foster RJ, Hyman AI, Milic-Emili J, Kinney JM (1980) Effects of respiratory apparatus on breathing pattern. J Appl Physiol 48:577–580.

Avesani M, Formaggio E, Fuggetta G, Fiaschi A, Manganotti P, Fiaschi A (2008) Corticospinal excitability in human subjects during nonrapid eye movement sleep: single and paired-pulse transcranial magnetic stimulation study. Exp Brain Res 187:17-23.

Awiszus F, Feistner H (1994) Correlations between size parameters and the amplitude of the excitatory postsynaptic potential evoked by magnetic brain-stimulation in human hand muscle motoneurons. Exp Brain Res 98:128–134.

Axen K, Haas S, Haas F, Gaudino D, Haas A (1983) Ventilatory adjustments during sustained mechanical loading in conscious humans. J Appl Physiol 55:1211–1218.

Axen K, Haas SS (1979) Range of first-breath ventilatory responses to added mechanical loads in naive men. J Appl Physiol 46:743–751.

Azabou E, Roche N, Sharshar T, Bussel B, Lofaso F, Petitjean M (2013) Transcranial direct-current stimulation reduced the excitability of diaphragmatic corticospinal pathways whatever the polarity used. Respir Physiol Neurobiol 189:183–187.

Babcock M, Shkoukani M, Aboubakr SE, Badr MS (2003) Determinants of long-term facilitation in humans during NREM sleep. J Appl Physiol 94:53–59.

Babcock MA, Badr MS (1998) Long-term facilitation of ventilation in humans during NREM sleep. Sleep 21:709–716.

Bach KB, Mitchell GS (1996) Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. Respir Physiol 104:251–260.

Bach KB, Mitchell GS (1998) Hypercapnia-induced long-term depression of respiratory activity requires α2-adrenergic receptors. J. Appl. Physiol. 84:2099–2105.

Badr MS, Skatrud JB, Dempsey JA (1992) Determinants of poststimulus potentiation in humans during NREM sleep. J Appl Physiol 73:1958–1971.

Bagnato S, Curra A, Modugno N, Gilio F, Quartarone A, Rizzo V, Girlanda P, Inghilleri M, Berardelli A (2005) One-hertz subthreshold rTMS increases the threshold for evoking inhibition in the human motor cortex. Exp Brain Res 160:368–374.

Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS (2001) Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. Respir Physiol 129:25–35.

Baker TL, Mitchell GS (2000) Episodic, but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output. J Physiol (Lond) 529:215–219.

Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, Johnson RA, Watters JJ, Mitchell GS (2004) BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. Nat Neurosci 7:48–55.

Baker-Herman TL, Mitchell GS (2002) Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. J Neurosci 22:6239–6246.

Baker-Herman TL, Strey KA (2011) Similarities and differences in mechanisms of phrenic and hypoglossal motor facilitation. Respir Physiol Neurobiol 179:48–56.

Ball T, Schreiber A, Feige B, Wagner M, Lücking CH, Kristeva-Feige R (1999) The role of higher-order motor areas in voluntary movement as revealed by high-resolution EEG and fMRI. Neuroimage 10:682–694.

Barker AT, Freeston IL, Jalinous R, Jarratt JA (1987) Magnetic stimulation of the human-brain and peripheral nervous-system - an introduction and the results of an initial clinical-evaluation. Neurosurg 20:100–109.

Barrett G, Shibasaki H, Neshige R (1986) Cortical potentials preceding voluntary movement - evidence for 3 periods of preparation in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 63:327–339.

Bender PR, Weil JV, Reeves JT, Moore LG (1987) Breathing pattern in hypoxic exposures of varying duration. J. Appl. Physiol. 62:640–645.

Bendixen HH, Smith GM, Mead J (1964) Pattern of ventilation in young adults. J Appl Physiol 19:195–198.

Bennett JR, Dunroy HMA, Corfield DR, Hart N, Simonds AK, Polkey MI, Morrell MJ (2004) Respiratory muscle activity during REM sleep in patients with diaphragm paralysis. Neurology 62:134-137.

Berardelli A, Abbruzzese G, Chen R, Orth M, Ridding MC, Stinear C, Suppa A, Trompetto C, Thompson PD (2008) Consensus paper on short-interval intracortical inhibition and other transcranial magnetic stimulation intracortical paradigms in movement disorders. Brain Stimul 1:183–191.

Berardelli A, Inghilleri M, Rothwell JC, Romeo S, Curra A, Gilio F, Modugno N, Manfredi M (1998). Facilitation of muscle-evoked responses after repetitive cortical stimulation in man. Exp Brain Res 122:79–84.

Berger AJ (1979) Phrenic motoneurons in the cat - sub-populations and nature of respiratory drive potentials. J Neurophysiol 42:76–90.

Bestmann S, Baudewig J, Siebner HR, Rothwell JC, Frahm J (2003) Subthreshold high-frequency TMS of human primary motor cortex modulates interconnected frontal motor areas as detected by interleaved fMRI-TMS. Neuroimage 20:1685–1696.

Bestmann S, Baudewig J, Siebner HR, Rothwell JC, Frahm J (2004) Functional MRI of the immediate impact of transcranial magnetic stimulation on cortical and subcortical motor circuits. Eur J Neurosci 19:1950–1962.

Bianchi AL, Denavitsaubie M, Champagnat J (1995) Central control of breathing in mammals - neuronal circuitry, membrane-properties, and neurotransmitters. Physiol Rev 75:1–45.

Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW (1982) Theory for the development of neuron selectivity - orientation specificity and binocular interaction in visual-cortex. J Neurosci 2:32–48.

Bindman L, Lippold OCJ, Redfearn JWT (1964) The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. J Physiol 172:369–382.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361:31–39.

Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaestetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:357–374.

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:331–356.

Boggio PS, Nunes A, Rigonatti SP, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Fregni F (2007). Repeated sessions of noninvasive brain DC stimulation is associated with motor function improvement in stroke patients. Restor Neurol Neurosci 25:123–129.

Boggio PS, Nunes A, Rigonatti SP, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Fregni F (2007) Repeated sessions of noninvasive brain DC stimulation is associated with motor function improvement in stroke patients. Restor Neurol Neurosci 25:123-129.

Böhmer G, Schmid K, Schauer W (1991) Evidence for an involvement of NMDA and non-NMDA receptors in synaptic excitation of phrenic motoneurons in the rabbit. Neurosci Lett 130:271–274.

Boroojerdi B, Ziemann U, Chen R, Buterfisch CM, Cohen LG (2001) Mechanisms underlying human motor system plasticity. Muscle Nerve 24:602–613.

Brannan S, Liotti M, Egan G, Shade R, Madden L, Robillard R, Abplanalp B, Stofer K, Denton D, Fox PT (2001) Neuroimaging of cerebral activations and deactivations associated with hypercapnia and hunger for air. Proc Natl Acad Sci USA 98:2029–2034.

Brasil-Neto JP, Cohen LG, Panizza M, Nilsson J, Roth BJ, t M (1992) Optimal focal transcranial magnetic activation of the human motor cortex: effects of coil orientation, shape of the induced current pulse, and stimulus intensity. J Clin Neurophysiol 9:132–136.

Brons JF, Woody CD (1980) Long-term changes in excitability of cortical neurons after Pavlovian conditioning and extinction. J Neurophysiol 44:605–615.

Brouwer B, Ashby P (1990) Corticospinal projections to upper and lower limb spinal motoneurons in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 76: 509–519.

Buetefisch CM, Hines B, Shuster L, Pergami P, Mathes A (2011) Motor demand-dependent improvement in accuracy following low-frequency transcranial magnetic stimulation of left motor cortex. J Neurophysiol 106:1614–1621.

Buonomano DV, Merzenich MM (1998) Cortical plasticity: From synapses to maps. Annu Rev Neurosci 21:149–186.

Burrone J, O'Byrne M, Murthy VN (2002) Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. Nature 420:414–418.

Butler JE (2007) Drive to the human respiratory muscles. Respir Physiol Neurobiol 159:115–126.

Butler JE, McKenzie DK, Gandevia SC (1999) Discharge properties and recruitment of human diaphragmatic motor units during voluntary inspiratory tasks. J Physiol 518:907–920.

Calancie B, Nordin M, Wallin U, Hagbarth KE (1987) Motor-unit responses in human wrist

flexor and extensor muscles to transcranial cortical stimuli. J Neurophysiol 58:1168–1185.

Cao KY, Berthon-Jones M, Zwillich CW, Sullivan CE (1992) Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dog. J Appl Physiol 73:2083–2088.

Caporale N, Dan Y (2008) Spike timing-dependent plasticity: A Hebbian learning rule. Ann Rev Neurosci 31:25–46.

Cárdenas-Morales L, Groen G, Kammer T (2011) Exploring the After-Effects of Theta Burst Magnetic Stimulation on the Human Motor Cortex: A Functional Imaging Study. Hum Brain Mapp 32:1948–1960.

Cárdenas-Morales L, Nowak DA, Kammer T, Wolf RC, Schönfeldt-Lecuona C (2010) Mechanisms and applications of theta-burst rTMS on the human motor cortex. Brain Topogr 22:294–306.

Carp JS, Wolpaw JR (1994) Motoneuron plasticity underlying operantly conditioned decrease in primate H-reflex. J Neurophysiol 72:431–442.

Carroll TJ, Riek S, Carson RG (2001) Reliability of the input-output properties of the cortico-spinal pathway obtained from transcranial magnetic and electrical stimulation. J Neurosci Methods 112:193–202.

Carson RG, Nelson BD, Buick AR, Carroll TJ, Kennedy NC, Mac Cann R (2013) Characterizing Changes in the Excitability of Corticospinal Projections to Proximal Muscles of the Upper Limb. Brain Stimul 6:760-768.

Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH, Wilson FD, Nairn AC, Greengard P. 1980. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP- dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia. Proc Natl Acad Sci USA 77:7492–7496.

Castro-Alamancos MA, Borrell J (1995) Contribution of NMDA and nonNMDA glutamate receptors to synchronized excitation and cortical output in the primary motor cortex of the rat. Brain Res Bull 37:539–543.

Cauda F, Giuliano G, Federico D, Sergio D, Katiuscia S (2011) Discovering the somatotopic organization of the motor areas of the medial wall using low-frequency BOLD fluctuations. Hum Brain Mapp 32:1566–1579.

Cechetto DF, Shoemaker JK (2009) Functional neuroanatomy of autonomic regulation. Neuroimage 47:795–803.

Chan JHL, Lin CSY, Pierrot-Deseilligny E, Burke D (2002) Excitability changes in human peripheral nerve axons in a paradigm mimicking paired-pulse transcranial magnetic stimulation. J Physiol (Lond) 542:951–961.

Cheeran B, Koch G, Stagg CJ, Baig F, Teo J (2010) Transcranial Magnetic Stimulation: From Neurophysiology to Pharmacology, Molecular Biology and Genomics. Neuroscientist 16:210-221.

Cheeran BJ, Ritter C, Rothwell JC, Siebner HR (2009) Mapping genetic influences on the corticospinal motor system in humans. Neurosci 164:156–163.

Chen R (2004) Interactions between inhibitory and excitatory circuits in the human motor cortex. Exp Brain Res 154:1–10.

Chen R, Classen J, Gerloff C, Celnik P, Wassermann EM, t M, Cohen LG (1997) Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. Neurology 48:1398–1403.

Chen R, Cros D, Curra A, Di Lazzaro V, Lefaucheur JP, Magistris MR, Mills K, Rösler KM, Triggs WJ, Ugawa Y, Ziemann U (2008) The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. Clin Neurophysiol 119:504–532.

Chen R, Garg R (2000) Facilitatory I wave interaction in proximal arm and lower limb muscle representations of the human motor cortex. J Neurophysiol 83:1426–1434.

Chen R, Lozano AM, Ashby P (1999) Mechanism of the silent period following transcranial magnetic stimulation. Evidence from epidural recordings. Exp Brain Res 128:539–542.

Chen R, Tam A, Bütefisch C, Corwell B, Ziemann U, Rothwell JC, Cohen LG (1998b) Intracortical inhibition and facilitation in different representations of the human motor cortex. J Neurophysiol 80:2870–2881.

Chen R, Yaseen Z, Cohen LG, t M (1998a) Time course of corticospinal excitability in reaction time and self-paced movements. Ann Neurol 44:317–325.

Chen R, Yung D, Li JY (2003) Organization of ipsilateral excitatory and inhibitory pathways in the human motor cortex. J Neurophysiol 89:1256–1264.

Chitravanshi VC, Sapru HN (1996) NMDA as well as non-NMDA receptors mediate the neurotransmission of inspiratory drive to phrenic motoneurons in the adult rat. Brain Res 715:104–112.

Chouinard PA, Paus T (2010) What have we learned from "perturbing" the human cortical motor system with transcranial magnetic stimulation? Front Hum Neurosci 4:173.

Chowdhuri S, Shanidze I, Pierchala L, Belen D, Mateika JH, Badr MS (2010) Effect of episodic hypoxia on the susceptibility to hypocapnic central apnea during NREM sleep. J Appl Physiol 108:369–377.

Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. Neuropsychopharmacology 33:18–41.

Civardi C, Cantello R, Asselman P, Rothwell JC (2001) Transcranial magnetic stimulation can be used to test connections to primary motor areas from frontal and medial cortex in humans. Neuroimage 14:1444–1453.

Classen J, Liepert J, Wise SP, t M, Cohen LG (1998) Rapid plasticity of human cortical movement representation induced by practice. J Neurophysiol 79:1117–1123.

Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. J Appl Physiol 75:5–14.

Cogiamanian F, Ardolino G, Vergari M, Ferrucci R, Ciocca M, Scelzo E, Barbieri S, Priori A (2012) Transcutaneous spinal direct current stimulation. Front Psychiatry 3:63–63.

Cogiamanian F, Vergari M, Pulecchi F, Marceglia S, Priori A (2008) Effect of spinal transcutaneous direct current stimulation on somatosensory evoked potentials in humans. Clin Neurophysiol 119:2636–2640.

Cogiamanian F, Vergari M, Schiaffi E, Marceglia S, Ardolino G, Barbieri S, Priori A (2011) Transcutaneous spinal cord direct current stimulation inhibits the lower limb nociceptive flexion reflex in human beings. Pain 152:370–375.

Colebatch J (2007) Bereitschaftspotential and movement-related potentials: Origin, significance, and application in disorders of human movement. Mov Disord 22:601–610.

Colebatch JG, Adams L, Murphy K, Martin AJ, Lammertsma AA, Tochon-Danguy HJ, Clark JC, Friston KJ, Guz A (1991) Regional cerebral blood flow during volitional breathing in man. J Physiol (Lond) 443:91–103.

Coles SK, Dick TE (1996) Neurones in the ventrolateral pens are required for post-hypoxic frequency decline in rats. J Physiol (Lond) 497:79–94.

Conte A, Belvisi D, Iezzi E, Mari F, Inghilleri M, Berardelli A (2008) Effects of attention on inhibitory and facilitatory phenomena elicited by paired-pulse transcranial magnetic stimulation in healthy subjects. Exp Brain Res 186:393–399.

Cooper SJ (2005) Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. Neurosci Biobehav Rev 28:851–874.

Corda M, Von Euler C, Lennerstrand G (1965) Proprioceptive Innervation of the Diaphragm. J Physiol 178:161–177.

Corfield DR, Morrell MJ, Guz A (1995) The nature of breathing during hypocapnia in awake man. Respir Physiol 101:145–159.

Corfield DR, Murphy K, Guz A (1998) Does the motor cortical control of the diaphragm 'bypass' the brain stem respiratory centres in man? Respir Physiol 114:109–117.

Cracco RQ, Cracco JB, Maccabee PJ, Amassian VE (1999) Cerebral function revealed by transcranial magnetic stimulation. J Neurosci Methods 86:209-219.

Creutzfeldt OD, Fromm GH, Kapp H (1962) Influence of transcortical D-C currents on cortical neuronal activity. Exp Neurol 5: 436–452.

Critchlow V, Von Euler C (1963) Intercostal Muscle Spindle Activity and Its Gamma Motor Control. J Physiol 168:820–847.

Cull-Candy SG, Miledi R, Trautmann A, Uchitel OD (1980) Release of transmitter at normal, myasthenia-gravis and myasthenic syndrome affected human endplates. J Physiol (Lond) 299:621–638.

Cunningham DJC, Robbins PA, Wolff CB (1986) Integration of respiratory responses to changes in alveolar partial pressures of CO2 and O2 and in arterial pH. In: Handbook of physiology. Section 3: The respiratory system. Am Physiol Soc, Bethesda, MD, Vol. II, pp. 475–528.

Cunnington R, Windischberger C, Deecke L, Moser E (2002) The preparation and execution of self-initiated and externally-triggered movement: a study of event-related fMRI. Neuroimage 15:373–85.

Cushing S, Bui T, Rose PK (2005) Effect of nonlinear summation of synaptic currents on the input-output properties of spinal motoneurons. J Neurophysiol 94:3465–3478.

Dafotakis M, Grefkes C, Wang L, Fink GR, Nowak DA (2008) The effects of 1 Hz rTMS over the hand area of M1 on movement kinematics of the ipsilateral hand. J Neural Transm 115:1269–1274.

Daoudal G, Debanne D (2003) Long-term plasticity of intrinsic excitability: Learning rules and mechanisms. Learn Mem 10:456–465.

Datta AK, Shea SA, Horner RL, Guz A (1991) The influence of induced hypocapnia and sleep on the endogenous respiratory rhythm in humans. J Physiol (Lond) 440:17–33.

Davenport PW, Vovk A (2009) Cortical and subcortical central neural pathways in respiratory sensations. Respir Physiol Neurobiol 167:72–86.

Davey NJ, Murphy K, Maskill DW, Guz A, Ellaway PH (1996) Site of facilitation of diaphragm EMG to corticospinal stimulation during inspiration. Respir Physiol 106:127–135.

Davis GW (2013) Homeostatic Signaling and the Stabilization of Neural Function. Neuron 80:718–728.

Day BL, Dressler D, Maertens de Noordhout A, Marsden CD, Nakashima K, Rothwell JC, Thompson PD (1989) Electric and magnetic stimulation human motor cortex: surface EMG and single motor unit responses. J Physiol (Lond) 412:449–73.

Day BL, Rothwell JC, Thompson PD, Dick JPR, Cowan JMA, Berardelli A, Marsden CD (1987) Motor cortex stimulation in intact man II: multiple descending volleys. Brain 110:1191–209.

Deecke L, Lang W, Heller HJ, Hufnagl M, Kornhuber HH (1987) Bereitschaftspotential in patients with unilateral lesions of the supplementary motor area. J Neurol Neurosurg Psychiatry 50:1430–1434.

Del Negro C, Morgado-Valle C, Feldman J (2002) Respiratory rhythm: An emergent network property? Neuron 34:821–830.

Demoule A, Verin E, Du Montcel ST, Similowski T (2008) Short-term training-dependent plasticity of the corticospinal diaphragm control in normal humans. Respir Physiol Neurobiol 160:172–180.

Demoule A, Verin E, Le Locher C, Derenne JP, Similowski T (2003a) Validation of surface recordings of the diaphragm response to transcranial magnetic stimulation in humans. J Appl Physiol 94:453–461.

Demoule A, Verin E, Ross E, Moxham J, Derenne JP, Polkey MI, Similowski T (2003b) Intracortical inhibition and facilitation of the response of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation. J Clin Neurophysiol 20:59–64.

Devanne H, Lavoie BA, Capaday C (1997) Input–output properties and gain changes in the human corticospinal pathway. Exp Brain Res 114:329–338.

Di Lazzaro V, Dileone M, Pilato F, Capone F, Musumeci G, Ranieri F, Ricci V, Bria P, Di Iorio R, de Waure C, Pasqualetti P, Profice P (2011) Modulation of motor cortex neuronal networks by rTMS: comparison of local and remote effects of six different protocols of stimulation. J Neurophysiol 105:2150–2156.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Meglio M, Cioni B, Tamburrini G, Tonali P, Rothwell JC (2000) Direct demonstration of the effect of lorazepam on the excitability of the human motor cortex. Clin Neurophysiol 111:794-799.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Pilato F, Saturno E, Dileonea M, Mazzonec P, Insolad A, Tonalia PA, Rothwell JC (2004) The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in conscious humans. Clin Neurophysiol 115:255–266.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Profice P, Saturno E, Pilato F, Insola A, Mazzone P, Tonali P, Rothwell JC (1998) Comparison of descending volleys evoked by transcranial magnetic and electric stimulation in conscious humans. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 109, 397–401.

Di Lazzaro V, Pilato F, Dileone M, Profice P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Ranieri F, Meglio M, Tonali PA, Rothwell JC (2008a) The physiological basis of the effects of intermittent theta burst stimulation of the human motor cortex. J Physiol 586:3871–3879.

Di Lazzaro V, Pilato F, Dileone M, Profice P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Ranieri F, Tonali PA, Rothwell JC (2008b) Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation suppresses specific excitatory circuits in the human motor cortex. J Physiol 586:4481–4487.

Di Lazzaro V, Pilato F, Oliviero A, *et al.* (2006) Origin of facilitation of motor-evoked potentials after paired magnetic stimulation: direct recording of epidural activity in conscious humans. J Neurophysiol 96:1765–1771.

Di Lazzaro V, Pilato F, Saturno E, Oliviero A, Dileone M, Mazzone P, Insola A, Tonali PA, Ranieri F, Huang YZ, Rothwell JC (2005) Theta-burst repetitive transcranial magnetic stimulation suppresses specific excitatory circuits in the human motor cortex. J Physiol 565:945–950.

Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Oliviero A, Ziemann U (2010) The effects of motor cortex rTMS on corticospinal descending activity. Clin Neurophysiol 121:464–473.

Di Lazzaro V, Profice P, Ranieri F, Capone F, Dileone M, Oliviero A, Pilato F (2012) I-wave origin and modulation. Brain Stimul 5:512–525.

Di Lazzaro V, Ranieri F, Profice P, Pilato F, Mazzone P, Capone F, Insola A, Oliviero A (2013) Transcranial Direct Current Stimulation Effects on the Excitability of Corticospinal Axons of the Human Cerebral Cortex. Brain Stimul 6:641–643.

Di Lazzaro V, Thickbroom GW, Pilato F, Profice P, Dileone M, Mazzone P, Insola A, Ranieri F, Tonali PA, Rothwell JC (2007) Direct demonstration of the effects of repetitive paired-pulse transcranial magnetic stimulation at I-wave periodicity. Clin Neurophysiol 118:1193–1197.

Di Lazzaro V, Zieman U, Lemon RN (2008c) State of the art: Physiology of transcranial motor cortex stimulation. Brain Stim 1:345–362.

Di Lazzaro V, Ziemann U (2013) The contribution of transcranial magnetic stimulation in the functional evaluation of microcircuits in human motor cortex. Front Neural Circuits 7, 18.

Dick TE, Kong FJ, Berger AJ (1987) Correlation of recruitment order with axonal conduction-velocity for supraspinally driven diaphragmatic motor units. J Neurophysiol 57:245–259.

Dick TE, Viana F, Berger AJ (1988) Electrophysiological determination of the axonal projections of single dorsal respiratory group neurons to the cervical spinal cord of cat. Brain Res 454:31–39.

Dobbins EG, Feldman JL (1994) Brain-stem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. J Comp Neurol 347:64–86.

Doeltgen SH, Ridding MC (2010) Behavioural exposure and sleep do not modify corticospinal and intracortical excitability in the human motor system. Clin Neurophysiol 121:448–452.

Doi A, Ramirez JM (2008) Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. Respir Physiol Neurobiol 164:96–104.

Donoghue JP (1995) Plasticity of adult sensorimotor representations. Curr Opin Neurobiol 5:749–754.

Draganski B, May A (2008) Training-induced structural changes in the adult human brain. Behav Brain Res 192:137–142.

Dubreuil V, Ramanantsoa N, Trochet D, Vaubourg V, Amiel J, Gallego J, Brunet J-F, Goridis C (2008) A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. Proc Natl Acad Sci USA 105:1067–1072.

Duffau H (2006) Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. J Clin Neurosci 13:885–897.

Duffin J (2004) Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. Exp Physiol 89:517–529.

Duffin J (2005) Role of acid-base balance in the chemoreflex control of breathing. J Appl Physiol 99:2255–2265.

Duffin J, Li YM (2006) Transmission of respiratory rhythm: Midline-crossing connections at the level of the phrenic motor nucleus? Respir Physiol Neurobiol 153:139–147.

Duffin J, Tian GF, Peever JH (2000) Functional synaptic connections among respiratory neurons. Respir Physiol 122:237–246.

Duguet A, Demoule A, Gonzalez J, Remy-Neris O, Derenne J, Similowski T (2006) Predicting the recovery of ventilatory activity in central respiratory paralysis. Neurology 67:288–292.

Dum RP, Strick PL (1996) Spinal cord terminations of the medial wall motor areas in macaque monkeys. J Neurosci 16: 6513–6525.

Eberhard A, Calabrese P, Baconnier P, Benchetrit G (2001) Comparison between the respiratory inductance plethysmography signal derivative and the airflow signal. Adv. Exp Med Biol 499:489–94.

Eldridge FL (1974) Central neural respiratory stimulatory effect of active respiration. J Appl Physiol 37:723–735.

Eldridge FL (1976) Central neural stimulation of respiration in unanesthetized decerebrate cats. J Appl Physiol 40:23–28.

Eldridge FL, Millhorn DE (1986) Oscillation, gating, and memory in the respiratory control system. In: Handbook of physiology: the respiratory system (Fishman AP, ed), pp 93–114. Washington, DC: American Physiological Society.

Ellenberger HH, Feldman JL (1988) Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats. J Comp Neurol 269:47–57.

Ellenberger HH, Vera PL, Haselton JR, Haselton CL, Schneiderman N (1990) Brain-stem projections to the phrenic nucleus - an anterograde and retrograde HRP study in the rabbit. Brain Res Bull 24:163–174.

Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. Nature 399:66–70.

Estève F, Blanc-Gras N, Gallego J, Benchetrit G (1996) The effects of breathing pattern training on ventilatory function in patients with COPD. Biofeedback Self Regul 21:311–321.

Evans KC, Banzett RB, Adams L, McKay L, Frackowiak RSJ, Corfield DR (2002) BOLD fMRI identifies limbic, paralimbic, and cerebellar activation during air hunger. J Neurophysiol 88:1500–1511.

Evans KC, Shea SA, Saykin AJ (1999) Functional MRI localisation of central nervous system regions associated with volitional inspiration in humans. J Physiol (Lond) 520:383–392.

Fang J-H, Chen J-JJ, Hwang I-S, Huang Y-Z (2010) Review: Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation over the Human Primary Motor Cortex for Modulating Motor Control and Motor Learning. J Med Biol Eng 30:193–201.

