



**HAL**  
open science

# Effet de l'exposition périnatale aux nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité des réseaux de neurones moteurs impliqués dans les fonctions respiratoire et locomotrice

Angelo Nicolosi

► **To cite this version:**

Angelo Nicolosi. Effet de l'exposition périnatale aux nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité des réseaux de neurones moteurs impliqués dans les fonctions respiratoire et locomotrice. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT: 2017BORD0912. tel-01834606

**HAL Id: tel-01834606**

**<https://theses.hal.science/tel-01834606>**

Submitted on 10 Jul 2018

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**  
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET LE SANTÉ  
SPÉCIALITÉ **NEUROSCIENCES**

Par **Angelo NICOLSI**

**EFFET DE L'EXPOSITION PÉRINATALE AUX  
NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC SUR L'ACTIVITÉ  
DES RÉSEAUX DE NEURONES MOTEURS IMPLIQUÉS  
DANS LES FONCTIONS RESPIRATOIRE ET LOCOMOTRICE**

Sous la direction de : **Didier MORIN**

Soutenue le Lundi 18 décembre 2017

Membres du jury :

Véronique BACH, Professeur, Université de Picardie Jules Verne  
Laurence BODINEAU, Professeur, Université Pierre et Marie Curie  
Laurent GRELOT, Professeur, Aix-Marseille Université  
Laurent JUVIN, Maître de Conférences, Université de Bordeaux  
Morgane LE BON-JEGO, Maître de Conférences, Université de Bordeaux  
Didier MORIN, Professeur, Université de Bordeaux

*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Président*  
*Membre invité*  
*Examineur*  
*Directeur de thèse*



## Remerciements

*Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INICIA pour les intimes), UMR CNRS 5287, dirigé par le Docteur Jean-René Cazalets, que je remercie pour m'avoir accueilli au sein de cette structure, il y a maintenant 5 ans (et oui déjà !), au sein de laquelle toutes les conditions étaient réunies afin de mener à bien ce travail de recherche.*

*Je tiens également à remercier les Professeurs Véronique Bach et Laurence Bodineau qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce manuscrit de thèse. J'espère que sa lecture vous aura été aussi agréable que le plaisir que j'ai pu prendre à l'écrire. Merci également au Professeur Laurent Grélot, et à Morgane Le Bon-Jego pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.*

*Un grand merci à toi Didier. Voilà maintenant 5 ans que tu as la (grande) patience de me supporter au quotidien, de répondre à mes (trop) nombreuses questions, de me conseiller sur de nombreux points, encore plus pendant l'intense période de la rédaction de ce manuscrit. Ce temps passé avec toi fut très enrichissant d'un point de vue scientifique, mais également inoubliable lors d'échanges moins formels (non je ne parlerais pas ici des repas de Noël !).*

*Je suis bien obligé de te remercier Laurent. Également là depuis le début, tu as toujours été là pour me former, et prodiguer tes nombreux conseils (dilutions...), mais aussi occuper mes parfois longues journées de manips avec nos discussions et débats sur bien des sujets. Nous ne savons d'ailleurs toujours pas qui de nous deux est le plus bavard au laboratoire...☺.*

*Merci également à toi Muriel pour ton expertise, tes conseils et ton implication sans lesquels une grosse partie de ce projet n'aurait pas vu le jour. S'il y a une chose que je dois retenir de notre collaboration, outre les innombrables connaissances scientifiques que tu as pu m'apporter, c'est que tout est toujours simple, il suffit juste de suivre les pointillés.*

*Sans elle, ce manuscrit serait dépourvu de bien belles images fluorescentes, merci donc à toi Laura pour ton savoir-faire sans lequel certaines de mes figures seraient bien plus ternes.*

*Pour son expertise sur le monde merveilleux des nanoparticules, mais également pour avoir réalisé les clichés et comptages en MET, je tiens à remercier Christèle Jaillet.*

Merci également à Pierrick Pasquereau pour avoir permis et aider à réaliser toute la partie sur le dosage du zinc.

Comment ne pas remercier les membres de THE CPGs team: Sandrine, chef d'équipe toujours présente en salle de manips pour le plus grand bien de l'ambiance; Greg pour tous tes conseils et tes idées, surtout sur toute la partie statistiques et locomotion; Anne-Emilie pour ta présence et nos discussions matinales; mais également la PAM (Etienne, Emilie, Emma) pour m'avoir fait découvrir le plaisir de la scopolamine avant de m'étourdir avec la stimulation galvanique.

Il serait trop long de citer tout le monde ici, mais un grand merci à tous les membres de l'INCLIA (que ce soit les personnels techniques, les autres équipes ou encore le service gestion) sans qui l'ambiance au laboratoire serait bien différente, et surtout moins bonne !

Passons maintenant aux choses sérieuses... Un grand merci à tous ceux avec qui j'ai pu partager le bureau étudiant. Les "anciens" thésards (Alexis, Jean-Patrick, Léa et Lauriane) qui surent prodiguer leurs conseils au début de cette aventure. Mais également les différents stagiaires qui en plus d'apporter un peu d'ambiance dans le bureau, m'ont permis de découvrir l'art de la formation de la prochaine génération de chercheurs. Merci à toi Mélissa, depuis 5 ans à apporter la bonne ambiance au bureau, à partager des moments de folie dont la liste exhaustive nécessiterait un autre manuscrit de cette ampleur. Tu as réussi à me supporter pendant tout ce temps et surtout tu as créé MiMo, qui restera à jamais gravé au sein du laboratoire et de mon esprit ☺. Bien qu'arrivé plus tard, merci à toi Zied, également pour ta participation à la bonne ambiance et la folie de ce bureau (merci Franky Vincent... ☺). Je vous souhaite bien du bonheur à toi et ta femme. Mathilde, la "jeune" du bureau, fortement impliquée également dans l'ambiance et les délires. N'oublies pas que pour 13 balles chez Casto, on peut tout faire !! Merci aussi à Matthieu. Ta présence dans le bureau signifiait au début l'arrivée du week-end. Puis Maître Papawé devint grand, se maria et intégra de manière permanente le bureau, apportant également une grosse valise remplie d'humour et de blagues en tout genre. Je te souhaite bien du bonheur pour la suite.

Il est maintenant temps de clore ce chapitre de remerciements, et pour cela, il est normal de finir par le plus important à mes yeux: la famille. Toujours là pour m'aider, me guider, et me conseiller dans mes choix, vous avez toujours été présents à mes côtés mêmes dans les moments les plus difficiles. Sans vous, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Pour ça et tout le reste je vous adresse cette ultime MERCI.

# Table des matières

<b>Sommaire des figures.....</b>	<b>9</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>12</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>Problématique et présentation du mémoire.....</b>	<b>14</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>16</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>17</b>
<b><i>Réseaux de neurones et activité rythmique.....</i></b>	<b>18</b>
<i>Le concept de CPG.....</i>	18
La théorie du réflexe.....	18
Le concept de "Half-Center".....	19
Le modèle de "Unit Burst Generator".....	20
Le modèle de "Half Center" multi-niveaux.....	20
Modélisation de l'activité respiratoire centrale.....	21
<i>Comment un réseau de neurones peut-il générer un rythme ?.....</i>	22
Propriétés intrinsèques des neurones autorythmiques.....	22
Propriétés émergentes des réseaux.....	23
<b><i>La respiration.....</i></b>	<b>25</b>
<i>L'appareil respiratoire.....</i>	26
Anatomie des voies aériennes.....	26
Les alvéoles, siège des échanges gazeux.....	28
La plèvre.....	29
La pompe aspirante.....	29
Les systèmes de régulation de la respiration.....	30
<i>Les structures respiratoires centrales.....</i>	33
Le groupe respiratoire ventral.....	34
Le groupe respiratoire dorsal.....	35
Les régions respiratoires pontiques.....	35
Le complexe pré-Bötzinger, structure centrale de l'activité respiratoire.....	36
Le groupe respiratoire parafacial, acteur de l'activité expiratoire.....	38
Le complexe post-inspiratoire.....	39
<b><i>La locomotion.....</i></b>	<b>41</b>
<i>Du milieu aquatique à la conquête d'autres espaces.....</i>	41

<i>Le cycle locomoteur</i> .....	42
<i>Structure du système locomoteur</i> .....	43
Le squelette .....	43
Les articulations.....	43
Les muscles.....	44
Structures nerveuses impliquées dans la locomotion.....	45
Contrôle sensoriel de la locomotion .....	46
<i>Les centres générateurs du rythme et du patron locomoteur</i> .....	48
Les circuits de l'alternance bilatérale .....	48
Les circuits de l'alternance de type fléchisseur/extenseur .....	50
Autres populations neuronales locomotrices .....	51
<b><i>Les nanoparticules</i></b> .....	<b>52</b>
<i>Histoire des nanoparticules: de leur première utilisation à leur découverte</i> .....	53
<i>Propriétés nouvelles et applications des nanoparticules</i> .....	54
Électronique et informatique .....	54
Production et stockage d'énergie.....	55
Médecine et santé.....	56
Les nanoparticules dans notre quotidien.....	57
<i>Toxicologie des nanoparticules</i> .....	57
Les scandales sanitaires du passé : métaux lourds et amiante .....	57
Voies d'entrées et distribution des nanoparticules dans l'organisme .....	59
Effets périphériques des nanoparticules.....	59
Effets des nanoparticules sur le système nerveux .....	61
<b><i>Objectifs de la thèse</i></b> .....	<b>63</b>
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	<b>65</b>
<b><i>Animaux</i></b> .....	<b>66</b>
<b><i>Expériences ex vivo</i></b> .....	<b>66</b>
<i>Préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée de rat nouveau-né</i> .....	66
Un modèle de référence pour l'étude des réseaux moteurs .....	66
La préparation tronc cérébral/moelle épinière ex vivo .....	67
Barrières .....	68
<i>Préparation de tranches de tronc cérébral contenant le préBötC</i> .....	68
Une préparation de choix pour l'étude des neurones respiratoires .....	68
Préparation des tranches de tronc cérébral à partir de rat nouveau-né .....	69
<b><i>Milieus et solutions</i></b> .....	<b>69</b>

<i>Le liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa).....</i>	69
<i>Cocktail pharmacologique NMDA/5-HT.....</i>	70
<i>Nanoparticules d'oxyde de zinc.....</i>	70
<b>Électrophysiologie.....</b>	<b>70</b>
<i>Enregistrements extracellulaires.....</i>	71
<i>Enregistrement intracellulaire "Patch-Clamp".....</i>	71
<b>Techniques neuroanatomiques.....</b>	<b>72</b>
<b>Expériences in vivo.....</b>	<b>73</b>
<i>Exposition chronique aux NPs ZnO au cours de la gestation.....</i>	73
<i>Enregistrements pléthysmographiques.....</i>	73
<b>Caractérisation des nanoparticules.....</b>	<b>74</b>
<i>Microscopie électronique en transmission.....</i>	74
<i>Spectromètre d'absorption atomique à flamme.....</i>	74
<b>Analyses et statistiques.....</b>	<b>75</b>
<i>Activité respiratoire.....</i>	75
<i>Activité locomotrice.....</i>	75
<i>Statistiques.....</i>	76
<b>Résultats.....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre I: Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de zinc.....</b>	<b>78</b>
<i>Résumé.....</i>	78
<i>Introduction.....</i>	78
<i>Matériels et Méthodes.....</i>	79
<i>Résultats.....</i>	79
<i>Nanoparticules d'oxyde de zinc: forme et taille.....</i>	79
<i>Mesure de la quantité d'ions zinc relarguée par les nanoparticules.....</i>	79
<i>Discussion.....</i>	80
<i>Taille des nanoparticules: un facteur essentiel.....</i>	80
<i>Rôle et implication du zinc libre.....</i>	81
<b>Chapitre II: Effets des NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale.....</b>	<b>83</b>
<i>Résumé.....</i>	83
<i>Introduction.....</i>	84
<i>Matériels et Méthodes.....</i>	85
<i>Résultats.....</i>	86
<i>L'activité respiratoire fictive.....</i>	86
<i>Effets des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité respiratoire centrale.....</i>	86

Les NPs ZnO agissent directement sur les neurones du complexe pré-Bötzinger .....	88
<i>Discussion</i> .....	90
Préparations isolées ex vivo: une activité spontanée de type respiratoire .....	91
Perturbation de l'activité respiratoire centrale induite par les NPs ZnO: les mécanismes cellulaires possibles .....	92
<b>Chapitre III: Transmission verticale des NPs ZnO: étude in vivo .....</b>	<b>96</b>
<i>Résumé</i> .....	96
<i>Introduction</i> .....	96
<i>Matériels et méthodes</i> .....	97
Injection de rattes gestantes .....	97
Enregistrements pléthysmographiques des rats nouveau-nés .....	98
<i>Résultats</i> .....	98
Activité ventilatoire des animaux nouveau-nés .....	98
Effets de l'exposition chronique maternelle aux NPs ZnO .....	98
<i>Discussion</i> .....	100
<b>Chapitre IV: Effets des NPs ZnO sur l'activité locomotrice .....</b>	<b>103</b>
<i>Résumé</i> .....	103
<i>Introduction</i> .....	103
<i>Matériels et méthodes</i> .....	105
<i>Résultats</i> .....	106
L'activité locomotrice fictive .....	106
Effet des NPs ZnO sur l'activité locomotrice fictive .....	106
Une cible préférentielle des NPs ZnO dans le système nerveux ? .....	107
<i>Discussion</i> .....	108
<b>Discussion générale .....</b>	<b>110</b>
<b><i>Rappel des principaux résultats</i> .....</b>	<b>111</b>
<b><i>Période périnatale et vulnérabilité</i> .....</b>	<b>113</b>
<b><i>Nanomatériaux et nanoparticules: vers une évaluation du risque</i> .....</b>	<b>119</b>
<b><i>Nanoparticules et nano-médecine</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>126</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>129</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>152</b>

# Sommaire des figures

## Introduction générale

<u>Figure 1:</u> Les modèles de réseaux rythmiques locomoteurs .....	18
<u>Figure 2:</u> Les modèles de réseaux rythmiques respiratoires .....	21
<u>Figure 3:</u> Les mécanismes de la rythmogenèse .....	22
<u>Figure 4:</u> Anatomie des voies aériennes supérieures et inférieures .....	26
<u>Figure 5:</u> La mécanique respiratoire .....	29
<u>Figure 6:</u> Les systèmes de régulation de la respiration .....	30
<u>Figure 7:</u> Les phases du cycle respiratoire .....	33
<u>Figure 8:</u> Représentation schématique des structures du tronc cérébral impliquées dans la genèse et la régulation de l'activité respiratoire (Vue sagittale) .....	34
<u>Figure 9:</u> Le complexe préBötC: le générateur central de l'activité inspiratoire .....	36
<u>Figure 10:</u> Activation spatio-temporelle des neurones du pFRG et du préBötC au cours d'un épisode de respiration fictive .....	38
<u>Figure 11:</u> Activité et anatomie du complexe post-inspiratoire (PiCo) .....	40
<u>Figure 12:</u> Les phases du cycle locomoteur chez l'Homme .....	42
<u>Figure 13:</u> Structures nerveuses impliquées dans le "contrôle" de la locomotion .....	45
<u>Figure 14:</u> Représentation schématique de l'organisation des populations neuronales impliquées dans la genèse du rythme et du patron locomoteur .....	49
<u>Figure 15:</u> Les nanoparticules: une grande variété de formes et de tailles .....	52
<u>Figure 16:</u> Histoire de la découverte et de l'utilisation des nanoparticules .....	53
<u>Figure 17:</u> Passage et distribution des nanoparticules .....	59

## Matériels et Méthodes

Figure 18: Représentation schématique du dispositif expérimental *ex vivo* ..... 71

Figure 19: Marquage immunohistochimique du complexe pre-Bötzinger ..... 72

Figure 20: Représentation schématique du dispositif expérimental de pléthysmographie  
..... 73

## Résultats

### Chapitre I: Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de zinc

Figure 21: Caractérisation des NPs ZnO et quantification des concentrations en ions Zn<sup>2+</sup>  
relargués ..... 80

### *Chapitre II: Effets des NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale*

Figure 22: La préparation *ex vivo* de rat nouveau-né utilisée pour l'étude de la neurotoxicité  
des ZnO NPs ..... 85

Figure 23: Effets d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur les bouffées d'activité respiratoire  
..... 86

Figure 24: L'importance de l'augmentation de fréquence respiratoire induite par les NPs  
ZnO est corrélée à la fréquence respiratoire initiale ..... 87

Figure 25: Les structures du tronc cérébral sont responsables à la fois de l'accélération des  
bouffées respiratoires et de la réduction drastique de la longévité de la préparation induites  
par l'exposition aiguë aux NPs ZnO ..... 88

Figure 26: Effets des NPs ZnO sur les bouffées respiratoires générées par le complexe  
préBötzinger (préBötC) dans des tranches de bulbe rachidien de rats nouveau-nés ..... 89

Figure 27: Les NPs ZnO dépolarisent les neurones inspiratoires du préBötC et réduisent la  
commande inspiratoire centrale ..... 90

Figure 28: Résumé graphique des mécanismes cellulaires potentiels expliquant les  
changements induit par les NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale de mammifères  
nouveau-nés ..... 94

### *Chapitre III: Transmission verticale des NPs ZnO: étude in vivo*

Figure 29: Caractérisation par pléthysmographie de l'activité respiratoire *in vivo* de rats nouveau-nés ..... 98

Figure 30: Effet d'une exposition prénatale aux NPs ZnO sur l'activité respiratoire de rats nouveau-nés .....99

### *Chapitre IV: Effets des NPs ZnO sur l'activité locomotrice*

Figure 31: Caractérisation de l'activité locomotrice fictive d'une préparation *ex vivo* de rats nouveau-nés ..... 106

Figure 32: Effets d'une application aigüe de NPs ZnO sur la période et les relations de phase de l'activité locomotrice fictive ..... 107

Figure 33: Implication des structures du tronc cérébral et de la moelle épinière dans l'effet sur l'activité locomotrice *ex vivo* d'une application aigüe de NPs ZnO ..... 108

## Résumé

De par leur taille (<100 nm) leur conférant des propriétés nouvelles, **les nanoparticules (NPs)** sont déjà utilisées dans de nombreux produits de la vie quotidienne. La population y étant donc exposée de façon croissante, elles sont au cœur de nombreuses discussions sur la **santé publique et environnementale**. En effet, les NPs sont capables de pénétrer dans l'organisme, traverser différentes barrières biologiques telles les barrières alvéolaire, placentaire, ou encore hématoencéphalique, s'accumuler dans certains organes et potentiellement induire diverses pathologies. Pouvant s'agréger dans le cerveau, des études ont déjà montré des effets modulateurs des NPs sur les activités bioélectriques des neurones, mais aucune à ce jour n'a permis d'évaluer leurs effets potentiels sur l'activité de tout un réseau, tels ceux responsables de la genèse d'activités motrices impliquées dans des fonctions vitales. **Mon travail de thèse s'est donc attaché à déterminer si les NPs, en particulier d'oxyde de zinc (ZnO), pouvaient modifier l'activité des réseaux de neurones responsables de la genèse des activités respiratoire et locomotrice.** Cette étude, réalisée *ex vivo* sur des préparations de moelle-épine/tronc cérébral ou de tranches bulbaires isolées de **rat nouveau-nés**, mais également *in vivo* après injection des NPs au cours de la gestation, a permis de combiner des approches électrophysiologiques, pharmacologiques et neuroanatomiques. Ce travail doctoral a permis de mettre en évidence l'existence d'un effet délétère des NPs ZnO sur les neurones respiratoires, provoquant lors d'une exposition aiguë une augmentation de la fréquence inspiratoire suivie d'un arrêt précoce et définitif de cette activité. De plus, les NPs modifient le rythme ventilatoire et prolongent la durée des pauses respiratoires (apnées) d'animaux nouveau-nés dont la mère a été exposée de façon chronique aux NPs ZnO au cours de la gestation. Enfin, elles perturbent également l'activité des réseaux spinaux locomoteurs en provoquant un changement du rythme et en modifiant les patrons d'alternance caractéristiques de cette activité. Ces données permettent d'apporter un éclairage nouveau concernant la neurotoxicité potentielle des NPs ZnO sur le fonctionnement et le développement des réseaux neuronaux moteurs chez les mammifères, mais elle permet également de s'interroger sur la vulnérabilité périnatale des organismes lors d'une exposition maternelle au cours de la gestation. Malgré les avantages technologiques et économiques qu'offre le développement des nanotechnologies et des nanoparticules, il est donc nécessaire de considérer avec attention le risque chimique que pourrait représenter l'exposition (aiguë et/ou chronique) aux NPs sur la santé de la population en général, mais également dans la cadre d'activités professionnelles.

## **Abstract**

Due to their size (<100nm) that confers them unique properties, nanoparticles (NPs) are used in many products of everyday life. The growing exposition of the population to NPs, have elicited concerns about their possible impact on health and environment. Indeed, NPs are able to enter and diffuse into organism, through the alveolar, placental, and blood-brain barriers. More dramatically, NPs accumulate into organs such as the brain, and could potentially induce various diseases. Recent findings have highlighted the ability of NPs to modulate the bioelectric properties of individual neurons. However, whether NPs could impair the functioning of a whole neural network remained unknown. My thesis work aimed at determining whether exposures to zinc oxide (ZnO) NPs could alter the activity of neuronal networks responsible for the genesis and control of respiration and locomotion. Using *ex vivo* brainstem/spinal cord preparations from neonatal rats, we have shown that an acute exposure to ZnO NPs induced an early increase of inspiratory frequency followed by a premature cessation of the rhythm generation. Our results show that the inspiratory neurons from the pre-Bötzinger complex can be considered as a preferential target of ZnO NPs. Furthermore, using plethysmographic recordings, we report that the chronic injections of ZnO NPs in pregnant female rats change the respiratory rhythm of newborn animals and increase the duration of respiratory pause (apnoea). Taking together, our data shed a new light on the potential neurotoxicity of ZnO NPs on the functioning of motor neuronal networks in mammals, and the perinatal vulnerability throughout maternal exposure during gestation.

# Problématique et présentation du mémoire

Les nanoparticules (NPs) font de plus en plus partie de notre quotidien. En effet, les propriétés remarquables que leur confère leur très petite taille (<100 nm) leur vaut d'être présentes dans de très nombreux produits industriels et de consommation courante. Néanmoins, l'augmentation de leur exposition (en fréquence et durée) et donc leur accumulation dans notre environnement pourraient avoir des effets délétères voire dramatiques sur la population si l'innocuité de telles substances s'avérait ne pas être nulle. De précédentes études ont déjà rapporté que les NPs, dont celles d'oxyde de zinc (ZnO), pouvaient pénétrer dans l'organisme et induire divers effets délétères tels que des inflammations pulmonaires, mais aussi des effets au niveau neuronal avec une perturbation du fonctionnement des neurones. Toutefois à ce jour, peu de données sont disponibles concernant l'effet des NPs sur des ensembles de neurones, en particulier ceux constitutifs des réseaux moteurs. C'est dans ce contexte que mes travaux de recherche au cours de ces trois années doctorales m'ont conduit à étudier la toxicité éventuelle des NPs ZnO sur le fonctionnement des réseaux de neurones respiratoires et locomoteurs. Les expériences ont été menées sur un modèle de vertébré supérieur, le rat nouveau-né, modèle permettant une étude neurotoxicologique (effets de l'exposition aiguë aux NPs ZnO) à partir notamment de préparations réduites de système nerveux central (tronc cérébral/moelle épinière isolés, tranche bulbaire) qui facilitent l'utilisation combinée de techniques électrophysiologiques, pharmacologiques et neuroanatomiques. Ce modèle autorise également l'étude d'une transmission verticale (materno-fœtale) permettant d'aborder les questions de développement, de mise en place et de fonctionnement des réseaux respiratoires en période périnatale lors de l'exposition chronique de mères gestantes aux NPs.

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Doctorat, ce manuscrit sera subdivisé en six parties. Une **première partie introductive** effectuera un bref historique sur le fonctionnement des réseaux de neurones, revenant notamment sur le concept de *Central Pattern Generator* (CPG), puis s'intéressera à l'organisation générale et à la commande nerveuse des appareils respiratoire et locomoteur. Une ultime partie de cette introduction sera consacrée à la découverte des NPs, à leurs propriétés physico-chimiques, à leur utilisation et enfin à leur éventuelle toxicité.

La **seconde partie** décrira les **différentes méthodes** et **techniques expérimentales** utilisées dans l'ensemble de mes travaux, en intégrant également un court historique des différentes préparations utilisées lors de cette étude.

La **troisième partie** sera elle consacrée à la présentation de mes **résultats**, subdivisés en quatre chapitres indépendants. Les NPs ZnO utilisées lors de cette étude seront tout d'abord caractérisées, puis leurs effets sur la commande respiratoire seront étudiés lors d'une exposition aiguë en condition *ex vivo*, et lors d'une exposition chronique en condition *in vivo* chez la femelle gestante. Enfin, l'ultime partie de mes résultats sera consacrée aux effets des NPs ZnO sur l'activité des réseaux locomoteurs spinaux.

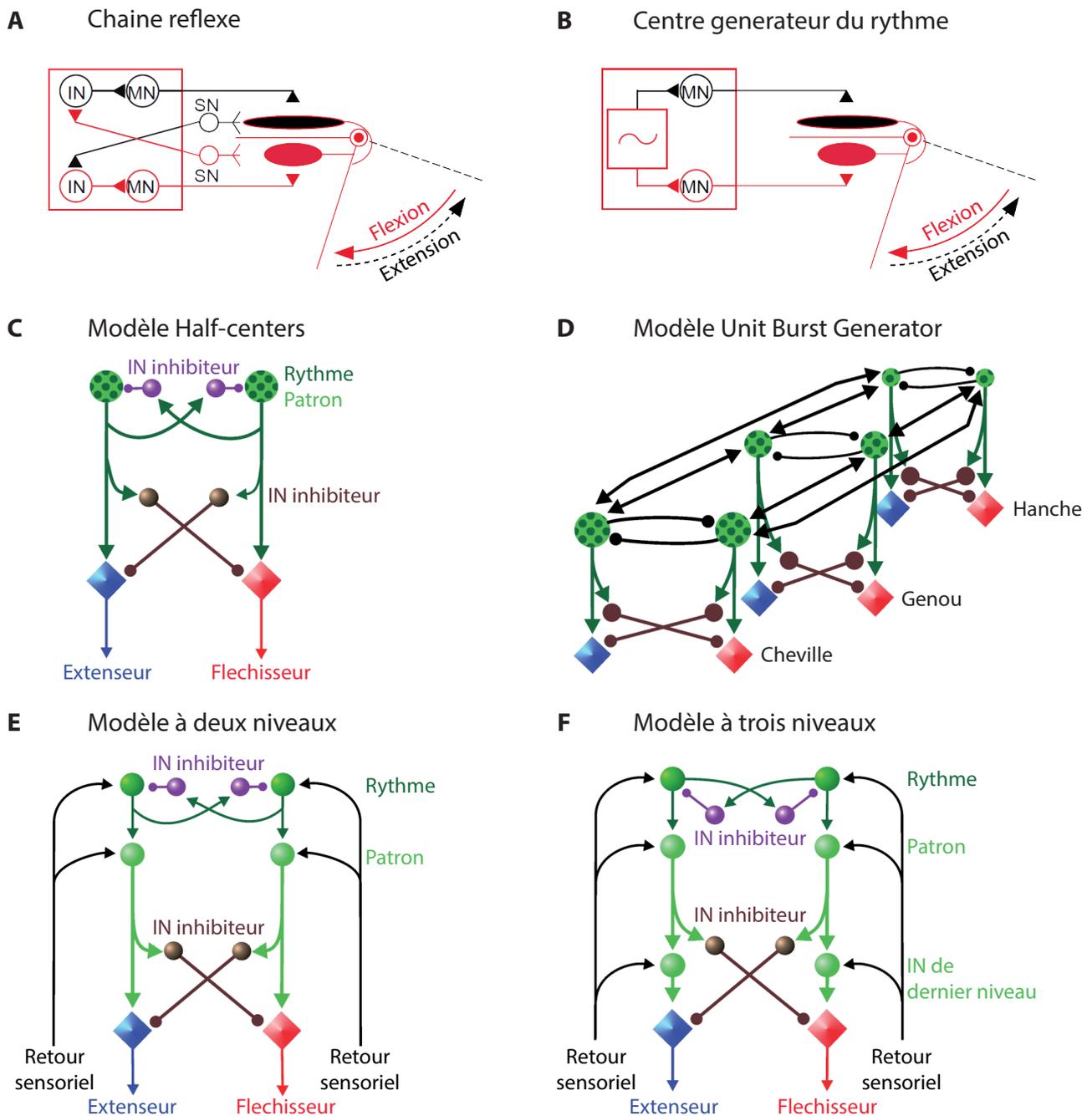
La **quatrième partie** fera l'objet d'une **discussion générale** qui permettra de replacer l'ensemble de mes données dans un contexte plus général, notamment de toxicologie des NPs et de vulnérabilité périnatale. **Les perspectives** expérimentales mises en avant par ce travail doctoral constitueront la **cinquième partie** de ce manuscrit.

Enfin, une **dernière partie** recensera en annexe les **communications scientifiques**, écrites ou orales, issues de ce travail de thèse.

## Abréviations

<b>5-HT:</b> Sérotonine	<b>NA:</b> Noyau ambigu
<b>AAS-F:</b> Spectromètre d'absorption atomique à flamme	<b>NK1R:</b> Récepteur à la neurokinine 1
<b>BHE:</b> Barrière hémato-encéphalique	<b>NMDA:</b> N-methyl D-aspartate
<b>ChAT:</b> Choline acétyltransférase	<b>NP ZnO:</b> Nanoparticule d'oxyde de zinc
<b>CHX10:</b> Ceh-10 Homeodomain-Containing Homolog	<b>NPs:</b> Nanoparticules
<b>CPGs:</b> Central Pattern Generators	<b>NTS:</b> Noyau du tractus solitaire
<b>DBX1:</b> Developing brain homeobox protein 1	<b>PA:</b> Potentiels d'action
<b>DMRT3:</b> Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 3	<b>PBS:</b> Tampon phosphate salin
<b>DRG:</b> Dorsal Respiratory Group	<b>PFA:</b> Paraformaldéhyde
<b>EGTA:</b> Acide éthylène-bis-(oxy-éthylènenitrilo) tétraacétique	<b>pFRG:</b> Groupe respiratoire para-facial
<b>EN1:</b> Homeobox protein engrailed-1	<b>PiCo:</b> Post-inspiratory complex
<b>GATA2:</b> GATA binding protein 2	<b>préBötC:</b> Complexe pré-Bötzinger
<b>HB9:</b> basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9	<b>ROS:</b> Reactive Oxygen Species
<b>HEPES:</b> acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	<b>RTN:</b> Noyau retro-trapézoïde
<b>IP:</b> Intrapéritonéale	<b>SHOX2:</b> Short stature homeobox 2
<b>Isl1:</b> Insulin gene enhancer protein	<b>SIM1:</b> Single-minded homolog 1
<b>ITR:</b> Intertrigeminal region	<b>SLR:</b> Région motrice sous-thalamique
<b>LCRa:</b> Liquide céphalo-rachidien artificiel	<b>SNC:</b> Système nerveux central
<b>MET:</b> Microscopie électronique à transmission	<b>TTX:</b> Tétrodotoxine
<b>MLR:</b> Région locomotrice mésentencéphalique	<b>VRG:</b> Ventral Respiratory Group

# **Introduction générale**



**Figure 1: Les modèles de réseaux rythmiques locomoteurs**

Les excitations sont représentées par des flèches et les inhibitions par des cercles. D'anciens travaux montrent deux hypothèses de genèse d'une activité rythmique et alternée. Dans le modèle de chaîne réflexe (A), les neurones sensoriels en provenance d'un muscle actif excitent des interneurons activant à leur tour les neurones moteurs du muscle antagoniste. Dans le modèle du centre générateur du rythme (B), un circuit central génère un patron d'activités rythmiques alternées entre les motoneurons des muscles antagonistes. (C) Modèle classique de Half-center. L'activité rythmique est produite par deux populations d'interneurons excitateurs (vert) interconnectés par des inhibitions réciproques (violet). Le même interneurone excite à la fois le motoneurone correspondant et l'interneurone inhibiteur responsable de l'inhibition rythmique du motoneurone antagoniste. (D) Dans le modèle de Unit Burst Generator plusieurs half-centers interconnectés génèrent et contrôlent l'activité rythmique d'un groupe fonctionnel de motoneurons. (E, F) Modèles à deux et trois niveaux dans lesquels la génération du rythme (vert foncé) et du patron (vert clair) sont produites par des populations différentes.

IN: Interneurone, MN: Motoneurone, SN: Neurone sensoriel

(A, B) Modifiées d'après Marder et al., 2001 (C à F) Modifiées d'après McCrea et al., 2008

## Réseaux de neurones et activité rythmique

De nombreux comportements rythmiques dits automatiques tels que la digestion, la mastication, la respiration ou encore la locomotion nécessitent la présence de réseaux neuronaux engagés dans la genèse parfois spontanée d'une activité rythmique fonctionnelle. En l'absence de tout stimulus ou retour sensoriel, ces ensembles neuronaux sont capables de produire des rythmes stéréotypés et sont alors qualifiés de générateurs centraux de patrons moteurs (*Central pattern generator, CPG*). Depuis plus d'un siècle maintenant, l'étude des propriétés bioélectriques des neurones constituant ces réseaux a permis de comprendre comment de telles activités peuvent être générées dans le système nerveux central (SNC).

### Le concept de CPG

Suite aux travaux princeps de Sherrington sur la locomotion chez le chat (Sherrington 1906), le concept émergent concernant les activités rythmiques s'articulait autour de la notion de "*stepping reflex*", autrement dit de la nécessité d'une activation des informations sensorielles pour alimenter la production du ou des mouvements suivants (**Figure 1A**). Toutefois, ce concept fut rapidement écarté suite aux expériences menées chez le chat qui, en l'absence de retour sensoriel (rhizotomie dorsale) et de commande corticale (lésion médullaire complète au niveau thoracique), était encore capable de produire des activités alternées rythmiques caractéristiques de la locomotion (Brown 1911). L'auteur suggérait alors que l'alternance entre flexion et extension des muscles des membres postérieurs pendant la marche chez le chat était le fruit d'une inhibition réciproque entre circuits centraux de neurones rythmiques (**Figure 1B**). Le concept de CPG prenait naissance, renforcé par la notion d'*half-centers* pour laquelle les activités rythmiques alternées de type locomoteur sont issues de deux centres générateurs s'inhibant mutuellement (voir ci-après).

#### *La théorie du réflexe*

Malgré la découverte de Brown, ses travaux furent momentanément "oubliés" et la théorie du réflexe a perduré pendant presque 50 ans, des études ayant été publiées en ce sens (Sherrington 1913, Eccles et Sherrington 1931). L'argument qui relança le débat et amorça la fin de cette théorie fut apporté par Wilson (Wilson 1961). Après désafférentation (c'est-à-dire suppression des informations sensibles), l'auteur montre qu'une écrevisse restait capable de générer un comportement moteur rythmique de fuite en réponse à une stimulation tonique

de la corde nerveuse. Quelques années plus tard et grâce à l'utilisation d'enregistrements intracellulaires, la présence d'une zone de la moelle épinière chez le chat pouvant correspondre à la localisation des CPG locomoteurs est décrite (Lundberg 1965, Jankowska et al. 1967b, Jankowska et al. 1967a). Mais l'argument le moins controversé et qui a permis de prouver définitivement qu'une partie du système nerveux est capable de générer de manière intrinsèque un patron moteur rythmique fut apporté par le développement de modèles de système nerveux central isolé *ex vivo* dans lesquels plus aucune afférence sensitive et donc plus aucune information temporelle provenant de l'environnement pouvant induire ou réguler un rythme n'était présente. Par exemple chez le criquet, la lésion des retours sensitifs induit uniquement un ralentissement du rythme respiratoire (Lewis et al. 1973). De la même manière, la suppression des afférences sensibles intestinales chez le homard n'interrompt pas les mouvements digestifs (Winlow et Laverack 1972). Ces études et de nombreuses autres sur différents modèles expérimentaux ont rapporté ces expériences de désafférentation (pour revue, (Delcomyn 1980)) et prouvé l'existence de zones rythmogènes dans le système nerveux, certaines ayant leur spécialisation comme les CPGs locomoteurs dans la moelle épinière (Grillner et Wallen 1985) ou encore les centres respiratoires dans le tronc cérébral (Suzue 1984).

#### *Le concept de "Half-Center"*

Dans son étude, Brown (1911) avait proposé que l'activité alternée de la locomotion reposait sur la présence de deux groupes de neurones s'inhibant à tour de rôle (**Figure 1C**). Ce concept de *Half-Center* fut la théorie dominante, et quasi-exclusive pendant plus d'un demi-siècle. En effet, que ce soit chez le poisson ou le mammifère, l'activité rythmique locomotrice persiste dans des préparations d'hémi-moelle épinière. Concernant la fonction respiratoire, le complexe pre-Bötzinger (préBötC), isolé dans une tranche de tissu bulbaire, reste capable de générer un rythme de type inspiratoire (Carroll et Ramirez 2013). Il pourrait constituer le premier "*half-center*" du réseau respiratoire, le second pouvant être alors le RTN/pFRG (Janczewski et Feldman 2006) connu pour produire la phase expiratoire elle-même bloquée pendant la phase inspiratoire. Toutefois, le blocage pharmacologique des inhibitions n'entravant pas la genèse des activités respiratoires (Shao et Feldman 1997) ou locomotrices (Cohen et Harris-Warrick 1984), le modèle de "*half-center*" fut progressivement délaissé. De plus, dès les années 70, plusieurs neuroscientifiques montrent que ce modèle ne peut rendre

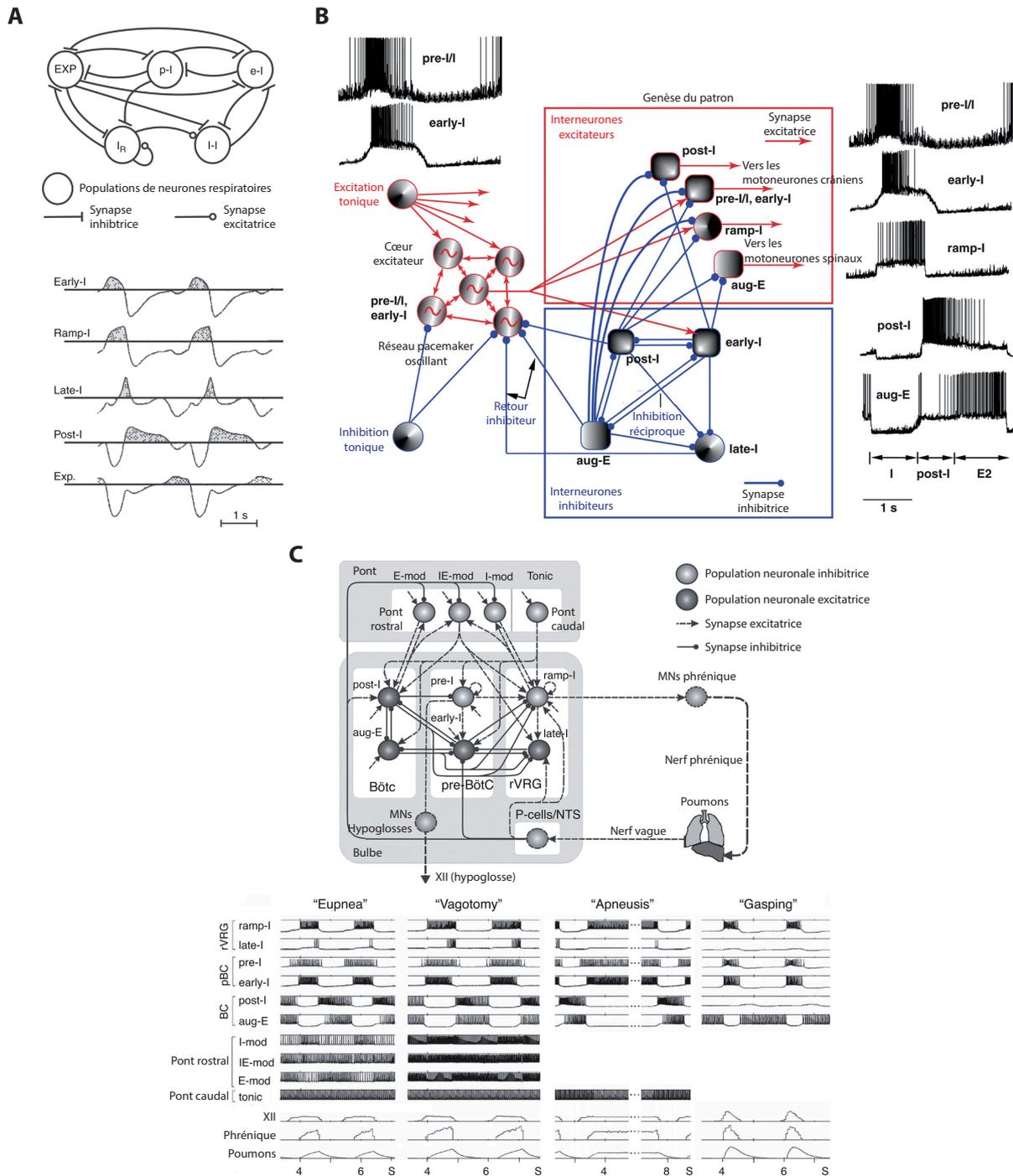
compte des patrons moteurs complexes observés pendant la locomotion, en particulier chez les quadrupèdes (les différentes allures locomotrices par exemple), mais également pendant la respiration (présence de pauses respiratoires, de soupirs...).