Fedorko L, Merrill EG, Lipski J (1983) Two descending medullary inspiratory pathways to phrenic motoneurones. Neurosci Lett 43:285-291.

Feldman AG (2009) New insights into action-perception coupling. Exp Brain Res 194:39-58.

Feldman JL (1986) Neurophysiology of breathing in mammals. Handbook of Physiology. The Nervous System. Intrinsic Regulatory System in the Brain. Am Physiol Soc, Bethesda, MD, sect. 1, vol. IV, chapt. 9, p. 463–524.

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

Feldman JL, Loewy AD, Speck DF (1985) Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat - an autoradiographic study. J Neurosci 5:1993–2000.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. Annu Rev Neurosci 26:239–266.

Fiamma M, Samara Z, Baconnier P, Similowski T, Straus C (2007a) Respiratory inductive plethysmography to assess respiratory variability and complexity in humans. Respir Physiol Neurobiol 156:234–239.

Fiamma MN, Straus C, Thibault S, Wysocki M, Baconnier P, Similowski T (2007b) Effects of hypercapnia and hypocapnia on ventilatory variability and the chaotic dynamics of ventilatory flow in humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292: R1985–R1993.

Fink BR (1961) Influence of cerebral activity in wakefulness on regulation of breathing. J Appl Physiol 16:15–20.

Fink BR, Hanks EC, Ngai SH, Papper EM (1963) Central regulation of respiration during anesthesia and wakefulness. Ann NY Acad Sci 109:892–899.

Fink GR, Corfield DR, Murphy K, Kobayashi I, Dettmers C, Adams L, Frackowiak RSJ, Guz A (1996) Human cerebral activity with increasing inspiratory force: A study using positron emission tomography. J Appl Physiol 81:1295–1305.

Fisher RJ, Nakamura Y, Bestmann S, Rothwell JC, Bostock H (2002) Two phases of intracortical inhibition revealed by transcranial magnetic threshold tracking. Exp Brain Res 143:240–248.

Fitzgerald PB, Fountain S, Daskalakis ZJ (2006) A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition. Clin Neurophysiol 117:2584–2596.

Foerster O (1936) Motorische Felder und Bahen. In: Bunke O, Foerster O, editors. Handbook der Neurologie, Vol 6.Berlin: Springer.50–51.

Fortrat JO, Yamamoto Y, Hughson RL (1997) Respiratory influences on non-linear dynamics of heart rate variability in humans. Biol Cybern 77:1–10.

Frazier DT, Revelette WR (1991) Role of phrenic nerve afferents in the control of breathing. J Appl Physiol 70:491–496.

Freedman S, Weinstein SA (1965) Effects of external elastic and threshold loading on breathing in man. J Appl Physiol 20:469-472.

Fregosi RF, Mitchell GS (1994) Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. J Physiol 477: 469–479.

Fried I, Katz A, McCarthy G, Sass KJ, Williamson P, Spencer SS, Spencer DD (1991) Functional organization of human supplementary motor cortex studied by electrical stimulation. J Neurosci 11:3656–3666.

Fuhr P, Cohen LG, Dang N, Findley TW, Haghighi S, Oro J, t M (1992) Physiological analysis of motor reorganization following lower-limb amputation. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 85:53–60.

Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS (2000) Long term facilitation of phrenic motor output. Respir Physiol 121:135–146.

Fuller DD, Zabka AG, Baker TL, Mitchell GS (2001) Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia - Selected contribution: Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. J Appl Physiol 90:2001–2006.

Fung PK, Robinson PA (2014) Neural field theory of synaptic metaplasticity with applications to theta burst stimulation. J Theor Biol 340:164–176.

Funk GD, Johnson SM, Smith JC, Dong XW, Lai J, Feldman JL (1997) Functional respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. J Neurophysiol 78:1414–1420.

Gallego J, Nsegbe E, Durand E (2001) Learning in respiratory control. Behav Modif 25:495–512.

Gallego J, Perruchet P (1991a) Classical conditioning of ventilatory responses in humans. J Appl Physiol 70: 676–682.

Gallego J, Perruchet P (1991b) Effect of practice on the voluntary control of a learned breathing pattern. Physiol Behav 49:315–319.

Gálveza V, Alonzo A, Martin D, Loo CK (2013). Transcranial direct current stimulation treatment protocols: should stimulus intensity be constant or incremental over multiple sessions? Int J Neuropsychoph 16:13–21.

Gandevia S, Macefield G (1989) Projection of low-threshold afferents from human intercostal muscles to the cerebral-cortex. Respir Physiol 77:203–214.

Gandevia S, Rothwell J (1987) Activation of the human diaphragm from the motor cortex. J Physiol (Lond) 384:109–118.

Gandiga PC, Hummel FC, Cohen LG (2006) Transcranial DC stimulation (tDCS): a tool for double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. Clin Neurophysiol 117:845–850.

Gangitano M, Valero-Cabre A, Tormos JM, Mottaghy FM, Romero JR, Pascual-Leone A (2002) Modulation of input-output curves by low and high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. Clin Neurophysiol 113:1249–1257.

Ganguly K, Kiss L, Poo MM (2000). Enhancement of presynaptic neuronal excitability by correlated presynaptic and postsynaptic spiking. Nat Neurosci 3:1018–1026.

Gentner R, Wankerl K, Reinsberger C, Zeller D, Classen J (2008) Depression of human corticospinal excitability induced by magnetic theta-burst stimulation: evidence of rapid polarity-reversing metaplasticity. Cereb Cortex 18:2046–2053.

Georgopoulos D, Bshouty Z, Younes M, Anthonisen NR (1990) Hypoxic exposure and activation of the afterdischarge mechanism in conscious humans. J Appl Physiol 69:1159–1164.

Gerloff C, Corwell B, Chen R, t M, Cohen LG (1997) Stimulation over the human supplementary motor area interferes with the organization of future elements in complex motor sequences. Brain 120:1587–1602.

Gerst DG 3rd, Yokhana SS, Carney LM, Lee DS, Badr MS, Qureshi , Anthouard MN, Mateika JH (2011) The hypoxic ventilatory response and ventilatory long-term facilitation are altered by time of day and repeated daily exposure to intermittent hypoxia. J Appl Physiol 110:15–28.

Goldsworthy MR, Pitcher JB, Ridding MC (2012) A comparison of two different continuous theta burst stimulation paradigms applied to the human primary motor cortex. Clin Neurophysiol 123:2256–2263.

Gozal D, Marcus CL, Ward SLD, Keens TG (1996) Ventilatory responses to passive leg motion in children with congenital central hypoventilation syndrome. Am J Respir Crit Care Med 153:761-768.

Greer JJ, Smith JC, Feldman JL (1991) Role of excitatory amino-acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. J Physiol (Lond) 437:727–749.

Grossman P, Wilhelm FH, Brutsche M (2010) Accuracy of ventilatory measurement employing ambulatory inductive plethysmography during tasks of everyday life. Biol Psychol 84:121–128.

Haggard P, Whitford B (2004) Supplementary motor area provides an efferent signal for sensory suppression. Cogn Brain Res 19: 52–58.

Hallett M (2000) Transcranial magnetic stimulation and the human brain. Nature 406:147–150.

Hamada M, Hanajima R, Terao Y, Okabe S, Nakatani-Enomoto S, Furubayashi T, Matsumoto H, Shirota Y, Ohminami S, Ugawa Y (2009) Primary motor cortical metaplasticity induced by priming over the supplementary motor area. J Physiol 587:4845–4862.

Hamada M, Murase N, Hasan A, Balaratnam M, Rothwelll JC (2013) The Role of Interneuron Networks in Driving Human Motor Cortical Plasticity. Cereb Cortex 23:1593–1605.

Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Enomoto H, Shiio Y, Mochizuki H, Furubayashi T, Uesugi H, Iwata NK, Kanazawa I (2002) Mechanisms of intracortical I-wave facilitation elicited with paired-pulse magnetic stimulation in humans. J Physiol (Lond) 538:253–261.

Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Sakai K, Furubayashi T, Machii K, Kanazawa I (1998) Paired-pulse magnetic stimulation of the human motor cortex: differences among I waves. J Physiol 509:607–618.

Haouzi P, Chenuel B, Barroche G (2006) Interactions between volitional and automatic breathing during respiratory apraxia. Respir Physiol Neurobiol 152:169–175.

Harper RM, Macey PM, Woo MA, Macey KE, Keens TG, Gozal D, Alger JR (2005) Hypercapnic exposure in congenital central hypoventilation syndrome reveals CNS respiratory control mechanisms. J Neurophysiol 93:1647–1658.

Harris DP, Balasubramaniam A, Badr MS, Mateika JH (2006) Long-term facilitation of ventilation and genioglossus muscle activity is evident in the presence of elevated levels of carbon dioxide in awake humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291:R1111–R1119.

Hasan A, Hamada M, Nitsche MA, Ruge D, Galea JM, Wobrock T, Rothwell JC (2012) Direct-current-dependent shift of theta-burst-induced plasticity in the human motor cortex. Exp Brain Res 217:15–23.

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–R819.

Hayashi F, Hinrichsen CFL, McCrimmon DR (2003) Short-term plasticity of descending synaptic input to phrenic motoneurons in rats. J Appl Physiol 94:1421–1430.

He SQ, Dum RP, Strick PL (1993) topographic organization of corticospinal projections from the frontal-lobe - motor areas on the lateral surface of the hemisphere. J Neurosci 13:952-980.

Heide G, Witte OW, Ziemann U (2006) Physiology of modulation of motor cortex excitability by low-frequency suprathreshold repetitive transcranial magnetic stimulation. Exp Brain Res 171:26–34.

Henneman E, Somjen G, Carpente DO (1965) Functional significance of cell size in spinal motoneurons. J Neurophysiol 28:560–580.

Hess A, Yu L, Klein I, De Mazancourt M, Jebrak G, Mal H, Brugiere O, Fournier M, Courbage M, Dauriat G, Schouman-Clayes E, Clerici C, Mangin L (2013) Neural Mechanisms Underlying Breathing Complexity. Plos One 8.

Heywood P, Murphy K, Corfield DR, Morrell MJ, Howard RS, Guz A (1996) Control of breathing in man; insights from the 'locked-in' syndrome. Respir Physiol 106:13–20.

Hilaire G, Monteau R (1976) Connections between inspiratory medullary neurons and phrenic or intercostal motoneurones. J Physiol (Paris) 72:987–1000.

Hodges PW, Gandevia SC (2000) Activation of the human diaphragm during a repetitive postural task. J Physiol (Lond) 522:165–175.

Hoogendam JM, Ramakers GMJ, Di Lazzaro V (2010) Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. Brain Stimul 3:95–118.

Hopkinson NS, Sharshar T, Ross ET, Nickol AH, Dayer MJ, Porcher R, Jonville S, Moxham J, Polkey MI (2004) Corticospinal control of respiratory muscles in chronic obstructive pulmonary disease. Respir Physiol Neurobiol 141:1–12.

Hori N, Carp JS, Carpenter DO, Akaike N (2002) Corticospinal transmission to motoneurons in cervical spinal cord slices from adult rats. Life Sci 72:389–396.

Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O (1988) Bistability of alpha-motoneurones in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. J Physiol 405:345–367.

Hsieh YH, Siegel RE, Dick TE (2004) Pontine GABAergic pathways: role and plasticity in the hypoxic ventilatory response. Respir Physiol Neurobiol 143:141–153.

Huang YZ (2010) The modulation of cortical motor circuits and spinal reflexes using theta burst stimulation in healthy and dystonic subjects. Restor Neurol Neurosci 28:449–457.

Huang YZ, Chen RS, Rothwell JC,Wen HY (2007) The after-effect of human theta burst stimulation is NMDA receptor dependent. Clin Neurophysiol 118:1028–1032.

Huang YZ, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC (2005) Theta burst stimulation of the human motor cortex. Neuron 45:201–206.

Huang YZ, Rothwell JC, Edwards MJ, Chen RS (2008) Effect of physiological activity on an NMDA-dependent form of cortical plasticity in human. Cereb Cortex 18:563–570.

Huang YZ, Rothwell JC, Lu CS, Wang JJ, Weng YH, Lai SC, Chuang WL, Hung J, Chen RS (2009a) The effect of continuous theta burst stimulation over premotor cortex on circuits in primary motor cortex and spinal cord. Clin Neurophysiol 120:796–801.

Huang YZ, Sommer M, Thickbroom G, Hamada M, Pascual-Leonne A, Paulus W, Classen J, Peterchev AV, Zangen A, Ugawa Y (2009b) Consensus: New methodologies for brain stimulation. Brain Stimul 2:2–13.

Hulme SR, Jones OD, Abraham WC (2013) Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. Trends Neurosci 36:353–362.

Hund-Georgiadis M, von Cramon DY (1999) Motor-learning-related changes in piano players and non-musicians revealed by functional magnetic-resonance signals. Exp Brain Res 125:417–425.

Iezzi E, Conte A, Suppa A, Agostino R, Dinapoli L, Scontrini A, Berardelli A (2008) Phasic voluntary movements reverse the aftereffects of subsequent theta-burst stimulation in humans. J Neurophysiol 100:2070–2076.

Ilic TV, Meintzschel F, Cleff U, Ruge D, Kessler KR, Ziemann U (2002) Short-interval paired-pulse inhibition and facilitation of human motor cortex: the dimension of stimulus intensity. J Physiol (Lond) 545:153–167.

Inghilleri M, Berardelli A, Marchetti P, Manfredi M (1996) Effects of diazepam, baclofen and thiopental on the silent period evoked by transcranial magnetic stimulation in humans. Exp Brain Res 109:467–472.