#### *Le modèle de "Unit Burst Generator"*

Dans les années 70-80, ce modèle a contribué à démontrer qu'une organisation symétrique et organisée du générateur dans la moelle épinière peut produire un patron de commande motrice pour la marche, même en l'absence d'afférences périphériques. Les patrons locomoteurs sont souvent complexes et peuvent inclure des neurones actifs pendant toutes les phases de la marche, alors que d'autres cellules seront plutôt actives au démarrage ou l'arrêt d'une phase (extension ou flexion). De plus, ces patrons complexes persistent en l'absence d'afférences sensibles (Grillner et Zangger 1979). Les CPGs ne se contentent donc pas de générer une alternance entre flexion et extension, mais un patron plus complexe qui va de manière séquentielle démarrer puis arrêter au bon moment l'activité des muscles d'intérêt. Leur modèle propose donc une architecture où plusieurs "modules" ou *Unit Burst Generators* contrôlent un sous-ensemble de motoneurones, chaque module étant interconnecté entre les deux côtés de la moelle épinière, mais aussi entre chaque segment (ou groupe musculaire) (**Figure 1D**, (Grillner 2011)). De plus, chaque unité serait contrôlée par une commande supra-spinale. Mais malgré des éléments expérimentaux soutenant cette hypothèse (Edgerton et al. 1976), ce modèle n'explique pas tous les patrons complexes de l'activité motoneuronale comme en particulier les délétions (moments du cycle pendant lesquels certains motoneurones ne déchargent plus, alors qu'ils le devraient selon les prédictions du cycle locomoteur).

#### *Le modèle de "Half Center" multi-niveaux*

Beaucoup de modèles ont échoué à expliquer entièrement la grande diversité de patrons qui ont lieu lors de la locomotion (McCrea et Rybak 2008). Suite à des expériences chez le chat (Perret et Cabelguen 1980), un nouveau modèle de CPG bipartite est proposé pour expliquer ces activités complexes (**Figure 1E**). Dans ce dernier, les deux *half-centers* projettent vers les motoneurones antagonistes, permettant de créer des patrons complexes d'activités en modulant l'activation de ces deux centres. De plus, ils émettent l'hypothèse, étayée par d'autres équipes (Kriellaars et al. 1994), que la génération du rythme et du patron se fait



**Figure 2: Les modèles du réseau rythmique respiratoire**

(A) Représentation schématique de l'un des premiers modèles de réseau respiratoire présentant une activité à trois phases. Ce réseau comprend des neurones expiratoires (EXP), postinspiratoires (post-I), inspiratoires tardifs (e-I), inspiratoire précoces (I-I) et inspiratoire à activité en rampe (IR). Est également représenté le patron d'activité du réseau pour chaque neurone le composant.

Modifiée d'après Ogilvie et al., 1992.

(B) Modèle dit "hybride" comportant un cœur principal excitateur pour le rythme, mais également deux réseaux bulbaires interconnectés, l'un excitateur, l'autre inhibiteur, permettant la genèse du patron respiratoire. De nouveau sont également représentés les patrons d'activité des principaux neurones du réseau.

Modifiée d'après Smith et al., 2000.

(C) Modèle de réseau compartimenté, comprenant le pont, le bulbe rachidien ainsi que les retours sensoriels pulmonaires. Comme illustré par les tracés, ce modèle est capable de reproduire patrons d'activités respiratoires dans différentes conditions expérimentales.

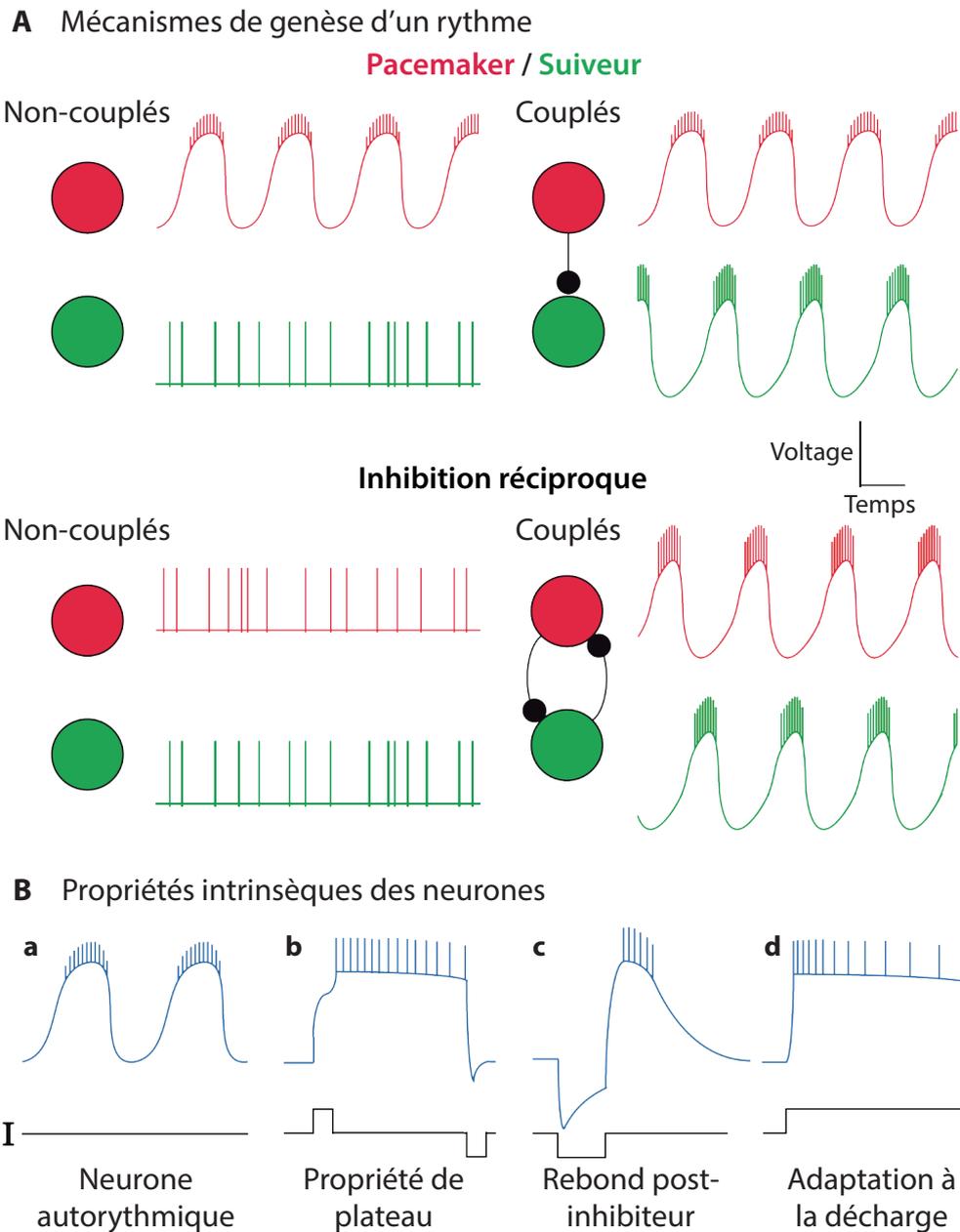
Modifiée d'après Rybak et al., 2004.

séparément, ces deux propriétés étant indépendantes. Ce modèle a été récemment repris, en ajoutant un troisième niveau de commande (**Figure 1F**, [\(Daun et al. 2009\)](#)).

#### *Modélisation de l'activité respiratoire centrale*

*Une partie des notions abordées dans ce paragraphes seront détaillées ultérieurement (Voir "Les structures respiratoires centrales" – page 33).*

Contrairement au réseau locomoteur, le rythme respiratoire implique des neurones autorythmiques, dits "pacemaker", et est composé de plusieurs phases: pré-inspiratoire, inspiratoire, post-inspiratoire et expiratoire. De plus, la genèse de l'activité respiratoire implique de nombreuses structures bulbo-pontiques (préBötC, pFRG...), rendant d'autant plus complexe l'étude et la modélisation de ces réseaux. L'un des premiers modèles à proposer une activité oscillante à trois phases fut proposé en 1992 ([Ogilvie et al. 1992](#)), reposant sur des neurones inspiratoires tardifs ayant leur pic d'activité en fin d'inspiration/début d'expiration, permettant ainsi la transition entre ces deux phases (**Figure 2A**). Mais ce modèle présente seulement des oscillations et aucune bouffée d'activité. En 1994, un nouveau modèle est proposé en ajoutant les notions de seuil de décharge et de bouffées d'activités dans les neurones impliqués, en permettant également de simuler les interactions entre plusieurs neurones ayant la même fonction ([Balis et al. 1994](#)). En 1997, une série de modèles plus complexes est élaborée, permettant de moduler l'activité en fonction des propriétés intrinsèques des neurones, mais comportant surtout un modèle simplifié de poumon incluant les retours sensitifs ([Rybak et al. 1997](#)). Ainsi, ce modèle est capable de reproduire l'effet sur les centres respiratoires d'une vagotomie (augmentation de la durée et de l'amplitude des inspirations et diminution de sa fréquence). Mais ces premiers modèles historiques ne peuvent reproduire la complexité de l'activité observée *in vitro* comme la persistance de l'activité en l'absence de toute inhibition, ou encore la régulation par les signaux sensitifs périphériques. Un modèle plus complexe, impliquant un cœur excitateur pour la genèse du rythme, et un second réseau pour la formation du patron, permet l'obtention d'un rythme pouvant être modulé même en l'absence d'inhibition (**Figure 2B**; [\(Smith et al. 2000\)](#)). Les modèles précédents étudiaient surtout les connexions entre les différents types de neurones. Pour ce dernier modèle présenté, deux nouveautés principales sont à noter: la prise en compte de l'anatomie, en compartimentant les populations de neurones à la façon des différentes régions présentes *in vivo*, mais également l'intégration des retours sensitifs dans



**Figure 3: Les mécanismes de la rythmogenèse**

(A) Le rythme peut être généré par des neurones autorythmiques, ou être le résultat de propriétés émergeant du couplage synaptique de neurones non-autorythmiques. Dans les réseaux sous dépendance de neurones pacemakers (rouge), ceux-ci vont activer un neurone antagoniste (ou suiveur, en vert) permettant une activité rythmique du réseau. Le modèle le plus simple dans le cas de neurones non rythmiques, va être le couplage via une inhibition réciproque, permettant de nouveau la genèse de bouffées d'activité alternées.

(B) Les neurones peuvent avoir différentes propriétés intrinsèques afin de générer un rythme. Certains sont capables de générer spontanément des bouffées d'activité (a). Lors d'une stimulation, certains neurones présentent des plateaux de dépolarisation persistants au delà de cette stimulation, et pouvant être arrêtés par une hyperpolarisation (b). Certains neurones répondent à l'inhibition par une activation dite de "rebond" post-hyperpolarisation (PIR) (c), enfin, certains neurones voient leur fréquence de décharge diminuer au cours du temps lors d'une injection de courant constant (adaptation à la décharge, d).

Modifié d'après Marder et al., 2001

la régulation du rythme respiratoire, en particulier via le réflexe d'Hering-Breuer (**Figure 2C**; Rybak et al. 2004). Ce modèle est capable de reproduire plusieurs activités complexes observées *in vitro* tels les soupirs, mais également de reproduire les patrons respiratoires observés lors de l'ablation ou la stimulation de certaines structures nerveuses (pont, nerf vague..., Lumsden 1923).

## Comment un réseau de neurones peut-il générer un rythme ?

La dynamique d'un réseau, quel qu'il soit, dépend des propriétés intrinsèques des neurones qui le constituent et/ou des interactions synaptiques entre ses cellules (Marder et Calabrese 1996). Ainsi, la capacité d'un réseau de neurones à générer un rythme repose soit sur la présence de neurones dits autorythmiques (tels les pacemakers), soit sur l'existence de connexions synaptiques particulières (telles les synapses inhibitrices réciproques), soit encore sur la présence de ces deux éléments (**Figure 3A**).

### *Propriétés intrinsèques des neurones autorythmiques*

Dans un réseau sous le contrôle de neurones de type pacemaker, ces derniers agissent comme oscillateur principal afin d'imposer leur propre rythme à l'ensemble du réseau, incluant les neurones non rythmiques (**Figure 3B.a**). Par analogie, ce système peut être assimilé à un métronome (les neurones pacemakers) dont le tempo peut être modifié en fonction des besoins de l'organisme et/ou des contraintes environnementales (par exemple, augmentation du rythme respiratoire en réponse à une dépense énergétique accrue lors d'une activité physique). Ce fonctionnement a ainsi été décrit aussi bien chez les invertébrés (rythme pylorique du ganglion stomatogastrique chez le crustacé ; Ayali et Harris-Warrick 1999) que chez les vertébrés (Smith et al. 1991). Il est à noter que pour ces deux exemples, il s'agit de rythmes actifs en continu dans l'organisme (Clemens et al. 1998, Reikling et al. 2000), ce qui pourrait indiquer que la présence de neurones de type pacemaker soit une spécificité des réseaux rythmiques nécessairement actifs en permanence pendant la vie de l'animal. Autrement dit, plus l'importance d'une fonction motrice rythmique apparaît comme vitale pour l'organisme et plus les réseaux centraux engagés dans la genèse de ces rythmes font appel à des neurones de type pacemaker.

Pour générer cette activité pacemaker, plusieurs conductances ioniques spécifiques sont impliquées, la répartition entre ces dernières pouvant varier selon le type cellulaire

(pacemaker cardiaque, respiratoire, thalamique...), mais permettant dans tous les cas la réactivation du neurone, même isolé du reste du réseau. Le courant cationique ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) activé par l'hyperpolarisation ( $I_H$ ,  $I_f$  "funny" dans le cœur, ou  $I_Q$  "queer" dans l'hippocampe) met en jeu un ce canal ionique s'activant pour des potentiels membranaires extrêmement bas, 50% des canaux étant ouverts dès  $-75\text{mV}$  (McCormick et Pape 1990). Ce courant permet alors une dépolarisation progressive du neurone jusqu'à l'activation de canaux au seuil d'activation plus haut. Le courant sodique persistant ( $I_{\text{NaP}}$ ) permet lui une entrée continue de sodium dans la cellule, et ce pour des potentiels bas, 50% des canaux étant ouverts à  $-50\text{mV}$  (French et al. 1990). Son action dépolarisante permet au neurone d'atteindre son seuil de décharge (pour revue, (Crill 1996)). Certaines cellules pacemaker dépendent aussi de l'association de conductance calciques ( $I_{\text{Ca}}$ ) et cationiques non spécifiques activées par le calcium ( $I_{\text{CAN}}$ ) pour pouvoir atteindre leur seuil de décharge, par exemple au niveau des pacemakers respiratoires (Thoby-Brisson et Ramirez 2001).

#### *Propriétés émergentes des réseaux*

De nombreux réseaux de neurones capables de produire des activités rythmiques le font en l'absence de neurones de type pacemaker. Afin d'illustrer comment une circuiterie neuronale constituée d'éléments non-rythmiques peut générer un rythme, prenons pour exemple un modèle d'*Half-centers* constitués simplement de deux groupes de neurones interconnectés via des synapses inhibitrices, l'activation du premier groupe provoquant l'inhibition du second, et *vice-versa*. La dynamique d'un tel réseau s'appuie nécessairement sur l'alternance d'un état neuronal actif à un état inactif. Pour ce faire, le premier groupe de neurones possédant par exemple des conductances permettant l'adaptation de la fréquence de décharge (présence de conductance de type  $I_{\text{KCa}}$ ; (Madison et Nicoll 1984), **Figure 3B.d**) passera progressivement d'un état actif (pendant lequel il inhibera l'activité du second groupe neuronal) à un état inactif (dû à la diminution progressive de son excitabilité et de sa fréquence de décharge; (Wang et Rinzel 1992). Ce dernier entraîne alors une levée d'inhibition sur le second groupe neuronal qui s'active alors, inhibant à son tour l'activité du premier. Répétée successivement, cette séquence permet la genèse d'un rythme émergent ainsi des propriétés de réseau en lien avec les spécificités synaptiques présentes. Une autre possibilité est la présence d'inhibitions réciproques entre groupes de neurones possédant des conductances de type calcique activées par l'hyperpolarisation. Ainsi, une fois mis au silence,

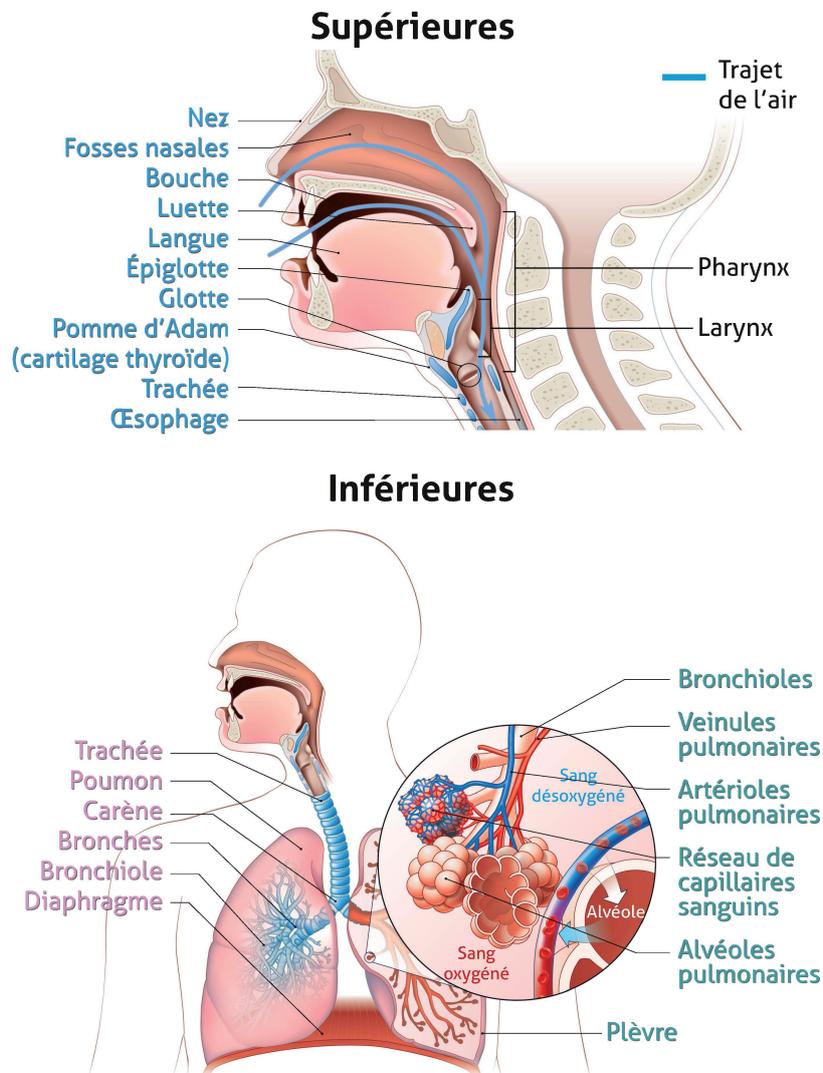
un groupe neuronal peut échapper à l'inhibition en générant un rebond post-inhibiteur (**Figure 3B.c**). Alors activé, ce groupe de neurones devient capable à son tour de mettre au silence via des synapses inhibitrices un groupe neuronal cible (Skinner *et al.* 1994). Ces mécanismes d'inhibitions réciproques sont largement retrouvés dans un grand nombre de générateurs de rythme, comme par exemple ceux impliqués dans le battement cardiaque des sangsues (Arbas et Calabrese 1987), ou encore dans la locomotion chez le mollusque (Satterlie *et al.* 2000), le têtard (Dale 1995) et la lamproie (Grillner 1999). Toutes ces études sont faites sur l'animal, qui bien que très proches pour certains modèles, reste différent de l'humain. Grâce à l'évolution de la technologie, en particulier l'IRM de diffusion, il devient maintenant possible d'effectuer ce genre de travail sur l'Homme (He *et al.* 2007). Malgré ses limites, ce travail nous permettra peut-être un jour de connaître parfaitement le fonctionnement de cette infinité de connexions qui constitue notre cerveau.

## La respiration

De la plus petite des bactéries au plus grand des mammifères, l'apport d'oxygène a toujours été au centre de la vie de des organismes aérobies. En effet, cet oxygène est indispensable à de nombreux processus métaboliques vitaux, en particulier la production d'énergie (phosphorylation oxydative, cycle de Krebs...). Cet apport d'oxygène est plutôt facile pour les organismes les plus simples, comme les bactéries ou les premiers organismes pluricellulaires, puisque la molécule de dioxygène ne fait que diffuser du milieu aquatique à l'espace intracellulaire. Mais l'évolution, en particulier l'apparition des muscles puis le passage en milieu aérien, a poussé les organismes à s'adapter et à trouver un moyen de capter de plus en plus d'oxygène pour subvenir à leurs besoins grandissant en énergie. Cela a commencé avec l'apparition des branchies chez les poissons, permettant d'augmenter la surface d'échange avec l'eau, et donc la quantité d'oxygène dissous absorbée (en plus de permettre la filtration de l'eau pour la prise alimentaire). Avec l'apparition des mâchoires, et donc le passage d'une alimentation par filtration à une alimentation par digestion, les branchies dépourvues de leur rôle de filtration évoluèrent et devinrent le premier organe dédié à la respiration. La structure des animaux devenant de plus en plus robuste, avec l'apparition d'une ossature et d'une musculature importante, le système respiratoire dut alors se complexifier pour permettre l'apport d'oxygène nécessaire. Apparaît alors la vessie natatoire (permettant aussi de modifier la flottaison du poisson), qui évolue jusqu'à devenir un organe à part, tel que les poumons primitifs chez les amphibiens. Puis, lors du passage au milieu terrestre, il devint nécessaire de créer un système permettant de capter l'oxygène gazeux, puis de le dissoudre dans le liquide constituant (sang ou hémolymphe) afin de le distribuer dans tout l'organisme et répondre aux besoins en énergie. Ce système devait également permettre d'évacuer les déchets, principalement le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Les poumons apparaissent alors et évoluent avec par exemple l'apparition d'invaginations dans le but d'augmenter leur surface d'échange. Enfin la pompe buccale fait place à un système complexe nécessitant l'intervention de muscles de plus en plus nombreux (jusqu'à l'apparition du diaphragme chez les mammifères), afin d'induire un mouvement de pompe au niveau du thorax.

Les besoins de l'organisme fluctuant en permanence, il est également nécessaire de pouvoir adapter l'apport en oxygène selon la demande, lors d'un effort physique par exemple.

# Les voies aériennes



**Figure 4: Anatomie des voies aériennes supérieures et inférieures**

Les voies aériennes ont pour rôle la préparation (réchauffage, filtration et humidification) et la conduction de l'air vers les poumons. Les voies aériennes supérieures, composées du nez, du pharynx et du larynx, possèdent également un rôle de carrefour aéro-digestif, à l'inverse des voies inférieures uniquement impliquées dans la conduction de l'air vers les alvéoles (zone d'échange de l'oxygène avec le sang). A noter que dans les 2 parties, le mucus et les déchets contenus sont évacués vers le système digestif.

Modifié d'après France-Signalisation (2015).

Ce système ventilatoire est donc sous le contrôle des centres respiratoires, situés chez le mammifère dans l'encéphale et plus précisément dans le tronc cérébral, permettant ainsi d'augmenter, de diminuer, voire de stopper la respiration quand cela s'avère nécessaire.

Je m'attacherai donc dans ce chapitre à présenter le système respiratoire, les éléments qui le constitue, ainsi que toutes les structures qui génèrent et régulent cette fonction vitale.

## L'appareil respiratoire

Dans ce chapitre seront présentés l'anatomie du système ventilatoire, le système d'échange gazeux alvéolaire, le principe de la pompe aspirante, et enfin les systèmes de régulation de l'activité respiratoire.

### *Anatomie des voies aériennes*

L'appareil respiratoire se subdivise en deux parties (**Figure 4**):

- Les voies aériennes supérieures constituées (dans le sens de passage de l'air lors de l'inspiration) du nez, du pharynx et d'une partie de larynx (avant les cordes vocales), et dont le rôle est de filtrer, réchauffer, humidifier et conduire l'air vers les poumons;
- Les voies aériennes inférieures constituées de la partie inférieure du larynx (après les cordes vocales), de la trachée, de l'arbre bronchique et des sacs alvéolaires, ces derniers ayant un rôle essentiel dans l'échange gazeux ( $O_2$  et  $CO_2$ ).

L'air que nous respirons n'est composé qu'à 20,9% d'oxygène. Il contient essentiellement de l'azote (78,6%), du dioxyde de carbone (0,04%), d'autres éléments traces (gaz rares (argon, néon, krypton, xénon), méthane, dihydrogène, ozone...), des particules en suspension (poussières, particules végétales, microorganismes, nanoparticules...), mais aussi de la vapeur d'eau, rendant l'air terrestre humide.

La première étape du trajet de l'air dans l'organisme se situe au niveau de la cavité nasale. L'intérieur du nez est constitué de structures osseuses enroulées, appelées cornets nasaux, qui permettent d'augmenter la surface d'échange entre les muqueuses et l'air. Ce dernier est réchauffé ou refroidi à une température proche de la température corporelle grâce à la forte vascularisation du tissu (les cornets étant érectiles, leur état de gonflement va permettre de plus ou moins réchauffer l'air par modification de la taille de la surface d'échange). Il est également filtré grâce à l'action conjointe du mucus, qui tapisse tout l'épithélium respiratoire

et qui piège les poussières et autres impuretés, et des cils qui dirigent le mucus vers le pharynx afin de passer dans l'œsophage. On trouve également dans la cavité nasale les nombreuses terminaisons des neurones olfactifs primaires qui identifient les différentes molécules odorantes via des récepteurs membranaires spécifiques avant de transmettre l'information au bulbe olfactif. Enfin, l'air est humidifié si nécessaire via la sécrétion des glandes séreuses.

Une fois réchauffé, filtré et humidifié, l'air passe dans le pharynx, situé à l'arrière de la cavité orale (seule partie visible de la gorge). Ce dernier est impliqué à la fois dans la respiration, la déglutition (passage vers l'œsophage), la phonation (caisse de résonance et modulation du son via sa musculature) et l'audition (via la trompe d'Eustache, rôle d'équilibrage des pressions et d'évacuation des déchets). Il est donc un vrai carrefour où se croisent l'air et le bol alimentaire. Il possède un rôle dans la filtration, toujours via le mucus, et l'évacuation de ce dernier dans le système digestif. Il participe également dans une moindre mesure au réchauffement de l'air inspiré. À noter que dans le règne animal le pharynx peut présenter des particularités comme la présence d'une mâchoire pharyngée (en plus de la mâchoire principale) comme chez la murène (Mehta et Wainwright 2007).

L'air atteint ensuite le larynx. Il s'agit d'un organe cartilagineux complexe très important pour plusieurs raisons. Premièrement, il permet d'éviter les fausses routes puisqu'il peut se fermer via l'action des très nombreux muscles intrinsèques et extrinsèques. En effet, l'élévation du pharynx et du larynx pendant la déglutition provoque la bascule de l'épiglotte, une structure cartilagineuse interne, qui recouvre alors l'orifice laryngé, le protégeant ainsi du passage des aliments. De plus, en cas de défaut de ce système, la moindre stimulation mécanique du larynx (en particulier par de la nourriture) déclenche un spasme glottique voir un puissant réflexe de toux afin d'évacuer les corps étrangers. Deuxièmement, le larynx est le siège de la phonation. Le jeu de différents muscles modifie l'ouverture et la tension des cordes vocales, la forme et la hauteur du larynx permettant, en collaboration avec la force de l'expiration (et aussi la position de la langue, des lèvres et du pharynx), de moduler la hauteur et le volume des sons. Le mouvement des cils présents au niveau laryngé assure l'évacuation du mucus vers l'œsophage et le système digestif.

La trachée est un tube cartilagineux flexible faisant la transition entre le larynx et les bronches. Ce tube n'est pas totalement fermé, une bande de muscles lisses étant présente sur le côté dorsal, ce qui permet à la trachée de modifier son diamètre, en particulier lors du

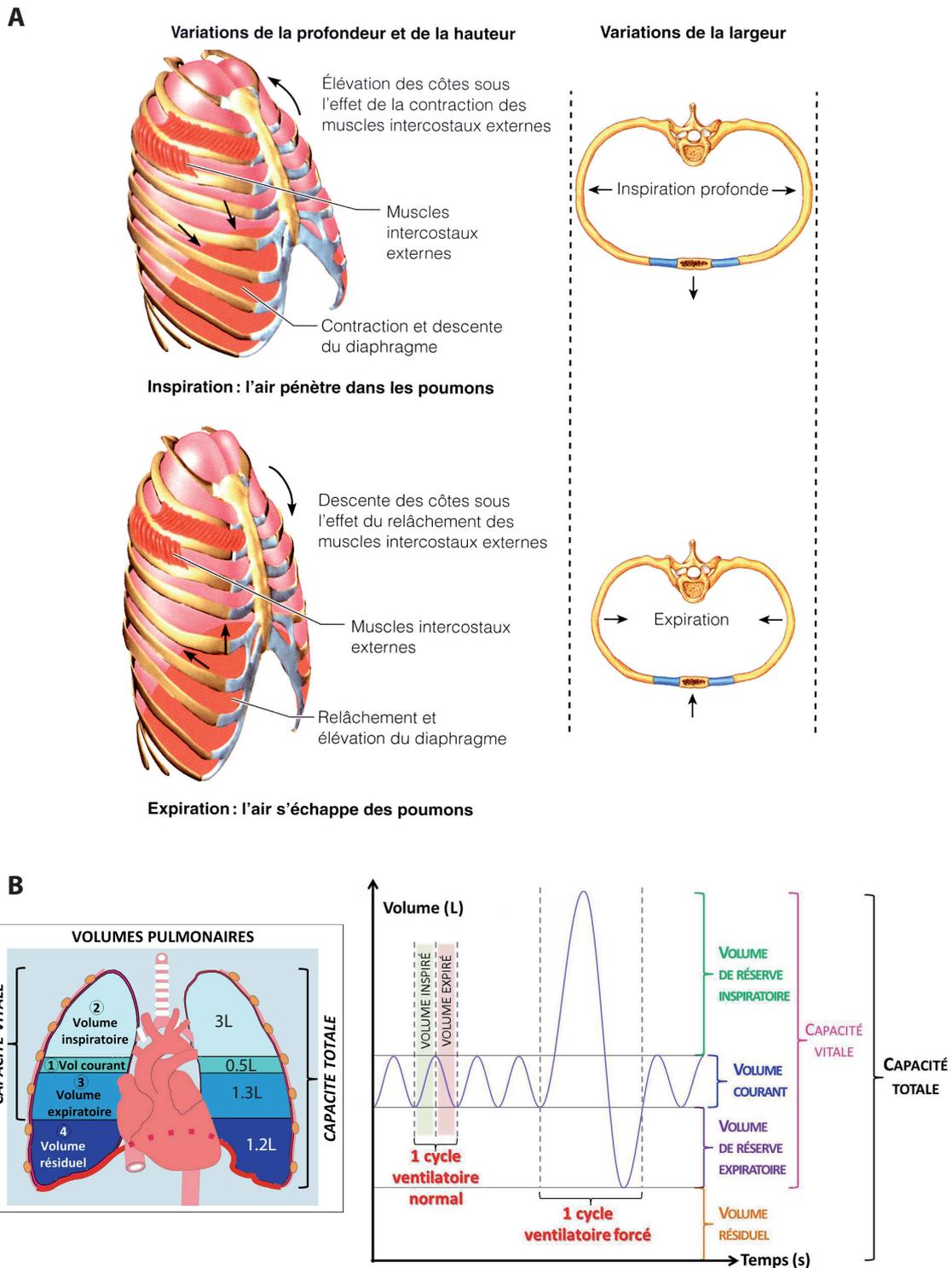
passage de nourriture dans l'œsophage (rétrécissement de la trachée pour faciliter le passage du bol alimentaire). Comme le larynx, la trachée est tapissée d'une muqueuse ciliée brassant le mucus vers le haut. Cette structure se termine par la carène trachéale (ou éperon trachéal) qui divise en deux la trachée, donnant les deux bronches primaires (ou bronches souches). Cette carène est tapissée d'une muqueuse très sensible (la plus sensible de tout l'arbre primaire) impliquée dans le réflexe de toux.

Les bronches primaires disposent d'une structure comparable à la trachée, avec un tube cartilagineux refermé d'un côté par une bande de muscles lisses. Ces bronches souches se poursuivent par les bronches secondaires, une par lobe pulmonaire. Il y a donc 2 bronches secondaires du côté gauche et 3 dans le poumon droit (différence due à la présence du cœur côté gauche). Les bronches secondaires se poursuivent par les tertiaires (ou segmentaires), puis par les bronchioles terminales et enfin respiratoire. Un changement de l'épithélium s'opère lors du passage aux bronchioles avec une perte du cartilage et des cellules ciliées, le tube n'étant alors constitué que de muscles lisses. Le mucus se voit également modifié avec le passage de cellules caliciformes aux cellules de Clara (*Club cells*). La quantité de liquide à la surface du tissu se voit diminuée, et va contenir entre autre des lysozymes et des immunoglobulines, afin de dégrader les polluants qui pourraient encore subsister à ce niveau. Un brassage du surfactant pulmonaire est toujours présent, mais via des microvillosités et non plus des cils. À noter que le système d'escalator mucociliaire ne permet de filtrer que des particules de 5 à 10 micromètres pour les plus fines. À savoir que l'épithélium de la trachée aux bronchioles est relativement sensible aux pressions mécaniques. En cas de congestion, cette sensibilité permet de déclencher un réflexe de toux, provoquant l'évacuation du surplus de mucus en dehors des poumons.

Enfin, les bronchioles se terminent par les sacs alvéolaires, eux-mêmes constitués de plusieurs alvéoles, où s'opéreront les échanges gazeux.

#### *Les alvéoles, siège des échanges gazeux*

Les alvéoles sont des petites poches d'environ 200 micromètres de diamètre, rassemblées en paquets nommés sacs alvéolaires, à l'extrémité des bronchioles. Étant la zone d'échange entre air et sang, les alvéoles sont recouvertes par les capillaires sanguins sur presque 70% de leur surface. On retrouve deux types de cellules dans les alvéoles. Les pneumocytes de type I, ou pavimenteuses, servent de structure à l'alvéole. Les pneumocytes de type II, ou



**Figure 5: La mécanique respiratoire**

**(A)** La respiration est permise par la mise en jeu des muscles respiratoires. Ainsi, pendant l'inspiration, la contraction conjointe du diaphragme et des muscles intercostaux externes permet l'augmentation du volume de la cage thoracique et ainsi le remplissage des poumons, ces derniers étant liés au volume thoracique via la plèvre. Lors de l'expiration, le relâchement des divers muscles permet à l'air de s'échapper et à la cavité thoracique de reprendre sa forme initiale.

**(B)** Lors de la respiration, seule une infime partie de la capacité pulmonaire est utilisée (0,5L sur les 6L de capacité totale, volume courant). Au besoin, le volume de réserve inspiratoire est mobilisé afin d'augmenter la quantité d'oxygène capté (Capacité vitale). A cause de contraintes mécaniques, seuls 4,8L de capacité vitale peuvent être utilisés sur les 6L de capacité totale. Les 1,2L restants constituent le volume résiduel.

granuleuses, sécrètent un surfactant aqueux dont la richesse en phospholipide et lipoprotéine permet de réduire la tension de surface de l'eau, et ainsi éviter que les alvéoles ne se collabent. On retrouve également des macrophages qui détruisent les derniers corps étrangers tels que les poussières, les bactéries ou les virus présents au niveau alvéolaire.

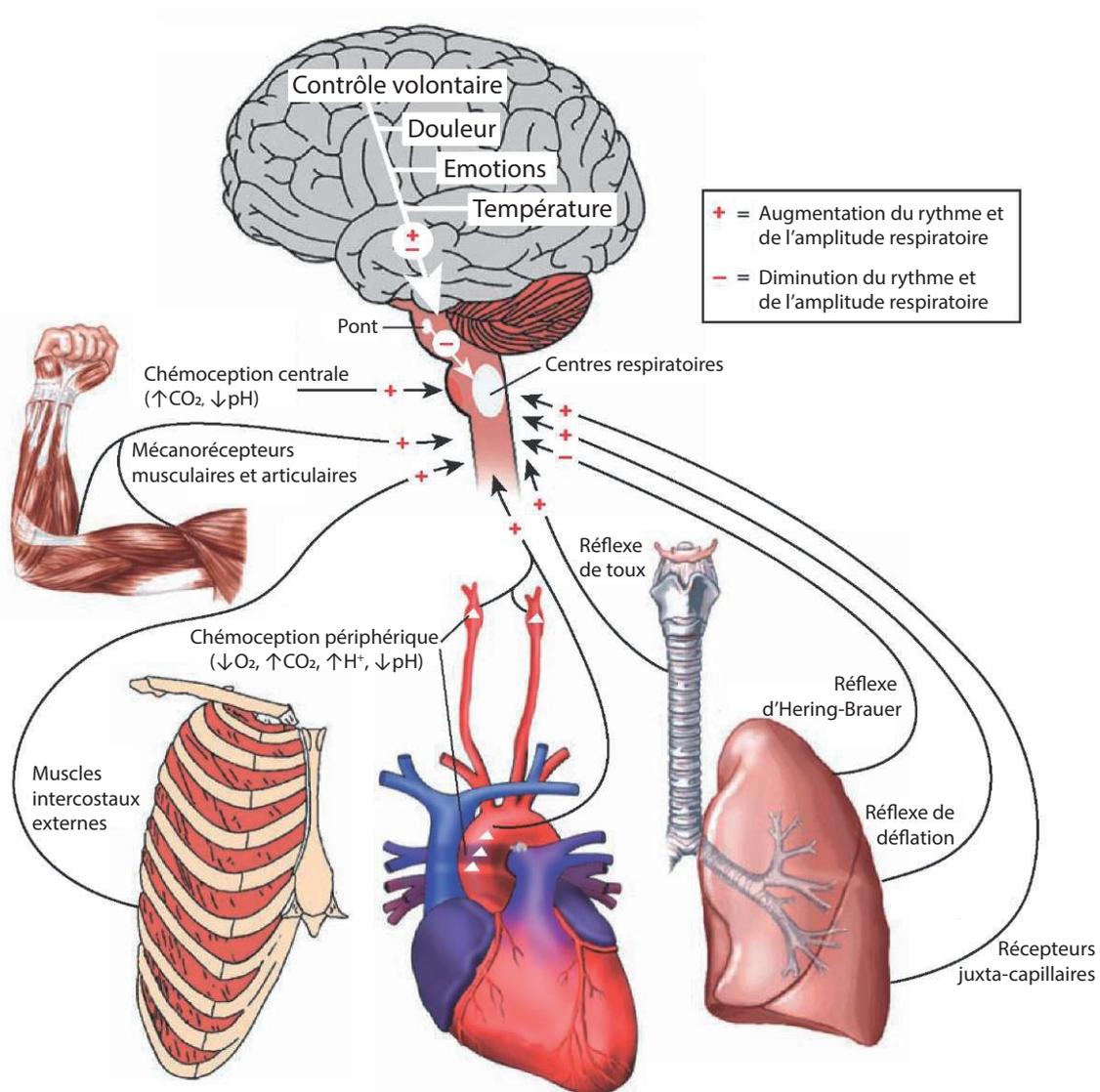
L'échange gazeux à ce niveau repose sur une diffusion des gaz au travers de la membrane alvéolo-capillaire, suivant le principe des gradients de pressions partielles (Pp). La différence de pression partielle des deux côtés de la membrane alvéolo-capillaire permet à l'oxygène de passer de l'alvéole ( $P_{pO_2}=14$  kP) au sang (5 kP), et au dioxyde de carbone du sang ( $P_{pCO_2}=6$  kP) à l'alvéole (5,3 kP). Malgré la faible taille des alvéoles (200  $\mu$ m), leur grand nombre (environ 700 millions) permet aux poumons de représenter une surface d'échange de 75m<sup>2</sup>.