Inghilleri M, Conte A, Curra A, Frasca V, Lorenzano C, Berardelli A (2004) Ovarian hormones and cortical excitability. An rTMS study in humans. Clin Neurophysiol 115:1063–1068.

Ito M, Sakurai M, Tongroach P (1982) Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. J Physiol 324:113–134.

Iyer MB, Schleper N, Wassermann EM (2003) Priming stimulation enhances the depressant effect of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. J Neurosci 23:10867–10872.

Jäncke L, Steinmetz H, Benilow S, Ziemann U (2004) Slowing fastest finger movements of the dominant hand with low-frequency rTMS of the hand area of the primary motor cortex. Exp Brain Res 155:196–203.

Jodkowski JS, Viana F, Dick TE, Berger AJ (1987) Electrical properties of phrenic motoneurons in the cat: correlation with inspiratory drive. J Neurophysiol 58:105–124.

Jodkowski JS, Viana F, Dick TE, Berger AJ (1988) Repetitive firing properties of phrenic motoneurons in the cat. J Neurophysiol 60:687–702.

Johansen-Berg H, Behrens TE, Robson MD, Drobnjak I, Rushworth MF, Brady JM, Smith JM, Higham DJ, Matthews PM (2004) Changes in connectivity profiles define functionally distinct regions in human medial frontal cortex. Proc Natl Acad Sci USA 101:13335–13340.

Johnson RA, Mitchell GS (2013) Common mechanisms of compensatory respiratory plasticity in spinal neurological disorders. Respir Physiol Neurobiol 189:419–428.

Johnson SM, Mitchell GS (2002) Activity-dependent plasticity in descending synaptic inputs to respiratory spinal motoneurons. Respir Physiol Neurobiol 131:79–90.

Jordan AS, Catcheside PG, O'Donoghue FJ, McEvoy RD (2002) Long-term facilitation of ventilation is not present during wakefulness in healthy men or women. J Appl Physiol 93:2129–2136.

Julkunen P, Saisanen L, Danner N, Niskanen E, Hukkanen T, Mervaala E, Kononen M (2009) Comparison of navigated and non-navigated transcranial magnetic stimulation for motor cortex mapping, motor threshold and motor evoked potentials. Neuroimage 44:790–795.

Kammer T, Beck S, Thielscher A, Laubis-Herrmann U, Topka H. 2001. Motor thresholds in humans: a transcranial magnetic stimulation study comparing different pulse waveforms, current directions and stimulator types. Clin Neurophysiol 112:250–258.

Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science 294:1030–1038.

Kaneko K, Kawai S, Fuchigami Y, Morita H, Ofuji A (1996). The effect of current direction induced by transcranial magnetic stimulation on the corticospinal excitability in humanbrain. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 101:478–482.

Karni A, Meyer G, Jezzard P, Adams MM, Turner R, Ungerleider LG (1995) Functional mri evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. Nature 377:155–158.

Kernell D, Hultborn H (1990) Synaptic effects on recruitment gain - a mechanism of importance for the input output relations of motoneuron pools. Brain Res 507:176–179.

Khedr EM, Trakhan MN (2001) Localization of diaphragm motor cortical representation and determination of corticodiaphragmatic latencies by using magnetic stimulation in normal adult human subjects. European J Appl Physiol 85:560–566.

Kiers L, Cros D, Chiappa KH, Fang J (1993) Variability of motor potentials evoked by transcranial magnetic stimulation. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 89:415–423.

Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS (2001) Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 130: 207–218.

Kinkead R, Mitchell GS (1999) Time-dependent hypoxic ventilatory response in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. Am J Physiol 277:R658–R666.

Kobayashi M, Theoret H, Pascual-Leone A (2009) Suppression of ipsilateral motor cortex facilitates motor skill learning. Eur J Neurosci 29:833–836.

Kong FJ, Berger AJ (1986) Firing properties and hypercapnic responses of single phrenic motor axons in the rat. J Appl Physiol 61:1999–2004.

Krause B, Marquez-Ruiz J, Kadosh RC (2013) The effect of transcranial direct current stimulation: a role for cortical excitation/inhibition balance? Front Hum Neurosci 7.

Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD (1993) Corticocortical inhibition in human motor cortex. J Physiol (Lond) 471:501–519.

Lackmy A, Marchand-Pauvert V (2010) The estimation of short intra-cortical inhibition depends on the proportion of spinal motoneurones activated by corticospinal inputs. Clin Neurophysiol 121:612–621.

Lafargue G, Sirigu A (2006) The nature of the sense of effort and its neural substrate. Rev Neurol (Paris) 162:703–712.

Lamy JC, Boakye M (2013) BDNF Val66Met polymorphism alters spinal DC stimulation-induced plasticity in humans. J Neurophysiol 110:109–116.

Lamy JC, Ho C, Badel A, Arrigo RT, Boakye M (2012) Modulation of soleus H reflex by spinal DC stimulation in humans. J Neurophysiol 108:906–914.

Lane MA (2011) Spinal respiratory motoneurons and interneurons. Respir Physiol Neurobiol 179:3–13.

Lane MA, Fuller DD, White TE, Reier PJ (2008a) Respiratory neuroplasticity and cervical spinal cord injury: translational perspectives. Trends Neurosci 31:538–547.

Lane MA, Lee K-Z, Fuller DD, Reier PJ (2009) Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. Respir Physiol Neurobiol 169:123–132.

Lane MA, White TE, Coutts MA, Jones AL, Sandhu MS, Bloom DC, Bolser DC, Yates BJ, Fuller DD, Reier PJ (2008b) Cervical Prephrenic Interneurons in the Normal and Lesioned Spinal Cord of the Adult Rat. J Comp Neurol 511:692–709.

Lang N, Siebner HR, Ernst D, Nitsche MA, Paulus W, Lemon RN, Rothwell JC (2004) Preconditioning with transcranial direct current stimulation sensitizes the motor cortex to rapid-rate transcranial magnetic stimulation and controls the direction of after-effects. Biol Psychiatry 56:634–639.

Larson J, Lynch G (1988) Role of N-Methyl-D-Aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal θ-rhythm. Brain Res 441:111–118.

Larson J, Wong D, Lynch G (1986) Patterned stimulation at the theta-frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. Brain Res 368:347–350.

Le Roux N, Amar M, Fossier P (2008) Acquiring new information in a neuronal network: from Hebb's concept to homeostatic plasticity. Journal de la Societe de biologie 202:143-160.

Lee DS, Badr MS, Mateika JH (2009) Progressive augmentation and ventilatory long-term facilitation are enhanced in sleep apnoea patients and are mitigated by antioxidant administration. J Physiol (Lond) 587:5451–5467.

Lee KZ, Fuller DD (2011) Neural control of phrenic motoneuron discharge. Respir Physiol Neurobiol 179:71–79.

Lee KZ, Reier PJ, Fuller DD (2009) Phrenic motoneuron discharge patterns during hypoxia-induced short-term potentiation in rats. J Neurophysiol 102:2184–2193.

Lefaucheur JP (2009) Methods of therapeutic cortical stimulation. Neurophysiol Clin 39:1–14.

Lefaucheur JP, Andre-Obadia N, Poulet E, Devanne H, Haffen E, Londero A, Cretin B, Leroi AM, Radtchenko A, Saba G, Thai-Van H, Litre CF, Vercueil L, Bouhassira D, Ayache SS, Farhat WH, Zouari HG, Mylius V, Nicolier M, Garcia-Larrea L (2011) French guidelines on the use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): Safety and therapeutic indications. Neurophysiol Clin-Clin Neurophysiol 41:221–295.

Lefaucheur JP, Lofaso F (2002) Diaphragmatic silent period to transcranial magnetic cortical stimulation for assessing cortical motor control of the diaphragm. Exp Brain Res 146:404–409.

Lehéricy S, Ducros M, Krainik A, Francois C, van de Moortele PF, Ugurbil K, Kim DS (2004) 3-D diffusion tensor axonal tracking shows distinct SMA and pre-SMA projections to the human striatum. Cereb Cortex 14:1302–1309.

Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, Koenig F, Paulus W, Nitsche MA (2009) Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. Clin Neurophysiol 120:1161–1167.

Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W (2002) Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. Brain 125:2238–2247.

Liepert J, Schwenkreis P, Tegenthoff M, Malin JP (1997) The glutamate antagonist riluzole suppresses intracortical facilitation. J Neural Transm 104:1207–1214.

Lim CY, Shin HI (2011) Noninvasive DC stimulation on neck changes MEP. Neuroreport 22:819–823.

Ling L (2008) Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation. Respir Physiol Neurobiol 164:233–241.

Liotti M, Brannan S, Egan G, Shade R, Madden L, Abplanalp B, Robillard R, Lancaster J, Zamarripa FE, Fox PT, Denton D (2001) Brain responses associated with consciousness of breathlessness (air hunger). Proc Natl Acad Sci USA 98:2035–2040.

Lipski J, Duffin J (1986) An electrophysiological investigation of propriospinal inspiratory neurons in the upper cervical cord of the cat. Exp Brain Res 61:625–637.

Lipski J, Duffin J, Kruszewska B, Zhang X (1993) Upper cervical inspiratory neurons in the rat - an electrophysiological and morphological-study. Exp Brain Res 95:477–487.

Lipski J, Fyffe REW, Jodkowski J (1985) Recurrent inhibition of cat phrenic motoneurons. J Neurosci 5:1545–1555.

Lipski J, Zhang X, Kruszewska B, Kanjhan R (1994) Morphological-study of long axonal projections of ventral medullary inspiratory neurons in the rat. Brain Res 640:171–184.

Lissens MA (1994) Motor evoked-potentials of the human diaphragm elicited through magnetic transcranial brain-stimulation. J Neurol Sci 124:204–207.

Locher C, Raux M, Fiamma MN, Morelot-Panzini C, Zelter M, Derenne J-P, Similowski T, Straus C (2006) Inspiratory resistances facilitate the diaphragm response to transcranial stimulation in humans. BMC physiology 6:7–7.

Logie ST, Colrain IM, Webster KE (1998) Source dipole analysis of the early components of the RREP. Brain Topogr 11:153–164.

Lu M-K, Arai N, Tsai C-H, Ziemann U (2012) Movement related cortical potentials of cued versus self-initiated movements: double dissociated modulation by dorsal premotor cortex versus supplementary motor area rTMS. Hum Brain Mapp 33:824–839.

Luppino G, Matelli M, Camarda R, Rizzolatti G (1993) Corticocortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (pre-SMA) in the macaque monkey. J Comp Neurol 338:114–140.

Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. Physiol Rev 84:87–136.

Macar F, Coull J, Vidal F (2006) The supplementary motor area in motor and perceptual time processing: fMRI studies. Cogn Process 7:89–94.

Macefield G, Gandevia SC (1991) The cortical drive to human respiratory muscles in the awake state assessed by premotor cerebral potentials. J Physiol 439:545–558.

Macey PM, Woo MA, Macey KE, Keens TG, Saeed MM, Alger JR, Harper RM (2005) Hypoxia reveals posterior thalamic, cerebellar, midbrain, and limbic deficits in congenital central hypoventilation syndrome. J Appl Physiol 98:958–969.

Maeda F, Keenan JP, Tormos JM, Topka H, Pascual Leone A (2000) Modulation of corticospinal excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation. Clin Neurophysiol 111:800–805.

Mahutte CK, Rebuck AS (1978) Influence of rate of induction of hypoxia on the ventilatory response. J. Physiol. 284:219–227.

Makoshi Z, Kroliczak G, van Donkelaar P (2011) Human Supplementary Motor Area Contribution to Predictive Motor Planning. J Motor Behav 43:303–309.

Malcolm MP, Triggs WJ, Light KE, Shechtman O, Khandekar G, Rothi LJG (2006) Reliability of motor cortex transcranial magnetic stimulation in four muscle representations. Clin Neurophysiol 117:1037–1046.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: An embarrassment of riches. Neuron 44:5–21.

Mangin L, Fiamma M.N, Straus C, Derenne J.P, Zelter M, Clerici C, Similowski T (2008) Source of human ventilatory chaos: lessons from switching controlled mechanical ventilation to inspiratory pressure support in critically ill patients. Respir Physiol Neurobiol 161:189–196.

Mantilla CB, Seven YB, Zhan W-Z, Sieck GC (2010) Diaphragm motor unit recruitment in rats. Respir Physiol Neurobiol 173:101–106.

Marik SA, Yamahachi H, McManus JNJ, Szabo G, Gilbert CD (2010) Axonal Dynamics of Excitatory and Inhibitory Neurons in Somatosensory Cortex. Plos Biology 8.

Martin P, Gandevia S, Taylor J (2006) Theta burst stimulation does not reliably depress all regions of the human motor cortex. Clin Neurophysiol 117:2684–2690.

Maskill D, Murphy K, Mier A, Owen M, Guz A (1991) Motor cortical representation of the diaphragm in man. J Physiol (Lond) 443:105–121.

Massimini M, Ferrarelli F, Huber R, Esser SK, Singh H, Tononi G (2005) Breakdown of cortical effective connectivity during sleep. Science 309:2228–2232.

Mateika JH, Sandhu KS (2011) Experimental protocols and preparations to study respiratory long term facilitation. Respir Physiol Neurobiol 176:1–11.

Matsumoto R, Nair DR, LaPresto E, Bingaman W, Shibasaki H, Lüders HO (2007) Functional connectivity in human cortical motor system: a cortico-cortical evoked potential study. Brain 130:181–197.