### *La plèvre*

Les poumons sont entourés par la plèvre, constituée de deux membranes séreuses, une accolée à la cage thoracique (dite plèvre pariétale), et l'autre aux poumons (plèvre viscérale). Ces deux membranes sont séparées par le liquide pleural, un lubrifiant naturel protégeant ainsi les membranes et les poumons d'un échauffement que pourrait engendrer l'action mécanique respiratoire. Cette double membrane pleurale permet enfin de lier le mouvement des poumons à celui de la cage thoracique.

### *La pompe aspirante*

Commandée par des motoneurones dont les corps cellulaires sont situés dans la corne ventrale de la moelle épinière au niveau cervical C3 à C5 chez l'Homme, la contraction combinée du diaphragme (mouvement vers le bas) et des muscles intercostaux externes (écartement des côtes (Sant'ambrogio et Camporesi 1973) induit une augmentation du volume thoracique (**Figure 5A**). La pression intrapulmonaire devenant alors inférieure à la pression atmosphérique, l'air entre dans les poumons. L'affaissement passif de la cage thoracique lors de l'expiration engendre une augmentation de la pression pulmonaire, facilitant ainsi l'exhalation de l'air. Lors d'un effort, l'expiration devient active afin de favoriser les échanges gazeux (notamment l'élimination du CO<sub>2</sub>). Dans ce cas, l'expiration fait intervenir la contraction d'autres muscles tels les abdominaux (induisant un déplacement du diaphragme) et les muscles intercostaux internes (rapprochement des côtes).



**Figure 6: Les systèmes de régulation de la respiration**

Afin d'adapter en permanence la respiration aux demandes métaboliques, de multiples facteurs centraux et périphériques permettent un ajustement rapide et adapté de la ventilation pulmonaire.

Ce cycle est répété entre 15 et 30 fois par minute chez l'Homme (70 à 150 fois par minute chez le rat). À chaque cycle, seuls 500 mL d'air sont renouvelés sur les 6 L de capacité pulmonaire totale (**Figure 5B**). Il s'agit du volume courant (VC). Au repos, les poumons conservent toujours une réserve d'air. Ainsi, leur volume varie entre 2,5 (expiration) et 3 L (inspiration) d'air. Ce volume restant est nommé capacité résiduelle fonctionnelle (CRF). Mais au besoin, l'utilisation du volume de réserve inspiratoire (VRI) permet d'obtenir une capacité inspiratoire (CI) de 3,5 L remplissant ainsi complètement les poumons. Du côté de l'expiration, tout l'air ne peut être expulsé (limite mécanique et risque de collapsus alvéolaire), les poumons contiendront toujours un volume minimum de 1,2 L d'air qui ne peut être utilisé. On parle de volume résiduel (VR). La respiration étant un mécanisme vital pour l'organisme, ce système est sous le contrôle des centres respiratoires bulbo-pontiques et est finement régulé à la fois par de nombreuses structures centrales (telles que le cortex, le système limbique, l'hypothalamus) et par les informations sensorielles (telles que les récepteurs sensibles à l'étirement des poumons, les mécanorécepteurs pulmonaires, les chémorécepteurs centraux et périphériques).

#### *Les systèmes de régulation de la respiration*

Comme déjà évoqué, la respiration est d'une importance capitale pour la vie de l'organisme. Il est également indispensable que cette fonction s'adapte en temps réel aux demandes métaboliques (**Figure 6**). Par exemple, lors d'un effort physique, le besoin en oxygène des muscles augmente fortement. La fréquence respiratoire augmente donc pour répondre à cette demande, mais également pour évacuer plus efficacement le dioxyde de carbone.

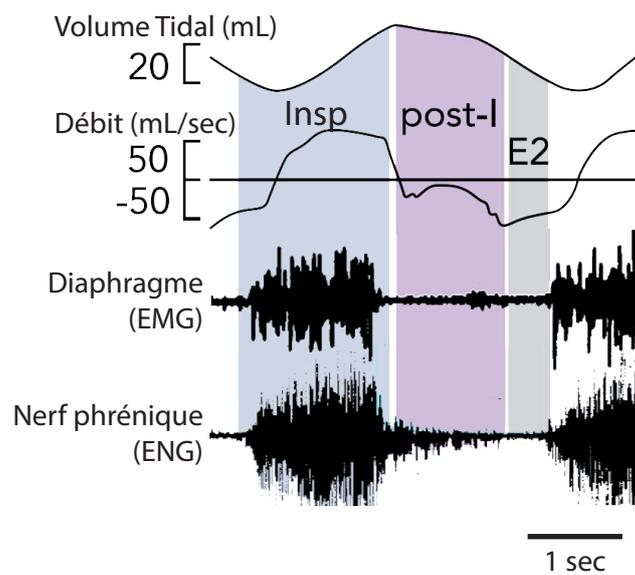
Les premiers éléments à influencer la fréquence respiratoire sont bien entendu l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>. Leur influence sur l'activité respiratoire a été démontrée depuis les années 1900 en modulant le taux de CO<sub>2</sub> dans l'air inspiré. Plus le ratio CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> était important, plus la fréquence respiratoire augmentait (Haldane et Priestley 1905). L'hypothèse est alors faite que la fréquence respiratoire est directement régulée par les structures centrales, sans intermédiaire. Mais dans les années 1920, une étude montre que la section du nerf de Hering, innervant le sinus carotidien (bifurcation donnant les deux artères carotides), abolissait l'augmentation de fréquence induite normalement par la baisse du taux d'O<sub>2</sub> dans l'air (Heymans et Heymans 1927). Il s'agit là de la première preuve de l'existence et de l'influence

des chémorécepteurs sur la respiration. Mais dans les mêmes conditions, l'augmentation du taux de CO<sub>2</sub> induit toujours une augmentation de la fréquence ventilatoire (Comroe 1939). L'hypothèse est donc que le taux d'O<sub>2</sub> est détecté au niveau carotidien, et celui de CO<sub>2</sub> au niveau central. Plus tard, le rôle joué par la valeur de pH sanguin sera proposé (Winterstein 1949). En effet, le CO<sub>2</sub> est très soluble dans l'eau en formant de l'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) qui contribue à l'acidification du milieu (en se dissociant en H<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Cette théorie sera vérifiée 30 ans plus tard en perfusant dans l'espace sous arachnoïdien une solution dont seul le pH variait, le taux de CO<sub>2</sub> restant stable. Une diminution du pH (acidose) provoquait une augmentation de la fréquence respiratoire identique à celle produite par l'inhalation de CO<sub>2</sub> (Loeschcke 1982), alors que la variation du taux de CO<sub>2</sub> sans variation du pH ne modifiait pas la fréquence respiratoire. La détection du taux de CO<sub>2</sub> est donc réalisée via des capteurs sensibles au pH, situés dans le cerveau et en particulier dans le bulbe rachidien, permettant de "mesurer" la valeur du pH au sein du liquide céphalo rachidien (LCR). En résumé, l'augmentation du taux de CO<sub>2</sub> (mesuré indirectement au niveau bulbaire) et/ou la diminution du taux d'O<sub>2</sub> (mesuré au niveau carotidien et aortique) provoquent une réponse des centres respiratoires se traduisant par une augmentation de la fréquence respiratoire afin de rétablir des conditions normales, et surtout optimales pour l'organisme.

En cas de défaut de cette sensibilité gazeuse, de nombreux phénomènes délétères pour l'organisme se mettent en place. Une hypoventilation et donc un rythme respiratoire trop bas, entraîne une baisse du taux d'oxygène sanguin (hypoxémie) et à terme une hypoxie des tissus (cyanose, inflammation...), pouvant aller jusqu'à un arrêt cardiaque (Eltzschig et Carmeliet 2011). L'hypoventilation provoque également une augmentation du taux de dioxyde de carbone sanguin (hypercapnie), aboutissant à une hyperventilation (le corps tente d'enrayer cette hausse en augmentant la fréquence et l'amplitude respiratoire; (Guillerm R Fau - Radziszewski et Radziszewski 1979)). Si cela reste insuffisant, le sang s'acidifie (acidose respiratoire), perturbant alors de nombreux processus métaboliques. À noter qu'une dysfonction des reins, certains médicaments ou pathologies (diabète par exemple) peuvent entraîner une acidose dite métabolique, dont les conséquences sur le corps seront identiques (Morris et Low 2008). À terme et sans traitement (contrôle du taux de CO<sub>2</sub> inspiré par exemple), l'hypercapnie aboutie à une augmentation du rythme cardiaque, des céphalées, des asthénies et à la mort pour les cas les plus graves.

En parallèle, d'autres éléments régulent la fréquence et l'amplitude respiratoire. Afin d'éviter une sur-inflation des poumons lors de la phase inspiratoire, le réflexe de Hering-Breuer est mis en jeu. Au niveau de l'arbre bronchique sont localisées des mécanorécepteurs sensibles à l'étirement qui une fois activés par l'inflation pulmonaire, participent à l'arrêt de l'inspiration via le nerf vague (X), permettant ainsi d'amorcer la phase expiratoire (voir la partie *Les structures respiratoires centrales* – page 33). Le réflexe inverse, dit de déflation, implique les mêmes récepteurs, mais en induisant cette fois-ci une augmentation du rythme respiratoire en réponse à un gonflement trop faible des poumons. Enfin les récepteurs juxta-capillaires, situés dans le parenchyme entre alvéoles et capillaires, induisent une augmentation du rythme en réponse à la présence anormale de liquide dans le tissu interstitiel. La température centrale agit également comme un stimulateur efficace de l'activité des centres respiratoires, l'élévation de la température provoquant une augmentation significative de la fréquence ventilatoire (à noter que chez beaucoup d'animaux, dont le chien, ce système représente le seul moyen de réguler leur température corporelle, le système pileux rendant complètement inefficace la production de sueur dans le but de réduire la température centrale).

Comme évoqué précédemment, certaines structures peuvent aussi agir sur la fréquence respiratoire. En effet, les centres émotionnels, que sont l'hypothalamus et le système limbique, jouent un rôle modulateur de l'activité respiratoire. La peur, le stress ou encore la joie sont autant d'émotions qui le plus souvent induisent une accélération du rythme respiratoire. Dans le cas d'une réaction de fuite chez l'animal, cette augmentation de la fréquence respiratoire dès l'étage émotionnel permet d'anticiper l'effort physique à venir, et ainsi maximiser l'efficacité de la fuite. Même si le plus souvent nous ne faisons pas attention à notre respiration, un contrôle volontaire de cette fonction reste possible. En effet, la stimulation de certaines régions du cortex moteur induit la contraction des muscles respiratoires (diaphragme, muscles intercostaux; Colle et Massion 1958, Gandevia et Rothwell 1987). Ce contrôle volontaire permet ainsi l'anticipation de certains comportements comme ceux impliqués dans l'apnée ou la phonation.



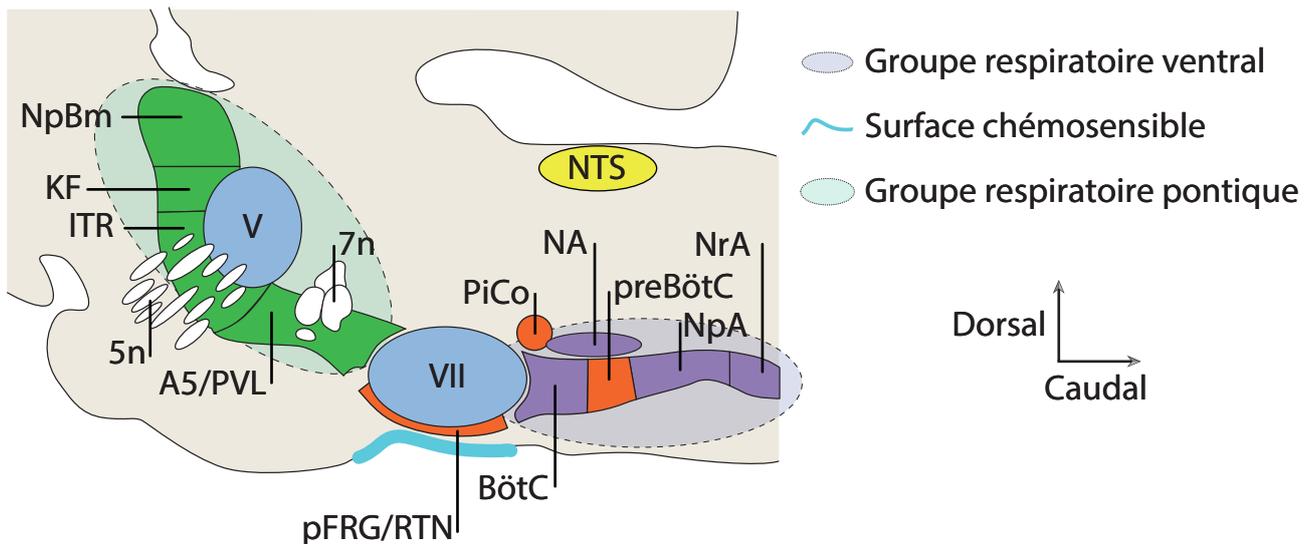
**Figure 7: Les phases du cycle respiratoire**

L'activité respiratoire est composée de 3 phases. La phase inspiratoire est caractérisée par la contraction du diaphragme par une activation du nerf phrénique et l'augmentation du volume pulmonaire. Durant la phase post-inspiratoire, le nerf phrénique est encore légèrement activé et le volume respiratoire reste relativement stable. Pendant la dernière phase expiratoire, plus aucune activation n'est présente, aboutissant à une sortie de l'air des poumons et une diminution de son volume. **EMG:** Electromyogramme, **ENG:** Electroneurogramme, **Insp:** Inspiration, **post-I:** post-inspiration, **E2:** Expiration.

Modifiée d'après Richter et al.,2014.

## Les structures respiratoires centrales

L'alternance entre inspiration et expiration est générée par des centres situés dans le tronc cérébral. L'existence de ces centres est déjà suspectée depuis l'antiquité avec les travaux de Claude Galien (129-216). En effet, lors de ses vivisections, il découvrit que la section de certains nerfs crâniens entraînait un arrêt respiratoire de l'animal. Il conclut donc de l'importance du cerveau et de ses connections pour la fonction respiratoire. Mais c'est le travail de César Julien Jean Legallois (1770-1814) qui permis de déterminer l'origine de la respiration au niveau du tronc cérébral. Grâce à des expériences de lésions ciblées du cerveau et de la moelle épinière, il parvint à déterminer l'importance vitale d'une petite zone bulbaire, et en vint à la conclusion qu'il s'agissait du centre respiratoire ([Fye 1995](#)). Ce travail fut par la suite complété et précisé par Pierre Flourens (1794-1867) qui baptisa cette zone "nœud vital" et s'attacha à cartographier les zones cérébrales liées à des fonctions telles que la mémoire, la pensée, l'équilibre, la circulation, la respiration... ([Flourens 1858](#)). Puis Thomas Lumsden, à l'aide de lésions plus précises, parvint à suggérer que les différentes étapes de la respiration étaient produites par des zones différentes de l'encéphale ([Lumsden 1923](#)). Presque toutes ces études reposaient sur l'enregistrement de l'activité des muscles respiratoires. Dans les années 80 s'opéra un tournant dans ce type d'étude. En effet, l'équipe de Richter enregistra *in vivo* l'activité des nerfs innervant les principaux muscles expiratoires (nerfs phrénique, hypoglosse et intercostal interne), et établit une relation directe entre ces activités nerveuses et musculaires ([Richter 1982](#)). Il détermina également 3 phases respiratoires: 1) une phase inspiratoire, se caractérisant par une brusque décharge sur le nerf phrénique (diaphragme); 2) une phase post-inspiratoire, ou pré-expiratoire, pendant laquelle une faible activité est encore enregistré au niveau phrénique; 3) une phase expiratoire, passive, pendant laquelle il n'y a plus aucune activité enregistrée au niveau phrénique (**Figure 7**). Cette technique d'enregistrements de l'activité nerveuse ouvrit une voie nouvelle qui permis un nombre exponentiel d'études et de découvertes sur le sujet, grâce en particulier au développement de préparations réduites telles que le tronc cérébral/moelle épinière isolé de rongeurs nouveau-nés ([Suzue 1984, Smith et Feldman 1987](#)).



**Figure 8: Représentation schématique des structures du tronc cérébral impliquées dans la genèse et la régulation de l'activité respiratoire (Vue sagittale)**

Les structures respiratoires ventrales sont représentées en violet, les structures dorsales en jaune, et les structures pontiques en vert. Les deux générateurs du rythme respiratoire (**pFRG** et **preBötC**) ainsi que le potentiel complexe post-inspiratoire (**PiCo**) sont représentés en orange. Les noyaux moteurs **V** et **VII** sont en bleu. La surface chémosensible est également représentée en bleu clair.

**5n**: Nerf trijumeau; **V**: Noyau moteur du nerf trijumeau; **7n**: Nerf facial; **VII**: Noyau facial; **A5/PVL**: Neurones adrénergiques A5/pont ventro-latéral; **BötC**: Complexe Bötzingier; **ITR**: Région péritrigéminale; **KF**: Noyau Kölliker-Fuse; **NA**: Noyau ambigu; **NpA**: Noyau para-ambigu; **NpBm**: Noyau para-brachial médian; **NrA**: Noyau rétro-ambigu; **NTS**: Noyau du tractus solitaire; **pFRG/RTN**: groupe respiratoire parafacial/noyau rétro-trapézoïdale; **PiCo**: complexe post-inspiratoire; **preBötC**: complexe preBötzingier.

Modifié d'après [Feldman et al., 2006](#)

### *Le groupe respiratoire ventral*

Le groupe respiratoire ventral ou VRG (*Ventral respiratory group*) est un ensemble de groupes neuronaux regroupés en colonne au niveau ventral du bulbe rachidien (**Figure 8**). Sa première description remonte aux années 70 (Bianchi 1971) grâce à la stimulation antidromique des nerfs innervant les différents muscles respiratoires chez le chat. Dans la région caudale du VRG se trouve le noyau retro-ambigu. Ce dernier reçoit de nombreuses afférences des autres structures respiratoires (préBötC, pFRG, noyau solitaire...) et possède des efférences vers la plupart des noyaux moteurs spinaux des muscles respiratoires (diaphragme, muscles intercostaux, abdominaux). Malgré ses nombreuses interactions, son rôle reste encore flou, mais il semblerait qu'il soit impliqué dans le passage d'une expiration passive, à une expiration active (Subramanian et Holstege 2009).

Rostralement à cette structure est localisé le noyau ambigu (NA). Il s'agit d'un noyau moteur actif pendant l'inspiration et l'expiration, innervant le pharynx, le larynx, et la partie supérieure de l'œsophage. Il assure un rôle dans la phonation et la mastication, mais également dans la respiration puisqu'il permet l'ouverture de la glotte (Barillot et al., 1990). À ce niveau se trouve également le noyau para-ambigu contenant des neurones pré-moteurs projetant sur les motoneurones spinaux des muscles respiratoires (Nunez-Abades et al. 1990).

Dans la partie la plus rostrale du VRG sont localisées certaines structures notamment impliquées dans la rythmogénèse respiratoire. Premièrement, le complexe Bötzing qui contient principalement des neurones expiratoires (Ezure et al. 2003). Bien qu'il ne soit pas un réseau oscillateur et donc générateur de rythme, il semblerait qu'il soit fortement impliqué dans le patron de l'activité respiratoire, en particulier dans la transition entre inspiration et expiration (Smith et al. 2007). La seconde structure de cette partie rostrale est le complexe pré-Bötzing (préBötC) dont le rôle est indispensable dans la genèse du rythme : isolée en tranche, cette structure est capable à elle seule de produire un rythme à l'origine de la respiration fictive (Smith et al. 1991). Absent, plus aucune activité rythmique respiratoire n'est générée (voir *Le complexe pré-Bötzing, structure centrale de l'activité respiratoire* - page 36).

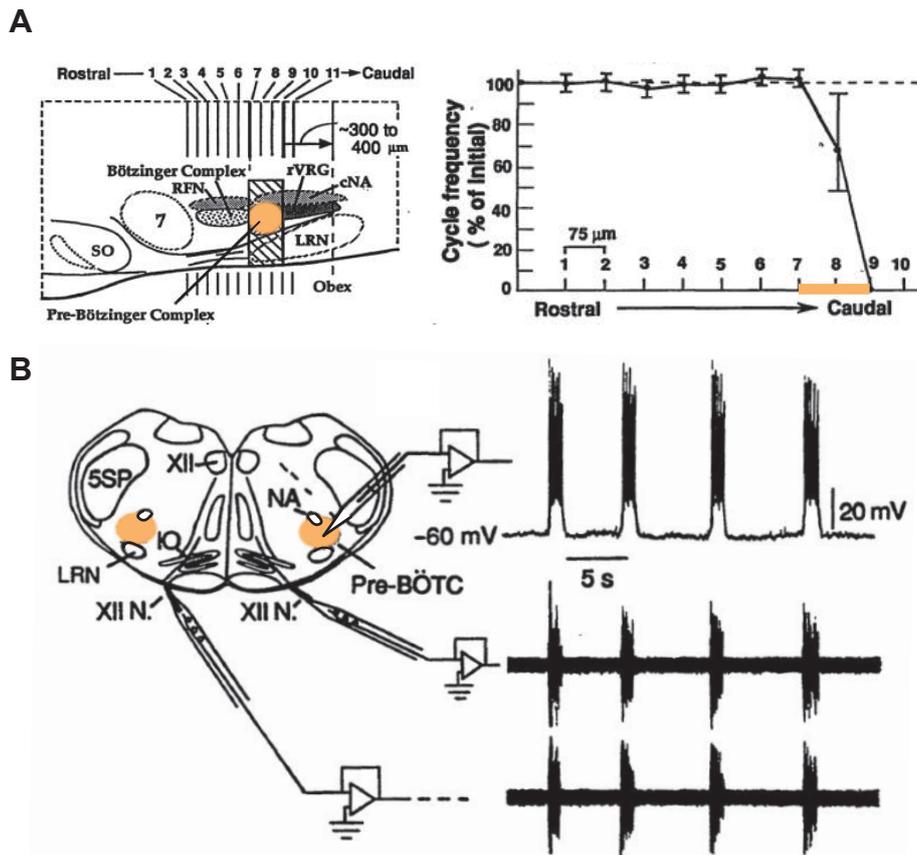
### *Le groupe respiratoire dorsal*

Ce groupe est composé de la partie caudale du noyau du tractus solitaire (NTS). Ce noyau possède un rôle très important dans l'intégration des informations périphériques (Alheid et al. 2011). En effet, ce noyau reçoit de nombreuses afférences mécano- et chémoréceptrices viscérales (Blouet 2013), comme par exemple celles renseignant sur le taux d'O<sub>2</sub> au niveau des sinus carotidiens (voir *Les systèmes de régulation de la respiration* – page 30) via le nerf glossopharygien (IX) (Lipski 1979). Il est également la cible des informations issues des récepteurs sensibles à l'étirement des bronches et bronchioles (réflexe d'Hering-Breuer) et véhiculées via le nerf vague (X; Kalia et Mesulam 1980), et reçoit des informations de différents capteurs laryngés et trachéaux impliqués dans le réflexe de toux (Jordan 1996). Enfin, ce noyau projette vers de nombreuses structures régulatrices (Blouet 2013), dont le préBötC (Zheng et al. 1998) et les motoneurones du nerf phrénique pour la partie respiratoire (de Castro et al. 1994).

### *Les régions respiratoires pontiques*

Les noyaux Kölliker-Fuse et parabrachial médian sont localisés dans la région pontique du tronc cérébral. Constituées de neurones impliqués dans transition inspiration-expiration (Bertrand et al. 1973), ces structures jouent également un rôle qui peut varier selon les espèces. Par exemple, ils sont indispensables chez le chat pour produire une activité respiratoire (Bianchi et al. 1995), et importants pour l'aversion gustative chez le rat (Di Lorenzo et al. 2009). Cette structure ne semble pas indispensable à la genèse du rythme, mais plutôt impliqué dans la modulation de la respiration vis-à-vis de modalités non respiratoires comme la pression sanguine ou la thermorégulation (pour revue, Dutschmann et Dick 2012) ou encore la locomotion (Giraudin et al. 2012). Néanmoins, l'ablation de cette région provoque temporairement une respiration dite apneustique, avec des phases inspiratoires plus longues et une quasi-absence d'expiration (Tang 1953).

Autre structure pontique, la région péririgéminale (ITR) possède des connexions avec les régions bulbaires et les noyaux moteurs du tronc cérébral (Holstege et Kuypers 1977). Son rôle n'est pas encore clairement défini, mais elle semble être impliquée dans les phénomènes d'apnée réflexe (Radulovacki et al. 2003), son dysfonctionnement pouvant être à l'origine des apnées du sommeil (Radulovacki et al. 2004).



### Figure 8: Le complexe preBötC : le générateur central de l'activité inspiratoire

(A) à gauche, représentation schématique des structures bulbo-pontiques. On notera la localisation du complexe preBötC (en orange) qui s'étend de la partie caudale du noyau rétro-facial (RFN) jusqu'à environ 200  $\mu\text{m}$  de l'obex. Les lignes verticales numérotées au dessus du schéma représentent les transections (espacées de 75  $\mu\text{m}$ ) réalisées dans le sens rostro-caudal.

à droite, graphique illustrant la fréquence respiratoire enregistrée au niveau du nerf phrénique (sur une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée *ex-vivo*) lors des expériences de sections du tronc cérébral. On notera que les sections réalisées au niveau du preBötC (sections oranges) entraînent une diminution puis un arrêt de l'activité inspiratoire.

(B) à gauche, illustration d'une tranche transversale de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contenant le complexe preBötC (en orange), ainsi que les motoneurons et les racines motrices du nerf hypoglosse (XII).

à droite, les enregistrements des nerfs XII droit et gauche montrent la présence d'une activité rythmique spontanée et synchrone bilatéralement (tracés du bas). Des enregistrements en patch-clamp (tracé du haut) ont permis de révéler la présence au sein du preBötC de neurones dont l'activité spontanée est en phase avec celle enregistrée au niveau des nerfs XII.

**7:** noyau moteur facial; **SO:** olive supérieure; **cNA:** noyau ambigu caudal; **RFN:** noyau rétro-facial; **LRN:** noyau réticulé latéral

Modifiée d'après Smith et al., 1991.

Enfin, le noyau adrénérge A5 est la dernière structure pontique impliquée dans l'activité respiratoire, mais également dans la fonction cardiovasculaire. En effet, son activation provoque des modifications du débit sanguin et de l'activité rénale (Maiores *et al.* 1999), mais surtout une inhibition de l'activité respiratoire, la stimulation électrique des noyaux A5 provoquant *ex vivo* chez le rat nouveau-né une diminution significative de la fréquence respiratoire (Errchidi *et al.* 1991).

#### *Le complexe pré-Bötzinger, structure centrale de l'activité respiratoire*

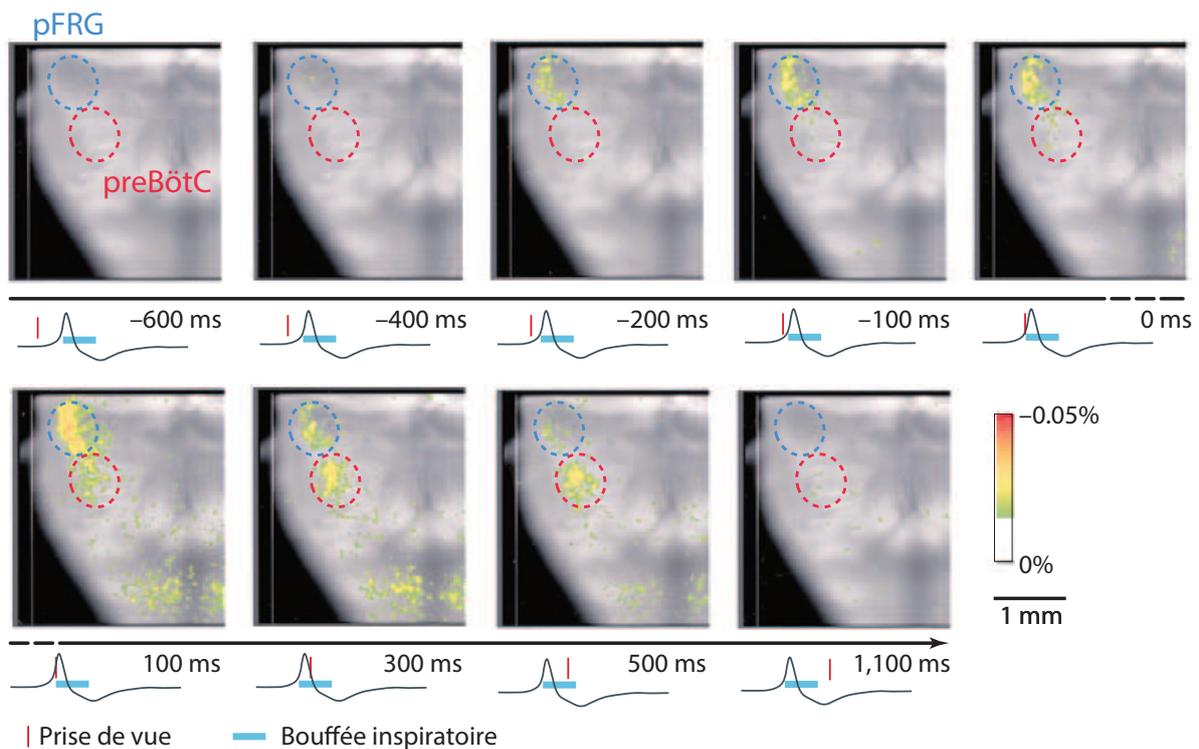
La découverte de cette structure bulbaire remonte aux années 90 avec le travail de Smith et collaborateurs (Smith *et al.* 1991). L'utilisation d'une préparation réduite de tronc cérébral/moelle épinière isolée *ex vivo* de rat nouveau-né, couplée à une approche électrophysiologique et lésionnelle, a permis de localiser une zone spontanément et rythmiquement active au niveau ventral du bulbe rachidien, considérée comme indispensable dans la genèse du rythme respiratoire (**Figure 9**). Ces expériences ont en effet montré qu'en l'absence du préBötC, plus aucune activité ne pouvait être générée *ex vivo* (Smith *et al.* 1991) et que la respiration était profondément perturbée *in vivo* (McKay *et al.* 2005). Cette zone importante a pu également être mise en évidence dans d'autres espèces comme le chat (Connelly *et al.* 1992), la souris (Ramirez *et al.* 1996) ou la chèvre (Wenninger *et al.* 2004), mais semblerait également exister chez l'Homme (Schwarzacher *et al.* 2011).

Différentes études ont montré qu'il existait deux types principaux de neurones au sein du préBötC: les neurones non-rythmiques (dits aussi "suiveurs"), qui ne possèdent pas d'activité oscillante intrinsèque, et les neurones de type pacemaker qui présentent spontanément une activité rythmique. Isolés pharmacologiquement (blocage de toute transmission synaptique) du reste du réseau (Johnson *et al.* 1994), ces neurones pacemakers continuent de produire des bouffées rythmiques de potentiels d'action, malgré un changement de rythme lié à une perte de synchronisation interneuronale (Koshiya et Smith 1999). Les neurones suiveurs, quant à eux, sont sous le contrôle de ces neurones pacemakers via une commande glutamatergique.

Deux populations de neurones pacemakers se distinguent au sein du préBötC. La première est constituée de neurones générant des activités courtes à haute fréquence, alors que la seconde présente plutôt une décharge longue durée et à basse fréquence (Thoby-Brisson et Ramirez 2001). Ces différences peuvent s'expliquer par la présence de diverses conductances

au sein de ces deux catégories de neurones, mais toutes impliquées dans la genèse de l'activité oscillante de ces neurones. Le premier type est sous la dépendance de conductances sodiques persistantes ( $I_{NaP}$ ) alors que le second dépend plutôt de conductances calciques ( $I_{Ca}$ ) et de courants cationiques non-spécifiques activés par le calcium ( $I_{CAN}$ ). À noter qu'il est nécessaire d'abolir l'activité des deux populations pour mettre l'activité respiratoire au silence, une seule des deux étant suffisante. D'un point de vue fonctionnel, une étude récente s'intéressant à la production de bouffées respiratoires de faible ou de forte amplitude (respectivement les "burstlets" et les "I-bursts") montre que l'application de cadmium dans l'environnement extracellulaire, connu pour bloquer les conductances calciques, supprime la genèse des "I-bursts" sans affecter celle des "burstlets" (Kam et al. 2013). Les auteurs proposent alors que la production du rythme et celle du patron respiratoire reposeraient sur deux mécanismes distincts, dépendantes de populations neuronales différentes dans le préBötC. Ainsi, les "burstlets" rythmiques (de faible amplitude) seraient liés à l'activité des neurones pacemakers  $I_{NaP}$ -dépendants du préBötC et joueraient le rôle d'horloge du rythme (fréquence respiratoire), là où les neurones pacemakers  $I_{CAN}$  et  $I_{Ca}$  dépendants seraient liés à la genèse du patron respiratoire (alternance inspiration et expiration entre autres). Cette dichotomie cellulaire permettrait alors de moduler indépendamment l'activité des neurones engagés dans la rythmogenèse respiratoire et celle des neurones impliqués dans la production du patron. Enfin, il est à noter que dans les deux populations, des conductances communes sont toutefois présentes, telles les conductances cationiques activées par l'hyperpolarisation ( $I_H$ ). Bien que non nécessaire à la genèse du rythme, cette conductance permet la modulation de la fréquence respiratoire (Thoby-Brisson et al. 2000).

Bien que la présence de neurones de type pacemaker soit une condition nécessaire pour que le rythme respiratoire puisse être généré au sein du préBötC, il semblerait qu'à la lumière d'une étude récente ce mécanisme ne soit pas suffisant. En effet, bien que la co-application de riluzole (agent pharmacologique bloquant les bouffées respiratoires dépendantes du courant  $I_{NaP}$ ) et d'acide flufénamique (bloquant les décharges dépendantes du courant  $I_{CAN}$ ) entraîne un arrêt du rythme respiratoire, ce dernier peut être rétabli par l'ajout de substance P (Del Negro et al. 2005). Ainsi, les auteurs de cette étude concluent que lors du blocage pharmacologique des conductances  $I_{NaP}$  et  $I_{CAN}$ , le rythme peut être maintenu au sein du préBötC par une augmentation de l'excitabilité. Ces données confirment ainsi que la



**Figure 10: Activation spatio-temporelle des neurones du pFRG et du preBötC au cours d'un épisode de respiration fictive**

Les images (réalisées à l'aide d'un indicateur sensible aux variations de voltage membranaire) ont été réalisées au niveau de la surface ventrale de la moitié droite d'un tronc cérébral isolé in vitro de rat nouveau-né. Chaque image correspond à un temps précis, avant, pendant et après une bouffée inspiratoire (représentée en bas de chaque image) enregistrée au niveau phrénique. On observe ainsi que les premiers neurones actifs sont localisés au niveau de la partie ventro-latérale du bulbe rachien, à la frontière entre le bulbe et le pont. Cette région correspond au groupe respiratoire parafacial (pFRG) dont l'activité dite pré-inspiratoire apparaît environ 200 ms avant la décharge du preBötC. Modifiée d'après Onimaru et Homma, 2003.

rythmogenèse respiratoire dépendrait à la fois des propriétés des neurones pacemakers (ces derniers permettant d'accroître l'excitabilité neuronale afin de promouvoir l'apparition d'un rythme) et des propriétés émergentes du réseau (balance synaptique entre systèmes de neurotransmission excitatrice et inhibitrice).

Différents systèmes de neurotransmissions coexistent dans le préBötC, présents dans le but de synchroniser l'ensemble des neurones pacemakers mais également d'entraîner les neurones suiveurs. En premier lieu, la transmission excitatrice glutamatergique joue un rôle primordial puisqu'en son absence, tous les neurones pacemakers sont désynchronisés et plus aucune activité rythmique respiratoire n'est correctement organisée (Wallen-Mackenzie et al. 2006). La transmission glutamatergique repose sur plusieurs types de récepteurs post-synaptiques. Il semble que les récepteurs de type NMDA ne soit pas nécessaires à la genèse du rythme (Greer et al. 1991) et à l'inverse, le blocage des récepteurs AMPA et Kainate entraîne un arrêt de l'activité respiratoire. Un système inhibiteur de neurotransmission GABAergique et glutamatergique est également présent au sein du préBötC. Bien que non indispensable à la genèse du rythme respiratoire, cette activité inhibitrice joue un rôle important pour déterminer la durée de l'activité inspiratoire (Feldman et al. 1992), la forme des bouffées respiratoires (en particulier pour l'activité inspiratoire croissante; (Haji et al. 1990, Schmid et al. 1991a, Schmid et al. 1991b), et enfin dans les interactions avec d'autres structures centrales comme le pFRG, générateur de l'activité expiratoire chez l'animal nouveau-né (Funke et al. 2008).