Matsunaga K, Maruyama A, Fujiwara T, Nakanishi R, Tsuji S, Rothwell JC (2005) Increased corticospinal excitability after 5 Hz rTMS over the human supplementary motor area. J Physiol 562: 295–306.

Mazzocchio R, Kitago T, Liuzzi G, Wolpaw JR, Cohen LG (2006) Plastic changes in the human H-reflex pathway at rest following skillful cycling training. Clin Neurophysiol 117:1682–1691.

McAllister CJ, Rönnqvist KC, Stanford IM, Woodhall GL, Furlong PL, Hall SD (2013) Oscillatory beta activity mediates neuroplastic effects of motor cortex stimulation in humans. J Neurosci 33:7919–7927.

McAllister SM, Rothwell JC, Ridding MC (2011) Cortical oscillatory activity and the induction of plasticity in the human motor cortex. Eur J Neurosci 33:1916–1924.

McCormick DA (1992) Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral-cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. Prog Neurobiol 39:337–388.

McCreery DB, Agnew WF, Yuen TGH, Bullara L (1990) Charge-density and charge per phase as cofactors in neural injury induced by electrical-stimulation. Ieee Trans Biomed Eng 37:996–1001.

McCrimmon DR, Dekin MS, Mitchell GS (1995) Glutamate, GABA and serotonin in ventilatory control. In: Regulation of Breathing, edited by J.A. Dempsey and I.A. Pack. New York, Marcel Dekker Inc., pp. 151–218.

McCrimmon DR, Smith JC, Feldman JL (1989) Involvement of excitatory amino-acids in neurotransmission of inspiratory drive to spinal respiratory motoneurons. J Neurosci 9:1910–1921.

McCrimmon DR, Zuperku EJ, Hayashi F, Dogas Z, Hinrichsen CFL, Stuth EA, TonkovicCapin M, Krolo M, Hopp FA (1997) Modulation of the synaptic drive to respiratory premotor and motor neurons. Respir Physiol 110:161–176.

McEvoy RD, Popovic RM, Saunders NA, White DP (1996) Effects of sustained and repetitive isocapnic hypoxia on ventilation and genioglossal and diaphragmatic EMGs. J Appl Physiol 81:866–875.

McFarlane PM, Satriotomo I, Windelborn JA, Mitchell GS (2009) NADPH oxidase activity is necessary for acute intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. J Physiol (Lond) 587:1931–1942.

McGuire M, Liu C, Cao Y, Ling LM (2008) Formation and maintenance of ventilatory long-term facilitation require NMDA but not non-NMDA receptors in awake rats. J Appl Physiol 105:942–950.

McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling LM (2002) Effect of hypoxic episode number and severity on ventilatory long-term facilitation in awake rats. J Appl Physiol 93:2155–2161.

McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling LM (2005) Phrenic long-term facilitation requires NMDA receptors in the phrenic motonucleus in rats. J Physiol (Lond) 567:599–611.

McKay LC, Adams L, Frackowiak RS, Corfield DR (2008) A bilateral cortico-bulbar network associated with breath holding in humans, determined by functional magnetic resonance imaging. Neuroimage 40:1824–1832.

McKay LC, Critchley HD, Murphy K, Frackowiak RS, Corfield DR (2010) Sub-cortical and brainstem sites associated with chemo-stimulated increases in ventilation in humans. Neuroimage 49:2526–2535.

McKay LC, Evans KC, Frackowiak RSJ, Corfield DR (2003) Neural correlates of voluntary breathing in humans. J Appl Physiol 95:1170–1178.

Mead J, Loring SH (1982) Analysis of volume displacement and length changes of the diaphragm during breathing. J Appl Physiol 53:750–755.

Méhiri S, Straus C, Arnulf I, Attali V, Zelter M, Derenne JP, Similowski T (2006) Responses of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation during wake and sleep in humans. Respir Physiol Neurobiol 154:406–418.

Merrill EG, Fedorko L (1984) Mono-synaptic inhibition of phrenic motoneurons - a long descending projection from botzinger neurons. J Neurosci 4:2350–2353.

Merton PA, Morton HB (1980) Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. Nature 285:227–227.

Meunier S, Kwon J, Russmann H, Ravindran S, Mazzocchio R, Cohen L (2007) Spinal use-dependent plasticity of synaptic transmission in humans after a single cycling session. J Physiol (Lond) 579:375–388.

Milic-Emili J (1982) Recent advances in clinical-assessment of control of breathing. Lung 160:1–17.

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

Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG (1980b) Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. Respir Physiol 42:171–198.

Mills KR, Boniface SJ, Schubert M (1992) Magnetic brain-stimulation with a double coil - the importance of coil orientation. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 85:17–21.

Mitchell G, Powell F, Hopkins S, Milsom W (2001) Time domains of the hypoxic ventilatory response in awake ducks: episodic and continuous hypoxia. Respir Physiol 124:117–128.

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

Mitchell GS, Johnson SM (2003) Plasticity in respiratory motor control - Invited review: Neuroplasticity in respiratory motor control. J Appl Physiol 94:358–374.

Modugno N, Nakamura Y, MacKinnon CD, Filipovic SR, Bestmann S, Berardelli A, Rothwell JC (2001) Motor cortex excitability following short trains of repetitive magnetic stimuli. Exp Brain Res 140:453–459.

Monteau R, Hilaire G (1991) Spinal respiratory motoneurons. Prog Neurobiol 37:83–144.

Muakkassa KF, Strick PL (1979) Frontal lobe inputs to primate motor cortex: evidence for four somatotopically organized 'premotor' areas. Brain Res 177:176–182.

Muellbacher W, Ziemann U, Boroojerdi B, Hallett M (2000) Effects of low-frequency transcranial magnetic stimulation on motor excitability and basic motor behavior. Clin Neurophysiol 111:1002–1007.

Muellbacher W, Ziemann U, Wissel J, Dang N, Kofler M, Facchini S, Boroojerdi B, Poewe W, Hallett M (2002) Early consolidation in human primary motor cortex. Nature 415:640–644.

Muller N, Volgyesi G, Becker L, Bryan MH, Bryan AC. (1979). Diaphragmatic muscle tone. J Appl Physiol 47:279–284.

Münchau A, Bloem BR, Irlbacher K, Trimble MR, Rothwell JC (2002) Functional connectivity of human premotor and motor cortex explored with repetitive transcranial magnetic stimulation. J Neurosci 22:554–561.

Munschauer FE, Mador MJ, Ahuja A, Jacobs L (1991) Selective paralysis of voluntary but not limbically influenced automatic respiration. Arch Neurol 48:1190–1192.

Murphy K, Mier A, Adams L, Guz A (1990) Putative cerebral cortical involvement in the ventilatory response to inhaled CO2 in conscious man. J Physiol (Lond) 420:1–18.

Nachev P, Kennard C, Husain M (2008) Functional role of the supplementary and pre-supplementary motor areas. Nat Rev Neurosci 9:856–869.

Nakamura H, Kitagawa H, Kawaguchi Y, Tsuji H (1997) Intracortical facilitation and inhibition after transcranial magnetic stimulation in conscious humans. J Physiol 498:817–823.

Nakayama T, Fujii Y, Suzuki K, Kanazawa I, Nakada T (2004) The primary motor area for voluntary diaphragmatic motion identified by high field fMRI. J Neurol 251:730–735.

Nattie E (1999) CO2, brainstem chemoreceptors and breathing. Prog Neurobiol 59:299–331.

Nattie E, Li A (2006) Central chemoreception 2005: a brief review. Auton Neurosci 126:332–338.

Ni Z, Charab S, Gunraj C, Nelson AJ, Udupa K, Yeh IJ, Chen R (2011) Transcranial Magnetic Stimulation in Different Current Directions Activates Separate Cortical Circuits. J Neurophysiol 105:749–756.

Niehaus L, Meyer BU, Weyh T (2000) Influence of pulse configuration and direction of coil current on excitatory effects of magnetic motor cortex and nerve stimulation. Clin Neurophysiol 111:75–80.

Nikolova M, Pondev N, Christova L, Wolf W, Kossev AR (2006) Motor cortex excitability changes preceding voluntary muscle activity in simple reaction time task. European J Appl Physiol 98:212–219.

Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A (2008) Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. Brain Stimul 1:206–223.

Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, Henning S, Tergau F, Paulus W (2003a) Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced

by transcranial direct current stimulation in humans. J Physiol (Lond) 553:293–301.

Nitsche MA, Kuo M-F, Karrasch R, Waechter B, Liebetanz D, Paulus W (2009) Serotonin Affects Transcranial Direct Current-Induced Neuroplasticity in Humans. Biological Psychiatry 66:503–508.

Nitsche MA, Liebetanz D, Antal A, Lang N, Tergau F, Paulus W (2003b) Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation - technical, safety and functional aspects. Suppl Clin Neurophysiol 56:255–276.

Nitsche MA, Liebetanz D, Lang N, Antal A, Tergau F, Paulus W (2003c) Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. Clinical Neurophysiology 114:2220–2222.

Nitsche MA, Liebetanz D, Schlitterlau A, Henschke U, Fricke K, Frommann K, Lang N, Henning S, Paulus W, Tergau F (2004) GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. Eur J Neurosci 19:2720–2726.

Nitsche MA, Mueller-Dahlhaus F, Paulus W, Ziemann U (2012) The pharmacology of neuroplasticity induced by non-invasive brain stimulation: building models for the clinical use of CNS active drugs. J Physiol (Lond) 590:4641-4662.

Nitsche MA, Paulus W (2000) Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. J Physiol (Lond) 527:633–639.

Nitsche MA, Paulus W (2001) Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. Neurology 57:1899–1901.

Nitsche MA, Seeber A, Frommann K, Mein CC, Rochford C, Nitsche MS, Fricke K, Liebetanz D, Lang N, Antal A, Paulus W, Tergau F (2005) Modulating parameters of excitability during and after transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. J Physiol (Lond) 568:291–303.

Noh NA, Fuggetta G, Manganotti P, Fiaschi A (2012) Long Lasting Modulation of Cortical Oscillations after Continuous Theta Burst Transcranial Magnetic Stimulation. Plos One 7.

Nurse CA (2005) Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. Auton Neurosci120:1–9.

Oberman L, Edwards D, Eldaief M, Pascual-Leone A (2011) Safety of Theta Burst Transcranial Magnetic Stimulation: A Systematic Review of the Literature. J Clin Neurophysiol 28:67–74.

O'Donnell DE, Banzett RB, Carrieri–Kohlman V, Casaburi R, Davenport PW, Gandevia SC, Gelb AF, Mahler DA, Webb KA (2007) Pathophysiology of dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease: a roundtable. Proc Am Thorac Soc 4:145–168.

Okabe S, Hanajima R, Ohnishi T, Nishikawa M, Imabayashi E, Takano H, Kawachi T, Matsuda H, Shiio Y, Iwata NK, Furubayashi T, Terao Y, Ugawa Y (2003) Functional connectivity revealed by single-photon emission computed tomography (SPECT) during repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) of the motor cortex. Clin Neurophysiol 114:450–457.

Olson EB, Bohne CJ, Dwinell MR, Podolsky A, Vidruk EH, Fuller DD, Powell FL, Mitchel GS (2001) Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats. J Appl Physiol 91:709–716.

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

Orem J, Netick A (1986) Behavioral-control of breathing in the cat. Brain Res 366:238–253.

Paradiso GO, Cunic DI, Gunraj CA, Chen R (2005) Representation of facial muscles in

human motor cortex. J Physiol (Lond) 567:323–336.

Parkis MA, Dong X-W, Feldman JL, Funk GD (1999) Concurrent inhibition and excitation of phrenic motoneurons during inspiration: Phase-specific control of excitability. J Neurosci 19:2368–2380.

Parshall MB, Schwartzstein RM, Adams L, Banzett RB, Manning HL, Bourbeau J, Calverley PM, Gift AG, Harver A, Lareau SC, Mahler DA, Meek PM, O'Donnell DE, Dyspnea ATSC (2012) An Official American Thoracic Society Statement: Update on the Mechanisms, Assessment, and Management of Dyspnea. Am J Respir Crit Care Med 185:435–452.

Pascual-Leone A, Dang N, Cohen LG, Brasil Neto JP, Cammarota A, Hallett M (1995) Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor-skills. J Neurophysiol 74:1037–1045.

Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Brasil-Neto JP, Cammarota A, Grafman J, Hallett M (1994) Akinesia in Parkinson's disease. II. EVects of subthreshold repetitive transcranial motor cortex stimulation. Neurology 44:892–898.

Pattinson KTS, Mitsis GD, Harvey AK, Jbabdi S, Dirckx S, Mayhew SD, Rogers R, Tracey I, Wise RG (2009) Determination of the human brainstem respiratory control network and its cortical connections in vivo using functional and structural imaging. Neuroimage 44:295–305.

Patton HD, Amassian VE (1954). Single- and multiple-unit analysis of cortical stage of pyramidal tract activation. J Neurophysiol 17:345–363.

Paulus W, Classen J, Cohen LG, Large CH, Di Lazzaro V, Nitsche M, Pascual-Leone A, Rosenow F, Rothwell JC, Ziemann U (2008) State of the art: Pharmacologic effects on cortical excitability measures tested by transcranial magnetic stimulation. Brain Stimul 1:151–163.

Paz JT, Mahon S, Tiret P, Genet S, Delord B, Charpier S (2009) Multiple forms of activity-dependent intrinsic plasticity in layer V cortical neurones in vivo. J Physiol (Lond) 587:3189–3205.