#### *Le groupe respiratoire parafacial, acteur de l'activité expiratoire*

Localisé ventralement au noyau moteur facial dans le tronc cérébral, le groupe respiratoire parafacial/noyau retro-trapézoïdale (pFRG/RTN) génère une activité rythmique en double bouffée précédant et suivant celle des neurones inspiratoires du préBötC (Onimaru et Homma 2003), cette étude le montrant grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents sensibles au voltage (**Figure 10**). De plus, une lésion de cette zone entraîne une réduction de la fréquence respiratoire et un changement du patron respiratoire. Déjà mentionnée dans certaines études menées sur des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolées de rats nouveau-nés (Onimaru et al. 1987), la bouffée précoce précédant l'inspiration est nommée pré-inspiratoire (pré-I), celle plus tardive générée dès la fin de l'inspiration étant considérée comme une bouffée expiratoire. La lésion bilatérale entraînant un arrêt définitif de l'activité expiratoire

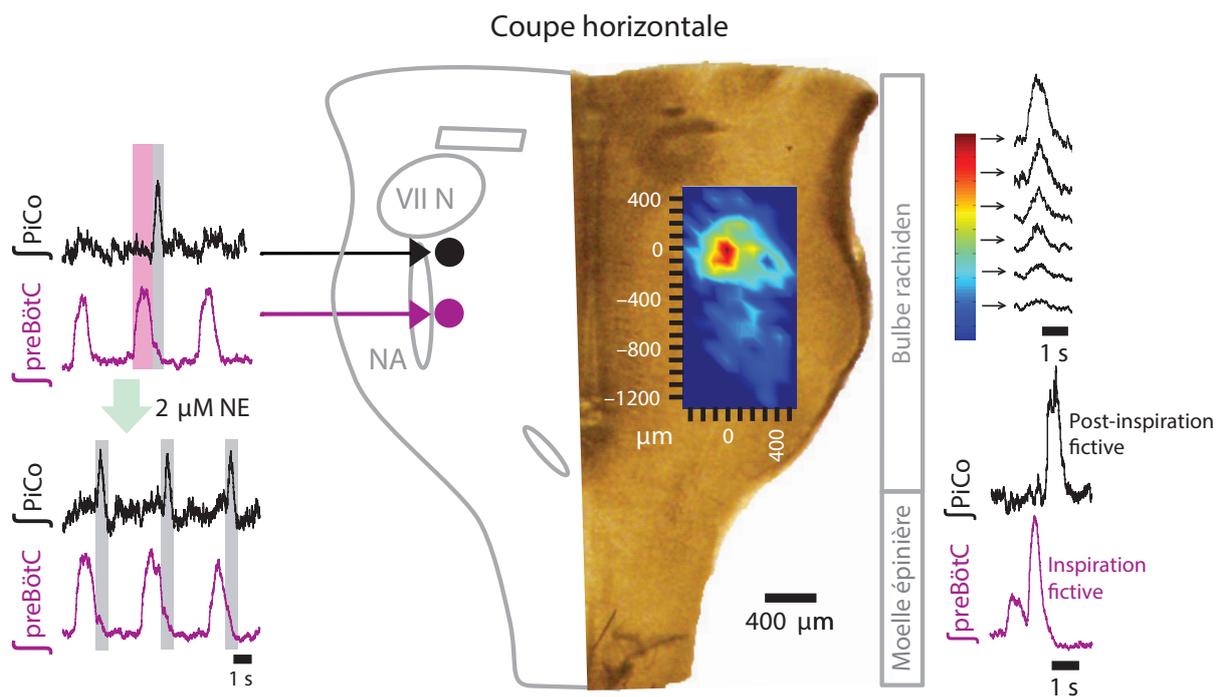
fictive (Janczewski et Feldman 2006, Giraudin et al. 2008), le pFRG/RTN est dès lors associé au centre de l'expiration active. Ainsi, l'activation optogénétique *in vivo* des cellules du pFRG/RTN exprimant la channelrhodopsine (canal ionique photosensible) déclenche chez des rats adultes des contractions des muscles abdominaux (muscles dits expiratoires) comparables à celles observés pendant l'expiration active (Pagliardini et al. 2011).

Il est à noter que ce réseau neuronal pFRG/RTN semble ne pas être indispensable pour la genèse d'une activité inspiratoire. En effet, la lésion bilatérale du pFRG/RTN n'entraîne soit qu'une augmentation (Ruangkittisakul et al. 2007, Giraudin et al. 2008) soit qu'une diminution (Onimaru et Homma 2008) du rythme respiratoire enregistré au niveau des racines cervicales donnant naissance aux nerfs phréniques (innervant le diaphragme). Ce complexe semble donc n'avoir qu'un rôle de régulateur du rythme respiratoire, même si en l'absence du préBötC, les neurones du pFRG/RTN continuent de présenter spontanément (à l'instar des cellules de type pacemaker) leurs décharges rythmiques caractéristiques en double bouffée pré-I et expiratoire (Mellen et al. 2003).

Enfin, le pFRG/RTN joue un rôle important dans la chémosensibilité centrale. Plusieurs expériences ont permis de démontrer cette sensibilité en modifiant les conditions environnementales. Ainsi, le RTN présente une augmentation d'activité en situation d'hypercapnie (Sato et al. 1992), ses neurones étant activés soit par une augmentation du taux de CO<sub>2</sub> du LCR (Mulkey et al. 2004), soit par la stimulation des chémorécepteurs périphériques (Takakura et al. 2006). De plus, une acidification localisée du RTN provoque également une augmentation du rythme respiratoire (Li et al. 1999). Il semblerait que la sensibilité aux variations du taux de CO<sub>2</sub> (et donc du pH du LCR) soit une propriété intrinsèque de ces neurones (Wang et al. 2013). Néanmoins, l'activité de cette structure en condition d'hypoxie est modulée par d'autres régions sensibles à l'oxygène, comme l'hypothalamus caudal ou la substance grise périaqueducal (Voituron et al. 2005).

#### *Le complexe post-inspiratoire*

Classiquement, le rythme respiratoire se décompose en 3 phases (Richter 1982) : une phase inspiratoire, une phase post-inspiratoire et enfin une phase expiratoire. Il est maintenant largement admis que le préBötC joue le rôle de générateur inspiratoire et le pFRG/RTN celui de générateur expiratoire. Mais qu'en est-il de la phase post-inspiratoire? Cette dernière constitue en effet un temps privilégié au cours duquel de nombreux comportements moteurs



**Figure 11: Activité et anatomie du complexe post-inspiratoire (PiCo)**

Le PiCo est situé dans le bulbe rachidien, rostralement au complexe preBötzinger (**preBötC**), dorsalement au noyau du nerf cranien facial VII, et est plus médian que le noyau ambigu (**NA**). Il possède une activité ayant toujours lieu après une inspiration. Cette activité peut être renforcée par l'ajout de noradrénaline (**NE**).

Modifiée d'après [Anderson et al., 2016](#).

(tels que la vocalisation, la déglutition ou encore la toux) se coordonnent avec la respiration. Une étude récente montre l'existence au sein du bulbe rachidien d'un réseau de neurones dont l'activité, lorsqu'elle est présente, suit systématiquement celle du préBötC (**Figure 11; (Anderson et al. 2016, Anderson et Ramirez 2017)**). Ce nouveau réseau neuronal, vraisemblablement cholinergique et glutamatergique, est localisé rostralement au préBötC et dorsalement au noyau ambigu, et est désormais identifié comme le complexe post-inspiratoire ou PiCo (*Postinspiratory Complex*). Dépendante du glutamate mais également de la noradrénaline, son activité se synchronise avec celle du préBötC en l'absence d'inhibition GABAergique. Les auteurs proposent que ces neurones PiCo possèderaient des propriétés rythmogènes dans la mesure où il est possible de conserver une activité rythmique de cette région dans différents types de tranches bulbaires ou de tronc cérébral, et que ces propriétés seraient nécessaires et suffisantes pour générer la phase post-inspiratoire dans les conditions expérimentales *in vivo* (Anderson et al. 2016, Anderson et Ramirez 2017)).

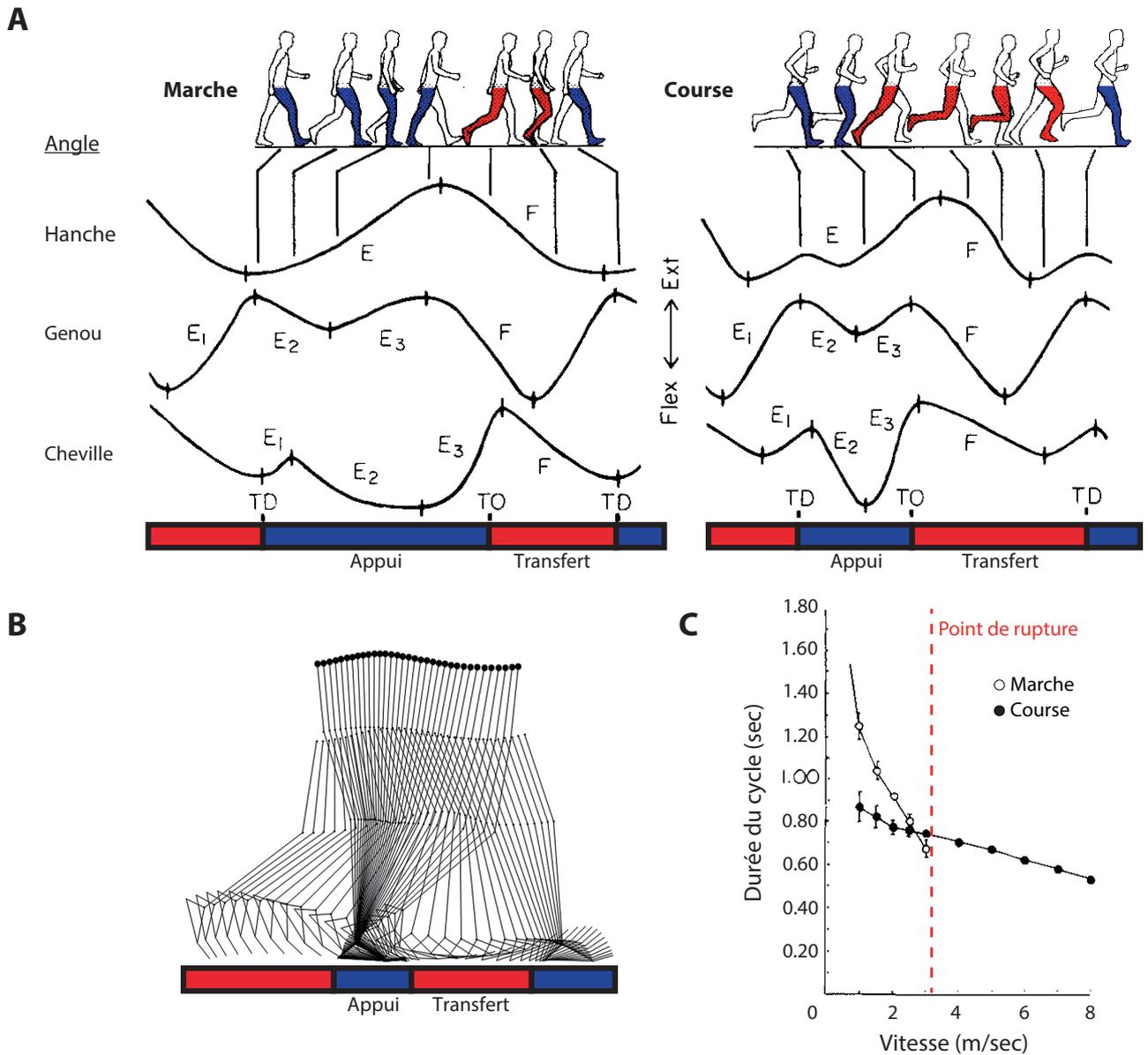
Au vu de la seule étude récente montrant son existence, et du scepticisme d'autres groupes de recherche qui ont montré que l'inhibition de la transmission adrénargique de cette zone *in vivo* n'abolit pas l'activité post-inspiratoire (Poon et Song 2017), on ne peut pas se prononcer clairement sur l'existence ou non du PiCo pour le moment. Néanmoins, la réalisation de lésions *in vivo* de cette zone pourrait permettre d'apporter de nouveaux arguments sur cette question.

## La locomotion

La locomotion est définie comme la capacité que possèdent certains organismes à se déplacer activement d'un endroit à un autre. Selon les espèces, le mode de locomotion peut fortement varier, couvrant par exemple la course, la nage, le saut et le vol. Dans tous les cas, la locomotion permet l'expression (ou l'exécution) de comportements fondamentaux tels que la recherche de nourriture, d'un habitat ou d'un partenaire, ou encore la fuite face à un prédateur. Pour leur permettre de se déplacer, chaque espèce dispose de structures anatomiques adaptées à son mode de locomotion, lui-même directement dépendant de son environnement. Ainsi, chez les vertébrés, un endosquelette sert de charpente solide à l'organisme, les muscles squelettiques permettant d'actionner les articulations, et le système nerveux central jouant le rôle de maître d'orchestre.

### Du milieu aquatique à la conquête d'autres espaces

Dès les premiers stades de l'évolution, les êtres unicellulaires aquatiques ont développé des organites tels que les flagelles permettant la motricité. La complexification des organismes et donc des modes de locomotion aquatique a permis *in fine* le développement de nageoires, un premier pas vers la conquête du milieu aérien. Développement de membres adaptés à la locomotion terrestre dans le but d'échapper aux prédateurs, ou simple volonté d'accéder à de nouvelles ressources alimentaires ? Rien ne permet de le savoir avec certitude. Ce qui est par contre certain, ce sont les modifications physiologiques qui furent nécessaires à ce passage. Outre l'apparition des poumons permettant de capter l'oxygène de l'air, les organismes ont également dû adapter leur structure afin de supporter la gravité, peu ressentie en milieu aquatique. Les nageoires ont progressivement été soutenues par des structures osseuses, puis cette charpente a vu l'apparition d'articulations actionnées par des muscles, permettant une plus grande liberté de mouvement (en particulier la flexion et l'extension). Toutes ces structures se sont ensuite renforcées de manière à pouvoir supporter le poids de l'animal sur terre. Les premiers animaux terrestres se déplaçaient surtout par reptation. Mais très rapidement, les "nageoires modifiées" se sont rapprochées de la ligne médiane, de manière à pouvoir soulever le corps du sol. Puis l'exosquelette dermique épais a laissé place à un endosquelette, permettant plus de souplesse et de vitesse dans les mouvements. Afin de protéger les organes internes, la cage thoracique s'est épaissie, évitant à l'animal d'écraser ses



### Figure 12: Les phases du cycle locomoteur chez l'Homme

**(A)** Description schématique du déplacement angulaire de la cheville, du genou et de la hanche pendant la marche et la course. La position du corps correspondante est imagée en haut de chaque condition. Les mouvements sont décrits pour la jambe droite, en bleu les phases d'appui et en rouge les phases de transfert. **E1** à **E3** (extension) et **F** (flexion) correspondent aux phases décrites dans le texte. **TD** correspond à la pose du pied, et **TO** au moment où le pied quitte le sol.

**(B)** Représentation cinématique des variations angulaires au cours de la marche. De nouveau, les phases d'appui (bleu) et de transfert (rouge) sont représentées.

**(C)** Durée du cycle locomoteur en fonction de la vitesse de déplacement pendant la marche et la course, le point de rupture (vitesse à laquelle l'allure passe invariablement à la course) étant représenté par le trait pointillé.

**(A)** et **(C)** modifiées d'après Nilsson *et al.*, 1985.

poumons sous son propre poids. Toutes les structures articulaires ont fortement évolué, toujours dans le but de procurer une plus grande liberté de mouvement à l'animal. C'est ainsi que la marche quadrupède a fait son apparition dans le règne animal.

Par la suite, certains animaux ont modifié leur manière de se déplacer en passant notamment à la bipédie afin d'adapter et d'améliorer leurs comportements au sein de leur biotope (par exemple voir plus loin, faciliter le repérage des prédateurs, des proies, de la nourriture, mais aussi faciliter l'orientation). Cette position a ainsi libéré les membres antérieurs, permettant de les utiliser à des usages autres que la marche. Pour permettre cette bipédie, les membres postérieurs et les muscles du dos se sont renforcés. Le crâne ainsi "posé" sur la colonne vertébrale se développe alors, gagnant en volume et permettant le développement du cerveau, notamment au niveau des régions frontales, facteur déterminant dans l'évolution des primates et particulièrement de l'Homme.

### Le cycle locomoteur

L'étude de la locomotion chez de nombreux modèles animaux a montré que les principales caractéristiques du cycle locomoteur sont communes à l'ensemble des espèces. La locomotion est caractérisée par une succession de cycles de flexion et d'extension des membres permettant une alternance entre les phases de transfert et d'appui, assurant la propulsion de l'animal, qu'il soit quadrupède ou bipède (Grillner *et al.* 1979, Nilsson *et al.* 1985, Rossignol *et al.* 2004). En observant le mouvement d'une seule jambe, il est possible de subdiviser la locomotion pendant la marche en plusieurs phases. La phase de transfert ("*swing phase*") débute lorsque le pied quitte le sol et se termine lors de la reprise de l'appui (**Figure 12A**). Cette phase est subdivisée en deux parties: F (flexion) et E1 (extension 1). La phase F est caractérisée par une flexion de toutes les articulations, permettant de relever le pied, suivie de l'extension du genou et de la cheville jusqu'au contact du pied avec le sol, pendant la phase E1. Pendant la phase d'appui ("*stance phase*"), le pied reste posé au sol. Cette phase est également divisée en deux parties: E2 et E3 (extension 2 et 3). Pendant la phase E2, le poids du corps est supporté par la jambe, puis une extension rapide de toutes les articulations pendant la phase E3 permet la propulsion du corps vers l'avant.

Pour se déplacer, un animal utilise ses 2 ou 4 membres, nécessitant une coordination étroite entre ces derniers. L'étude de la séquence des différents temps d'appui sur le sol de

chacun de ces membres permet de définir l'allure locomotrice (Abourachid 2003). La marche est caractérisée par l'alternance stricte des membres d'une même ceinture, un déphasage de 25% du cycle étant observé entre les membres d'une diagonale donnée chez le quadrupède. Lors du trot, ce déphasage disparaît. Au cours du galop, on observe un mouvement des membres postérieurs puis des membres antérieurs. Concernant la course des bipèdes, outre la vitesse d'exécution, la différence réside dans l'absence de la phase de double appui (période où les deux pieds sont au sol). Enfin, il faut savoir que la vitesse d'exécution du mouvement peut varier sans pour autant observer un changement d'allure, mais que des "points de rupture" existent, c'est-à-dire des vitesses limites pour lesquelles l'allure change invariablement (**Figure 12C**(Goslow et al. 1973)). Des expériences ont montré chez le cheval que les points de ruptures auraient surtout pour rôle la préservation de la mécanique articulaire, l'augmentation de la charge des animaux réduisant la vitesse de survenue de ces points (Farley et Taylor 1991).

## Structure du système locomoteur

### *Le squelette*

Composé de 206 os en moyenne chez l'Homme, le squelette est d'une importance capitale pour l'organisme. En effet, ses rôles sont multiples: c'est la charpente du corps sur laquelle viennent se fixer les autres éléments (tendons des muscles par exemple), il permet une protection de certains organes (système nerveux central), ou encore il assure la fabrication des cellules sanguines via la moelle osseuse. Au cours de la locomotion, le squelette permet la résistance des membres aux forces mécaniques exercées, mais aussi de guider le mouvement grâce à la présence d'articulations.

### *Les articulations*

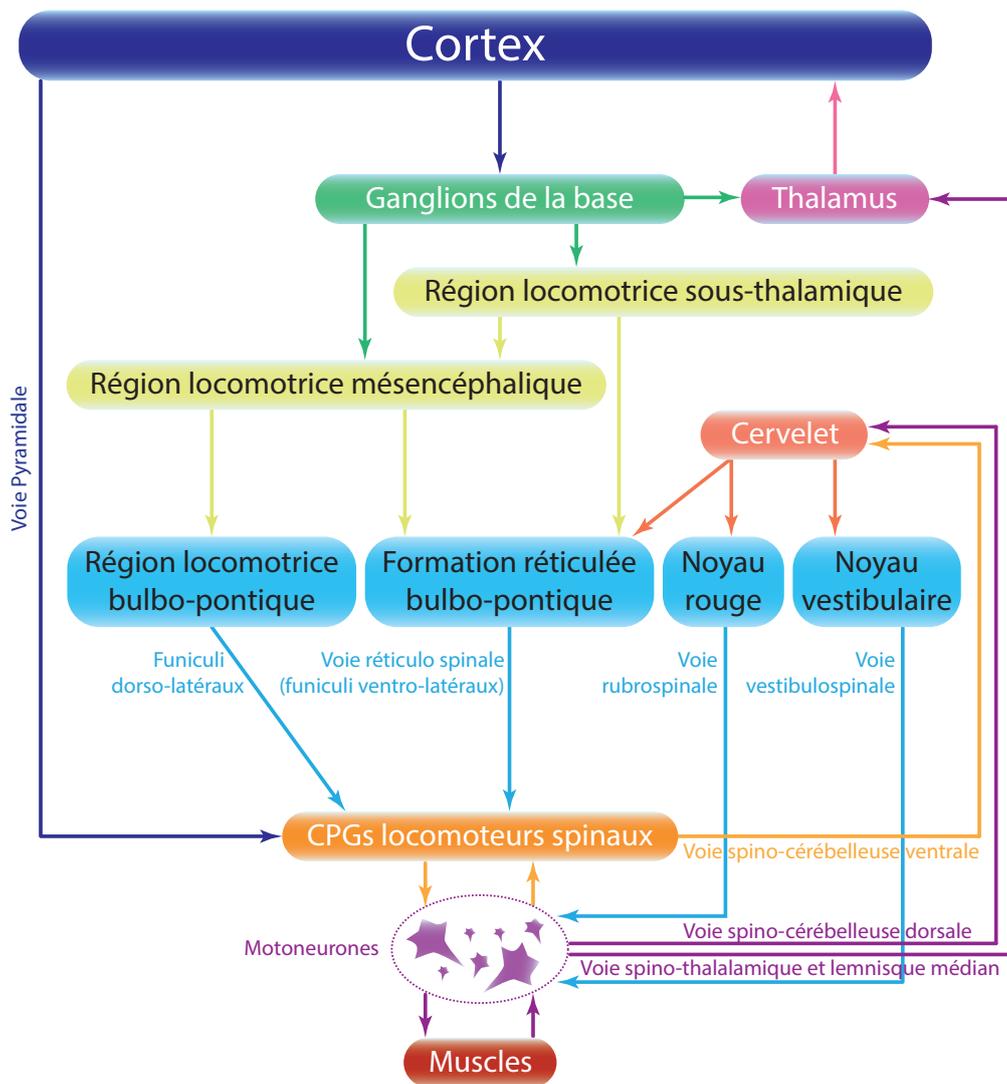
Une articulation est une zone de jonction entre deux structures osseuses. Elles peuvent être fixes, comme les sutures entre les différents os du crâne (articulation dite fibreuse), semi-mobiles comme les articulations entre les vertèbres (la grande mobilité du dos étant donnée par le grand nombre de ces articulations faiblement mobiles) ou les côtes (présence de cartilage permettant l'élasticité de la cage thoracique), et enfin les articulations mobiles représentées par le type synovial.

Malgré le grand nombre de mouvements différents produits par ces articulations (1 à 3 degrés de liberté), ces dernières sont toujours basées sur la même organisation. L'écartement des pièces osseuses est maintenu solidement par les ligaments (assemblage de collagène). À l'extrémité des os impliqués dans l'articulation, le cartilage hyalin permet d'éviter l'usure des pièces osseuses liée aux frottements. Afin de permettre le mouvement, ces articulations sont actionnées par des muscles reliés aux différentes pièces osseuses par des tendons constitués tout comme les ligaments de collagène.

### *Les muscles*

Les muscles permettent le mouvement, que ce soit pour le maintien de la posture, la ventilation pulmonaire, la circulation sanguine, la digestion ou encore la locomotion. Constitués de cellules contractiles appelées myocytes (ou fibres musculaires) dont la contraction provoque un raccourcissement du tissu, 3 types de tissu musculaire coexistent : le muscle cardiaque, le muscle lisse (au nombre de 68) retrouvé principalement au niveau viscérale et dont le contrôle est sous la dépendance du système nerveux végétatif, et enfin le muscle squelettique (au nombre de 570) responsable des mouvements du squelette et sous le contrôle du système nerveux somatique. Succinctement, les muscles striés squelettiques sont composés de différents types de fibres qui, compte tenu de leur répartition au sein d'un muscle donné, lui confèrent des propriétés contractiles et métaboliques particulières (Pette et Staron 2000):

- Les fibres S (*slow*) ou de type I, recrutées dès le début du mouvement et résistantes à la fatigue (compte tenu de leur métabolisme aérobie) ;
- Les fibres FR (*fast resistant*) et FF (*fast fatigable*) ou de type II (respectivement IIa et IIb), recrutées plus tardivement et développant une force de contraction plus grande que celle des fibres S, mais présentant une résistance à la fatigue beaucoup moins performantes (en raison de leur métabolisme anaérobie).
- Les fibres SF (*super fast*, ou de type IIx), retrouvées chez le guépard ou les athlètes de haut niveau (sprinteurs, haltérophiles...; Trappe et al. 2015), sont extrêmement puissantes et rapides, mais se fatiguent tout aussi rapidement. À noter qu'une personne restant alitée trop longtemps (paraplégie par exemple) voit son pourcentage de fibres IIx fortement augmenter en raison de l'absence de tonus musculaire (non



**Figure 13: Structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la locomotion**

nécessité de fibres résistantes à la fatigue) et de la modification de l'innervation musculaire (Malisoux et al. 2007).

Chaque muscle est un mélange de plusieurs types de fibres contractiles. Ainsi, plus un muscle est composé de fibres S et plus il sera endurant (muscles posturaux du dos par exemple), plus il est composé de fibres de type FF/FR/SF et plus il sera puissant (tel le biceps). Enfin, les muscles striés squelettiques possèdent des propriocepteurs capables de renseigner le système nerveux sur l'amplitude et la vitesse d'étirement musculaire (fuseau neuromusculaire, fibres Ia et II) ou sur l'état de contraction du muscle (organe tendineux de Golgi, fibres Ib).

#### *Structures nerveuses impliquées dans la locomotion*

Comme déjà évoqué, les mouvements locomoteurs sont la plupart du temps volontaires. Ainsi, le cortex moteur primaire est le principal générateur de la commande nerveuse envoyée vers la moelle épinière (**Figure 13**). Les axones des neurones du cortex moteur primaire cheminent ensuite dans la capsule interne, puis dans le tronc cérébral. Une majeure partie des fibres (80-90 %) croise le plan médian (décussation pyramidale) et projette sur les motoneurones effecteurs, directement pour les noyaux moteurs crâniens (faisceau cortico-nucléaire), ou en formant le faisceau cortico-spinal latéral pour les noyaux moteurs spinaux. La partie qui ne croise pas dans le tronc cérébral descend dans la moelle épinière via le faisceau cortico-spinal ventral, projette de façon ipsilatérale puis croise au niveau du segment précédant les motoneurones cibles.

Le système moteur extrapyramidal, impliqué dans la motricité dite involontaire (posture, locomotion), est plus complexe en raison de la présence de nombreux relais. Le premier est le passage par les ganglions de la base (ou noyaux gris centraux) dont le rôle dans la fonction locomotrice est particulièrement important. Ainsi, le dysfonctionnement d'un de ses éléments constitutifs tels que la substance noire compacte est responsable des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (Forno 1982). Suite aux ganglions de la base, l'information descendante relaie au niveau des régions locomotrices sous-thalamique (*Subthalamic locomotor region*, SLR) et mésencéphalique (*Mesencephalic locomotor region*, MLR) impliquées dans l'initiation de la locomotion. Ces régions projettent alors sur la formation réticulée bulbo-pontique engagée dans le contrôle de la locomotion qui à son tour projette sur la moelle épinière via les voies réticulo-spinales. La voie extrapyramidale comprend

également le faisceau rubro-spinal en provenance du noyau rouge. Ce dernier reçoit des afférences cérébelleuses et est impliqué dans la coordination des muscles distaux des membres supérieurs et inférieurs. Le faisceau vestibulo-spinal, issu des noyaux vestibulaires, est quant à lui impliqué dans le contrôle de l'équilibre et le faisceau olivo-cérébelleux dans la détection des erreurs entre mouvement programmé et exécuté. Enfin, le système extrapyramidal comprend également le faisceau tecto-spinal ou colliculo-spinal jouant un rôle dans les mouvements de la tête et du cou.

À noter que le cortex n'est pas indispensable à l'exécution de mouvements locomoteurs, un chat décortiqué étant capable d'avoir une locomotion adaptée à son environnement (Miller et al. 1975, Bjursten et al. 1976, MacKay-Lyons 2002). Lors d'une transection réalisée en avant des colliculi supérieurs, préservant ainsi la SLR, l'animal n'adapte plus ses mouvements à l'environnement, en plus d'avoir des séquences locomotrices spontanées stéréotypées (Whelan 1996). Une section plus caudale, supprimant cette SLR provoque l'arrêt des épisodes de locomotion spontanée. En revanche, la stimulation de la MLR permet de retrouver les différentes allures locomotrices (marche, trot, galop) en fonction de l'intensité de la stimulation (Shik et al. 1966).

Les commandes descendantes issues des systèmes pyramidaux et extrapyramidaux aboutissent à l'activation des CPGs locomoteurs localisés au niveau spinal et dont le rôle est de produire une activité complexe alternée et rythmique des différentes populations motoneuronales (la description et l'organisation de ces CPGs feront l'objet d'une partie dédiée; voir *Les centres générateurs du rythme et du patron locomoteur* – page 48).

#### *Contrôle sensoriel de la locomotion*

Effectuer un mouvement adapté nécessite une adaptation aux conditions environnementales avant (adaptation de l'allongement du bras par rapport à la distance d'un objet à saisir) et pendant (objet plus lourd qu'initialement prévu) son exécution. Ceci est possible par la mise en jeu des retours sensoriels et de mécanismes neuronaux spécifiques.

L'adaptation du mouvement avant son exécution (le *feed-forward*) met en jeu de nombreux sens de l'organisme, mais principalement la vue, afin de déterminer la force, la vitesse et l'amplitude d'un mouvement. Par exemple, la vue d'un obstacle va permettre d'anticiper et de lever le pied plus haut afin d'éviter ce dernier. Sans cette mise en relation des

sens et de la locomotion, il faudrait attendre de buter dans l'obstacle pour provoquer une modification du programme moteur.

Lors de la réalisation du mouvement, les informations issues de diverses modalités sensorielles (cutanées, articulaires, musculaires, visuelles, vestibulaires) permettent de corriger à courte latence le patron mis en jeu. C'est la notion de *feed-back*. Ainsi lors de la marche, les mécanorécepteurs cutanés (tels que les corpuscules de Ruffini pour la pression/étirement, les disques de Merkel pour la sensibilité tactile fine, ou encore les corpuscules de Meissner pour le toucher grossier) sont impliqués dans la détection de la pose du pied au sol et renseignent sur la transition de phase lors du cycle locomoteur (Dietz 2002). En effet, la suppression des retours tactiles chez le chat entraîne une incapacité à marcher sur les barreaux d'une échelle (Bouyer et Rossignol 2003a, Bouyer et Rossignol 2003b). Les fuseaux neuromusculaires, les organes tendineux de Golgi et les mécanorécepteurs articulaires génèrent également des informations sensorielles extrêmement précieuses permettant de rendre compte de la bonne réalisation du ou des mouvements. Ils renseignent aussi sur la position des membres au travers des angles articulaires, mais aussi sur l'état de tension (force produite), d'étirement et de contraction musculaire. En l'absence de retour proprioceptifs, l'ajustement du mouvement devient impossible, comme chez les souris KO *erg3*, dont les mouvements de marche deviennent imprécis à cause d'un défaut de coordination dans l'activation des muscles entre les différentes articulations, mais également entre les muscles antagonistes d'une même articulation (Akay et al. 2014).

En plus de ces mécanismes basés sur les retours sensoriels, nous allons trouver des boucles de régulation plus larges faisant intervenir des voies de communication ascendantes ainsi que des structures supraspinales, tels que le cervelet. Ce dernier reçoit les informations sur la réalisation effective du mouvement, grâce aux informations sensorielles, via le faisceau spinocérébelleux dorsal (FSCD; Arshavsky et al. 1972). Le cervelet reçoit également des informations sur la commande motrice générée au niveau des CPGs spinaux via le faisceau spinocérébelleux ventral (FSCV; Lundberg 1971). Grâce à ces informations, le cervelet exerce un rôle de "contrôle qualité" en comparant la commande motrice et le mouvement réellement en cours, et le réajuste au besoin en agissant sur les motoneurones et interneurones de la moelle épinière via les voies descendantes vestibulospinale, rubrospinale et réticulospinale.

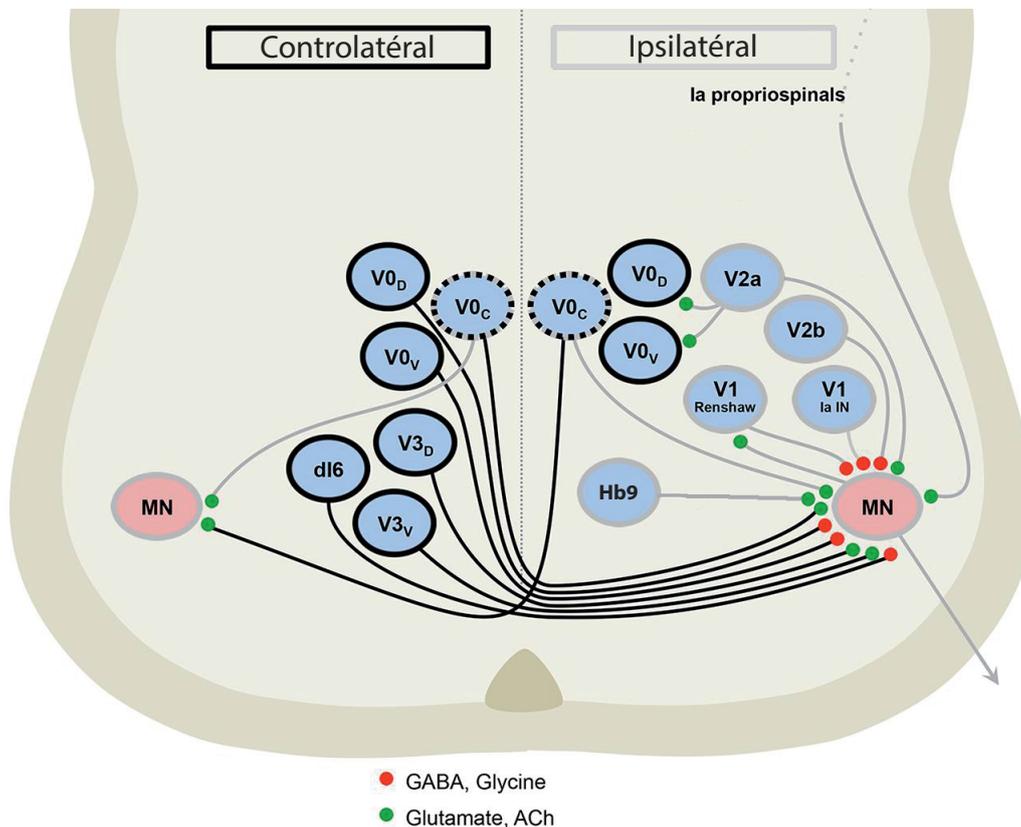
Une perturbation de cette boucle (lésion cérébelleuse par exemple) induit des mouvements stéréotypés (dépourvus d'adaptation) en plus de problèmes de coordination (ataxie).

### Les centres générateurs du rythme et du patron locomoteur

La structure et l'organisation des neurones composant les CPG locomoteurs spinaux ont d'abord été étudié dans des modèles plus simples de vertébrés tels que la lamproie ou le têtard (Roberts 2000, Grillner 2003). Ces modèles ont révélé la présence d'hémigénérateurs droits et gauches distribués le long de la moelle épinière. Toutefois, cette organisation ne s'applique qu'aux animaux se propulsant grâce à une nage ondulatoire et ne peut s'appliquer à une locomotion appendiculaire. Mais de nombreuses avancées sur la connaissance de l'organisation des CPGs spinaux chez le mammifère ont pu être réalisées grâce à la combinaison des techniques d'électrophysiologie de neuroanatomie et de génétique (cibler/identifier/mettre au silence des populations neuronales ciblées) permettant de manipuler l'activité de ces ensembles neuronaux afin de déterminer leur implication et leurs rôles au sein des CPGs locomoteurs (Brownstone et Wilson 2008, Jankowska 2008, Goulding 2009, Kiehn 2011). Chez le mammifère, il existe 2 CPGs locomoteurs spinaux: un au niveau cervical pour les mouvements des bras ou des pattes antérieures (Ballion et al. 2001), et l'autre au niveau lombaire pour le mouvement des jambes ou des pattes postérieures (Cazalets et al. 1995, Kjaerulff et Kiehn 1996), ces deux CPGs étant interconnectés. Ces interconnexions permettent la synchronisation antéro-postérieure du mouvement et font intervenir des voies directes et indirectes, l'inhibition de la transmission synaptique entre les deux générateurs n'abolissant pas complètement cette coordination. De plus, une partie de ces connexions semble décrosser, une hémisection au niveau thoracique réduisant seulement cette coordination (Juvin et al. 2007, Juvin et al. 2012). Le rôle des CPGs locomoteurs spinaux est de produire et de coordonner l'activité musculaire au sein d'un même membre (alternance de type fléchisseur/extenseur) mais aussi entre membres controlatéraux (alternance gauche/droite, alternance antéro-postérieure).

#### *Les circuits de l'alternance bilatérale*

Afin de produire un mouvement alterné et coordonné entre les deux côtés du corps, la coordination bilatérale met en jeu principalement des neurones commissuraux, neurones dont les axones croisent au niveau de la ligne médiane de la moelle épinière. À noter que pour la plupart des animaux quadrupèdes ou bipèdes, l'augmentation de la vitesse de déplacement



**Figure 14: Représentation schématique de l'organisation des populations neuronales impliquées dans la genèse du rythme et du patron locomoteur**

Les populations neuronales **V0** sont impliquées principalement dans l'alternance bilatérale via des projections controlatérales. Les populations **V1** et **V2b**, à projection ipsilatérale, sont impliquées dans l'alternance fléchisseur/extenseur par une action inhibitrice sur les motoneurones. Les populations **V3** ont aussi un rôle dans l'alternance gauche/droite de par leurs projections controlatérales. Les populations **V2a** sont elles impliquées dans l'alternance bilatérale mais également dans la genèse du rythme, leur ablation perturbant ces deux composantes. Enfin, le rôle des neurones **dl6** (controlatéraux) et **Hb9** (ipsilatéraux) n'est pas encore clairement établi.

Modifiée d'après [Lu et al., 2015](#).

va être liée à un changement dans la vitesse d'alternance entre les membres situés des deux côtés du corps. Les neurones impliqués dans l'alternance gauche/droite sont donc également impliqués dans le contrôle de l'allure. Des expériences "d'ablation" de certaines populations de neurones (mise au silence du promoteur génétique de la population cible) ont permis de déterminer leur rôle dans la locomotion.

Exprimant le facteur de transcription DBX1 (Pierani *et al.* 2001, Lanuza *et al.* 2004), les neurones V0 constituent une grande portion des neurones commissuraux de la corne ventrale de la moelle épinière (**Figure 14**). L'ablation totale de cette population entraîne une perte de l'alternance bilatérale sans toutefois affecter l'alternance de type fléchisseur/extenseur ou empêcher la genèse d'une activité locomotrice (Lanuza *et al.* 2004). Cette population est subdivisée en deux catégories: les V0<sub>D</sub> (dorsaux) inhibiteurs, et les V0<sub>V</sub> (ventraux) excitateurs, ces neurones projetant vers le côté controlatéral. D'autres expériences d'ablation sélective ont permis de montrer que les V0<sub>D</sub> sont impliqués dans l'alternance gauche/droite des déplacements lents (faible fréquence locomotrice), alors que les V0<sub>V</sub> sont plutôt impliqués dans les déplacements plus rapides (fréquence locomotrice importante) (Talpalar *et al.* 2013). Bien que non indispensables à la genèse de l'activité locomotrice, ils sont essentiels à l'alternance bilatérale des membres.

De type excitateur, la population de neurones commissuraux V3 exprime le facteur de transcription SIM1 et projette à la fois sur les motoneurones et sur les interneurones controlatéraux (Zhang *et al.* 2008b). Rythmiquement actifs pendant la locomotion (Borowska *et al.* 2013), leur ablation entraîne une locomotion plus variable que ce soit en terme de période ou d'amplitude des bouffées d'activité, mais sans suppression de l'alternance bilatérale.

Enfin, les neurones spinaux V2a exprimant le facteur de transcription CHX10 sont impliqués à la fois dans l'alternance gauche/droite et dans la genèse du rythme locomoteur (Jessell 2000). Ces neurones, projetant de façon ipsilatérale, sont de type excitateur et leur absence entraîne une modification du patron locomoteur uniquement pour des fréquences locomotrices élevées durant lesquelles l'alternance bilatérale disparaît (Crone *et al.* 2008). Il est à noter que dans les conditions expérimentales *in vivo*, l'absence des neurones V2a perturbe fortement la vitesse de déplacement à laquelle intervient la transition entre les différents modes de locomotion (marche, course, bond...) (Crone *et al.* 2009). De plus, lors

d'un rythme locomoteur soutenu, les neurones V2a activent les neurones V0v (Shevtsova et al. 2015) et se trouvent donc indirectement impliqués dans l'alternance bilatérale. Une étude récente a montré que certains neurones excitateurs V2a projetant ipsilatéralement pouvaient aussi exprimer le facteur de transcription SHOX2 (Dougherty et al. 2013). En conséquence, 3 classes de neurones excitateurs ipsilatéraux ont pu être identifiées: les V2a-SHOX2, les V2a non SHOX2 et les SHOX2 non-V2a. Lors de la mise au silence de tous les neurones SHOX2 par des techniques optogénétiques (expression d'un canal chlorure activé par la lumière dans les neurones SHOX2), le rythme locomoteur se trouve fortement perturbé sans aucun changement des phases locomotrices. Toutefois, la mise au silence des seuls V2a-SHOX2 affecte l'amplitude des bouffées d'activité sans modifier le rythme locomoteur. Il semble donc que les SHOX2 non-V2a joueraient un rôle dans la genèse et l'organisation du rythme locomoteur.

#### *Les circuits de l'alternance de type fléchisseur/extenseur*

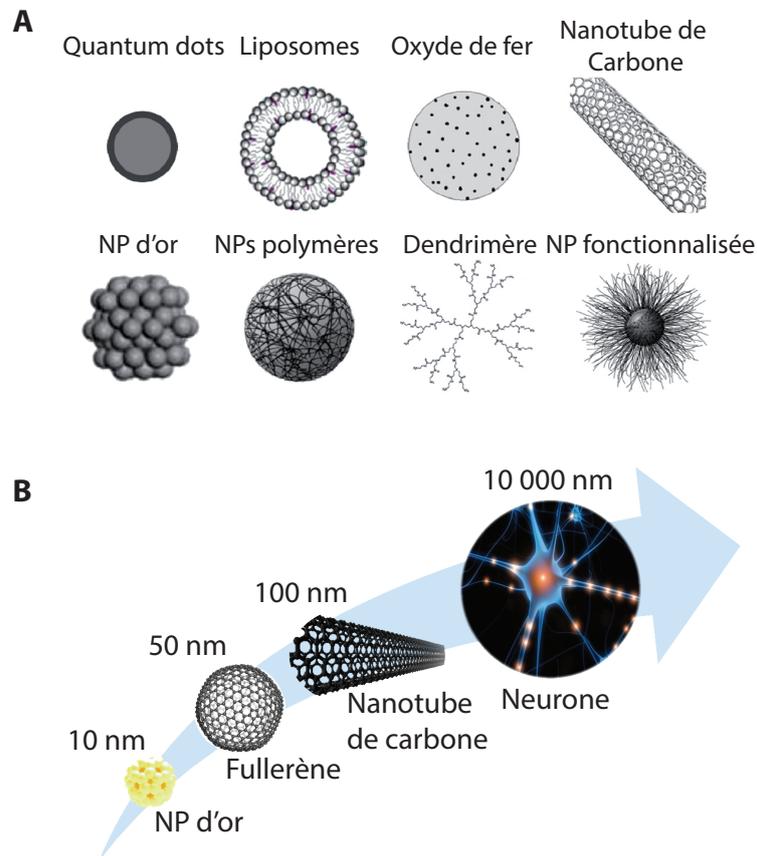
Lors de la marche, il est important que les muscles fléchisseurs se relâchent lors de la contraction des muscles extenseurs, et vice-versa. Ce mécanisme implique à la fois des circuits réflexes et les CPGs locomoteurs, et est appelé inhibition réciproque. Mettant en jeu des collatérales d'axones et des interneurons inhibiteurs, cette dernière permet la mise au silence des motoneurons agonistes (et synergistes) lors de l'activation des motoneurons antagonistes (et inversement) (Hultborn 1976).

Deux populations neuronales sont impliquées dans ce mécanisme: les neurones V1 exprimant le facteur de transcription EN1 (Moran-Rivard et al. 2001) et les neurones V2b exprimant le facteur GATA2 (Zhou et al. 2000). Ces interneurons spinaux projettent de façon ipsilatérale et présentent un phénotype inhibiteur. Si la mise au silence d'une de ces populations n'entraîne que peu d'effet sur l'activité locomotrice (légère diminution de la fréquence locomotrice en l'absence des V1) (Gosgnach et al. 2006, Zhang et al. 2014a), l'inhibition des deux populations induit une synchronisation des activités de type fléchisseur/extenseur (Zhang et al. 2014a). Via l'ablation génétique sélective de l'une des populations, une étude récente montre que les neurones V1 seraient plutôt impliqués dans l'inhibition des motoneurons des muscles de type fléchisseur, les V2b dans celle des muscles de type extenseur (Britz et al. 2015).

### *Autres populations neuronales locomotrices*

D'autres populations d'interneurones spinaux présentent des activités en phase avec l'activité locomotrice. Ainsi, les neurones exprimant le facteur de transcription HB9, de type excitateur et à projection ipsilatérale, constituent un petit groupe de neurones rythmiquement actifs pendant la locomotion (Hinckley *et al.* 2005, Wilson *et al.* 2005, Ziskind-Conhaim et Hinckley 2008). Isolés pharmacologiquement du reste du réseau (application de TTX), ce type cellulaire peut présenter des oscillations rythmiques de leur potentiel de membrane sous certaines conditions expérimentales (notamment en présence d'un cocktail pharmacologique NMDA/5-HT). Compte tenu de leurs propriétés intrinsèques particulières (présence de conductances impliquées dans le courant  $I_{NaP}$ ), ces neurones HB9 pourraient jouer le rôle de pacemakers locomoteurs. Toutefois, le faible nombre de ce type cellulaire présent au sein de la moelle épinière (environ 40 par segment spinal chez la souris) et le fait qu'ils soient majoritairement actifs après les bouffées d'activité motoneuronale (Kwan *et al.* 2009), semblent indiquer qu'ils ne puissent être responsables à eux seuls de la genèse du rythme locomoteur.

Enfin, la population de neurones de type inhibiteur dl6 qui exprime le facteur de transcription DMRT3 et qui projette à la fois ipsi- et controlatéralement, est également active pendant la locomotion (Dyck *et al.* 2012). Si leur rôle n'est pas encore clairement établi, les neurones dl6 pourraient être engagés dans la mise en place des allures locomotrices dans la mesure où l'ablation de cette population neuronale est suivie d'une diminution de la vitesse maximale produite par les souris au cours d'épisode de locomotion.



**Figure 15: Les nanoparticules: une grande variété de formes et de tailles**

**(A)** Représentation schématique de diverses formes de NPs. Certaines possèdent des formes relativement simples comme une sphère (quantum dots, liposomes, oxyde de fer) ou un tube (nanotube de carbone), alors que d'autres ont des formes plus complexes, souvent assemblage de plusieurs structures plus simples (NP d'or, polymères, dendrimère et NP fonctionnalisée).

Modifiée d'après [Re et al., 2012](#).

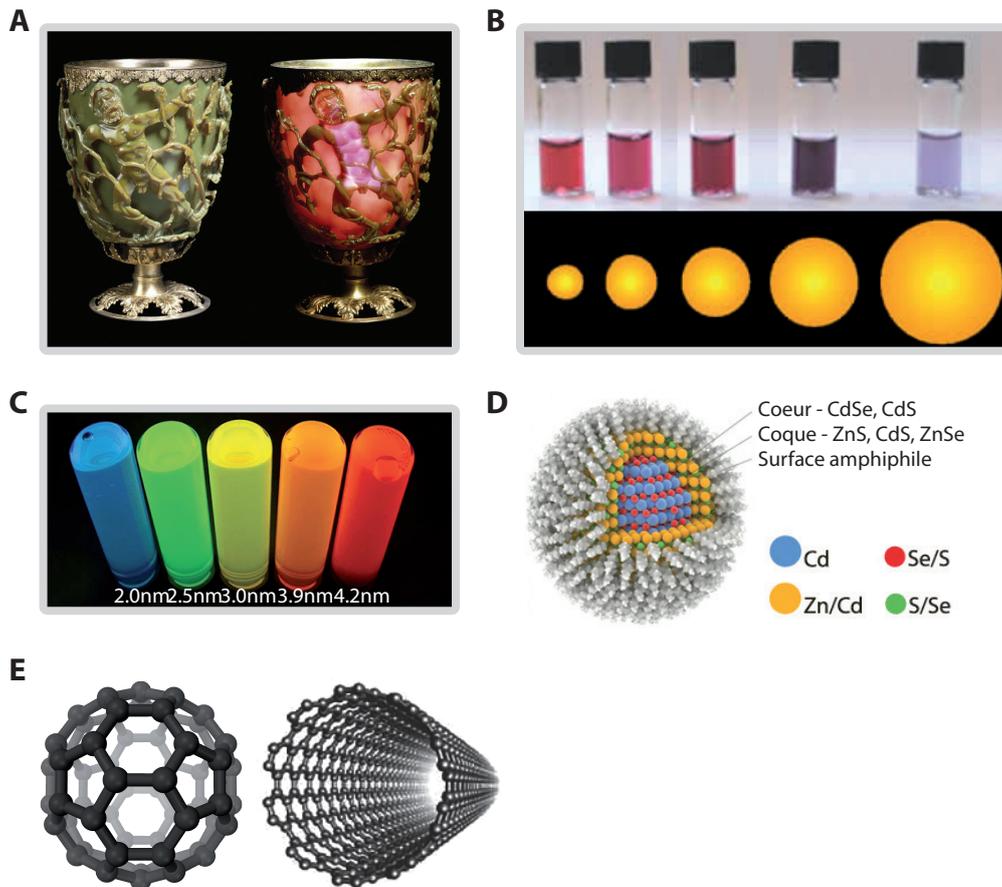
**(B)** Les NPs peuvent présenter des tailles variées, tant que l'une de leur dimension reste inférieure à 100 nm. Dans tous les cas, elles sont de taille bien inférieure à celle d'un neurone.

## Les nanoparticules

Dans le monde de la physique, une particule est un objet possédant des propriétés mesurables telles que volume ou masse. Cette définition peut aussi bien s'appliquer aux éléments subatomiques, comme les électrons, qu'à un corps céleste mobile comme la Terre. Mais le plus souvent, ce terme de particules est utilisé pour définir des éléments mis en suspension dans l'atmosphère terrestre (Lambe et Whitman 1969). À l'échelle micrométrique et nanométrique, les particules peuvent être classées selon leur taille: les particules grossières dont la taille est comprise entre 2,5 et 10  $\mu\text{m}$ , des particules fines de taille comprise entre 0,1 et 2,5  $\mu\text{m}$ , et enfin les particules ultrafines (terme utilisé pour la pollution) ou nanoparticules (NPs), dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm.

Outre leur taille, les NPs présentent une grande variété de formes: sphériques, ovoïdes, allongées, cristallines, tubulaires (**Figure 15**; Re et al. 2012). Leur composition peut également fortement varier, allant des métaux (or, argent, aluminium...), aux oxydes de métaux (oxyde de titane, de cuivre, de zinc...), jusqu'aux éléments non métalliques (graphite, carbone, silice...) (Bhatia 2016).

Les nanoparticules possèdent des propriétés physico-chimiques particulières dues à la fois à leur composition mais aussi à leur taille. En effet, en comparaison avec les particules plus grosses, les NPs présentent une surface d'échange beaucoup plus élevée. Par exemple, 1 mg de nanoparticules sphériques d'un diamètre d'1 nm offre la même surface d'échange qu'1 kg de particules d'1 mm de diamètre. Pour certains éléments chimiques, le passage à l'état nanométrique leur permet ainsi d'acquérir des propriétés nouvelles et pourront être utilisés dans des produits de consommation comme agent antibactérien, ou réflecteur des rayons UVs, ou encore comme semi-conducteurs. Cette petite taille intéresse également les biologistes car elle rend les NPs capables de passer différentes barrières biologiques, comme la barrière intestinale (Lundquist et Artursson 2016), placentaire (Poulsen et al. 2015), alvéolaire (Sipos et al. 2017), ou encore hématoencéphalique (Lockman et al. 2003a, Lockman et al. 2003b, Sarkar et al. 2017).



### Figure 16: Histoire de la découverte et de l'utilisation des nanoparticules

**(A)** Photographie de la coupe de Lycurgue, exposée au British Museum. La présence de NPs d'or et d'argent dans le verre fait varier sa couleur selon l'éclairage, de face elle est verte (gauche), éclairée par l'intérieur ou l'arrière le coupe est rouge (droite).

Tirée de [Leonhardt, 2007](#).

**(B)** Propriétés optiques de l'or colloïdal, découverte de Michael Faraday en 1857. La variation de la taille des particules modifie la longueur d'onde absorbée et donc la couleur de la solution.

**(C)** De la même manière que l'or colloïdal, la variation de la taille des quantum dots va modifier leur couleur, à la différence de la palette plus diversifiée et intense qu'avec l'or.

**(D)** Structure des quantum dots. Les photons de la lumière vont interagir avec la coque, provoquant le transfert d'un électron vers le cœur. Cet électron va interagir avec le cœur, avant d'être repoussé vers la coque tout en émettant de la lumière, dont la longueur d'onde va dépendre de la taille de la particule.

**(E)** Représentation en 3D de la Buckyball (à gauche) et d'un nanotube de carbone (à droite).

## Histoire des nanoparticules: de leur première utilisation à leur découverte

De manière générale, les nanoparticules sont considérées comme une invention de la science moderne. En réalité, les organismes vivants y sont exposés depuis la nuit des temps puisque des phénomènes naturels tels que les éruptions volcaniques, l'érosion des roches, ou encore les feux de forêt, dégagent des particules de tailles diverses, y compris à l'état nanométrique (Lanone et Boczkowski 2010). Certaines nanoparticules sont également utilisées depuis le 4<sup>ème</sup> siècle. À cette époque, il ne s'agissait bien évidemment pas d'une utilisation volontaire dans la mesure où leur existence était inconnue. Toutefois, le premier exemple d'objet exploitant le potentiel des NPs est la coupe de Lycurgue. Cette dernière est constituée de verre dichroïque, c'est-à-dire possédant deux couleurs selon l'éclairage (**Figure 16A**). En effet, un éclairage de face fait apparaître la coupe opaque et verte, alors qu'un éclairage de l'intérieur ou de l'arrière lui confère une teinte rouge translucide. Cette capacité de changement de couleur est due à la présence de nanoparticules d'or et d'argent (entre 50 et 70 nm) dans le verre (Leonhardt 2007). Lorsque la lumière passe au travers du verre, les nanoparticules entrent en résonance (dit "Plasmon de surface"), modifiant ainsi la longueur d'onde de la lumière transmise. Un autre exemple est celui des vitraux et verres trempés médiévaux. Les modèles aux couleurs les plus intenses, fabriquées entre le 6<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> siècles, doivent leur éclat à la présence de NPs contenues dans les peintures d'oxydes métalliques utilisées (Kurmann-Schwarz et Lautier 2009). De plus, certaines peintures contenant des NPs d'or posséderaient même des effets purifiants sur l'air environnant lors de leur exposition à la lumière du soleil (Zhang et al. 2014c). De la même manière, des poudres métalliques contenant des NPs (argent, cuivre...) étaient utilisées pour donner un lustre métallique (effet iridescent) aux poteries entre les 9<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> siècles, d'abord dans la région de ce qui est aujourd'hui l'Irak, puis partout dans la péninsule arabique et même en Europe (Sciau 2012).

À la suite de ces applications empiriques, Michael Faraday est le premier à décrire en 1857 les propriétés particulières des NPs. Il découvre l'or colloïdal "*ruby*" et démontre que cette solution (contenant en fait des NPs d'or en suspension) peut produire différentes couleurs selon les conditions d'éclairage et la taille des particules (**Figure 16B**; (Faraday 1857)). Mais à son époque, la technologie n'est pas encore assez avancée pour pouvoir observer la structure de l'or colloïdal et donc faire l'observation des NPs. Il faudra attendre le développement des

techniques de microscopie, en particulier la microscopie électronique en transmission en 1931 afin de pouvoir disposer d'outils permettant leur observation. Néanmoins, les scientifiques ont continué pendant un demi-siècle à utiliser le terme de colloïdes, l'observation des particules étant presque toujours effectuée en milieu liquide. Le terme "*Nanotechnology*" n'apparaît qu'en 1974 avec le Professeur Norio Taniguchi ([Taniguchi 1974](#)). En 1981, le russe Alexey Ekimov découvre une structure nanocristalline et semi-conductrice: les quantum dots ([Ekimov et Onushchenko 1982](#)). Il sera le premier à étudier leurs propriétés électroniques et optiques (**Figure 16C-D**). En 1985, une équipe de l'université de Rice (Houston, USA) découvre une structure nanométrique ressemblant à un ballon de football. Nommée "*Buckyball*", cette structure est en fait un fullerène composé uniquement de 60 atomes de carbone ([Kroto et al. 1985](#)). Cela leur vaudra un prix Nobel de chimie en 1996 (**Figure 16E**). En 1991, Sumio Iijima découvre les nanotubes de carbones, qui comme la "*Buckyball*" ne sont composés que d'atomes de carbone, mais organisés cette fois-ci dans une structure tubulaire, ce qui leur confère des propriétés extraordinaires en terme de résistance, de conductivité électrique et thermique ([Iijima 1991](#)). Les années 90 voient aussi l'arrivée des premières entreprises de nanotechnologie, que ce soit pour leur production, leur étude ou leur utilisation.

### Propriétés nouvelles et applications des nanoparticules

Au début des années 2000, la nanotechnologie fait son apparition dans des produits destinés aux consommateurs, avec des applications variées. Rapidement, le monde des nanotechnologies et des nanoparticules a permis d'améliorer grandement voire révolutionner de nombreux secteurs technologiques et industriels tels que les cosmétiques, les énergies, les transports, l'informatique, la médecine, l'agro-alimentaire, ou encore l'environnement.

#### *Électronique et informatique*

Les nanotechnologies ont contribué aux dernières avancées dans le domaine de l'informatique et de l'électronique, permettant le développement de systèmes plus rapides, plus compact, plus transportables, et pouvant afficher, organiser, traiter et stocker des quantités bien plus importantes d'informations. Par exemple les écrans ultra HD dits 4K utilisent maintenant des quantum dots (NPs de sélénure de cadmium) pour obtenir un affichage plus fin, mais aussi des couleurs plus vives que l'ancienne technologie à cristaux liquides ([Bourzac 2013](#)). Autre exemple, l'intégration dans les matériaux de NPs d'argent, au fort pouvoir antibactérien, a permis le développement de claviers, coques de téléphones ou

encore appareils auditifs possédant des surfaces antibactérienne (Kim et al. 2007). Cette innovation est également utilisée dans d'autres domaines comme des tables de travail antibactérienne/autonettoyantes dans la restauration ou la médecine. En électronique, la soudure des composants a longtemps utilisé un alliage étain/plomb, le danger du plomb n'étant plus à démontrer, un nouveau type d'apport mélangeant étain et NPs de cuivre a fait son apparition. Toutefois ce nouvel alliage ne remplace pas encore totalement l'ancien car il nécessite une température de soudure plus importante, non supportée par certains composants sensibles (Lin et al. 2003). Enfin, les nanoparticules promettent de nombreuses innovations dans ce domaine. En effet, le développement d'écran/composants flexibles à base de NPs (carbone, argent, cellulose, zinc...) permettra des innovations dans de nombreux domaines comme des téléphones ou tablettes pliables/enroulables, de l'électronique flexible et miniature pouvant être porté ou injecté sous la peau, comme des senseurs de divers paramètres médicaux, des puces photovoltaïques dans des vêtements... (Wang 2008, Kim et al. 2016).

#### *Production et stockage d'énergie*

Un autre domaine d'application pour les nanoparticules est la production et le stockage de l'énergie, qu'elle soit électrique ou issue du pétrole. Des NPs à base de Cadmium ou Ruthénium/Carbone permettent de catalyser et donc d'améliorer la production de carburant (Kang et al. 2009, Peng et al. 2015), alors que des NPs composées de Zinc/ferrite permettraient même de produire du carburant de synthèse grâce à l'énergie solaire (Bhosale et al. 2016). De plus, la production d'électricité à partir de panneaux solaires est actuellement limitée par le coût, l'encombrement et le manque d'efficacité des technologies. Des cellules solaires constituées de nanostructures d'or ou d'oxyde de zinc sont en cours de développement afin d'obtenir des panneaux solaires moins chers à produire, avec un meilleur rendement énergétique, plus fins voire flexibles, entrant dans le développement de cette énergie renouvelable (Beek et al. 2004, Wang et al. 2011). Concernant le stockage de l'énergie, des NPs sont déjà utilisées dans le but d'obtenir des batteries avec de meilleures capacités, se chargeant plus vite, plus légères, flexibles et avec une plus longue durée de vie (Zhang et al. 2014b, Zhou et al. 2016). Enfin, les NPs peuvent améliorer les systèmes déjà existant afin de les rendre plus économiques: ampoules (Xing et al. 2016) et ordinateurs à basse

consommation (Kuzum et al. 2012), allégement des véhicules permettant une économie de carburant... (Zhang et Friedrich 2005).

### *Médecine et santé*

Dans le domaine médical, le développement des NPs devrait apporter de nouveaux outils de diagnostic, de prévention et de traitement des maladies. Ainsi, les quantum dots sont à l'étude pour le développement de nouveaux marqueurs biologiques plus précis, plus spécifique des pathologies à diagnostiquer ou encore un suivi en temps réel d'une molécule passant dans le système digestif ou le système sanguin (Michalet et al. 2005, Li et Zhu 2013). Dans le traitement de l'athérosclérose, des chercheurs sont parvenus à créer une NP mimant les lipoprotéines de haute densité (HDL, ou "bon" cholestérol), aidant ainsi à la résorption des plaques d'athérome en délivrant de la statine à ces dernières (Duivenvoorden et al. 2014). Les NPs d'oxyde de zinc étant capable de cibler certaines cellules cancéreuses (Hanley et al. 2008), celles-ci pourrait être utilisées comme vecteur de médicaments. De plus, compte tenu de leur taille, elles peuvent passer les barrières biologiques comme la barrière hématoencéphalique, permettant alors de délivrer des médicaments dans des zones précises du cerveau (Bode et al. 2017). Les objectifs de ces travaux sont la réduction des quantités de médicaments administrés, l'augmentation de leur efficacité, tout cela sans affecter d'autres organes afin de réduire l'apparition d'effets secondaires indésirables (Bode et al. 2017). Les NPs permettraient également de cibler les cellules infectées par le VIH afin d'y délivrer directement les médicaments actuels, permettant là encore une réduction drastique des effets secondaires (Gu et al. 2017, Kesarkar et al. 2017). Une autre voie d'étude est la recherche médicale pour la régénération des tissus. Certaines NPs peuvent servir de support à la régénération de tissus et pourraient même la favoriser. Notons par exemple le graphène pour l'os (Elkhenany et al. 2017), le titane ou la céramique pour les dents (Xavier et al. 2015) ou encore l'oxyde de fer ou de zinc pour le tissu nerveux (Seil et Webster 2008, Neubert et Glumm 2016). Enfin, il est à noter que dans le cas de lésion de la moelle épinière, l'utilisation de nano-rubans de graphène (NPs de carbone) pourraient promouvoir et faciliter la régénération neuronale au sein de la barrière cicatricielle en fournissant un support à la repousse axonale (Solanki et al. 2013).

### *Les nanoparticules dans notre quotidien*

Les nanoparticules possédant des propriétés nouvelles et étant peu coûteuses, sont déjà présentes dans de nombreux produits du quotidien. L'une des premières industries à les avoir implantées dans ses produits est la cosmétique. En effet, compte tenu de leurs propriétés anti-UV, les NPs de titane et de zinc sont présentes dans les crèmes solaires ([Smijs et Pavel 2011](#)). Placées en suspension dans un produit lui conférant ainsi une couleur blanche, ces deux mêmes NPs sont utilisées dans les maquillages ([Vaseem et al. 2010](#)) et les encres de tatouage ([Schreiber et al. 2017](#)). L'utilisation de cette propriété dépasse le domaine de la cosmétique puisque ces NPs sont aussi utilisées comme colorant alimentaire (l'E171 pour le dioxyde de titane), dans les peintures ou encore dans les textiles ([Weir et al. 2012](#)). Le dioxyde de silicium (additif E551) peut être retrouvé dans de nombreux produits comme agent antiagglomérant, que ce soit dans le domaine agroalimentaire, pharmaceutique ou cosmétique ([Barik et al. 2008](#)). Les propriétés antibactériennes et désinfectantes de certaines NPs d'argent ou de zinc sont utilisées dans des produits d'hygiène quotidienne comme le dentifrice, les déodorants, le lait pour le corps ([Kokura et al. 2010, Mu et Sprando 2010](#)), les emballages alimentaires ([Bumbudsanpharoke et al. 2015](#)), ou encore dans certains textiles pour limiter le développement d'odeurs corporelles ([Durán et al. 2007, Becheri et al. 2008](#)). Enfin, de manière non-exhaustive, notons la présence de NPs dans les médicaments ([Salata 2004](#)), le bâtiment (matériaux de construction, peintures...) ([Kawashima et al. 2013](#)) ou encore l'automobile (additifs carburant et huiles, châssis, peinture...) ([Hernández Battez et al. 2008, Kole et Dey 2010](#)).

### **Toxicologie des nanoparticules**

Une des questions majeures soulevées par l'augmentation de la production et de l'utilisation des NPs concerne le risque sanitaire que pourrait engendrer l'exposition croissante et continue de la population et des travailleurs à ces composés chimiques.

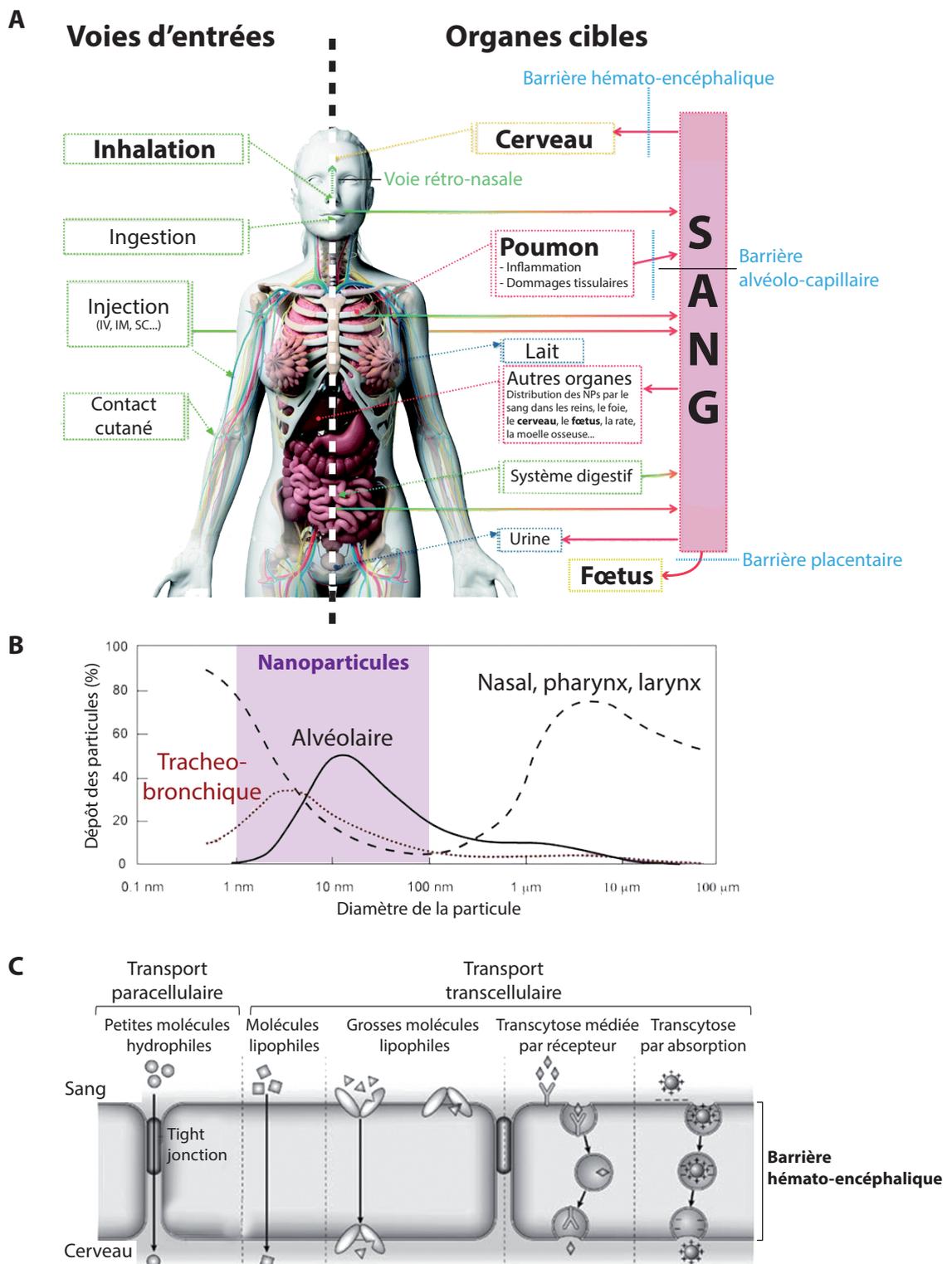
#### *Les scandales sanitaires du passé : métaux lourds et amiante*

Plusieurs éléments utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés extraordinaires ont ensuite été interdits suite à la découverte de leur dangerosité. Le mercure, par exemple, a longtemps été utilisé dans les thermomètres, les piles, les plombages, en pharmacie (effet désinfectant du Mercurochrome®), les ampoules ou encore dans certains pigments (Vermillon

par exemple). Son utilisation est maintenant fortement limitée et contrôlée du fait de sa haute toxicité (Maladie de Minamata). L'intoxication au mercure provoque en effet une atteinte de la fonction rénale, endocrine et cérébrale, induisant un stress oxydatif, une augmentation des conductions chlorure et une désorganisation des microtubules affectant de nombreux processus cellulaires dont la neurotransmission (Fernandes Azevedo et al. 2012).

Un autre exemple concerne le plomb dans la survenue du saturnisme. Utilisé dans les canalisations, dans la peinture des bâtiments (meilleur pouvoir couvrant) et aussi dans certains jouets, le plomb l'est encore dans les batteries (résistance à la corrosion), comme écran antiradiation, dans les fusibles et la soudure à l'étain, et enfin en cosmétique (Khôl traditionnel). Mais lors de son absorption, et au vu de sa faible élimination, le plomb a la capacité de s'accumuler dans le système nerveux provoquant le saturnisme. Parmi la longue liste de symptômes, on retient surtout de cette maladie le retard mental induit chez les enfants intoxiqués et son implication dans la schizophrénie. Le plomb se substitue au calcium dans de nombreux processus cellulaires induisant une altération des propriétés membranaires, un dérèglement de la signalisation cellulaire ou encore un stress oxydatif (Sanders et al. 2009). De plus, il a été montré que l'accumulation de plomb ou de mercure pourrait potentialiser des pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Pamphlett et Kum Jew 2013).

Le dernier exemple en lien direct avec les objectifs de ce travail doctoral est le zinc. Naturellement présent dans notre corps et le système nerveux, il possède une action modulatrice sur les récepteurs et la recapture de certains neurotransmetteurs (acétylcholine, sérotonine, glutamate et dopamine), mais également sur l'activité de plusieurs canaux ioniques (calcium, chlorure, potassium, sodium) (Frederickson et al. 2005). L'apport de zinc peut se faire via l'alimentation (fruits de mer, viande, fromage entre autres), mais aussi via la pollution, le zinc étant utilisé dans de nombreux processus et produits industriels (tels les piles, la protection anticorrosion (galvanisation), la monnaie, la couverture, les cicatrisants, les anti-inflammatoires). L'excès de zinc dans l'organisme est connu pour provoquer des diarrhées, des vomissements et des maux de tête (Fosmire 1990). Son accumulation dans le système nerveux central induit un stress oxydatif aboutissant à une mort neuronale massive suite à la synthèse de marqueurs pro-apoptotiques (Kim et al. 1999). Enfin, l'accumulation du zinc dans



**Figure 17: Passage et distribution des nanoparticules**

**(A)** Les voies d'entrées des NPs sont multiples, mais l'inhalation en reste la principale. Une fois dans le corps, les NPs peuvent rejoindre le **cerveau** de deux manières: via les terminaisons des nerfs olfactifs (voie rétro-nasale) ou après avoir passé les poumons, la barrière alvéolo-capillaire, le sang, et enfin la barrière hémato-encéphalique. Une fois dans le sang et dans le cas d'une femme enceinte, les NPs peuvent également rejoindre le **foetus** en passant la barrière placentaire. Après la naissance, l'enfant peut encore être exposé via le lait maternel. Modifiée d'après [Gnack et al., 2015](#).

**(B)** Lieu de dépôt dans l'arbre bronchique des particules en fonction de leur taille. Les NPs se déposent majoritairement au niveau alvéolaire, sauf en dessous d'une taille de 10 nm où le dépôt se limite au niveau trachéo-bronchique. Modifiée d'après [Buzea et al., 2007](#).

**(C)** Mécanismes de passage des NPs au travers de la barrière hémato-encéphalique. Modifiée d'après [Re et al., 2012](#).

le cerveau pourrait aussi faciliter l'agrégation des plaques amyloïdes observées dans la maladie d'Alzheimer (Watt et al. 2010).

Utilisée pour sa très grande résistance mécanique et thermique, l'amiante (ou fibres d'amiante) est composée de silicates magnésiens ou calciques aux propriétés réfractaires. Issue de diverses espèces minérales, l'amiante a largement été utilisée dans les procédés de calorifugeage (isolation thermique) et de flocage (coupe-feu), notamment dans le secteur du bâtiment, mais également dans l'automobile (résistance des matériaux de friction) ou encore pour la construction des routes (résistance à l'usure). Toutefois, compte tenu de sa taille réduite, les fibres d'amiante accèdent facilement dans les régions pulmonaires les plus profondes (Sebastien et al. 1975). Son accumulation dans les poumons provoque alors une insuffisance respiratoire chronique grave et peut également induire un mésothéliome (cancer grave de la plèvre ou du péricarde) (Kilburn et Warshaw 1991).

#### *Voies d'entrées et distribution des nanoparticules dans l'organisme*

Les principales voies d'entrée des NPs dans l'organisme regroupent la voie respiratoire (et rétro-nasale pour la translocation direct vers le cerveau via les nerfs olfactifs), la voie digestive et dans une moindre mesure la voie percutanée (**Figure 17A**; (Oberdorster et al. 2004, Elder et al. 2006, Kao et al. 2012)). Concernant l'inhalation des NPs, plusieurs études ont montré que la taille des particules influe sur leur lieu de dépôt dans l'arbre bronchique (**Figure 17B**). Plus les particules sont fines, plus elles se déposent loin, les plus fines pouvant atteindre les sacs alvéolaires (Oberdorster 2001). Néanmoins, les NPs dont le diamètre est inférieur à 10nm ne vont que très peu jusqu'aux alvéoles car plus susceptibles d'être emprisonnées par le mucus et donc d'être évacuées des poumons. Une fois accumulés dans les régions les plus profondes des poumons, les NPs sont capables de passer la barrière alvéolo-capillaire et ainsi rejoindre la circulation sanguine (Choi et al. 2010, Yacobi et al. 2010, Kreyling et al. 2014) afin de subir une translocation vers différents organes du corps, dont les reins, le foie et le cerveau (Geraets et al. 2014, Konduru et al. 2014). Il est à noter enfin que certaines NPs sont également capables de passer les barrières placentaire (Keelan 2011, Jo et al. 2013) et hématoencéphalique (**Figure 17C**; (Sela et al. 2015)).

#### *Effets périphériques des nanoparticules*

Au niveau pulmonaire, des études ont montré que chez l'animal, les nanotubes et nanofibres de carbone pouvaient provoquer des effets comparables à ceux déclenchés par les

fibres d'amiante, à savoir des inflammations, des granulomes ou encore des fibroses pulmonaires ([Frank et al. 2016](#)). Les NPs de titane ou de zinc sont également connues pour déclencher des effets pro-inflammatoires via l'induction d'un stress oxydatif au niveau pulmonaire, entraînant des effets cyto- et génotoxiques ([Hanot-Roy et al. 2016](#), [Sukwong et al. 2016](#), [Ng et al. 2017](#)). En tant qu'organes de filtration, le foie et les reins peuvent également montrer des dysfonctionnements liés à l'exposition aux NPs. Des atteintes hépatiques (inflammations, atteinte ADN) sont susceptibles d'apparaître lors d'une exposition aux NPs d'oxyde de zinc ([Hao et al. 2017](#)), de dioxyde de titane ([Li et al. 2017](#)) ou d'argent ([Piao et al. 2011](#)). Des troubles du métabolisme rénal peuvent être déclenchés par les NPs de carbone ([Reddy et al. 2010](#)), de zinc ([Yan et al. 2012](#)) ou de silice ([Passagne et al. 2012](#)). Enfin, la toxicité de certaines NPs (argent et zinc entre-autres) peuvent se traduire par des effets sur la reproduction, notamment au travers d'effets cyto- et génotoxiques sur les cellules de l'appareil reproducteur ([Asare et al. 2012](#), [Jo et al. 2013](#)). Il est à noter que les NPs éliminées par l'escalator muco-ciliaire des voies respiratoires se retrouvent alors dans le système digestif.

De nombreux produits alimentaires contiennent des additifs sous forme de NPs (titane, silice, argent, zinc) ([Calzolari et al. 2012](#), [Espitia et al. 2012](#)). Dans le système digestif, ces NPs sont capables de passer au travers de la paroi intestinale et rejoindre ainsi la circulation sanguine ([Jani et al. 1990](#)) pour être distribuées vers divers organes. Elles sont également susceptibles de provoquer des effets locaux tels que des perturbations de la flore commensale digestive (argent, cuivre), des effets pro-inflammatoires (argent, titane, silice, carbone) ou encore génotoxiques (titane, carbone) (pour revue ([Bergin et Witzmann 2013](#))). Certaines NPs déjà très répandues dans notre alimentation, comme le dioxyde de titane (additif E171), pourraient même potentialiser l'apparition de tumeurs intestinales ([Bettini et al. 2017](#)), alors que le dioxyde de silice (E551) aurait des effets cyto- et génotoxiques ([Athinarayanan et al. 2014](#)).

La dernière voie d'entrée des NPs dans l'organisme est la pénétration percutanée. Principalement suspectée pour les cosmétiques et les agents polluants, cette voie est plus sujette à controverse. En effet, certaines études montrent un passage au travers de la peau saine ([Cross et al. 2007](#)), alors que d'autres ne l'observent que sur des peaux lésées ([Larese et al. 2009](#)), voire n'observent aucune pénétration dans les couches profondes ([Leite-Silva et al.](#)

2013). Une étude récente montre cependant que de nombreuses NPs contenues dans les encres de tatouage se retrouvent dans les ganglions lymphatiques (Schreiver et al. 2017) occasionnant des effets délétères (Alarifi et al. 2013, Park et al. 2013).