Peiffer C, Poline JB, Thivard L, Aubier M, Samson Y (2001) Neural substrates for the perception of acutely induced dyspnea. Am J Respir Crit Care Med 163:951–957.

Pell GS, Roth Y, Zangen A (2011) Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: Influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms. Prog Neurobiol 93:59–98.

Penfield W, Boldrey E (1937) Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. Brain 60:389–443.

Perez MA, Lungholt BKS, Nielsen JB (2005) Short-term adaptations in spinal cord circuits evoked by repetitive transcranial magnetic stimulation: possible underlying mechanisms. Exp Brain Res 162:202–212.

Perez W, Tobin MJ (1985) Separation of factors responsible for change in breathing pattern induced by instrumentation. J Appl Physiol 59:1515–1520.

Perry SF, Similowski T, Klein W, Codd JR (2010) The evolutionary origin of the mammalian diaphragm. Respir Physiol Neurobiol 171:1–16.

Petersen NT, Pyndt HS, Nielsen JB (2003) Investigating human motor control by transcranial magnetic stimulation. Exp Brain Res 152:1-16.

Picard N, Strick PL (1996) Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. Cereb Cortex 6:342–353.

Picard N, Strick PL (2001) Imaging the premotor areas. Curr Opin Neurobiol 11:663–672.

Pierchala LA, Mohammed AS, Grullon K, Mateika JH, Badr MS (2008) Ventilatory long-term facilitation in nonsnoring subjects during NREM sleep. Respir Physiol Neurobiol 160:259–266.

Polacheck J, Strong R, Arens J, Davies C, Metcalf I, Younes M (1980) Phasic vagal influence on inspiratory motor output in anesthetized human subjects. J Appl Physiol 49:609–619.

Poon CS, Barahona M (2001) Titration of chaos with added noise. Proc Natl Acad Sci USA 98:7107–7112.

Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS (1998) Time domains of the hypoxic ventilatory response. Respir Physiol 112:123–134.

Prabhakar NR, Peng YJ (2004) Peripheral chemoreceptors in health and disease. J Appl Physiol 96:359–366.

Priori A (2003) Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged noninvasive modulation of brain excitability. Clin Neurophysiol 114:589–595.

Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M (1998) Polarization of the human motor cortex through the scalp. Neuroreport 9:2257–2260.

Priori A, Bertolasi L, Dressler D, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Marsden CD (1993) Transcranial electric and magnetic stimulation of the leg area of the human motor cortex - single motor unit and surface EMG responses in the tibialis anterior muscle. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 89:131–137.

Priori A, Hallett M, Rothwell JC (2009) Repetitive transcranial magnetic stimulation or transcranial direct current stimulation? Brain Stimul 2:241–245.

Quartarone A, Bagnato S, Rizzo V, Morgante F, Sant'angelo A, Battaglia F, Messina C, Siebner HR, Girlanda P (2005) Distinct changes in cortical and spinal excitability following high frequency repetitive TMS to the human motor cortex. Exp. Brain Res. 161:114–124.

Quartarone A, Siebner HR, Rothwell JC (2006) Task-specific hand dystonia:can too much plasticity be bad for you? Trends Neurosci 29:192-199.

Racine RJ, Chapman CA, Trepel C, Teskey GC, Milgram NW (1995) Post-activation potentiation in the neocortex .4. Multiple sessions required for induction of long-term potentiation in the chronic preparation. Brain Res 702:87–93.

Ramsay SC, Adams L, Murphy K, Corfield DR, Grootoonk S, Bailey DS, Frackowiak RSJ, Guz A (1993) Regional cerebral blood flow during volitional expiration in man: a comparison with volitional inspiration. J Physiol 461:85–101.

Rapp P (1993) Chaos in the neurosciences : cautionary tales from the frontier. Biologist 40:89-94.

Raux M, Ray P, Prella M, Duguet A, Demoule A, Similowski T (2007a) Cerebral cortex activation during experimentally induced ventilator fighting in normal humans receiving noninvasive mechanical ventilation. Anesthesiology 107:746–755.

Raux M, Straus C, Redolfi S, Morelot-Panzini C, Couturier A, Hug F, Similowski T (2007b) Electroencephalographic evidence for pre-motor cortex activation during inspiratory loading in humans. J Physiol (Lond) 578:569–578.

Raux M, Tyvaert L, Ferreira M, Kindler F, Bardinet E, Karachi C, Morelot-Panzini C, Gotman J, Pike GB, Koski L, Similowski T (2013) Functional magnetic resonance imaging suggests automatization of the cortical response to inspiratory threshold loading in humans. Respir Physiol Neurobiol 189:571–580.

Raux M, Xie H, Similowski T, Koski L (2010) Facilitatory conditioning of the supplementary motor area in humans enhances the corticophrenic responsiveness to transcranial magnetic stimulation. J Appl Physiol 108:39–46.

Reis J, Robertson EM, Krakauer JW, Rothwell J, Marshall L, Gertoff C, Wassermann EM, Pascual-Leone A, Hummel F, Celnik PA, Classen J, Floel A, Ziemann U, Paulus W, Siebner HR, Born J, Cohen LG (2008) Consensus: can transcranial direct current stimulation and transcranial magnetic stimulation enhance motor learning and memory formation? Brain Stimul 1:363–369.

Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. Physiol Rev 80:767–852.

Reynolds C, Ashby P (1999) Inhibition in the human motor cortex is reduced just before a voluntary contraction. Neurology 53:730–735.

Richter DW (1982) Generation and maintenance of the respiratory rhythm. J Exp Biol 100:93–107.

Richter DW, Ballantyne D, Remmers JE (1987) The differential organization of medullary post-inspiratory activities. Pflügers Arch 410:420–427.

Richter DW, Mironov SL, Busselberg D, Lalley PM, Bischoff AM, Wilken B (2000) Respiratory rhythm generation: Plasticity of a neuronal network. Neuroscientist 6:181–198.

Ridding MC, Rothwell JC (1997) Stimulus/response curves as a method of measuring motor cortical excitability in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol/ Electromyogr Motor Control 105:340–344.

Ridding MC, Taylor JL, Rothwell JC (1995) The effect of voluntary contraction on cortico-cortical inhibition in human motor cortex. J Physiol 487:541–548.

Ridding MC, Ziemann U (2010) Determinants of the induction of cortical plasticity by non-invasive brain stimulation in healthy subjects. J Physiol (Lond) 588:2291-2304.

Rijntjes M, Tegenthoff M, Liepert J, Leonhardt G, Kotterba S, Muller S, Kiebel S, Malin JP, Diener HC, Weiller C (1997) Critical reorganization in patients with facial palsy. Ann Neurol 41:621–630.

Rikard-Bell GC, Bystrzycka EK, Nail BS (1984) Brainstem projections to the phrenic nucleus: a HRP study in the cat. Brain Res bulletin 12:469–477.

Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP (2000) Learning-induced LTP in neocortex. Science 290:533–536.

Road JD (1990) Phrenic afferents and ventilatory control. Lung 168:137–149.

Road JD, Cairns AM (1997) Phrenic motoneuron firing rates before, during, and after prolonged inspiratory resistive loading. J Appl Physiol 83:776–783.

Roick H, Vongiesen HJ, Benecke R (1993) On the origin of the postexcitatory inhibition seen after transcranial magnetic brain-stimulation in awake human-subjects. Exp Bain Res 94:489–498.

Roland PE, Larsen B, Lassen NA, Skinhoj E (1980) Supplementary motor area and other cortical areas in organization of voluntary movements in man. J Neurophysiol 43:118–36.

Roshan L, Paradiso GO, Chen R (2003) Two phases of short-interval intracortical inhibition. Exp Brain Res 151:330–337.

Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Safety TMSCG (2009) Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. Clin Neurophysiol 120:2008–2039.

Rossi S, Pasqualetti P, Rossini PM, Feige B, Ulivelli M, Glocker FX, Battistini N, Lucking CH, Kristeva-Feige R (2000) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on movement-related cortical activity in humans. Cereb Cortex 10:802–808.

Rossini PM, Barker AT, Berardelli A, Caramia MD, Caruso G, Cracco RQ, Dimitrijevic MR, Hallett M, Katayama Y, Lucking CH, Maertens de Noordhout AL, Marsden CD, Murray NMF, Rothwell JC, Swash M, Tomberg C (1994) Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 91:79–92.

Roth BJ, Saypol JM, Hallett M, Cohen LG (1991) A theoretical calculation of the electric-field induced in the cortex during magnetic stimulation Electroencephalogr Clin Neurophysiol 81:47–56.

Rothwell JC (1997) Techniques and mechanisms of action of transcranial stimulation of the human motor cortex. J Neurosci Methods 74:113–122.

Rothwell JC (2004) Transcranial electrical and magnetic stimulation of the brain: basic physiological mechanisms. . In: Hallet M, Chokroverty S, editors. Magnetic stimulation in clinical neurophysiology. Butterworth; pp. 43–60.

Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Kujirai T (2009) Short latency intracortical inhibition: one of the most popular tools in human motor neurophysiology. J Physiol (Lond) 587:11-12.

Rothwell JC, Thompson PD, Day BL, Boyd S, Marsden CD (1991) Stimulation of the human motor cortex through the scalp. Exp Physiol 76:159–200.

Roulin E, Freitas US, Letellier C (2011) Working conditions for safe detection of nonlinearity and noise titration. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 83:046225.

Ruohonen J, Ilmoniemi RJ (2005) Basic physics and design of TMS devices and coils. In: Hallet M, Chokroverty S, editors. Magnetic stimulation in clinical neurophysiology. Butterworth; pp. 17—30.

Saboisky J, Gorman R, De Troyer A, Gandevia S, Butler J (2007a) Differential activation among five human inspiratory motoneuron pools during tidal breathing. J Appl Physiol 102:772–780.

Sakai K, Ugawa Y, Terao Y, Hanajima R, Furabayashi T, Kanazawa I (1997) Preferential activation of different I waves by transcr anial magnetic stimulation with a figure-of - eight shaped coil. Exp Brain Res 113:24–32.

Sale MV, Ridding MC, Nordstrom MA (2008) Cortisol inhibits neuroplasticity induction in human motor cortex. J Neurosci 28:8285–8293.

Samara Z, Raux M, Fiamma MN, Gharbi A, Gottfried SB, Poon CS, Similowski T, Straus C (2009) Effects of inspiratory loading on the chaotic dynamics of ventilatory flow in humans. Respir Physiol Neurobiol 165:82–89.

Sandhu MS, Dougherty BJ, Lane MA, Bolser DC, Kirkwood PA, Reier PJ, Fuller DD (2009) Respiratory recovery following high cervical hemisection. Respir Physiol Neurobiol 169:94–101.

Sanes JN, Donoghue JP (2000) Plasticity and primary motor cortex. Ann Rev Neurosci 23:393–415.

Sant'Ambrogio G, Wilson MF, Frazier DT (1962) Somatic afferent activity in reflex regulation of diaphragmatic function in the cat. J Appl Physiol 17:829–832.

Schinder AF, Poo M. (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity Trends Neurosci 23:639–645.

Schmidt M, Demoule A, Cracco C, Gharbi A, Fiamma MN, Straus C, Duguet A, Gottfried SB, Similowski T (2010) Neurally adjusted ventilatory assist increases respiratory variability and complexity in acute respiratory failure. Anesthesiology 112:670–681.

Serrien DJ, Strens LHA, Oliviero A, Brown P (2002) Repetitive transcranial magnetic stimulation of the supplementary motor area (SMA) degrades bimanual movement control in humans. Neurosci Lett 328:89–92.

Shadmehr R, Smith MA, Krakauer JW (2010) Error Correction, Sensory Prediction, and Adaptation in Motor Control. Ann Rev Neurosci 33:89–108.

Shafi MM, Westover MB, Oberman L, Cash SS, Pascual-Leone A (2014) Modulation of EEG Functional Connectivity Networks in Subjects Undergoing Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation. Brain Topogr 27:172–191.

Sharshar T, Hopkinson NS, Jonville S, Prigent HN, Carlier R, Dayer MJ, Swallow EB, Lofaso F, Moxham J, Polkey MI (2004a) Demonstration of a second rapidly conducting cortico-diaphragmatic pathway in humans. J Physiol (Lond) 560:897–908.

Sharshar T, Hopkinson NS, Ross ET, Jonville S, Dayer MJ, Nickol AH, Lofaso F, Moxham J, Polkey MI (2005) Motor control of the costal and crural diaphragm - insights from transcranial magnetic stimulation in man. Respir Physiol Neurobiol 146:5–19.

Sharshar T, Ross E, Hopkinson NS, Dayer M, Nickol A, Lofaso F, Moxham J, Similowski T, Polkey MI (2003) Effect of voluntary facilitation on the diaphragmatic response to transcranial magnetic stimulation. J Appl Physiol 95:26–34.

Sharshar T, Ross ET, Hopkinson NS, Porcher R, Nickol AH, Jonville S, Dayer MJ, Hart N, Moxham J, Lofaso F, Polkey MI (2004b) Depression of diaphragm motor cortex excitability during mechanical ventilation. J Appl Physiol 97:3–10.

Shea SA (1996) Behavioural and arousal-related influences on breathing in humans. Exp Physiol 81:1–26.

Shibasaki H (2012) Cortical activities associated with voluntary movements and involuntary movements. Clin Neurophysiol 123:229–243.

Shima K, Tanji J (1998) Both supplementary and presupplementary motor areas are crucial for the temporal organization of multiple movements. J Neurophysiol 80:3247–3260.