#### *Effets des nanoparticules sur le système nerveux*

Déjà évoqué précédemment, les NPs sont capables de rejoindre le cerveau, traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) et diffuser dans l'ensemble du tissu (Wolak et Thorne 2013). Il est à noter également que le passage des NPs vers le cerveau peut endommager la BHE, la rendant alors plus perméable à d'autres produits potentiellement neurotoxiques (Tang et al. 2009, Shim et al. 2014). Des atteintes des fonctions cérébrales et des mécanismes bioélectriques des neurones ont pu être observées lors d'études neurotoxicologiques. Ainsi, les NPs de cuivre provoquent des déficits mnésiques et de l'apprentissage chez le rat (An et al. 2012), alors que celles de titane et de zinc perturbent la mémoire spatiale (Hu et al. 2010, Han et al. 2011). Les NPs d'argent peuvent induire une perturbation de la BHE, un gonflement des astrocytes et une dégénérescence neuronale (Tang et al. 2009). Les NPs de titane quant à elles peuvent déclencher des lésions cérébrales, une désorganisation de la glie et une inflammation (Ma et al. 2010). Le dioxyde de silice retarderait la récupération lors d'une lésion de la moelle épinière (Sharma et al.) et l'oxyde de zinc serait responsable de phénomènes d'apoptose et de nécrose neuronale (Lai et al. 2008); (Afifi et al. 2016).

De nombreuses équipes se sont intéressées aux mécanismes neuronaux et cellulaires pouvant aboutir aux effets neurotoxiques sus-cités. Bon nombre de NPs induisent un stress oxydatif via la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*). En effet, que ce soit pour les NPs de titane (Huerta-Garcia et al. 2014), d'argent (Marano et al. 2011) ou de zinc (Wang et al. 2014), ces NPs sont capables d'induire la production de ROS qui, suivie d'une cascade réactionnelle, aboutit à une altération du génome (NPs de magnésium, titane ou zinc; (Lai et al. 2008) pouvant entraîner la mort cellulaire. En plus de leur toxicité cellulaire, les NPs altèrent également la neurotransmission. Par exemple, les NPs de titane agissent sur la plasticité synaptique et le taux de dopamine lors d'une exposition prénatale (Takahashi et al. 2010, Gao et al. 2011). Les NPs d'oxyde de zinc altèrent l'activité de nombreux canaux ioniques voltage dépendants (pour revue (Yang et al. 2010)), contribuant ainsi à modifier l'amplitude des potentiels d'action, en facilitant par exemple la récupération de l'inactivation des canaux

sodiques du potentiel d'action et l'amplitude maximale de ce courant, modifiant ainsi l'excitabilité cellulaire (Zhao et al. 2009).

## Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail doctoral sont centrés sur les effets potentiellement neurotoxiques que pourraient induire les NPs d'oxyde de zinc (ZnO) au cours de la période périnatale sur les réseaux de neurones, en particulier ceux engagés dans les fonctions respiratoires et locomotrices. Les expériences ont été menées sur des préparations de tissu nerveux isolé *ex vivo* de rat nouveau-né, mais également *in vivo* sur des femelles gestantes. Une combinaison d'approches électrophysiologique, pharmacologique, toxicologique, pléthysmographique et neuroanatomique a été développée pour répondre aux questions suivantes:

- **Concernant les caractéristiques des NPs ZnO:**
  - 1) Quelles sont la forme et la taille moyenne des NPs ZnO utilisées ?
  - 2) Ces particules sont-elles capables de se dissocier dans le milieu de survie utilisé pour les préparations réduites de système nerveux central ?
  - 3) Si oui, la quantité de zinc libre issue des NPs est-elle suffisante pour induire un effet sur le système nerveux ?
- **Concernant la neurotoxicité potentielle d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur l'activité du réseau respiratoire central au cours de la période postnatale :**
  - 1) Quels sont les paramètres (fréquence, durée de survie, amplitude des bouffées) de l'activité respiratoire fictive générée par les préparations de système nerveux central isolé *ex vivo* de rat nouveau-né (tronc cérébral/moelle épinière, tranche de bulbe rachidien) ?
  - 2) Quels sont les effets d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur cette activité respiratoire fictive ?
  - 3) Quels éléments du réseau respiratoire central sont les cibles préférentielles des NPs ZnO ?
  - 4) Par quels mécanismes neuronaux se manifestent les effets des NPs ZnO ?
- **Concernant la neurotoxicité potentielle d'une exposition chronique aux NPs ZnO durant la gestation sur la fonction respiratoire centrale postnatale:**
  - 1) Les NPs ZnO ont-elles un (ou des) effet(s) sur la gestation et le développement des animaux ?

2) Quels sont les dysfonctionnements respiratoires chez les nouveau-nés que peut entraîner l'exposition chronique des fœtus de rats aux NPs ZnO (via la transmission verticale materno-fœtale) ?

○ **Concernant la neurotoxicité potentielle d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur l'activité du réseau locomoteur lors de la période postnatale :**

1) Quels sont les paramètres d'une activité locomotrice fictive *ex vivo* ?

2) Quelles modifications de ces paramètres peut engendrer l'application aiguë de NPs ZnO ?

## **Matériels et Méthodes**

## Animaux

Les rats Sprague-Dawley, âgés de 0 à 5 jours postnataux (P0 à P5) et utilisés pour ce travail de thèse, ont été élevés au sein du laboratoire (Autorisation : B33-063-269). Toutes les expériences ont été menées conformément aux directives Européennes ainsi qu'à celles du comité d'éthique de l'Université de Bordeaux (Autorisation n°2016012716035722).

## Expériences *ex vivo*

### Préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés de rat nouveau-né

*Un modèle de référence pour l'étude des réseaux moteurs*

Une partie de cette étude a été menée sur des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolés *ex vivo* de rats nouveau-nés âgés de 0 à 5 jours. Cette préparation présente plusieurs avantages notables. En effet, elle peut être maintenue en survie pendant plusieurs heures (jusqu'à plus de 10h), grâce à la perfusion continue de liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa). Ceci est rendu possible par la myélinisation incomplète des neurones et la faible épaisseur du tissu à cet âge, rendant accessibles les cellules aux différentes substances ajoutées au milieu, que ce soit des substances neuroactives permettant l'induction d'une activité locomotrice (Cazalets *et al.* 1992), ou d'autres dont on souhaite étudier l'éventuelle toxicité. De nombreux réseaux neuronaux étant préservés dans cette préparation (en particulier les réseaux respiratoires et locomoteurs), leur étude reste possible par différentes approches mêlant l'électrophysiologie (extracellulaire, patch-clamp...), la pharmacologie (les substances testées pouvant être appliquées sur une partie ou sur la totalité du système nerveux), ou encore des approches anatomiques.

Utilisée depuis les années 70, cette préparation de moelle épinière isolée *ex vivo* fut initialement développée pour l'étude des réflexes spinaux (Vaughn et Grieshaber 1973, Saito 1979). Mais la première description des potentialités de cette préparation en regard de l'étude des réseaux centraux respiratoires fut apportée par Suzue dans une publication princeps éditée par *The Journal Of Physiology (London)* (Suzue 1984). L'auteur montre alors les capacités de rythmogenèse respiratoire spontanée sur tissu nerveux isolé et qualifie ces activités de respiration fictive en raison de l'absence de tout mouvement ventilatoire. Ce travail pionnier a permis par la suite à de nombreux groupes de recherche de s'intéresser en

particulier aux neurones responsables de la rythmogenèse respiratoire afin notamment d'identifier leur organisation et leurs propriétés au sein du tronc cérébral (Onimaru et al. 1987, Onimaru et al. 1988, Arata et al. 1990, Hilaire et al. 1990, Feldman et al. 1991, Smith et al. 1991, Onimaru et Homma 1992, Onimaru et al. 1992, Smith et al. 1992).

Il est également important de noter que dans la foulée des travaux princeps de Suzue (1984), le groupe de Jack Feldman (UCLA, USA), plus connu pour ses nombreuses études ultérieures sur le fonctionnement et l'organisation des centres respiratoires ainsi que sur la neuromodulation de cette activité, est le premier à décrire les possibilités offertes par cette préparation pour l'étude des réseaux moteurs spinaux engagés dans la production d'activité rythmiques alternées à caractère locomoteur (Smith et Feldman 1987, Smith et al. 1988). Par la suite, de nombreuses études sur la fonction locomotrice ont permis notamment de préciser la localisation des centres spinaux responsables de l'organisation et du maintien du rythme locomoteur chez les mammifères (Cazalets et al. 1995, Kjaerulff et Kiehn 1996).

Si ce type de préparation offre plusieurs avantages expérimentaux, il est important d'évoquer aussi quelles en sont ses limites. Pour rappel, ces préparations sont extraites de rats nouveau-nés et donc par définition immatures. Les observations effectuées ne pourraient alors n'être qu'un reflet de l'immaturation de ces réseaux de neurones (faible myélinisation, mise en place incomplète des réseaux). De plus, la préparation étant relativement réduite, l'absence de retour sensoriel et de l'influence des centres supérieurs ne permet pas une approche totalement intégrative des activités générées soit par les centres respiratoires soit par les générateurs locomoteurs. Néanmoins, la présence d'une activité rythmique spontanée pour la respiration et d'une activité pharmacologiquement induite pour la locomotion permet d'aborder le concept de rythmogenèse centrale pour des fonctions hautement vitales sur des modèles d'études de mammifères tels que le rat ou la souris en période périnatale.

#### *La préparation tronc cérébral/moelle épinière ex vivo*

Les rats nouveau-nés âgés de 0 à 5 jours sont d'abord anesthésiés à l'isoflurane, 4% pendant 7 minutes, puis les animaux sont rapidement décapités. La peau, les muscles et le tissu adipeux du dos sont retirés, puis l'animal est placé dans une chambre de dissection remplie de LCRa à température ambiante et oxygéné continuellement (carbogène : 95% O<sub>2</sub> ; 5% CO<sub>2</sub>). Sous contrôle binoculaire, une section des os du crâne ainsi qu'une laminectomie complète sont réalisées. Les racines ventrales et dorsales sont alors sectionnées le plus distalement possible

du tissu, permettant ainsi de récupérer l'ensemble tronc cérébral/moelle épinière. Cette préparation est alors transférée dans une cuve d'enregistrement remplie de LCRa (température ambiante) et dont le fond est recouvert de Sylgard® 184 (Dow Corning, USA) permettant sa fixation, face ventrale vers le haut. Afin de permettre une bonne perfusion du tissu et toujours sous contrôle binoculaire, les méninges sont ensuite délicatement retirées. Les différentes racines motrices d'intérêt sont identifiées par comptage rostro-caudal à partir de la première racine cervical (C1 à C8), permettant l'identification des racines thoraciques (T1 à T13) lombaires (L1 à L6), sacrées (S1 à S4) et coccygiennes (Coc1 à Coc4).

### *Barrières*

Lors de certaines expériences, une barrière étanche de Vaseline a pu être mise en place afin de séparer la cuve d'enregistrement en deux compartiments distincts. Ceci permet d'appliquer des solutions de composition différentes (par exemple contenant des nanoparticules ou non) sur des régions précises de la préparation. Après chaque expérience, l'étanchéité de la barrière est testée par ajout de colorant (bleu de méthylène) dans l'un des compartiments. Si une fuite est décelée (passage du colorant d'un compartiment à l'autre), les données de l'expérience sont systématiquement écartées de l'analyse.

## **Préparation de tranches de tronc cérébral contenant le préBötC**

### *Une préparation de choix pour l'étude des neurones respiratoires*

Une partie de l'étude a été menée à partir de tranches de tronc cérébral dont la particularité est de conserver intact le générateur du rythme inspiratoire, le complexe pré-Bötzinger. Cette préparation présente ainsi l'avantage de faciliter l'accès aux structures générant l'activité inspiratoire centrale et à ses constituants. En effet, les neurones inspiratoires sont directement accessibles à la surface du tissu, permettant plus "aisément" des approches d'électrophysiologie intracellulaire tel que le patch-clamp. A l'instar des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolée, ces tranches conservent spontanément une activité rythmique d'origine inspiratoire (Smith et al. 1991, Ramirez et al. 1996) et ont permis des avancées majeures dans la compréhension du fonctionnement intime des centres respiratoires chez les mammifères nouveau-nés (pour revue, voir (Ramirez et Richter 1996) (Smith et al. 2009, Ramirez et al. 2012)).

### *Préparation des tranches de tronc cérébral à partir de rat nouveau-né*

Les rats nouveau-nés âgés de 0 à 5 jours sont d'abord anesthésiés à l'isoflurane, 4% pendant 7 minutes, puis les animaux sont décapités au niveau spinal C3-C4. Après résection de la peau et des os du crâne, le cerveau et la partie supérieure de la moelle épinière sont isolés dans du LCRa glacé et oxygéné (carbogène : 95% O<sub>2</sub> ; 5% CO<sub>2</sub>). Une fois la transection réalisée au niveau du colliculus inférieur, le cervelet est retiré afin d'isoler le tronc cérébral. Ce dernier est alors collé au cyanoacrylate sur un bloc d'agar, la partie rostrale vers le haut et la partie caudale vers le bas. Le tout est ensuite monté dans un vibratome (Leica VT100S). Une série de tranches de 220 µm d'épaisseur est effectuée dans le sens rostro-caudal jusqu'à atteindre la limite postérieure du noyau facial et la limite antérieure du noyau ambigu. Une dernière tranche de 550 µm, contenant le complexe pré-Bötzinger est alors effectuée, puis transférée vers la cuve d'enregistrement continuellement perfusée par du LCRa maintenu à 30°C.

## Milieux et solutions

### Le liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa)

Afin de maintenir le tissu nerveux en survie, plusieurs milieux ont été utilisés lors de ces expériences. Chacun d'entre eux se veut très proche du liquide céphalo-rachidien naturel, mais des ajustements de la composition ont néanmoins été nécessaires. Ainsi, pour l'étude de l'activité respiratoire sur préparation tronc cérébral/moelle épinière, la composition du LCRa est la suivante (en mM): 125 NaCl ; 3,35 KCl ; 0,58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,26 CaCl<sub>2</sub> ; 1,15 MgCl<sub>2</sub> ; 21 NaHCO<sub>3</sub> ; 30 D-glucose. Pour les expériences sur les tranches de tronc cérébral, la composition du liquide est (en mM): 120 NaCl ; 8 KCl ; 1,26 CaCl<sub>2</sub> ; 1,5 MgCl<sub>2</sub> ; 21 NaHCO<sub>3</sub> ; 0,58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 30 D-glucose. Enfin, pour les enregistrements de l'activité locomotrice sur préparation tronc cérébral/moelle épinière, la composition du LCRa est (en mM): 130 NaCl ; 3 KCl ; 2,5 CaCl<sub>2</sub> ; 1,3 MgSO<sub>4</sub> ; 25 NaHCO<sub>3</sub> ; 0,58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 10 D-glucose. Dans tous les cas de figure, après bullage au carbogène (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), le pH est systématiquement ajusté à 7,4. Ce milieu de survie étant continuellement appliqué dans la cuve d'enregistrement à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson, 4 à 6 ml/min).

## Cocktail pharmacologique NMDA/5-HT

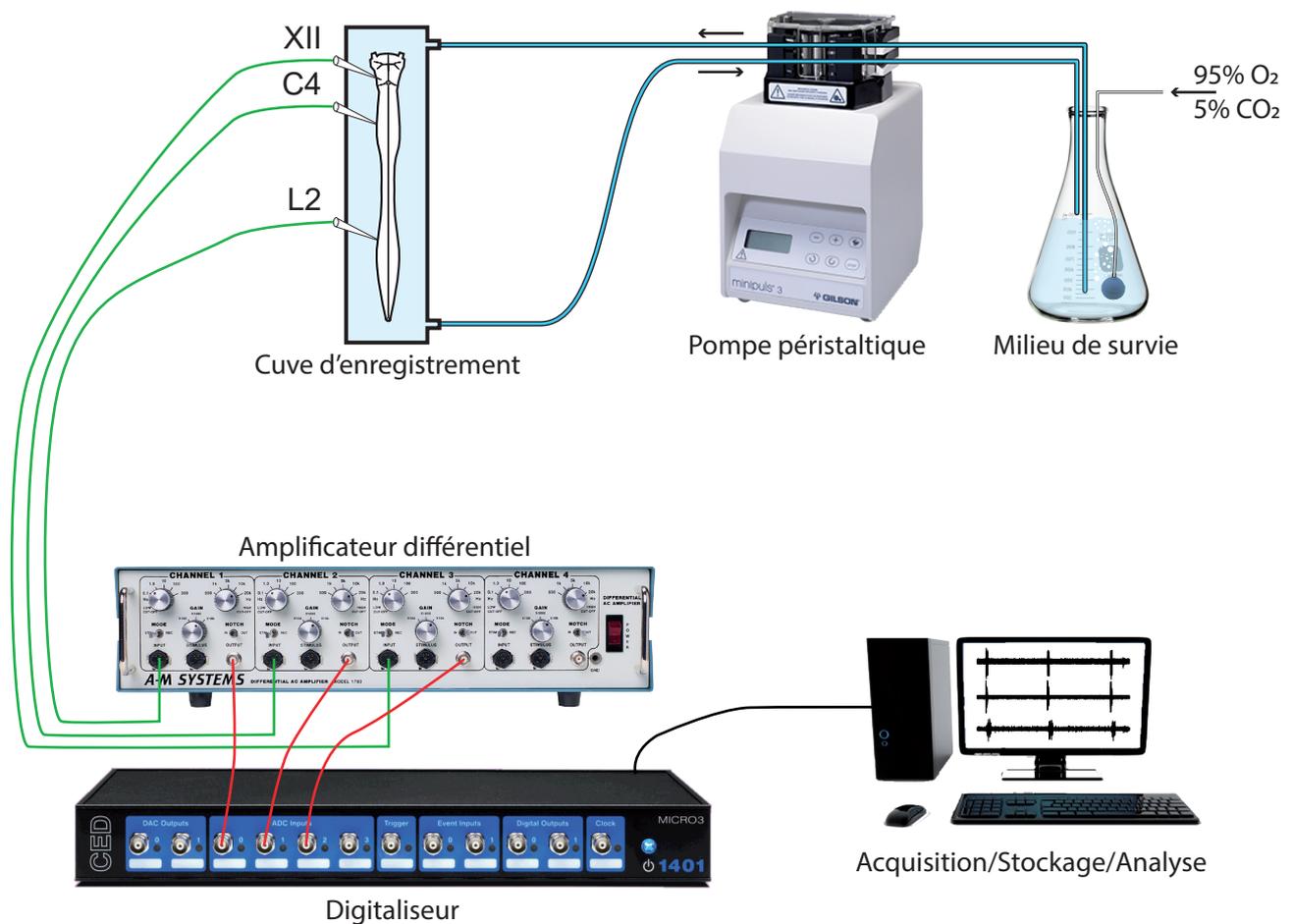
Afin d'induire des épisodes de locomotion fictive lors des expériences sur préparation tronc cérébral/moelle épinière, un mélange constitué de N-méthyl-D-aspartate (7,5  $\mu$ M ; NMDA ; AbCam) et de sérotonine (15 $\mu$ M ; 5-HT ; Sigma-Aldrich) a été appliqué sur la préparation par ajout dans le milieu de survie (Cazalets *et al.* 1992). Le liquide étant renouvelé par une pompe péristaltique, un délai de 5 minutes est systématiquement observé entre le début de l'application des substances neuroactives et l'observation de leurs effets. Il s'agit là du temps nécessaire pour que le LCRA soit totalement remplacé dans la cuve par celui contenant les substances d'intérêt. Après une application pouvant durer 15 à 20 minutes, le LCRA normal est de nouveau perfusé dans la cuve afin de mettre fin à l'épisode de locomotion fictive (étape de "rinçage").

## Nanoparticules d'oxyde de zinc

Afin de déterminer l'effet des NPs ZnO, différentes concentrations ont été utilisées que ce soit sur les préparations *ex vivo* (1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu$ g/mL) ou lors de l'exposition chronique d'animaux (20 et 40 mg/kg). Ces concentrations ont été préparées à partir d'une suspension commerciale de NPs ZnO à 0,5 g/mL (Sigma-Aldrich) diluée dans de l'eau distillée pour les expériences *ex vivo* ou dans une solution physiologique saline injectable (NaCl 0,9%) pour l'exposition chronique *in vivo*.

## Électrophysiologie

Que ce soit sur la préparation de tronc cérébral/moelle épinière ou sur la préparation de tranche de tronc cérébral, l'activité électrique des neurones a été enregistrée par des approches dites extracellulaires. Sur préparation de tronc cérébral/moelle épinière, les activités motrices de type locomoteur ou de type respiratoire ont été enregistrées au niveau des racines spinales motrices (ventrales). Sur la préparation de tranche de tronc cérébral, l'activité du préBötC a été enregistrée directement à la surface de la tranche pour l'activité globale du complexe, parfois couplée à l'enregistrement intracellulaire de l'activité de ses neurones.



**Figure 18: Représentation schématique du dispositif expérimental ex vivo**

Les préparations de tissu sont maintenues en survie dans un liquide cephalo-rachidien artificiel bullé au carbogène (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) et perfusé en continu par une pompe péristaltique dans la cuve d'enregistrement. Le signal des électrodes est amplifié, puis digitalisé afin d'être visualisé, stocké puis analysé sur un ordinateur.

## Enregistrements extracellulaires

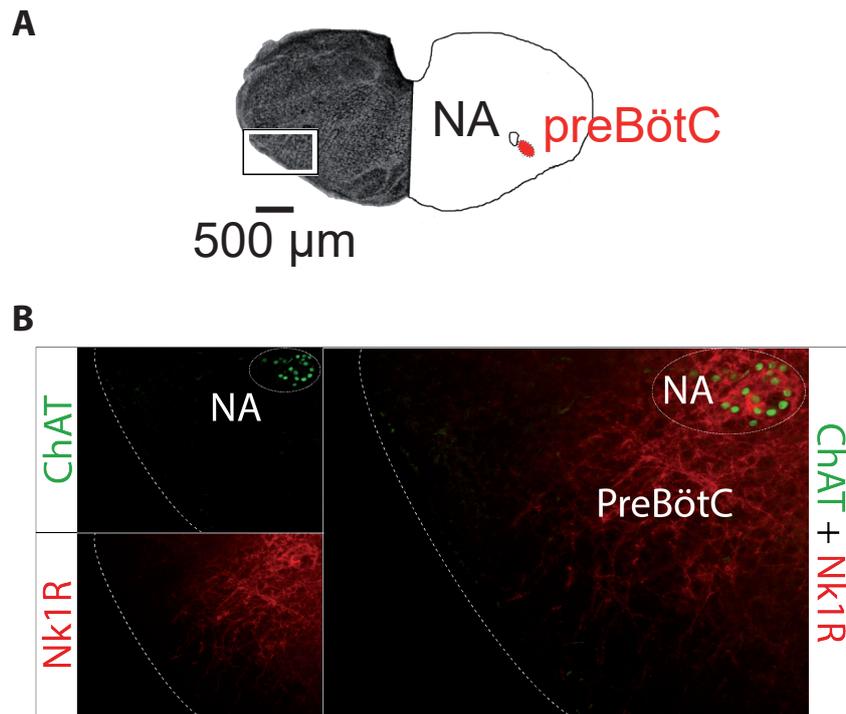
Les activités bioélectriques des différentes racines d'intérêt sur la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée *ex vivo* ont été enregistrées avec des électrodes de succion. Elles sont fabriquées à partir de capillaires en verre (diamètre 1,5mm, borosilicate, Harvard Apparatus) à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige). L'extrémité de l'électrode est alors taillée au diamètre de la racine à enregistrer à l'aide d'une pointe diamantée (EMS). L'électrode est ensuite montée sur un micromanipulateur (Narishige) puis remplie de LCRa par aspiration à l'aide d'une seringue. Son extrémité est ensuite approchée de la racine d'intérêt, qui sera alors délicatement aspirée dans l'électrode (**Figure 18**).

Concernant les enregistrements extracellulaires sur les tranches de préBötC, des électrodes de verres ont été fabriquées de la même manière que précédemment. Toutefois, l'enregistrement de l'activité du préBötC nécessite l'obtention d'une électrode d'un diamètre proche de celui du complexe, ainsi qu'un angle de la pointe permettant d'apposer délicatement l'électrode à la surface de la tranche. De nouveau, l'électrode est remplie de LCRa par aspiration, avant son apposition sur le tissu.

Dans les deux cas, le signal électrique acquis à une fréquence de 3 kHz est amplifié (x10 000), filtré (passe-haut 100Hz, passe-bas 1kHz, AM Systems 1700), digitalisé (CED micro1401 mk II) afin d'être visualisé puis enregistré sur ordinateur via le logiciel Spike2 (CED).

## Enregistrement intracellulaire "Patch-Clamp"

L'enregistrement intracellulaire des neurones du préBötC a été effectué à l'aveugle, c'est-à-dire en l'absence de visualisation des neurones au travers d'un microscope. Pour cela, des microélectrodes d'environ 4M $\Omega$  sont étirées (P97, Sutter Instrument) à partir de capillaires de verre (1,2mm de diamètre, borosilicate, WPI), puis remplies d'une solution intracellulaire de composition (en mM): 140 potassium D-gluconate ; 1 CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O ; 10 EGTA ; 2 MgCl<sub>2</sub> ; 4 Na<sub>2</sub>ATP ; 10 HEPES ; et 0,1% biocytine ; pH ajusté à 7,2. Elles sont ensuite montées sur un micromanipulateur (Luigs and Neumann) pour être plongées dans le liquide puis dans le tissu. Des créneaux de courant hyperpolarisant injectés rythmiquement dans l'électrode permettent une mesure de la résistance du tissu et donc d'estimer la proximité des neurones, indiquée également par la présence d'activités électriques. Une légère aspiration suffira alors à coller et ouvrir le neurone, ce retrouvant ainsi en configuration "cellule entière".



### Figure 19: Marquage immunohistochimique du complexe pre-Bötzingier

La révélation du complexe pre-Bötzingier (**preBötC**) sur une tranche de tronc cérébral (schématisée en **A**; le rectangle blanc indiquant la zone visible en **B** à plus fort grossissement) nécessite deux marquages. Le premier marque la choline acétyl-transférase (**ChAT**) en vert (*en haut à gauche*), permettant de révéler les neurones du noyau ambigu (**NA**). Le second met en avant les neurones exprimant la substance P via un marquage du récepteur à la neurokinine 1 (**Nk1R**) en rouge, révélant les neurones du NA et du preBötC (*en bas à gauche*). La superposition des deux images permet révéler le preBötC, ce dernier étant marqué uniquement en rouge (Nk1R). Clichés réalisés sur un microscope à épifluorescence.

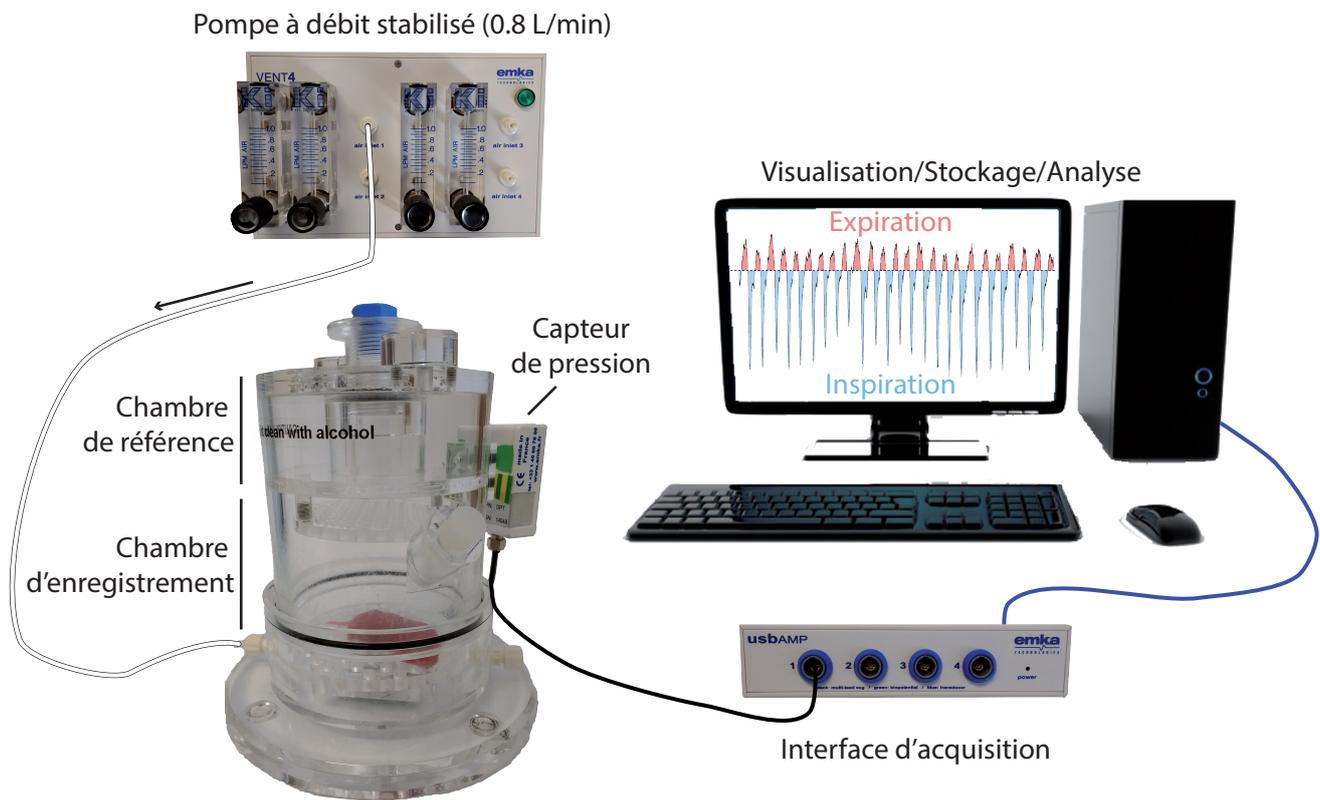
L'identification des neurones respiratoires est faite par la présence d'une bouffée de potentiels d'action dans le neurone, générée en synchronie avec celle du préBötC (activité extracellulaire). De nouveau, le signal acquis à une fréquence de 10kHz est amplifié et filtré (Multiclamp700B, Axon Instruments), digitalisé (Digidata 1550B, Axon Instrument), visualisé et enregistré sur ordinateur (pClamp10, Axon Instrument) pour analyse ultérieure.

## Techniques neuroanatomiques

Suite aux enregistrements électrophysiologiques sur tranches de tronc cérébral, des marquages immuno-histochimiques ont été réalisés afin de visualiser le préBötC, mais également l'emplacement des neurones enregistrés en patch-clamp, grâce à la biocytine contenue dans la microélectrode d'enregistrement.

Pour révéler le préBötC, deux marquages sont nécessaires (**Figure 19**). Le premier marquage de la choline acétyltransférase (ChAT) permet de révéler les motoneurones contenus dans le noyau ambigu (NA). Le second marquage des récepteurs à la neurokinine 1 (NK1R) permet d'identifier les récepteurs à la substance P, que l'on retrouve à la fois dans le NA et dans le préBötC. Ce dernier sera donc marqué par le NK1R, mais pas par la ChAT, permettant ainsi de révéler sa localisation.

Les tranches de tronc cérébral contenant le préBötC sont alors fixées par immersion dans le paraformaldéhyde (PFA à 4% ; 4°C pendant 2h), rincées dans du PBS-sucrose (sucrose à 20% ; à 4°C pendant 12h) puis congelées dans l'isopentane (-43°C). La préparation est alors recoupée en tranches de 30µm dans un cryostat, rincées de manière répétée dans le PBS (10min, 3 fois), saturées dans un mélange PBS/triton (0,3% ; BSA 1%) pendant 1h30, puis incubées toute la nuit à température ambiante avec les anticorps primaires anti-NK1R lapin (1:10000, Millipore) et anti-ChAT chèvre (1:100, Millipore). Les tranches sont de nouveau rincées dans le PBS (15min, 3 fois) puis incubées pendant une heure avec les anticorps secondaires âne anti-lapin (Alexa 568, 1:500), âne anti-chèvre (Alexa 647, 1:300) et streptavidine-fluoresceine (Alexa 488, 1:300). Enfin, après un dernier rinçage dans le PBS (15min, 3 fois), les tranches sont montées entre lames et lamelles dans du Vectashield® Hard Set afin de permettre leur observation et acquisition sous microscope confocal (Olympus FV5-102). Les images sont ensuite assemblées et corrigées dans les logiciels Olympus Fluoview, Adobe Photoshop et Adobe Illustrator.



**Figure 20: Représentation schématique du dispositif expérimental de pléthysmographie**

L'activité respiratoire de l'animal placé dans la chambre d'enregistrement est mesurée via un capteur de pression, mesurant également les conditions atmosphériques dans la chambre de référence (les deux étant indépendantes). Le signal est ensuite envoyé à une interface d'acquisition puis à un ordinateur pour la visualisation, le stockage et l'analyse des données. Par convention, les inspirations sont représentées par des valeurs négatives (en bleu) et les expirations par des valeurs positives (en rouge). Enfin, une pompe à débit stabilisé permet le renouvellement de l'air dans la chambre d'enregistrement, assurant le maintien du taux d'oxygène, d'humidité et de la température à l'intérieur de celle-ci.

## Expériences *in vivo*

### Exposition chronique aux NPs ZnO au cours de la gestation

Afin d'étudier l'effet des nanoparticules sur le développement et la mise en place des réseaux moteurs, des expériences d'exposition chronique aux NPs de rattes gestantes ont été effectuées. Pour cela, dans les locaux de l'animalerie du laboratoire, des femelles sont isolées après accouplement puis partagées en trois groupes. Afin de s'assurer des meilleures chances possibles d'accouplement, les femelles subissent un frottis vaginal à l'aide d'un coton tige. Après étalement du contenu du frottis sur une lame de microscope, l'observation de cellules épithéliales cornifiées permet d'identifier que la femelle est en période d'œstrus et donc apte à l'accouplement. Le premier groupe dit "Sham" reçoit des injections intrapéritonéales (IP) de sérum physiologique (NaCl 0,9% injectable). Ce groupe permet de s'assurer, lors de la comparaison des résultats, que les effets éventuels soient bien dus aux NPs et non résultants de l'injection seule (effet du stress de la manipulation par exemple). Le second groupe reçoit quant à lui une dose de NP ZnO de 20 mg/kg, et le troisième de 40 mg/kg. Dans les 3 groupes, la dose est adaptée au poids de l'animal: pour un même poids, le même volume de liquide est injecté (entre 0,8 et 1,3 mL), et ce quel que soit le groupe expérimental. Enfin, l'injection est répétée aux 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 17 et 19<sup>ème</sup> jours de gestation, cette dernière étant en moyenne de 21 jours chez le rat Sprague-Dawley.

### Enregistrements pléthysmographiques

À la suite des injections, l'activité ventilatoire des rats nouveau-nés a été évaluée *in vivo* sur animal se comportant normalement grâce à l'utilisation de la pléthysmographie (**Figure 20**). Cet appareil se présente sous la forme d'un dispositif comportant deux chambres indépendantes l'une de l'autre, les deux chambres étant reliées à un capteur de pression différentiel. La première permet de mesurer la pression atmosphérique tout en amortissant, et donc limitant, les perturbations locales de pression (liées au courant d'air par exemple) qui pourraient perturber les enregistrements. L'animal est quant à lui placé dans la seconde chambre, dont l'air est renouvelé en permanence par une pompe réglée à un débit constant de 0,8 L/min. Le débit doit être parfaitement stabilisé, le renouvellement d'air permettant ainsi d'enregistrer l'activité ventilatoire des animaux pendant 10 minutes sans risque pour leur survie (anoxie ou hypercapnie sévère), mais également d'éviter une élévation de la

température et de l'humidité dans la chambre qui pourrait perturber la qualité des enregistrements.

La pléthysmographie permet de quantifier les rythmes et volumes respiratoires. Après acquisition du signal par l'ordinateur via une interface analogique/digitale à une fréquence de 1KHz, le logiciel (IOX, Emka) soustrait la pression atmosphérique à celle de la chambre d'enregistrement, puis calcule le volume d'air inspiré ou expiré par l'animal. Par convention, les inspirations sont représentées par des volumes négatifs, les expirations par des volumes positifs. L'injection d'un volume d'air connu dans la chambre de l'animal (en l'absence de celui-ci) à l'aide d'une seringue (10 mL) permet de calibrer l'appareil avant chaque expérience.

## Caractérisation des nanoparticules

### Microscopie électronique en transmission

Afin de déterminer les caractéristiques des NP ZnO contenues dans la solution utilisée, un échantillon de la suspension commerciale (Sigma Aldrich) est dilué 10 fois, puis une goutte est déposée sur un film de carbone supporté par une grille en cuivre. L'excédent de liquide est alors éliminé à l'aide d'un papier filtre et la grille est disposée dans un microscope électronique en transmission (Hitachi H-600). Les clichés obtenus sont alors analysés pour déterminer la taille et la forme des NPs en présence.

### Spectromètre d'absorption atomique à flamme

Dans le but de quantifier la concentration de zinc libre ( $Zn^{2+}$ ) possiblement relargué par les NP ZnO, du LCRa (bullé au carbogène, chauffé à 30°C) contenant différentes concentrations en NPs (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) est récupéré puis centrifugé (10 000 rpm pendant 15 min) afin d'éliminer les NPs non dissociées. Le surnageant contenant les ions  $Zn^{2+}$  libres est ensuite analysé par spectrométrie d'absorption atomique à flamme (ThermoFischer iCE™ 3300 AAS). Le LCRa seul sans nanoparticule est utilisé comme contrôle négatif ("Blanc"). Avant chaque expérience, une courbe étalon est réalisée à partir de solutions de différentes concentrations de zinc dissous (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mg/L).

## Analyses et statistiques

### Activité respiratoire

L'activité extracellulaire, que ce soit sur tronc cérébral/moelle épinière isolé ou sur tranches, est effectuée à partir des tracés intégrés, c'est-à-dire rectifiés (mise en valeur absolue) et intégrés ("Smooth",  $\tau = 0,2$  sec) à l'aide du logiciel Spike2 (CED). Exportées dans Excel 2016 (Microsoft), l'analyse des valeurs de fréquence, de durée et d'amplitude respiratoire est réalisée.

Concernant l'activité intracellulaire des neurones du préBötC, l'analyse des données issues de pClamp 10 (Axon), à savoir la valeur du potentiel de membrane au repos et au cours de l'exposition aux NPs ZnO, l'excitabilité des neurones (nombre de PAs/sec lors de l'injection d'un créneau de courant dépolarisant), les propriétés du potentiel d'action (amplitude et durée) et de la commande inspiratoire (amplitude), est effectuée après exportation dans Excel 2016 (Microsoft).

Concernant les données issues de la pléthysmographie, l'analyse de la fréquence et des pauses respiratoires est effectuée de la même manière que pour l'activité extracellulaire, mais après exportation des données de IOX (Emka), vers Spike2 (CED) pour la détection des événements, puis analyse dans Excel 2016 (Microsoft).

### Activité locomotrice

Cette activité possède deux caractéristiques principales: la période du cycle locomoteur (fictif), c'est-à-dire le délai entre deux bouffées d'une même racine, et les relations de phases représentant le délai normalisé (alternance vs synchronie) entre les activités de deux racines motrices (e.g. flexion vs extension, gauche vs droite). Dans chaque condition expérimentale, 60 secondes de l'enregistrement sont extraites aléatoirement des épisodes de locomotion fictive. Les enregistrements sont ensuite filtrés (passe-haut 50Hz, passe-bas 5kHz), rectifiés et intégrés avant d'être analysés à l'aide d'un programme Matlab (Mathworks) développé au sein du laboratoire. Ce dernier calcule la période du cycle locomoteur et les relations de phase en se basant sur la détection du début de la bouffée. Par convention, l'une des racines lombaire L2 est toujours utilisée comme référence pour ces calculs (détection du début des bouffées, du cycle et donc de la période locomotrice). La valeur de phase, comprise entre 0 et

1, est obtenue en effectuant le rapport délai/période locomotrice, comme représenté sur le schéma. À la manière d'une horloge, une valeur proche de 0 ou de 1 signifie que les deux activités sont synchrones, une valeur proche de 0,5 indique que les deux activités sont alternées. Ces relations sont ensuite représentées sous forme circulaire (Matlab).

## Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SigmaPlot 11 (Systat). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Pour comparer la moyenne entre deux groupes, un t-test de Student ou un test de Mann-Whitey pour les distributions non-normales ont été utilisés. Pour comparer plus de 2 groupes, une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Tukey ou une ANOVA *on ranks* (test de Kruskal Wallis) suivi d'un test post-hoc de Dunn ont été réalisés. La comparaison de paramètres avant/après application d'une substance ou de NPs est effectuée à l'aide d'un t-test de Student dit pairé, ou un test de Wilcoxon pour les distributions non normales. La différence est considérée statistiquement significative pour une valeur de p inférieure à 0,05.

## Résultats

# Chapitre I: Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de zinc

## Résumé

Les nanoparticules peuvent avoir des formes, des tailles et des compositions différentes. En fonction de ces paramètres, leurs propriétés physico-chimiques et donc leurs effets notamment sur les tissus biologiques peuvent être multiples. Afin de caractériser les NPs ZnO utilisées dans nos études, la microscopie électronique à transmission a été couplée à la spectrométrie d'absorption de masse. Les résultats montrent que les NPs ZnO sont de forme plutôt sphérique, et possèdent une taille moyenne de  $34 \pm 2$  nm. De plus, une fraction de NPs se décompose en ions zinc libres dont la concentration, comprise entre 8 et 32  $\mu\text{M}$  n'excède jamais celles connues pour déclencher des effets biologiques.

## Introduction

Compte tenu de leur diversité, les nanoparticules se distinguent par leurs formes (arrondies, tubulaires...), leur composition (argent, carbone, cuivre, silice, titane, zinc...) et leur taille (pour revue [\(Bhatia 2016\)](#)). Ces multiples différences leur confèrent par conséquent des propriétés particulières telles que par exemple des propriétés antibactériennes (pour l'argent ou le zinc [\(Wang et al. 2017\)](#)) ou encore anti-UV (pour le titane ou le zinc [\(Smijs et Pavel 2011\)](#)). Une simple variation de sa taille peut suffire à modifier la distribution [\(Wang et al. 2007\)](#) ou l'efficacité [\(Raghupathi et al. 2011\)](#) d'une nanoparticule. C'est pourquoi il est nécessaire de caractériser précisément le type, la taille et la forme des NPs utilisées. Compte tenu de leurs effets délétères précédemment rapportés par différents auteurs, sur les conductances ioniques [\(Zhao et al. 2009\)](#), sur l'activité neuronales [\(Valdiglesias et al. 2013\)](#) ou sur le comportement [\(Han et al. 2011\)](#) et de leur présence dans divers produits de notre quotidien [\(Vaseem 2010\)](#), nous avons centré notre étude sur les nanoparticules d'oxyde de zinc (NPs ZnO). Se présentant le plus souvent sous forme de suspension, les NPs ZnO sont connues pour être pratiquement insolubles dans l'eau, mais capable de relarguer une fraction non négligeable d'ions zinc (jusqu'à 10%, [\(Reed et al. 2012\)](#)) qui, même en très faible concentration, pourraient avoir un effet au niveau biologique.

Le but de ce travail vise à caractériser les nanoparticules utilisées dans cette étude. Pour cela, nous avons combiné deux techniques telles que la microscopie électronique en transmission pour l'observation de la morphologie des NPs ZnO, et la spectrométrie d'absorption atomique de flamme pour mesurer la quantité d'ions zinc dissous issus de ces NPs.

## Matériels et Méthodes

La microscopie électronique en transmission (MET) permet la caractérisation de la forme et de la taille des NPs par détection des électrons transmis par l'échantillon placé sur le support. Les NPs ZnO étant métalliques, leur observation ne nécessite pas l'emploi de produit contrastant.

La spectrométrie d'absorption atomique à flamme (AAS-F) permet quant à elle la détection et la mesure de la concentration de zinc d'un échantillon. Les NPs étant restées dans le culot lors de la centrifugation, seule la concentration en zinc libre est mesurée. Pour cela, l'échantillon est aérosolisé avant de passer dans une flamme oxyacétylénique ( $\approx 2300^\circ\text{C}$ ). Le changement d'absorbance de la flamme lors du passage de l'échantillon permet la mesure de la concentration par comparaison avec une courbe étalon préalablement déterminée.

*L'ensemble des protocoles est détaillé dans le chapitre "Matériels et Méthodes" général (page 74).*

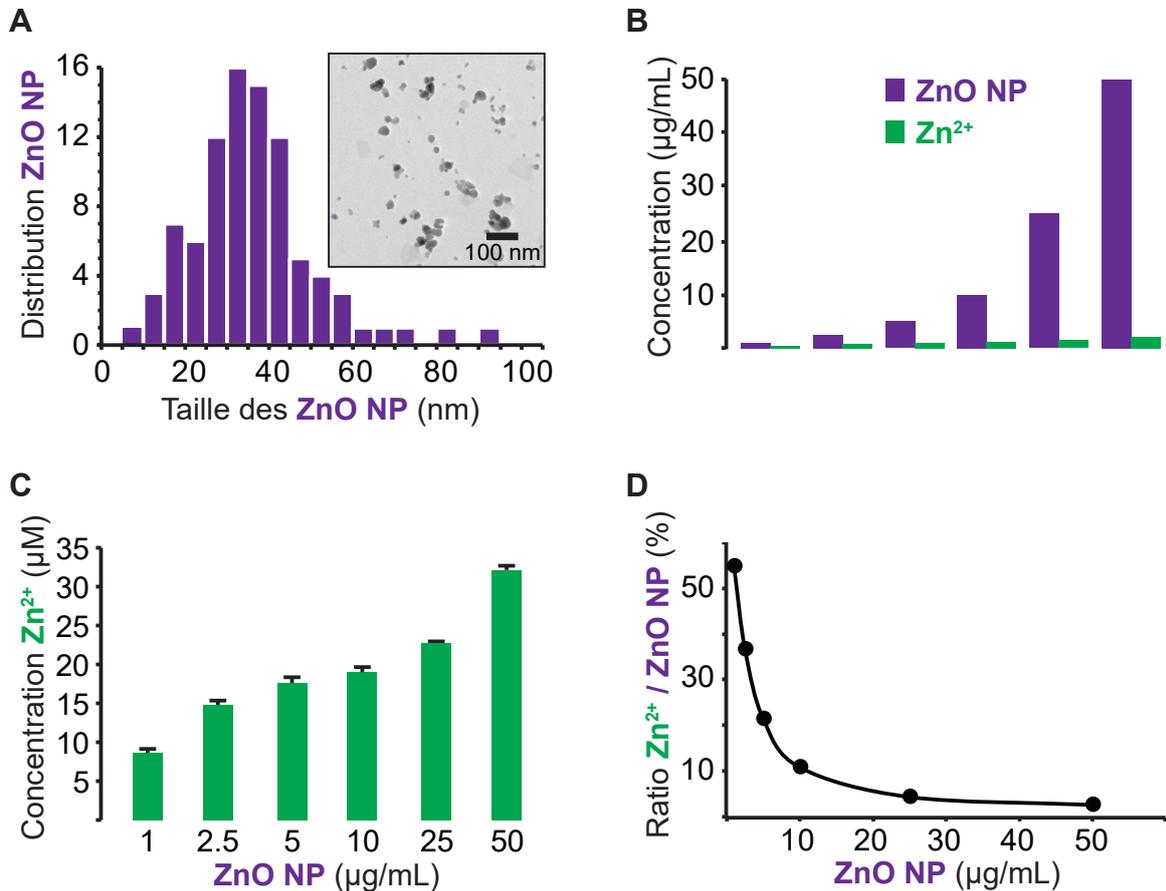
## Résultats

### *Nanoparticules d'oxyde de zinc: forme et taille*

Afin de déterminer la forme et la taille des NPs ZnO, une dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la solution mère est réalisée puis des clichés sont effectués en MET. Sur ces derniers, nous avons observé que les NPs ZnO présentent une forme plutôt sphérique, et peuvent s'agréger entre-elles (**Figure 21A**). Après quantification, nous observons un diamètre compris entre 6 et 89 nm, avec une moyenne à  $34\pm 2$  nm, en accord avec la fiche technique du fabricant ( $\leq 40$  nm).

### *Mesure de la quantité d'ions zinc relarguée par les nanoparticules*

La possible décomposition chimique des NPs ZnO pourrait contribuer à l'augmentation de la concentration d'ions zinc libre ( $\text{Zn}^{2+}$ ) dans la solution saline utilisée dans nos expériences. Afin de tester cette possibilité, nous avons utilisé la spectrométrie d'absorption atomique de



**Figure 21: Caractérisation des NPs ZnO et quantification des concentrations en ions Zn<sup>2+</sup> relargués**

**(A)** Distribution de la taille des NPs ZnO, et microphotographie au microscope électronique en transmission (*Insert*)

**(B)** Diagramme en bâtons montrant la décomposition en ions Zn<sup>2+</sup> en fonction de la concentration en NPs ZnO.

**(C)** Diagramme en bâtons des concentrations en ions Zn<sup>2+</sup> relargués pour chaque concentration en NPs ZnO. Valeurs en moyenne ± SEM.

**(D)** Courbe représentant le ratio Zn<sup>2+</sup>/NPs ZnO en fonction de la concentration en NPs ZnO.

flamme pour déterminer la concentration en  $Zn^{2+}$  dans les surnageants suite à la centrifugation des différentes solutions de LCRa contenant les nanoparticules. Une augmentation de la concentration dose-dépendante en  $Zn^{2+}$  a pu être détectée pour les solutions salines oxygénées contenant 1 à 50  $\mu\text{g/mL}$  de NPs ZnO (**Figure 21B**). La concentration en  $Zn^{2+}$  mesurée était comprise entre 0,5 et 2,1  $\mu\text{g/mL}$ , c'est-à-dire entre 8 et 32  $\mu\text{M}$  (**Figure 21C**). Malgré cette corrélation positive entre la concentration en NPs ZnO et en  $Zn^{2+}$ , le ratio  $Zn^{2+}/\text{NPs ZnO}$  diminue avec l'augmentation de la concentration en nanoparticules, pour se stabiliser aux alentours de 4% à 50  $\mu\text{g/mL}$  de NPs ZnO (**Figure 21D**). Ces données montrent que, dans nos conditions expérimentales, seulement une fraction très limitée de la suspension de NPs ZnO se décompose en zinc libre.

## Discussion

### *Taille des nanoparticules: un facteur essentiel*

Étudier les effets des NPs sur le système nerveux central (SNC) nécessite de s'interroger sur les mécanismes de translocation de ces particules potentiellement impliqués dans leur accumulation au sein des régions cérébrales. Il a déjà été rapporté que les NPs inhalées pouvaient rejoindre le SNC en traversant la barrière épithéliale et alvéolo-capillaire le long de l'arbre respiratoire, mais également en empruntant le mode de transport rétrograde axonal le long des nerfs olfactif, trijumeau et vague (Oberdorster *et al.* 2009, Kreyling 2016). Il est maintenant admis que le taux et l'étendue de la translocation des NPs dans l'organisme dépend fortement de plusieurs facteurs, et notamment leur forme ou leur taille. Par exemple, les nanoparticules comprises entre 20 et 30 nm sont connues pour induire une forte perturbation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) chez le rat (Sharma *et al.* 2013). De plus, plusieurs études menées chez les rongeurs ont montré que la translocation des nanoparticules du tractus respiratoire vers d'autres organes tels que le cerveau, est facilitée pour des particules ayant une taille comprise entre 30 et 100 nm, et ce pour plusieurs types de NPs : carbone (Oberdorster *et al.* 2004), or (Yu *et al.* 2007), oxyde de manganèse (Elder *et al.* 2006), dioxyde de titane (Wang *et al.* 2008) et oxyde de zinc (Kao *et al.* 2012, Cho *et al.* 2013). Sur cette base, nous pouvons donc raisonnablement penser que lors d'une exposition chronique par inhalation, les NPs ZnO utilisées dans cette étude pourraient être capables de rejoindre différentes régions du SNC.

Concernant l'impact potentiel des nanoparticules sur le système nerveux, plusieurs études ont montré que les neurones exposés présentent des dommages cellulaires pouvant affecter les fonctions cérébrales. Par exemple, le nano-oxyde de cuivre ([An et al. 2012](#)), le dioxyde de silicone ([Sun et al. 2016](#)), et les NPs ZnO ([Han et al. 2011](#)) sont capables d'induire des changements sur la potentialisation à long terme hippocampique lors de l'exposition de rats, associés à une réduction significative dans l'apprentissage et la mémoire due à des altérations de la plasticité synaptique. De la même manière, le nano-dioxyde de manganèse provoque un dysfonctionnement des neurones dopaminergiques chez les rats traités, conduisant à l'altération des capacités d'apprentissage spatial ([Li et al. 2014](#)).

#### *Rôle et implication du zinc libre*

Le zinc est naturellement retrouvé dans l'organisme dans la mesure où il est impliqué dans plusieurs processus cellulaires. Il est par exemple nécessaire à la fonction catalytique de certaines enzymes, dans la conformation et la stabilisation de protéines, mais aussi dans certains processus de transcription ([Coleman 1992](#)). Au niveau du système nerveux central, le zinc est retrouvé dans certaines régions cérébrales comme l'hippocampe, le néocortex, l'hypothalamus, l'amygdale ou encore le bulbe olfactif ([Ono et Cherian 1999](#)). Présent dans les vésicules synaptiques de certains neurones, via la pompe spécifique ZnT-3 ([Palmiter et al. 1996](#)), le zinc est impliqué dans la modulation de la transmission synaptique. En effet, il est capable d'agir directement sur certains récepteurs synaptiques qu'ils soient excitateurs (NMDA, AMPA) ou inhibiteurs (GABA, glycine). Concernant les récepteurs AMPA, l'effet du zinc est dépendant de sa concentration: une faible concentration (50 à 300  $\mu$ M) potentialise les courants médiés par les récepteurs AMPAs alors qu'une concentration plus importante (1 à 3 mM) provoque une inhibition de ces mêmes récepteurs ([Mayer et al. 1989](#), [Bresink et al. 1996](#)). Néanmoins, une partie de ces récepteurs est insensible au zinc ([Lin et al. 2001](#)). Une concentration de 100  $\mu$ M de zinc permet de complètement bloquer l'activité neuronale induite par l'ajout de NMDA ou de glycine sur des cultures de neurones olfactifs de rats ([Trombley et Shepherd 1996](#)) et peut aussi diminuer les courants inhibiteurs portés par les récepteurs GABAergiques ([Smart et al. 1994](#)). Le zinc est également capable d'agir directement sur certaines conductances ioniques voltage dépendantes. En effet, une concentration de 50  $\mu$ M est capable d'inhiber de manière réversible 85% des conductances calciques voltage dépendantes ([Easaw et al. 1999](#)). Concernant les conductances sodiques

voltage dépendantes, une faible concentration en zinc libre (0,1  $\mu\text{M}$ ) augmente l'amplitude et les cinétiques d'activation/inactivation du canal, alors qu'une forte concentration (100  $\mu\text{M}$ ) inhibe 33% du courant sodique entrant (Delgado et al. 2006). Enfin, sur les canaux potassiques, le zinc va décaler les seuils d'activation et d'inactivation de manière concentration dépendante (1 à 1000  $\mu\text{M}$ ), modifiant la cinétique d'ouverture et de fermeture du canal (Bardoni et Belluzzi 1994).

En plus de tous ces rôles physiologiques, le zinc libre est aussi connu pour être impliqué dans la physiopathologie lors de graves dommages au niveau cérébral, mais aussi dans certaines maladies neurodégénératives (pour revue, voir (Frederickson et al. 2005)), l'excès de  $\text{Zn}^{2+}$  dans les tissus organiques étant reconnu toxique (Choi et Koh 1998). En effet, dans la maladie d'Alzheimer, le zinc serait responsable de la précipitation de la protéine bêta-amyloïde et donc de la formation des plaques amyloïdes, la concentration en zinc et en transporteurs spécifiques y étant très élevée (Zhang et al. 2008a, Braidy et al. 2017). En oncologie, le taux tissulaire de zinc augmente (sein) ou diminue (prostate, foie, cerveau, poumon,...) avec le développement de la tumeur, perturbant le fonctionnement cellulaire mais également certains mécanismes de transcription, pouvant aboutir à des mutations génétiques provoquant la prolifération des cellules cancéreuses (Hrabeta et al. 2016).

Ainsi, compte tenu de la présence de zinc libre dans nos expériences (voir Chapitre II, III et IV des résultats), on ne peut pas totalement exclure un effet de ces ions. Néanmoins, à notre connaissance, la cytotoxicité induite par les ions zinc n'a été reportée que pour des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$ . Par exemple, l'exposition des neurones corticaux à 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  est suivie d'une perte de 50% de l'ATP intracellulaire (Marin et al. 2000), la mort de ces neurones n'intervenant qu'à partir de 300  $\mu\text{M}$  (Yokoyama et al. 1986). Une concentration supérieure à 100  $\mu\text{M}$  va complètement inhiber l'ATP de la kinésine, perturbant très fortement le transport et donc de nombreux mécanismes cellulaires (Bohm 2017). Dans les cellules de neuroblastome humain, une diminution significative de la viabilité cellulaire n'a été observée que pour des concentrations en ions zinc supérieures à 600  $\mu\text{M}$  (Valdiglesias et al. 2013). Au vu des concentrations mesurées dans nos expériences (32  $\mu\text{M}$  maximum dans le LCRA), nous pouvons raisonnablement conclure que les effets que pourraient provoquer les NPs ZnO dans nos expériences ne seraient vraisemblablement pas dus à la présence de zinc libre.

# Chapitre II: Effets des NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale

## Résumé

Grâce à leur taille extrêmement réduite, les nanoparticules sont capables de passer les différentes barrières biologiques, dont la barrière hémato-encéphalique, s'accumuler dans différents organes et pourraient également causer des maladies diverses. Elles peuvent donc potentiellement s'agréger dans le cerveau et induire des dommages neuronaux. Malgré les études ayant déjà reportées les effets des NPs sur les propriétés bioélectriques des neurones, leur possible influence sur le fonctionnement d'un réseau neuronal n'a pas été documentée. Le but de notre travail a donc été d'étudier les effets d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur les réseaux centraux responsables de la genèse du rythme respiratoire chez les mammifères. Pour cela, nous avons utilisé des préparations réduites de tronc cérébral/moelle épinière isolés *ex vivo* de rat nouveau-né, dans lesquelles le réseau respiratoire central reste intact. Nous avons montré que les NPs ZnO accélèrent et perturbent fortement l'activité respiratoire produite par le complexe pre-Bötzinger, responsable de la genèse de l'activité inspiratoire. De plus, cette accélération est suivie d'un arrêt soudain et définitif de l'activité respiratoire lors de l'exposition aux NPs ZnO. En utilisant des tranches de tronc cérébral contenant le préBötC, les enregistrements de patch clamp en mode cellule entière montrent que les NPs ZnO dépolarisent les neurones inspiratoires du préBötC et perturbent leurs propriétés bioélectriques aboutissant à une réduction significative de l'amplitude des potentiels d'action. La résultante de ces effets est une forte dépression de l'activité de l'ensemble du réseau respiratoire et un arrêt prématuré et définitif du rythme respiratoire. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un effet neurotoxique et délétère des NPs ZnO sur l'activité des centres respiratoires chez le rat en période postnatale.

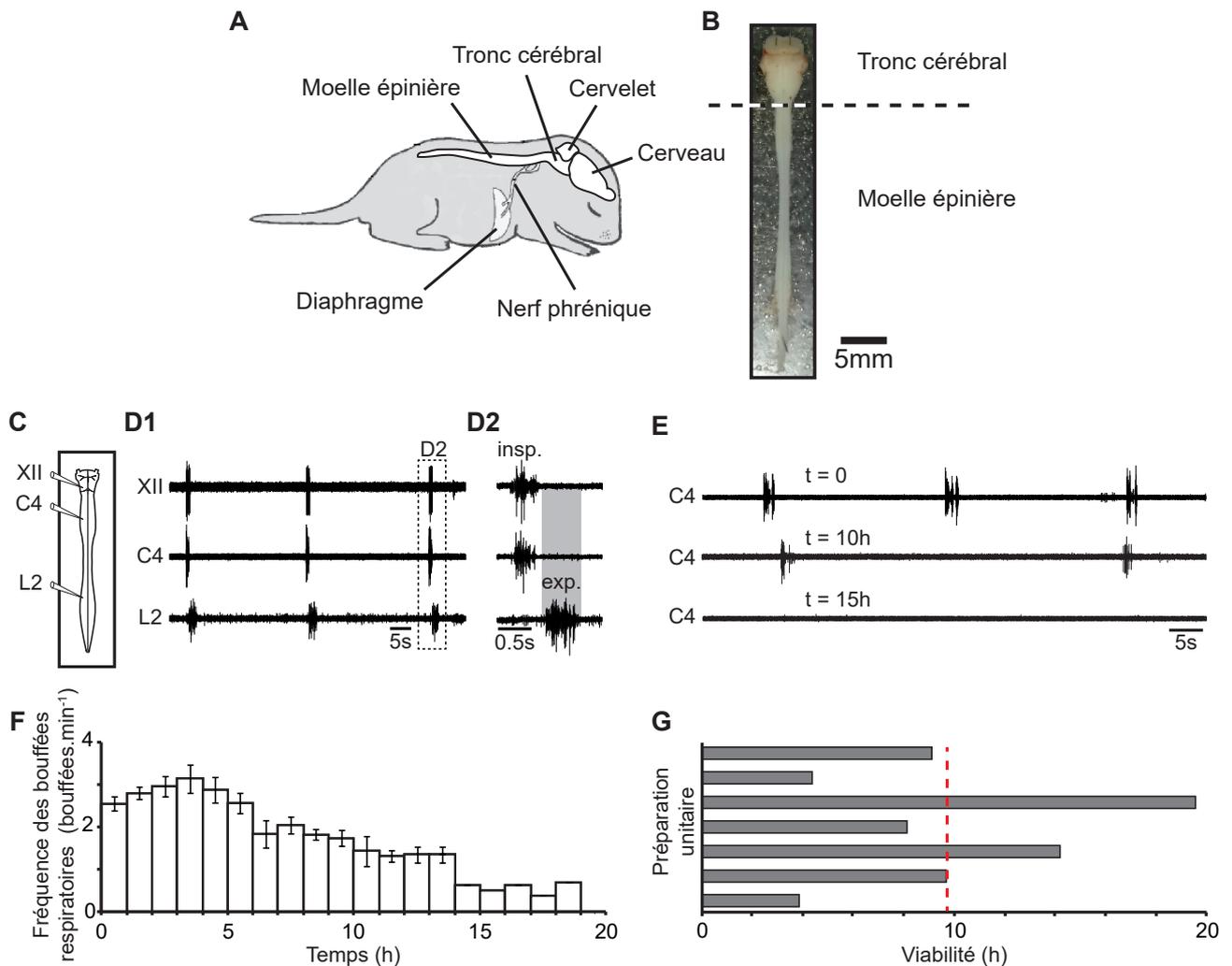
## Introduction

La recherche dans le domaine des nanotechnologies et des NPs s'est rapidement développée, de manière quasiment exponentielle, surtout durant les dernières décennies. Les propriétés uniques des NPs ont permis le développement de nouveaux produits aux caractéristiques inédites dans un grand nombre de domaines, tels que l'informatique, l'électronique, les énergies, l'aérospatiale, l'agroalimentaire, les cosmétiques, la pharmacie et la médecine (Бузеа et al. 2007). De par leur taille extrêmement réduite (<100 nm), les NPs peuvent entrer facilement dans l'organisme par diverses voies (le système respiratoire étant considéré comme l'une des principales voies d'entrée (Oberdorster et al. 2004, Elder et al. 2006, Kao et al. 2012)), et passer différentes barrières biologiques telles que la barrière hémato-encéphalique (Lockman et al. 2003b, Lockman et al. 2004, Sarkar et al. 2017). En conséquence, les NPs sont capables de s'accumuler dans le cerveau (Simko et Mattsson 2010) et pourraient être à l'origine de divers troubles et/ou pathologies cérébrales.

Parmi toutes ces nanoparticules, celles d'oxyde de zinc font parties des plus largement utilisées parmi les NPs métalliques. On les retrouve dans des domaines très variés, comme par exemple l'électronique (Wang 2008), l'agroalimentaire (Tankhiwale et Bajpai 2012), ou encore les cosmétiques (Vaseem 2010). En conséquence, l'exposition de la population (produits de consommation) et des travailleurs (NPs manufacturées) est en constante progression. Pourtant, les effets possiblement délétères des NPs sur la santé, et en particulier sur le système nerveux central, restent extrêmement peu documentés.

En effet, nous savons déjà que les NPs ZnO peuvent induire, entre autres, au niveau cellulaire, une augmentation de la mort neuronale (Valdiglesias et al. 2013) et astrocytaire (Lai et al. 2008), une augmentation du stress oxydatif (Shrivastava et al. 2014) ou encore une modification des propriétés intrinsèques des neurones (Yang et al. 2010). Des effets comportementaux, tels qu'une baisse de la mémoire et de l'apprentissage, ont pu être mis en évidence chez le rat (Han et al. 2011). Néanmoins à ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur l'effet de ces NPs sur l'activité d'un réseau moteur vital comme le réseau respiratoire central.

Le but de ce travail vise à déterminer les effets d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur les activités bioélectriques des neurones des centres respiratoires, contrôlant en particulier la



**Figure 22: La préparation ex vivo de rat nouveau-né utilisée pour l'étude de la neurotoxicité des ZnO NPs**

(A) Représentation schématique du système nerveux central d'un rat nouveau-né.

(B) Photographie de la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolé dans sa chambre d'enregistrement.

(C) Représentation schématique de la préparation isolée avec la localisation des enregistrements extracellulaires, au niveau de nerfs ventraux hypoglosse (XII), cervical (C4) et lombaire (L2).

(D1) Enregistrements de l'activité respiratoire spontanée au niveau du nerf crânien XII, et des racines ventrales C4 et L2. Le tracé agrandi à droite (D2) montre l'alternance claire entre les bouffées d'activités spontanées inspiratoires (XII et C4) et expiratoires (L2). Notez qu'en condition contrôle (c'est-à-dire lors de la perfusion de la préparation avec du LCRa normal), l'activité respiratoire spontanée peut être enregistrée pendant plusieurs heures avant son arrêt définitif (E).

(F) Histogramme montrant l'évolution de la fréquence respiratoire fictive au cours du temps en condition contrôle. Données représentées en moyenne  $\pm$  SEM (n=7 préparations).

(G) Diagramme en bâton montrant pour chaque préparation le temps pendant lequel elles ont exprimé une activité rythmique de type respiratoire. La ligne pointillée rouge indique la valeur moyenne de survie des préparations.

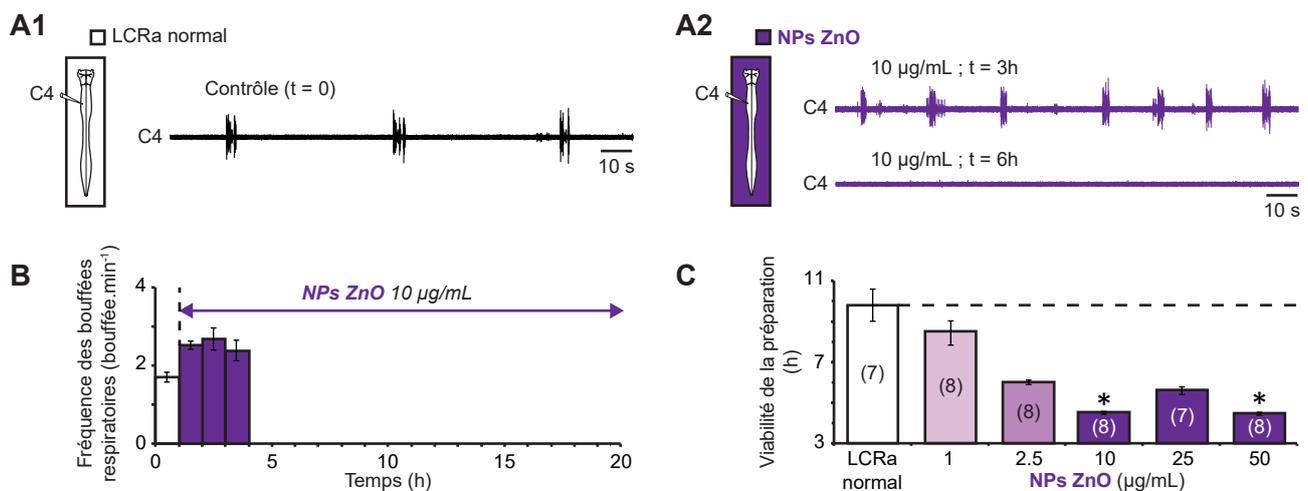
contraction rythmique du diaphragme chez le mammifère. Grâce à l'utilisation d'une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolé *ex vivo* de rat nouveau-né, nous avons pu, pour la première fois, montrer les effets délétères et neurotoxiques des NPs ZnO sur l'activité du réseau respiratoire central, leur action aboutissant à un arrêt brutal et définitif de l'activité respiratoire.

## Matériels et Méthodes

*L'ensemble des protocoles est détaillé dans le chapitre "Matériels et Méthodes" général (page 65).*

*Préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés et électrophysiologie.* Afin d'étudier l'effet des nanoparticules sur l'activité respiratoire, la préparation de tronc cérébral/moelle épinière de rat nouveau-né isolés *ex vivo* a été utilisée. L'activité respiratoire a été mesurée à l'aide de techniques d'électrophysiologie extracellulaire (électrodes de succion), au niveau du nerf crânien XII (hypoglosse – inspiration) et des racines spinales C4 (diaphragme - inspiration) et L2 (abdominaux – expiration). Pour les préparations exposées aux différentes doses de NPs, un temps contrôle de 30 min avant leur application a été observé afin de mesurer les paramètres initiaux de la préparation. Une barrière étanche de Vaseline a parfois été mise en place afin d'appliquer sélectivement les NPs sur le tronc cérébral ou la moelle épinière.

*Préparation de tranches de tronc cérébral: électrophysiologie et immunohistochimie.* Dans le but d'étudier les effets des NPs sur les neurones des centres respiratoires bulbaires, des préparations de tranches de tronc cérébral contenant le complexe préBötC, isolées à partir de rat nouveau-né, ont été utilisées. L'activité électrique de l'ensemble de ce réseau a été réalisée par électrophysiologie extracellulaire (électrode apposée à la surface de la tranche). L'activité des neurones du préBötC a quant à elle été menée en mode patch-clamp cellule entière (technique dite en aveugle). Sur chaque tranche, le ou les neurones enregistrés ont pu être identifiés par leur patron d'activité et par l'utilisation de techniques immunohistochimiques. Les neurones dont le potentiel de repos était supérieur à -40 mV, dont l'amplitude des PAs était trop faible (absence d'overshoot, c'est-à-dire ne dépassant pas 0 mV) ou dont le marquage n'était pas situé dans le préBötC, étaient systématiquement écartés de l'analyse.



**Figure 23: Effets d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur les bouffées d'activité respiratoire**

**(A1, A2)** Représentations schématiques des conditions expérimentales (gauche) et enregistrement brut de l'activité respiratoire spontanée au niveau d'une racine cervicale ventrale (C4, droite) en condition contrôle **(A1)** et après plusieurs temps d'exposition aux NPs ZnO **(A2)**.

**(B)** Histogramme montrant la variation de la fréquence respiratoire spontanée au cours du temps (moyenne  $\pm$  SEM) en période contrôle (barre blanche) et lors de l'exposition aux NPs ZnO (barres violettes, n= 8 préparations).

**(C)** Diagramme en bâton illustrant l'effet dose dépendant des NPs ZnO sur la longévité de l'activité respiratoire de la préparation (moyenne  $\pm$  SEM). Le nombre de préparations mesurées est indiqué entre parenthèses. \* p<0.05; **LCRa**: Liquide céphalo-rachidien artificiel.

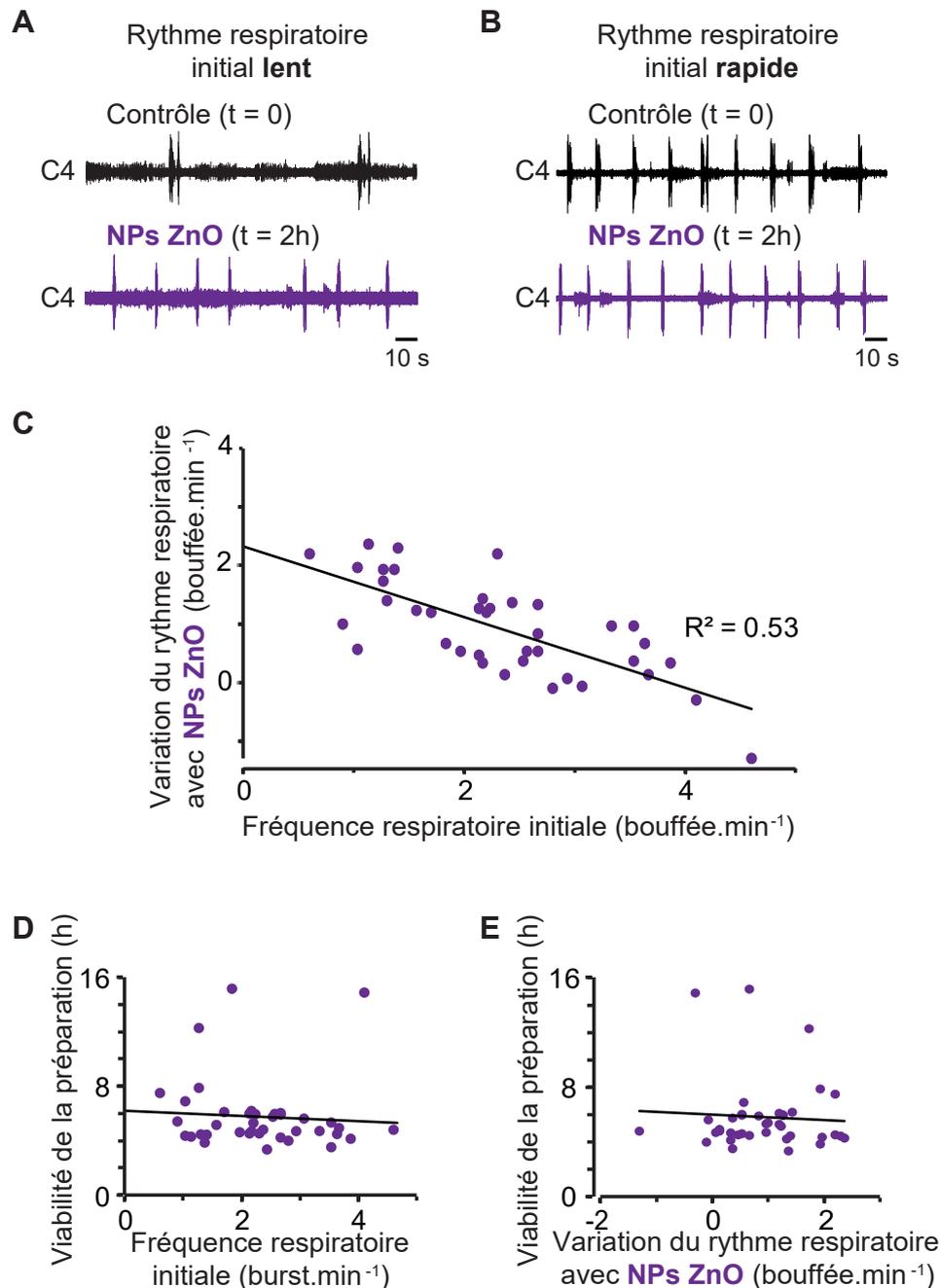
## Résultats

### *L'activité respiratoire fictive*

En condition contrôle, la commande motrice respiratoire générée par la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés (**Figure 22A, B**) présente des épisodes spontanés de bouffées rythmiques de potentiels d'action, que ce soit au niveau des nerfs crâniens (hypoglosse, XII) ou des racines spinales ventrales (4<sup>ème</sup> cervicale : C4 ; 2<sup>nde</sup> lombaire : L2 ; **Figure 22C, D1**). De manière similaire à l'activité respiratoire observée *in vivo*, des phases inspiratoires et expiratoires sont générées en alternance pendant la respiration fictive *in vitro* (**Figure 22D2**). D'un point de vue fonctionnel, il est considéré que l'inspiration et l'expiration sont issues d'un couplage entre deux générateurs de rythmes localisés tous deux dans le bulbe rachidien, le complexe pré-Bötzinger et le groupe respiratoire para-facial (Janczewski et Feldman 2006). Au cours de nos enregistrements réalisés *in vitro*, la fréquence respiratoire moyenne produite ( $2,5 \pm 0,2$  bouffées/min, n=7 préparations; **Figure 22E, F**) est faible en comparaison de l'activité observée *in vivo* ( $180 \pm 3$  bouffées/min, n=70, **Figure 29A**). Pendant les 6 premières heures d'enregistrement, la fréquence respiratoire est restée stable pour ensuite diminuer progressivement jusqu'à l'arrêt complet et définitif de l'activité, observé après en moyenne  $9h48 \pm 47min$  d'enregistrement (n=7 préparations; **Figure 22E, G**). En résumé, la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés est capable de produire une activité respiratoire fictive et spontanée, 72 fois plus lente que celle observée *in vivo*, mais qui est exprimée de manière stable pendant plusieurs heures par l'intermédiaire d'une activité rythmique inspiratoire et expiratoire retrouvée le long du tronc cérébral et de la moelle épinière.