Shirota Y, Hamada M, Terao Y, Ohminami S, Tsutsumi R, Ugawa Y, Hanajima R (2012) Increased primary motor cortical excitability by a single-pulse transcranial magnetic stimulation over the supplementary motor area. Exp Brain Res 219:339-349.

Siebner HR, Lang N, Rizzo V, Nitsche MA, Paulus W, Lemon RN, Rothwell JC (2004) Preconditioning of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation with transcranial direct current stimulation: Evidence for homeostatic plasticity in the human motor cortex. J Neurosci 24:3379–3385.

Siebner HR, Rothwell J (2003) Transcranial magnetic stimulation: new insights into representational cortical plasticity. Exp Brain Res 148:1–16.

Similowski T, Catala M, Rancurel G, Derenne JP (1996a) Impairment of central motor conduction to the diaphragm in stroke. Am J Respir Crit Care Med 154:436–441.

Similowski T, Straus C, Coic L, Derenne JP (1996b) Facilitation-independent response of the diaphragm to cortical magnetic stimulation. Am J Respir Crit Care Med 154:1771–1777.

Similowski T, Straus C, Duguet A, Arnulf I, Derenne JP (1996) Contrôle de la respiration. In: Aubier M, Fournier M, Pariente R: Traité de pneumologie. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp99-110.

Sjöström PJ, Turrigiano GG, Nelson SB (2001) Rate, timing and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. Neuron 32:1149–1164.

Skatrud JB, Dempsey JA (1983) Interaction of sleep state and chemical stimuli in sustaining rhythmic ventilation. J Appl Physiol 55:813–822.

Smejkal V, Druga R, Tintera J (2000) Brain activation during volitional control of breathing. Physiol Res 49:659–663.

Smith CA, Rodman JR, Chenuel BJA, Henderson KS, Dempsey JA (2006) Response time and sensitivity of the ventilatory response to CO2 in unanesthetized intact dogs: central vs. peripheral chemoreceptors. J Appl Physiol 100:13–19.

Smith MJ (2002) Ovarian hormone effects on cortical excitability in health and disease. Biol Psychiatry 51:154S-154S.

Smith WK (1938) The representation of respiratory movements in the cerebral cortex. J Neurohysiol 6:55-68.

Smyth C, Summers JJ, Garry MI (2010) Differences in motor learning success are associated with differences in M1 excitability. Hum Mov Sci 29:618–630.

Spitzer NC (1999) New dimensions of neuronal plasticity. Nat Neurosci 2:489–491.

St John WM, Bartlett D Jr (1979) Comparison of phrenic motoneuron responses to hypercapnia and isocapnic hypoxia. J Appl Physiol 46:1096–1102.

Stagg CJ, Wylezinska M, Matthews PM, Johansen-Berg H, Jezzard P, Rothwell JC, Bestmann S (2009) Neurochemical Effects of Theta Burst Stimulation as Assessed by Magnetic Resonance Spectroscopy. J Neurophysiol 101:2872–2877.

Stefan K, Gentner R, Zeller D, Dang S, Classen J (2008) Theta-burst stimulation: remote physiological and local behavioral after-effects. Neuroimage 40:265–274.

Stent GS (1973) A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. Proc Natl Acad Sci USA 70:997–1001.

Steyvers M, Etoh S, Sauner D, Levin O, Siebner HR, Swinnen SP, Rothwell JC (2003) High-frequency transcranial magnetic stimulation of the supplementary motor area reduces bimanual coupling during anti-phase but not in-phase movements. Exp Brain Res 151:309–317.

Stock AK, Wascher E, Beste C (2013) Differential effects of motor efference copies and proprioceptive information on response evaluation processes. Plos One 8:e62335.

Strafella AP, Paus T (2001) Cerebral blood-flow changes induced by paired pulse transcranial magnetic stimulation of the primary motor cortex. J Neurophysiol 85:2624–2629.

Straus C, Samara Z, Fiamma MN, Bautin N, Ranohavimparany A, Le Coz P, Golmard JL, Darré P, Zelter M, Poon CS, Similowski T (2011) Effects of maturation and acidosis on the chaos-like complexity of the neural respiratory output in the isolated brainstem of the tadpole, Rana esculenta. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 300:R1163-1174.

Straus C, Similowski T (2011) Chemosensitivity recovery in ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel (vol 171, pg 171, 2010). Respir Physiol Neurobiol 178:357-358.

Straus C, Zelter M, Derenne JP, Pidoux B, Willer JC, Similowski T (1997) Putative projection of phrenic afferents to the limbic cortex in humans studied with cerebral-evoked potentials. J Appl Physiol 82:480–490.

Sumner P, Nachev P, Morris P, Peters AM, Jackson SR, Kennard C, Husain M (2007) Human medial frontal cortex mediates unconscious inhibition of voluntary action. Neuron 54:697–711.

Sun MK, Reis DJ (1994) Central neural mechanisms mediating excitation of sympathetic neurons by hypoxia. Prog Neurobiol 44:197–219.

Sun Q, Goodchild AK, PilowskyPM (2001) Firing patterns of pre-Bötzinger and Bötzinger neurons during hypocapnia in the adult rat. Brain Res 903:198–206.

Suzuki M, Kirimoto H, Onishi H, Yamada S, Tamaki H, Maruyama A, Yamamoto JI (2012) Reciprocal changes in input-output curves of motor evoked potentials while learning motor skills. Brain Res 1473:114–123.

Swanson GD, Ward DS, Bellville JW (1976) Post-hyperventilation isocapnic hyperpnea. J Appl Physiol 40:592–596.

Syed Z, Lin HS, Mateika JH (2013) The impact of arousal state, sex, and sleep apnea on the magnitude of progressive augmentation and ventilatory long-term facilitation. J Appl Physiol 114:52–65.

Talelli P, Cheeran BJ, Teo JTH, Rothwell JC (2007) Pattern-specific role of the current orientation used to deliver Theta Burst Stimulation. Clin Neurophysiol 118:1815–1823.

Tankus A, Yeshurun Y, Flash T, Fried I (2009) Encoding of speed and direction of movement in the human supplementary motor area. J Neurosurg 110:1304–1316.

Tawadrous FD, Eldridge FL (1974) Posthyperventilation breathing patterns after active hyperventilation in man. J Appl Physiol 37:353–356.

Teo JTH, Swayne OB, Rothwell JC (2007) Further evidence for NMDA-dependence of the after-effects of human theta burst stimulation. Clin Neurophysiol 118:1649–1651.

Teo JTH, Swayne OBC, Cheeran B, Greenwood RJ, Rothwell JC (2011) Human Theta Burst Stimulation Enhances Subsequent Motor Learning and Increases Performance Variability. Cereb Cortex 21:1627–1638.

Terada J, Mitchell GS (2011) Diaphragm long-term facilitation following acute intermittent hypoxia during wakefulness and sleep. J Appl Physiol 110:1299–1310.

Terao Y, Ugawa Y (2002) Basic mechanisms of TMS. J ClinNeurophysiol 19:322–343.

Terao Y, Ugawa Y, Enomoto H, Furubayashi T, Shiio Y, Machii K, Hanajima R, Nishikawa M, Iwata NK, Saito Y, Kanazawa I. 2001.Hemispheric lateralization in the cortical motor preparation for human vocalization. J Neurosci 21:1600–1609.

Terao Y, Ugawa Y, Hanajima R, Machii K, Furubayashi T, Mochizuki H, Enomoto H, Shiio Y, Uesugi H, Iwata NK, Kanazawa I (2000) Predominant activation of I1-waves from the leg motor area by transcranial magnetic stimulation. Brain Res 859:137–46.

Teulier M, Fiamma MN, Straus C, Similowski T (2013) Acute bronchodilation increases ventilatory complexity during resting breathing in stable COPD: Toward mathematical biomarkers of ventilatory function? Respir Physiol Neurobiol 185:477–480.

Therrien AS, Richardson BA, Balasubramaniam R (2011) Continuous theta-burst stimulation to primary motor cortex reduces the overproduction of forces following removal of visual feedback. Neuropsychologia 49:2941–2946.

Thickbroom GW (2007) Transcranial magnetic stimulation and synaptic plasticity: experimental framework and human models. Exp Brain Res 180:583–593.

Thielscher A, Kammer T (2002) Linking physics with physiology in TMS: a sphere field model to determine the cortical stimulation site in TMS. NeuroImage 17:1117–1130.

Thompson AK, Chen XY, Wolpaw JR (2009) Acquisition of a Simple Motor Skill: Task-Dependent Adaptation Plus Long-Term Change in the Human Soleus H-Reflex. J Neurosci 29:5784–5792.

Tian GF, Duffin J (1998) The role of dorsal respiratory group neurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. Exp Brain Res 121:29–34.

Tian GF, Peever JH, Duffin J (1998) Botzinger-complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. Exp Brain Res 122:149–156.

Todd G, Flavel SC, Ridding MC (2009) Priming theta-burst repetitive transcranial magnetic stimulation with low- and high-frequency stimulation. Exp Brain Res 195:307–315.

Tokimura H, Ridding MC, Tokimura Y, Amassian VE, Rothwell JC (1996) Short latency facilitation between pairs of threshold magnetic stimuli applied to human motor cortex. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 101:263–272.

Tokuno H, Nambu A (2000) Organization of nonprimary motor cortical inputs on pyramidal and nonpyramidal tract neurons of primary motor cortex: an electrophysiological study in the macaque monkey. Cereb Cortex 10:58–68.

Touge T, Gerschlager W, Brown P, Rothwell JC (2001) Are the after-effects of low-frequency rTMS on motor cortex excitability due to changes in the efficacy of cortical synapses? Clin Neurophysiol 112:2138–2145.

Trémoureux L, Raux M, Hudson AL, Ranohavimparany A, Straus C, Similowski T (2014) Does the Supplementary Motor Area Keep Patients with Ondine's Curse Syndrome Breathing While Awake? Plos One 9.

Trémoureux L, Raux M, Jutand L, Similowski T (2010) Sustained preinspiratory cortical potentials during prolonged inspiratory threshold loading in humans. J Appl Physiol 108:1127–1133.

Truini A, Vergari M, Biasiotta A, La Cesa S, Gabriele M, Di Stefano G, Cambieri C, Cruccu G, Inghilleri M, Priori A (2011) Transcutaneous spinal direct current stimulation inhibits nociceptive spinal pathway conduction and increases pain tolerance in humans. Eur J Pain 15:1023–1027.

Turner DL, Mitchell GS (1997) Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goat. J Physiol (Lond) 499:543–550.

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. Nature 391:892–896.

Turrigiano GG, Nelson SB (2000) Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. Curr Opin Neurobiol 10:358–364.

Valero-Cabré A, Oliveri M, Gangitano M, Pascual-Leone A (2001) Modulation of spinal cord excitability by subthreshold repetitive transcranial magnetic stimulation of the primary motor cortex in humans. Neuroreport 12:3845–3848.

Valls-Sole J, Pascual-Leone A, Wassermann EM, Hallett M (1992) Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 85:355–364.

Van Wart A, Matthews G (2006) Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking Na(v)1.6 sodium channels. J Neurosci 26:7172–7180.

Verin E, Marie J-P, Similowski T (2011) Cartography of human diaphragmatic innervation: Preliminary data. Respir Physiol Neurobiol 176:68–71.

Vernet M, Bashir S, Yoo W-K, Oberman L, Mizrahi I, Ifert-Miller F, Beck CJ, Pascual-Leone A (2014) Reproducibility of the effects of theta burst stimulation on motor cortical plasticity in healthy participants. Clin Neurophysiol 125:320–326.

Verwey W, Lammens R, van Honk J (2002) On the role of the SMA in the discrete sequence production task: a TMS study. Neuropsychologia 40:1268–1276.

Vorobiev V, Govoni P, Rizzolatti G, Matelli M, Luppino G (1998) Parcellation of human mesial area 6: cytoarchitectonic evidence for three separate areas. Eur J Neurosci 10:2199–2203.

Voss M, Bays PM, Rothwell JC, Wolpert DM (2007) An improvement in perception of self-generated tactile stimuli following theta-burst stimulation of primary motor cortex. Neuropsychologia 45:2712–2717.

Wadhwa H, Gradinaru C, Gates GJ, Badr MS, Mateika JH (2008) Impact of intermittent hypoxia on long-term facilitation of minute ventilation and heart rate variability in men and women: do sex differences exist? J Appl Physiol 104:1625–1633.

Wang W, Similowski T, Sériès F (2007) Interaction between genioglossus and diaphragm responses to transcranial magnetic stimulation in awake humans. Exp Physiol 92:739–747.

Wassermann EM, Grafman J, Berry C, Hollnagel C, Wild K, Clark K, Hallett M (1996a) Use and safety of a new repetitive transcranial magnetic stimulator. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 101:412–417.

Wassermann EM, McShane LM, Hallett M, Cohen LG (1992) Noninvasive mapping of muscle representations in human motor cortex. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 85:1–8.

Wassermann EM, Samii A, Mercuri B, Ikoma K, Oddo D, Grill SE, Hallett M (1996b) Responses to paired transcranial magnetic stimuli in resting, active, and recently activated muscles. Exp Brain Res 109:158–163.

Werhahn KJ, Kunesch E, Noachtar S, Benecke R, Classen J (1999) Differential effects on motorcortical inhibition induced by blockade of GABA uptake in humans. J Physiol 517:591–597.

White O, Davare M, Andres M, Olivier E (2013) The Role of Left Supplementary Motor Area in Grip Force Scaling. Plos One 8.

Whitelaw WA, Derenne JP, Couture J, Milic-Emili J (1976) Adaptation of anesthetized men to breathing through an inspiratory resistor. J Appl Physiol 41:285–291.

Widdicombe J (2009) Lung afferent activity: Implications for respiratory sensation. Respir Physiol Neurobiol 167:2–8.

Wiegand L, Zwillich CW, White DP (1988) Sleep and the ventilatory response to resistive loading in normal men. J Appl Physiol 64:1186–1195.

Winkler T, Hering P, Straube A (2010) Spinal DC stimulation in humans modulates post-activation depression of the H-reflex depending on current polarity. Clin Neurophysiol 121:957–961.

Wise SP (1996) Corticospinal efferents of the supplementary sensorimotor area in relation to the primary motor area. In: Supplementary Sensorimotor Area (Luders HO, ed), pp 57–69.

Wolpaw JR (2007) Spinal cord plasticity in acquisition and maintenance of motor skills. Acta Physiologica 189:155–169.

Wolpaw JR (2010) What Can the Spinal Cord Teach Us about Learning and Memory? Neuroscientist 16:532–549.

Wolpaw JR, Carp JS (2006) Plasticity from muscle to brain. Prog Neurobiol 78:233–263.

Wolpaw JR, Tennissen AM (2001) Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. Annu Rev Neurosci 24:807–843.

Wolpert DM, Flanagan JR (2001) Motor prediction. Curr Biol 11:R729–732.

Wolpert DM, Ghahramani Z (2000) Computational principles of movement neuroscience. Nat Neurosci 3:1212–1217.

Wu C, Bichot N, Kaas J (2000) Converging evidence from microstimulation, architecture, and connections for multiple motor areas in the frontal and cingulate cortex of prosimian primates. J Comp Neurol 423:140–177.

Wu T, Chan P, Hallett M (2008) Modifications of the interactions in the motor networks when a movement becomes automatic. J Physiol 586:4295–4304.

Wysocki M, Fiamma MN, Straus C, Poon CS, Similowski T (2006) Chaotic dynamics of resting ventilatory flow in humans assessed through noise titration. Respir Physiol Neurobiol 153:54-65.

Yamaguti WP, Claudino RC, Neto AP, Chammas MC, Gomes AC, Salge JM, Moriya HT, Cukier A, Carvalho CR (2012) Diaphragmatic Breathing Training Program Improves Abdominal Motion During Natural Breathing in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Randomized Controlled Trial. Arch Phys Med Rehabil 93:571–577.

Yanos J, Banner A, Stanko R, Gentry S, Greenawalt K (1990) Ventilatory responses to inspiratory threshold loading in humans. J Appl Physiol 68:2511–2520.

Yeragani VK, Radhakrishna RK, Tancer M, Uhde T (2002) Nonlinear measures of respiration: respiratory irregularity and increased chaos of respiration in patients with panic disorder. Neuropsychobiology 46:111–120.

Yokota S, Tsumori T, Ono K, Yasui Y (2001) Phrenic motoneurons receive monosynaptic inputs from the Kolliker-Fuse nucleus: a light- and electron-microscopic study in the rat. Brain Res 888:330–335.

Yoo W-K, You SH, Ko M-H, Kim ST, Park C-h, Park J-W, Ohn SH, Hallett M, Kimg Y-H (2008) High frequency rTMS modulation of the sensoirmotor networks: Behavioral changes and fMRI correlates. Neuroimage 39:1886–1895.

Younes M (1995) Mechanisms of respiratory load compensation. In: Regulation of Breathing, edited by Dempsey JA, Pack AI. Philadelphia, PA: Dekker, pp. 867–922.

Yuen TGH, Agnew WF, Bullara LA, Jacques S, McCreery DB (1981) Histological-evaluation of neural damage from electrical-stimulation - considerations for the selection of parameters for clinical-application. Neurosurgery 9:292–299.

Zafar N, Paulus W, Sommer M (2008) Comparative assessment of best conventional with best theta burst repetitive transcranial magnetic stimulation protocols on human motor cortex excitability. Clin Neurophysiol 119:1393–1399.

Zhang W, Linden DJ (2003) The other side of the engram: Experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. Nat Rev Neurosci 4:885–900.

Zhou ZG, Champagnat J, Poon CS (1997) Phasic and long-term depression in brainstem nucleus tractus solitarius neurons: Differing roles of AMPA receptor desensitization. J Neurosci 17:5349–5356.

Ziemann U, Chen R, Cohen LG, Hallett M (1998a) Dextromethorphan decreases the excitability of the human motor cortex. Neurology 51:1320-1324.

Ziemann U, Corwell B, Cohen LG (1998b). Modulation of plasticity in human motor cortex after forearm ischemic nerve block. J Neurosci 18:1115–1123.

Ziemann U, Hallett M, Cohen LG (1998c). Mechanisms of deafferentation–induced plasticity in human motor cortex. J Neurosci 18:7000–7007.

Ziemann U, Lonnecker S, Steinhoff BJ, Paulus W (1996a) Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study. Ann Neurol 40:367–78.

Ziemann U, Lönnecker S, Steinhoff BJ, Paulus W (1996b) The effect of lorazepam on the motor cortical excitability in man. Exp Brain Res 109:127–35.

Ziemann U, Paulus W, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Byblow WD, Berardelli A, Siebner HR, Classen J, Cohen LG, Rothwell JC (2008) Consensus: Motor cortex plasticity protocols. Brain Stimul 1:164–182.

Ziemann U, Rothwell JC (2000) I waves in motor cortex. J Clin Neurophysiol 17:397–405.

Ziemann U, Rothwell JC, Ridding MC (1996c) Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. J Physiol (Lond) 496:873–81.

Ziemann U, Siebner HR (2008) Modifying motor learning through gating and homeostatic metaplasticity. Brain Stimul 1:60–66.

Ziemann U, Tergau F, Wassermann EM, Wischer S, Hildebrandt J, Paulus W (1998d) Demonstration of facilitatory I wave interaction in the human motor cortex by paired transcranial magnetic stimulation. J Physiol (Lond) 511:181–90.

Zifko U, Remtulla H, Power K, Harker L, Bolton CF (1996) Transcortical and cervical magnetic stimulation with recording of the diaphragm. Muscle Nerve 19:614–620.

Zimmer MB, Goshgarian HG (2007) GABA, not glycine, mediates inhibition of latent respiratory motor pathways after spinal cord injury. Exp Neurol 203:493–501.

Zoghi M, Pearce SL, Nordstrom MA (2003) Differential modulation of intracortical inhibition in human motor cortex during selective activation of an intrinsic hand muscle. J Physiol (Lond) 550:933–946.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. Ann Rev Physiol 64:355–405.

Annexes 1

Fax émis par : 33155873642 AFSSAPS U.E.C. 11-05-11 13:04 Pg: 1/1

afssaps

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

AUTORISATION D'ESSAI CLINIQUE NE PORTANT PAS SUR UN PRODUIT DE SANTE (ESSAI-HPS)

Nombre de pages : 1
(Incluant la page de garde)

Envoi par Télécopie

Date : 11 MAI 2011

Identifiants de l'essai clinique					
Titre	Effet de la stimulation magnétique transcranienne sur la commande ventilatoire et les sensations respiratoires chez l'humain sain et malade (STIMpnée)				
Promoteur	ADOREP			Réf. CPP	106-10
Réf. Promoteur	ADOREP2010-1534-STIMpnée	N° ID RCB	2010-A01278-31	Réf. Afssaps	**B110571-90**

Expéditeur	**Destinataire** (demandeur : nom / société / tél.)
AFSSAPS / DEMEB / Département de l'évaluation des essais cliniques et des médicaments à statut particulier **Unité essais cliniques médicaments et hors produits de santé**	Pr Thomas SIMILOWSKI Laboratoire de physiopathologie respiratoire 01 42 16 77 97
Dossier suivi par : Perrine ROBIN Tél : 33 (0) 1 55 87 36 41 / Fax : 33 (0) 1 55 87 36 42	Fax **01 70 24 72 82**

CPP destinataire en copie	Ile-de-France VI (Paris-La-Pitié)	Fax	**01.42.16.27.15**	**Code 30**

Vu le code de la santé publique et notamment ses articles L. 1123-8, R. 1123-32 et vu le dossier de demande d'autorisation d'essai clinique adressé à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) ;

L'autorisation mentionnée à l'article L. 1123-8 du code de la santé publique est accordée pour l'essai clinique cité en objet. Cette autorisation est valable pour toute la durée de l'essai à compter de la date de la présente décision.

Toutefois, conformément à l'article R. 1123-33 du code de la santé publique, la présente autorisation devient caduque si la recherche n'a pas débuté dans un délai d'un an.

Pour le Directeur Général et par délégation
Dr Philippe VELLA
Chef de l'unité essais cliniques médicaments et hors produits de santé

11 MAI 2011

Pour toute demande d'informations complémentaires concernant cette autorisation, je vous recommande de solliciter un rendez-vous téléphonique en adressant à cet effet un courriel uniquement sur la boîte **contact-essaiscliniques**@afssaps.sante.fr.
Je vous demande alors de veiller à reporter dans l'objet du message uniquement les mentions suivantes : **AEC/B110571-90.**

Par ailleurs, afin d'optimiser la gestion des dossiers de modifications substantielles (MS) que vous pourriez être amené(e) à déposer pour l'essai sus-cité, je vous recommande de les transmettre par courriel adressé uniquement sur la boîte **ams-essaiscliniques**@afssaps.sante.fr. Je vous précise qu'il vous est possible d'utiliser à cet effet le système de messagerie électronique sécurisée Eudralink. Lors de l'envoi de ces dossiers, je vous demande de veiller à reporter dans l'objet du message les mentions suivantes :
- pour les MS transmises à l'Afssaps pour information : **MSI/B110571-90**
- pour les MS soumises pour autorisation ou pour les dossiers mixtes (comportant des modifications soumises pour autorisation et d'autres pour information) : **MSA/B110571-90**

Si vous ne recevez pas toutes les pages de cette télécopie, veuillez contacter le secrétariat de l'Unité essais cliniques médicaments et hors produits de santé au : 33 (0) 1 55 87 36 41.

Confidentialité
Cette transmission est à l'attention exclusive du(des) destinataires ci-dessus mentionné(s) et peut contenir des informations privilégiées et/ou confidentielles. Si vous n'êtes pas le destinataire voulu ou une personne mandatée pour lui remettre cette transmission, vous avez reçu ce document par erreur et toute utilisation, révélation, copie ou communication de son contenu est interdite. Si vous avez reçu cette transmission par erreur, veuillez nous en informer par téléphone immédiatement et nous retourner le message original par courrier. Merci.

Confidentiality
This transmission is intended to the addressee(s) listed above only and may contain preferential or/and confidential information. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that you have received the document by mistake and any use, disclosure, copying or communication of the content of this transmission is prohibited. If you have received this transmission by mistake, please call us immediately and return the original message by mail. Thank you.

143/147, bd Anatole France - F-93285 Saint-Denis cedex - tél. +33 (0)1 55 87 30 00 - **www.afssaps.sante.fr**

Annexes 2

Pneumologie
et réanimation médicale

CPP - Ile-de-France VI
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

Projet de recherche enregistré
Sous le n° 106-10
ID RCB : 2010-A01278-31

A Paris, le 22 février 2013

Documents soumis à l'approbation du comité :
. Amendement n°5 du 1/2/13

Le comité a été saisi le : 4 février 2013

d'une demande d'avis pour les documents ci-dessus référencés relatifs au protocole intitulé :

« Effet de la stimulation magnétique transcrânienne sur la commande ventilatoire et les sensations respiratoires chez l'humain sain et malade » Protocole STIMpnée

Le titre est modifié comme suit :
« Effet de la stimulation magnétique et électrique transcrânienne et spinale sur la commande ventilatoire et les sensations respiratoires chez l'humain sain et malade » Protocole STIMpnée

dont le promoteur est : **ADOREP**

dont le coordinateur est : **Professeur T. SIMILOWSKI**

Le comité a examiné les informations relatives à ce projet lors de sa séance du :

20 février 2013

Ont participé à la délibération :
Claude ANDRE - Allergologue (T)
Odile BALAND - Infirmière (T)
Magali BOUVIER - Qualifiée en matière juridique (T)
Nathalie BRION - Thérapeute (S)
Laurent CAPELLE - Neurochirurgien (T)
Christophe DEMONFAUCON - Représentant des associations agréées de malades (T)
Micheline DENANCE - Représentante des associations agréées d'usagers du système de santé (S)
Marie-Hélène FIEVET - Pharmacien hospitalier (T)
Anne-Marie FONCELLE - Qualifiée en matière juridique (S)
Clarisse GOUDIN - Qualifiée en matière juridique (S)
Gilles HUBERFELD - Neurologue (S)
Nathalie JOUNIAUX-DELBEZ - Psychologue hospitalier (S)
Christiane LOOTENS - Représentante des associations agréées de malades (S)
Michèle MEUNIER-ROTIVAL - Chercheur en génétique (S)
Anne-Laure MORIN - Qualifiée en matière juridique (T)
Thang NGUYEN - Médecin généraliste (T)
Alexia SAVIGNONI - Biostatisticien (S)
Sophie TEZENAS DU MONTCEL - Biostatisticien (T)
Martin THIBIERGE - Neuroradiologue (T)

LE COMITE A ADOPTE LA DELIBERATION SUIVANTE : AVIS FAVORABLE

Le Président du CPP
Docteur Laurent CAPE

CPP IDF VI - 47, Boulevard de l'Hôpital 75013 PARIS