### *Effets des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité respiratoire centrale*

Pour déterminer l'effet des NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale, les nanoparticules (de 1 à 50  $\mu g/mL$ ) ont été appliquées directement dans le bain de perfusion, sur l'ensemble de la préparation tronc cérébral/moelle épinière isolée. En comparant avec la condition témoin (**Figure 23A1**), la présence de NPs ZnO a de multiples effets sur la sortie respiratoire de la racine ventrale C4. Après une période de 30 minutes d'exposition aiguë aux NPs (10  $\mu g/mL$ ), la fréquence de l'activité respiratoire spontanée augmente significativement de  $70 \pm 17\%$  (n=8;  $p < 0,05$ ; **Figure 23A2**). Cet effet exciteur sur le rythme respiratoire persiste 3-4 heures après le début de l'exposition aux NPs (**Figure 23B**), et est significativement plus



**Figure 24: L'importance de l'augmentation de fréquence respiratoire induite par les NPs ZnO est corrélée à la fréquence respiratoire initiale**

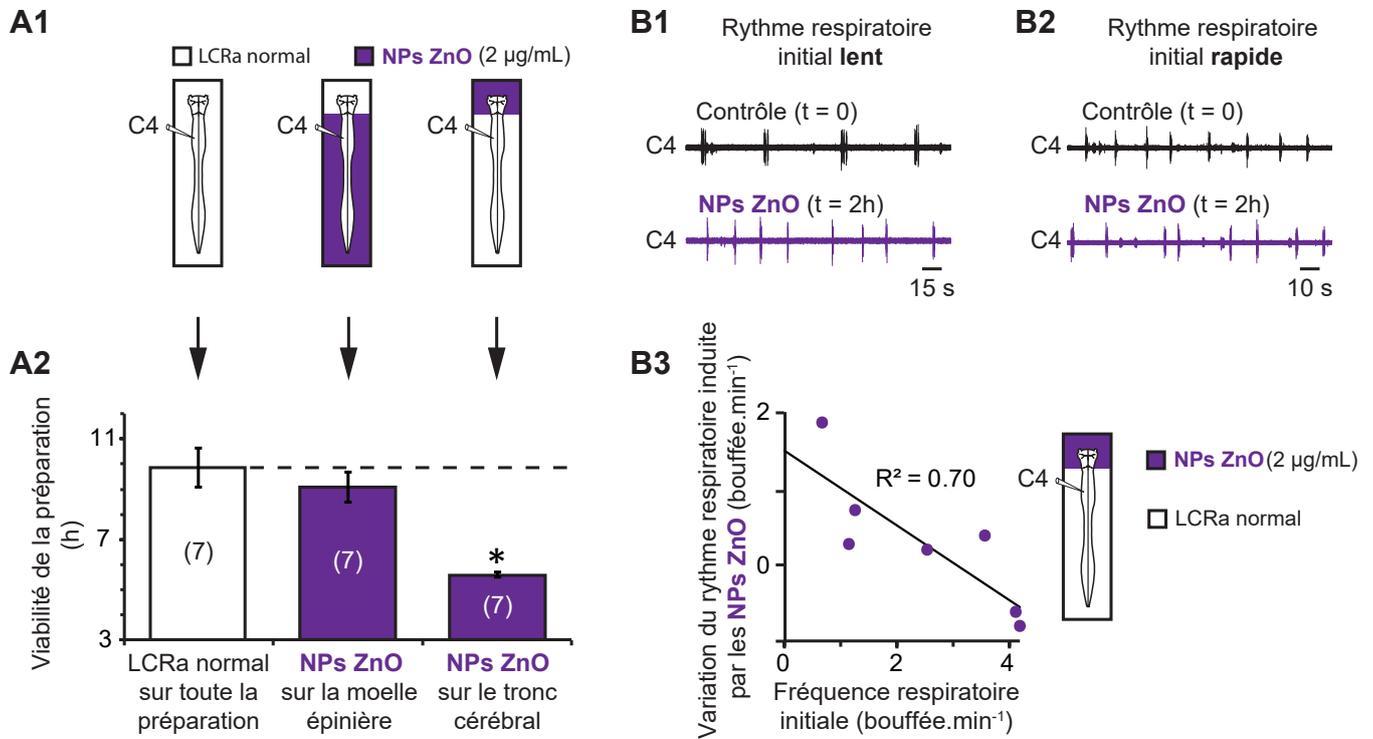
(A, B) Enregistrements extracellulaires bruts de l'activité respiratoire au niveau de la racine ventrale C4 de préparations générant un rythme initial lent (A) ou rapide (B) en condition contrôle (tracé du haut) et après 2 heures d'application des NPs ZnO à 10 µg/mL (tracé du bas).

(C) Régression linéaire montrant la relation entre le changement du rythme inspiratoire induit par les NPs ZnO et la fréquence respiratoire initiale (n=39 préparations).  $R^2$ : Coefficient de détermination.

(D, E) Régressions linéaires montrant que la viabilité de la préparation n'est corrélée ni à la fréquence respiratoire initiale (D) ni au changement de rythme induit par l'application de NPs ZnO (E).

prononcée sur les préparations dont le rythme respiratoire initial est lent (**Figure 24A, C**), en comparaison aux préparations dont le rythme respiratoire initial est plus rapide (**Figure 24B, C**). Par la suite, l'application de NPs ZnO diminue de manière drastique et significative la durée de survie moyenne des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolés (**Figure 23A2, B**). Cet arrêt prématuré et définitif de l'activité respiratoire est dose dépendante (**Figure 23C**,  $EC_{50}$  estimé  $\approx 2\mu\text{g/mL}$ ). Ainsi, l'arrêt du rythme respiratoire intervient significativement plus tôt dans le groupe des préparations exposées aux NPs ZnO ( $10\mu\text{g/mL}$ ,  $4\text{h}30 \pm 4$  minutes,  $n=8$ ) que dans le groupe non exposé ( $9\text{h}48 \pm 47$  minutes,  $n=7$ ;  $p<0,05$ ). Il est également important de noter que la réduction de la durée de survie induite par les NPs n'est corrélée ni à la fréquence respiratoire initiale (**Figure 24D**), ni à la variation de fréquence induite par ces mêmes NPs (**Figure 24E**). En conclusion, ces résultats montrent que chez le rat nouveau-né, lors de l'exposition aigüe d'une préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés *ex vivo*, les nanoparticules modulent puis perturbent fortement le fonctionnement du réseau neuronal central impliqué dans la genèse du rythme respiratoire.

À la suite de ces données, il était important de déterminer si l'effet des NPs ZnO sur l'activité respiratoire résultait d'une action générale sur le tissu nerveux central ou d'une action préférentielle sur les neurones bulbaires responsables de la genèse de l'activité respiratoire. Pour répondre à cette question, une barrière étanche de Vaseline a été positionnée au niveau de la jonction bulbo-spinale afin de permettre la perfusion différentielle du tronc cérébral (contenant les générateurs du rythme respiratoire (Smith *et al.* 1991)) et de la moelle épinière (où sont situés les motoneurones inspiratoires et expiratoires (Giraudin *et al.* 2008)). Sur les 21 préparations utilisées dans cette série d'expériences, 7 ont été perfusées avec du LCRa normal (conditions témoins) et 14 avec des NPs ZnO ( $EC_{50}$ ,  $2\mu\text{g/mL}$ ) que ce soit sur la moelle épinière ( $n=7$ ) ou sur le tronc cérébral ( $n=7$ , **Figure 25A1**). Quand les NPs ZnO sont appliquées sélectivement sur la moelle épinière (avec le milieu de survie normal sur le tronc cérébral), aucun changement significatif n'est observé, que ce soit sur la fréquence respiratoire ou sur la durée de survie des préparations (**Figure 25A2**). Par contre, lors de l'application des NPs uniquement sur le tronc cérébral, nous avons pu observer de nouveau une augmentation significative de la fréquence respiratoire, plus importante pour les préparations au rythme initial plutôt lent ( $57 \pm 4\%$ ,  $n=3$ ;  $p<0,05$ ; **Figure 25B1, B3**), comparé à celles ayant un rythme respiratoire initial rapide (**Figure 25B2, B3**). Il est également important



**Figure 25: Les structures du tronc cérébral sont responsables à la fois de l'accélération des bouffées respiratoires et de la réduction drastique de la longévité de la préparation induites par l'exposition aiguë aux NPs ZnO**

**(A1)** Représentation schématique des procédures expérimentales utilisant une barrière de Vaseline afin de séparer le tronc cérébral de la moelle épinière dans les préparations isolées. **LCRa**: Liquide céphalo-rachidien artificiel.

**(A2)** Diagramme en bâtons mesurant la viabilité des préparations baignées dans du LCRa normal (barre blanche) ou avec des NPs ZnO appliquées sélectivement sur la moelle épinière (barre violette gauche) ou le tronc cérébral (barre violette à droite). Données moyennes  $\pm$  SEM. Le nombre de préparations est indiqué entre parenthèses. \*  $p < 0.05$ .

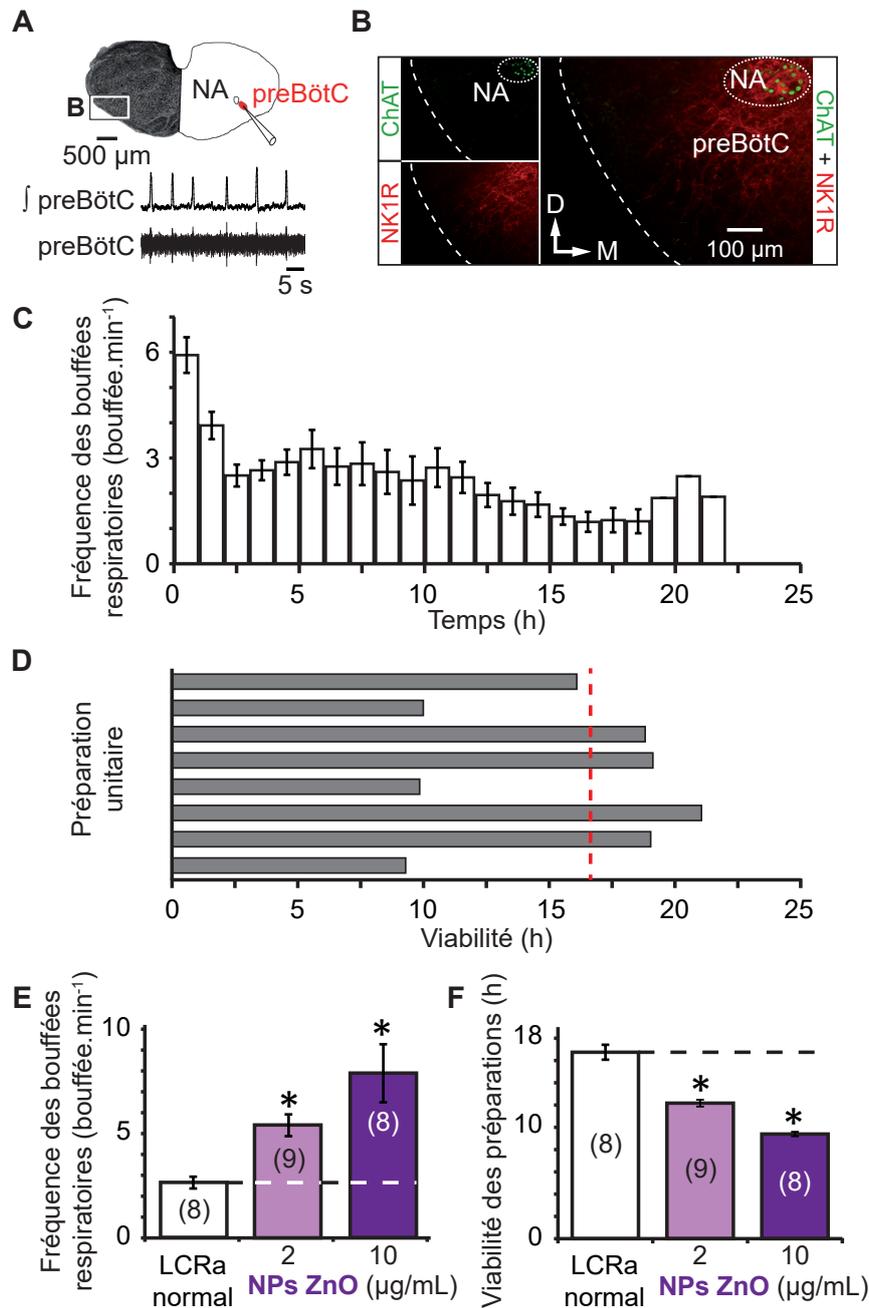
**(B1, B2)** Enregistrements extracellulaires bruts effectués des bouffées d'activité de la racine cervicale ventrale (C4) dans les préparations générant un rythme respiratoire initial lent (**B1**) ou rapide (**B2**) en condition contrôle (*tracé du haut*) et après 2h d'application des NPs ZnO (2  $\mu\text{g/mL}$ ) sur le tronc cérébral (*tracé du bas*).

**(B3)** Régression linéaire (*gauche*) représentant la relation entre la variation du rythme respiratoire induite par les NPs ZnO et la fréquence respiratoire initiale en période contrôle sur les préparations isolées (n=7), dans les conditions schématisées à droite. **R<sup>2</sup>**: Coefficient de détermination.

de noter que l'arrêt définitif de l'activité respiratoire est plus précoce lors de l'application des NPs ZnO uniquement sur le tronc cérébral ( $5h36 \pm 6$  minutes,  $n=7$ ;  $p<0,05$ ; **Figure 25A2**). Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que chez le rat nouveau-né, les structures bulbaires des centres respiratoires sont plus sensibles (et donc plus vulnérables) aux NPs que les neurones spinaux impliqués dans la contraction des muscles respiratoires.

*Les NPs ZnO agissent directement sur les neurones du complexe pré-Bötzinger*

Afin de préciser les mécanismes impliqués dans l'effet des NPs ZnO sur le réseau respiratoire central, une série d'expériences a été effectuée sur des tranches de tronc cérébral au niveau bulbaire, contenant le circuit central générateur de l'activité inspiratoire, le complexe pré-Bötzinger (préBötC). Il est maintenant largement admis que chez les rongeurs nouveau-nés, la phase inspiratoire de l'activité pulmonaire est générée par un réseau de neurones situés dans le préBötC, lui-même faisant partie du groupe respiratoire ventral du bulbe rachidien (Smith *et al.* 1991, Rekling et Feldman 1998)(**Figure 26A, haut**). Localisé ventralement au noyau ambigu qui est identifiable via son immunoréactivité à l'acétylcholine transférase (ChAT; **Figure 26B**), le préBötC peut être identifié anatomiquement par l'expression du récepteur à la neurokinine 1 (NK1R; **Figure 26B**), comme précédemment décrit (Gray *et al.* 1999, Gray *et al.* 2001, Thoby-Brisson *et al.* 2005). En utilisant ces repères anatomiques, nous avons ensuite effectué des expériences combinant l'enregistrement électrophysiologique de l'activité du préBötC et l'application de NPs ZnO. Lorsque les tranches étaient baignées dans un LCRa normal, les enregistrements du préBötC montrent une activité rythmique spontanée (**Figure 26A, bas**) dont le patron ressemble fortement à l'inspiration fictive observée dans les préparations de tronc cérébral/moelle épinière (voir **Figure 22**). Après une période initiale de fréquence de décharge élevée ( $5,92 \pm 0,5$  bouffées/min;  $n=8$  tranches; **Figure 26C**), le rythme inspiratoire ralentit progressivement jusqu'à se stabiliser après 2 heures d'enregistrement, à une moyenne de  $2,5 \pm 0,75$  bouffées/min ( $n=8$ ). Comme déjà observé dans la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée, un arrêt définitif de l'activité respiratoire intervient après en moyenne  $16h44 \pm 40$  minutes ( $n=8$ ; **Figure 26D**). Ces données confirment que dans ces tranches réduites de tronc cérébral, une région limitée du bulbe rachidien ventro-latéral, nommé le préBötC, contient des neurones capables de générer spontanément des bouffées d'activité respiratoire pendant plusieurs heures.



**Figure 26: Effets des NPs ZnO sur les bouffées d'activité respiratoire générées par le complexe pre-Bötzingier (preBötC) dans des tranches de bulbe rachidien de rats nouveau-nés**

**(A)** Microphotographie d'une tranche transversale de bulbe rachidien de rat nouveau-né de 2 jours contenant le preBötC (haut). L'insert (rectangle blanc) délimite la partie ventrolatérale de la tranche de bulbe rachidien montrée à plus fort grossissement en **B**. NA: Noyau ambigu. En bas, enregistrements brut (tracé du haut) et intégré (tracé du bas) de l'activité respiratoire spontanée enregistrée au niveau du preBötC obtenus grâce à une macroélectrode posée à la surface de la tranche.

**(B)** Microphotographie (correspondant à un z-stack de 15 images d'une épaisseur totale de 15µm) d'un immunomarquage pour l'acétylcholine transférase (ChAT, en haut à gauche, vert), le récepteur à la neurokinine 1 (NK1R, en bas à gauche, rouge) dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien, images superposées à droite. **D**: Dorsal, **M**: Médial.

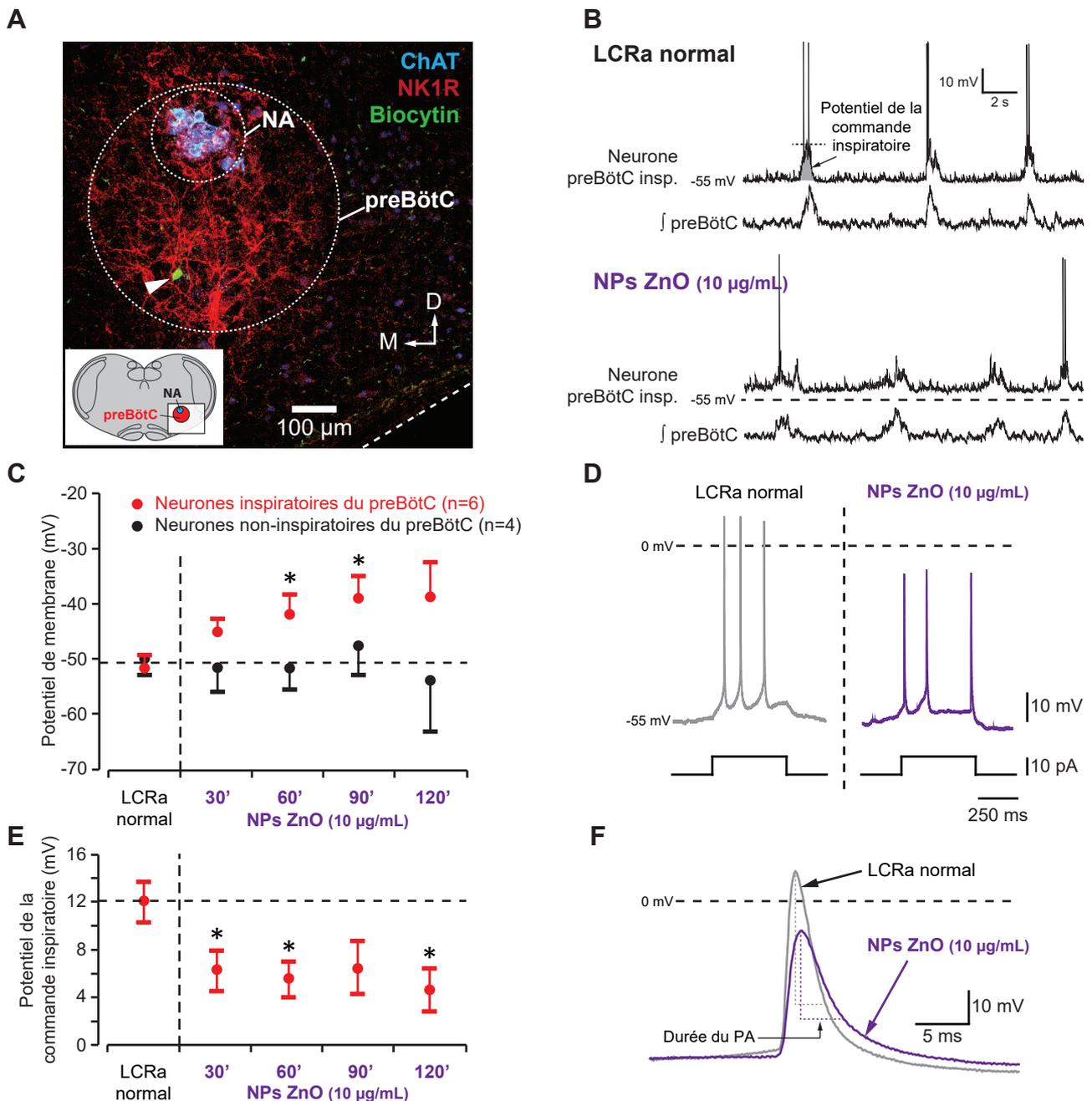
**(C)** Histogramme montrant l'évolution de la fréquence moyenne de l'activité respiratoire spontanée au cours du temps en condition contrôle (Données moyennes ± SEM, n=8 préparations).

**(D)** Diagramme en bâtons représentant la viabilité de chaque préparation. La ligne pointillée rouge montre la longévité moyenne.

**(E, F)** Diagrammes en bâtons illustrant la nature dose-dépendante de l'effet des NPs ZnO sur la fréquence de l'activité respiratoire (**E**) et sur la viabilité des préparations (**F**, données moyennes ± SEM). Le nombre de préparation est indiqué entre parenthèses. \*p<0.05; LCRa: Liquide céphalo-rachidien artificiel.

La préparation de tranches de bulbe rachidien offre alors une opportunité unique d'observer les effets directs des NPs ZnO sur le fonctionnement des centres respiratoires chez le mammifère. Similaire à ce qui a été observé sur préparation de tronc cérébral/moelle épinière, les NPs ZnO ont des effets multiples sur l'activité du préBötC. Après 3 heures d'exposition, les NPs ZnO (2 et 10 µg/mL) déclenchent une accélération significative et dose dépendante du rythme respiratoire, respectivement  $5,39 \pm 0,52$  (2 µg/mL; n=9; p<0,05) et  $7,89 \pm 1,39$  bouffées/minute (10 µg/mL; n=8; p<0,05), par comparaison au groupe non exposé ( $2,65 \pm 0,28$  bouffées/minutes; n=8; **Figure 26E**). Faisant suite à cet effet exciteur, les NPs ZnO entraînent une réduction drastique et significative de la durée de survie moyenne des tranches de tronc cérébral (**Figure 26F**). Ici encore, l'arrêt de l'activité respiratoire du préBötC est observé et ce de manière dose dépendante, plus précocement dans les préparations exposées aux NPs (2 et 10 µg/mL, après respectivement  $12h10 \pm 18$  min ; n=9; et  $9h24 \pm 12$  min ; n=8; p<0,05 dans les deux cas) que dans les tranches témoins ( $16h44 \pm 40$  min; n=8 ; **Figure 26F**). Dans ces conditions expérimentales (tranches de bulbe rachidien), le préBötC est isolé de ses circuits modulateurs et les effets observés supportent donc la conclusion que les NPs ZnO agissent directement sur les neurones du préBötC pour produire leurs effets délétères sur l'activité respiratoire centrale.

Afin de mieux étudier l'effet neurotoxique des NPs ZnO sur les centres respiratoires, une dernière série d'expériences a été réalisée en utilisant la technique de patch-clamp en configuration cellule entière, permettant l'enregistrement unitaire des neurones du préBötC (n=10). Localisés ventralement au NA (identifié par son immunoréactivité à la ChAT), ces neurones expriment les récepteurs NK1 (**Figure 27A**). En condition témoin, une majorité des neurones du préBötC enregistrés présentent de grandes dépolarisations membranaires rythmiques et spontanées (potentiel moyen de la commande synaptique ;  $12,1 \pm 1,7$  mV; n=6), associées à des périodes de décharge ayant lieu en phase avec l'activité de l'ensemble du préBötC. Ces neurones sont donc identifiés comme inspiratoires (**Figure 27B**, tracés du haut) et les neurones du préBötC qui n'exprimaient pas ces activités ont alors été classés comme non respiratoires (n=4). Afin de déterminer la réponse de ces deux types de neurones du préBötC à l'exposition aux NPs ZnO, ces dernières ont été appliquées sur l'ensemble de la tranche, à une concentration de 10 µg/mL (**Figure 27B**, tracés du bas). Après 90 minutes d'exposition, les neurones inspiratoires du préBötC ont montré une dépolarisation



**Figure 27: Les NPs ZnO dépotent les neurones inspiratoires du preBötC et réduisent la commande inspiratoire centrale**

(A) Microphotographie (correspondant à un z-stack de 15 images, 15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au total) d'un immunomarquage pour le NK1R (rouge) dans un neurone marqué à la biocytin (vert) localisé dans la région du preBötC, ventralement au marquage ChAT (bleu) des neurones du noyau ambigu (NA). La flèche blanche indique le neurone enregistré en B. L'insert montre une représentation schématique de la tranche de bulbe rachidien, le rectangle blanc correspondant à la zone de la microphotographie. D: dorsal, M: médian.

(B) Enregistrement simultané d'un neurone inspiratoire du preBötC en patch-clamp "cellule entière" et de l'activité extracellulaire intégrée de la région du preBötC en condition contrôle (tracés du haut) et pendant l'application de NPs ZnO (tracés du bas). La ligne pointillée indique le potentiel de repos mesuré en condition contrôle.

(C) Nuage de points représentant l'évolution du potentiel de membrane au cours du temps pendant l'exposition aux NPs ZnO dans les neurones inspiratoires (points rouges) et non respiratoires (points noirs) du preBötC.  $*p < 0.05$ ; LCRa: Liquide céphalorachidien artificiel.

(D) Décharge d'un neurone en réponse à l'injection d'un courant dépotent en condition contrôle (gauche) et pendant l'application des NPs ZnO (droite). Le potentiel de membrane de la cellule pendant l'exposition aux NPs a été ramené à la valeur observée en condition contrôle par l'injection d'un courant dépotent pendant le protocole.

(E) Nuage de points représentant l'évolution de l'amplitude de la commande synaptique inspiratoire au cours du temps dans les neurones du preBötC ( $n=6$ ) pendant l'application des NPs ZnO.  $*p < 0.05$ .

(F) Exemple représentatif de l'évolution des potentiels d'action (AP) dans le même neurone, en condition contrôle et pendant l'application de NPs ZnO, montrant leurs effets sur l'amplitude et la durée du PA.

significative de  $12,8 \pm 4,9\text{mV}$  ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ; **Figure 27C**; points rouges) alors que le potentiel de repos des neurones non respiratoires reste inchangé ( $-49,9 \pm 2,8\text{mV}$  (témoin) vs  $-47,8 \pm 5,1\text{mV}$  (NPs ZnO);  $n=4$ ;  $p=0,725$ ; **Figure 27D**; points noirs). Le patron de décharge répété de ces neurones a ensuite été examiné par l'injection d'un créneau de courant dépolarisant (500 ms; 10 pA) à partir du potentiel de repos. En condition témoin, le créneau de courant positif a été ajusté afin d'induire des potentiels d'actions (PA) pendant la phase silencieuse "expiratoire" de la commande respiratoire (**Figure 27D**, gauche). En présence de NPs ZnO, le nombre de PA produits ne change pas comparé à la situation témoin ( $p=0,444$ ; **Figure 27D**, droite), indiquant une absence de variation de l'excitabilité cellulaire. Après 2h d'exposition aux nanoparticules, l'amplitude moyenne de la commande inspiratoire a diminué de manière significative de  $12,1 \pm 1,7\text{mV}$  ( $n=6$ ) à  $4,7 \pm 1,8\text{mV}$  ( $p<0,05$ ; **Figure 27E**). Cette réduction progressive de l'amplitude des courants synaptiques inspiratoires entraîne une impossibilité à générer des PA (voir **Figure 27B**, traces inférieures). Finalement, notre étude s'est portée sur l'analyse des caractéristiques des PA, et en particulier sur leur amplitude, leur valeur maximale, et leur durée en condition témoin et lors de l'exposition aux NPs (Tableau 1). L'amplitude et la valeur maximale des PA évoqués sont significativement diminuées en présence de  $10 \mu\text{g/mL}$  de NPs ZnO, aussi bien dans les neurones inspiratoires (**Figure 27F**) que dans les neurones non respiratoires ( $p<0,05$ ). Bien que non significative, une tendance à l'augmentation de la durée des PA a pu être observée ( $p=0,194$ ).

## Discussion

Les résultats décrits dans cette étude mettent en évidence que chez le nouveau-né, une exposition aiguë aux NPs ZnO peut moduler puis perturber l'activité du réseau respiratoire. Pendant l'application de nanoparticules, les neurones inspiratoires du préBötC sont dépolarisés de manière tonique et présentent une forte diminution de la commande synaptique inspiratoire. Ces effets peuvent faire partie de mécanismes neuronaux responsables des effets délétères des NPs sur les centres respiratoires des animaux nouveau-nés. À ce jour, notre étude est la première à mettre en évidence une probable altération fonctionnelle d'un réseau moteur vital suite à l'exposition aux NPs métalliques.

### *Préparations isolées ex vivo: une activité spontanée de type respiratoire*

La nature respiratoire "fictive" (de par l'absence de muscle) de ces bouffées d'activité cyclique a été démontrée depuis longtemps (Suzue 1984, Smith et Feldman 1987). Les bouffées motrices enregistrées au niveau des racines ventrales phréniques C4 (qui contrôlent normalement la contraction rythmique du diaphragme) et du nerf XII (contrôlant les mouvements de la langue et participant à l'ouverture des voies aériennes supérieures) sont générés en synchronie (**Figure 22C, D**) et sont considérés comme reflétant la phase inspiratoire de la respiration (Smith et Feldman 1987, Morin et al. 2000). Cette activité est générée par un réseau de neurones bulbaires localisés dans le complexe pré-Bötzinger (Smith et al. 1991, Gray et al. 2001, Johnson et al. 2001). Les activités motrices enregistrées au niveau des racines ventrales L2 (qui comportent une partie des axones des motoneurones des muscles abdominaux) correspondent quant à elles à la phase expiratoire (Smith et al. 1990), générée par les neurones bulbaires du groupe respiratoire para-facial (Ruangkittisakul et al. 2007, Giraudin et al. 2008).

Lors de cette étude, nous avons observé que le rythme respiratoire des préparations était plus lent que celui observé *in vivo* sur animal vigile. Ceci peut s'expliquer par les conditions expérimentales employées pour assurer la survie des préparations isolées. Premièrement, la température du bain de perfusion est plus basse que la température corporelle de l'animal (Murakoshi et al. 1985). Deuxièmement, le LCRa utilisé contient une faible concentration en potassium ( $K^+$ ) et une forte concentration en calcium ( $Ca^{2+}$ ) ce qui réduit l'excitabilité neuronale (Ruangkittisakul et al. 2007, Panaitescu et al. 2010). Enfin troisièmement, l'absence des voies provenant des régions cérébrales supérieures, des informations issues des retours sensoriels (en particulier ceux du nerf vague; Cohen 1979), et la présence du pont (en particulier le noyau adrénérergique A5 connu pour exercer une influence inhibitrice sur l'activité des centres respiratoires; Hilaire et al. 1989), contribuent à la dépression de l'activité du générateur du rythme respiratoire. Après une phase initiale de stabilité du rythme respiratoire, nous avons pu observer une diminution continue de la fréquence respiratoire, pouvant s'expliquer par la modification progressive des gradients de  $PO_2$ ,  $K^+$  et  $H^+$  au sein du tissu perfusé (Brockhaus et al. 1993, Okada et al. 1993).

## *Perturbation de l'activité respiratoire centrale induite par les NPs ZnO: les mécanismes cellulaires possibles*

Nos résultats montrent que les NPs ZnO induisent une accélération initiale du rythme respiratoire fictif, maintenue pendant les premières heures d'exposition, suivie de l'arrêt soudain de toute activité respiratoire. Démonstré dans de précédentes études électrophysiologiques, plusieurs NPs (oxyde de cuivre ([Xu et al. 2009](#), [Liu et al. 2011](#)), argent ([Liu et al. 2009](#)) et or ([Jung et al. 2014](#))) modulent les propriétés fonctionnelles de canaux ioniques sensibles au voltage et responsables de l'excitabilité de la cellule et du réseau neuronal. Par exemple, dans les neurones d'hippocampe de rat, les NPs ZnO augmentent de manière significative l'amplitude maximale des courants portés par les canaux sodiques voltage-dépendants, conduisant à l'augmentation de l'amplitude et de la valeur maximale (ou "overshoot") des potentiels d'action ([Zhao et al. 2009](#)). En conséquence, la fréquence de décharge des neurones hippocampiques est amplifiée et leur excitabilité particulièrement plus importante. De la même manière dans notre étude, les NPs ZnO augmentent transitoirement l'excitabilité des réseaux bulbaires respiratoires, accroissant ainsi la fréquence du rythme respiratoire.

Lors de nos expériences, l'effet le plus marquant des NPs ZnO fut l'arrêt précoce et définitif du rythme respiratoire se traduisant par une réduction drastique de la viabilité de nos préparations. Même si les mécanismes cellulaires précis restent encore à déterminer, les éléments acquis permettent de proposer plusieurs hypothèses. Il est maintenant largement accepté que la commande respiratoire centrale chez les mammifères est générée et transmise via des interneurons bulbaires glutamatergiques. Au sein des réseaux respiratoires, le glutamate active les récepteurs post-synaptiques de type *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) et non-NMDA (pour revue, ([Ballanyi et al. 1999](#), [Greer 2012](#), [Feldman et al. 2013](#), [Smith et al. 2013](#))). Depuis, de nombreuses études ont montré que les NPs métalliques pouvaient induire une neurotoxicité en interférant avec le métabolisme du glutamate (réduction de l'expression du transporteur vésiculaire vGlut2 et donc de la quantité de glutamate au niveau synaptique) et en perturbant le fonctionnement des récepteurs NMDA (réduction de leur expression) ([Ma et al. 2010](#), [Hong et al. 2015](#), [Begum et al. 2016](#)). Il est donc possible qu'une baisse de la synthèse et/ou de la libération du glutamate, associée ou pas à une "down-regulation" des récepteurs post-synaptiques glutamatergiques, soit à l'origine des perturbations induites par les NPs ZnO entraînant l'interruption de la transmission de la commande synaptique

inspiratoire au sein des neurones du préBötC. De plus, les NPs ZnO sont connues pour être cytotoxiques. Elles réduisent la viabilité cellulaire par une surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et induisent des phénomènes apoptotiques dans les cellules rétiniennes ganglionnaires de rat (Guo et al. 2013), les cellules souches neuronales de souris (Deng et al. 2009), les astrocytes de rat (Sruthi et Mohanan 2015) et enfin les neurones humains (Lai et al. 2008, Valdiglesias et al. 2013). En conséquence, les NPs ZnO pourraient agir sur les neurones impliqués dans la genèse du rythme respiratoire par une augmentation de la production de ROS, qui à son tour induirait un stress oxydatif et des dommages cellulaires, pour aboutir à l'apoptose. Ainsi, l'arrêt respiratoire observé lors de l'exposition aiguë aux NPs ZnO résulterait de la mort des neurones appartenant aux réseaux générateurs du rythme respiratoire.

Sur la base d'études précédentes principalement conduites sur le réseau hippocampique de rat, et sur celles exposées dans ce travail doctoral, nous proposons des mécanismes possibles de la perturbation de l'activité respiratoire centrale induite par les NPs ZnO suite à leur application aiguë chez le nouveau-né (**Figure 28, haut**). Des études antérieures menées sur les neurones pyramidaux hippocampiques CA3 ont montré que l'application de NPs ZnO produit une forte augmentation de l'amplitude des courants sodiques par l'augmentation du nombre de canaux sodiques ouverts (**Figure 28, mécanisme n°1**; (Zhao et al. 2009)). Lors de nos expériences, un mécanisme similaire pourrait expliquer la dépolarisation tonique observée dans les neurones inspiratoires pendant l'application de NPs. De manière intéressante, cet effet semble être spécifique de ce type de cellule puisque le potentiel de membrane des neurones du préBötC non-respiratoires reste inchangé en présence de NPs ZnO. La genèse du rythme respiratoire repose à la fois sur la présence de neurones pacemakers dans le préBötC possédant des propriétés de décharge voltage-dépendantes, et sur des propriétés émergentes du réseau respiratoire (Thoby-Brisson et Ramirez 2001, Del Negro et al. 2002, Pena et al. 2004, Chevalier et al. 2016). Sur cette base, nous supposons que la dépolarisation des neurones induite par les NPs ZnO est responsable de l'accélération du rythme respiratoire qui a été observé dès l'application des NPs. Il est également possible que la dépolarisation induite par les NPs active des canaux calciques voltage-dépendants, provoquant alors une entrée de calcium dans le compartiment cytoplasmique (**Figure 28, mécanisme n°2**). La concentration élevée en calcium intracellulaire qui en résulterait pourrait participer à l'amplification de la dépolarisation membranaire initiale, mais également pourrait

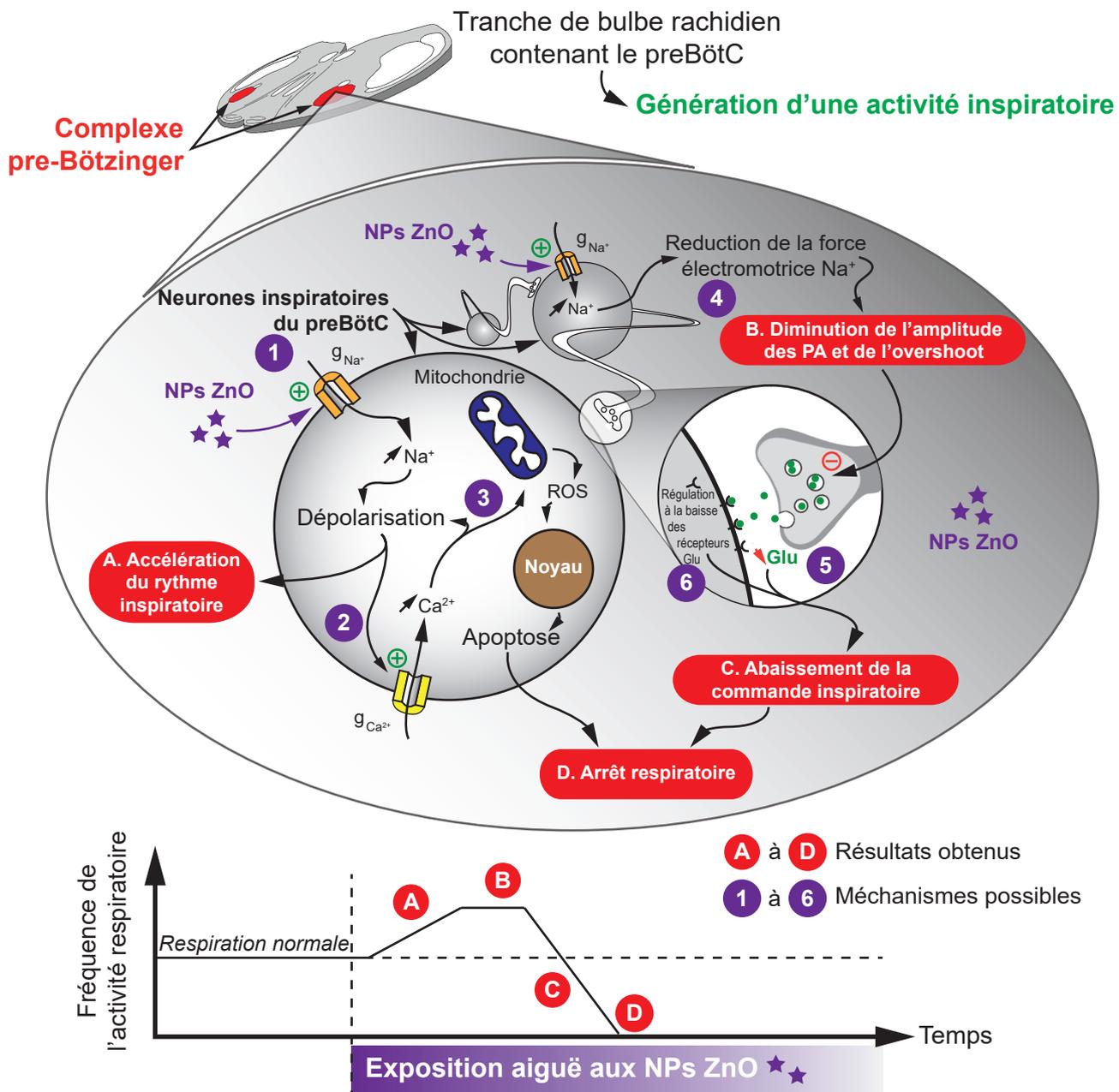


Figure 28: Résumé graphique des mécanismes cellulaires potentiels expliquant les changements induits par les NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale de mammifères nouveau-nés (Voir le texte pour plus de détails).

déclencher un dysfonctionnement mitochondrial à l'origine de la production de ROS (**Figure 28, mécanisme n°3**). Ces derniers seraient alors responsables de l'apoptose neuronale, selon un mécanisme déjà observé au niveau des cellules rétinienne ganglionnaires de rat (Guo et al. 2013). Enfin, à l'instar des études menées sur des neurones corticaux de souris en culture (Lynch et al. 1995), une accumulation anormale de cation dans la cellule peut provoquer des dommages neuronaux qui, dans le cas des neurones inspiratoires du préBötC, pourraient aboutir à un arrêt respiratoire brutal et définitif.

Nos résultats montrent également que l'amplitude maximale des potentiels d'action est diminuée de manière significative en présence de NPs ZnO. Une fois encore, ces effets sont en faveur d'une accumulation de sodium dans le cytoplasme des neurones inspiratoires du préBötC. Ainsi, une augmentation anormalement élevée de l'afflux sodique réduirait le gradient électrochimique du sodium, diminuerait la force électromotrice sodique et donc l'amplitude du potentiel d'action (**Figure 28, mécanisme n°4**). Une réduction de l'amplitude des potentiels d'action a pour conséquence une diminution de l'influx calcique au niveau de la terminaison nerveuse, ce qui se traduit par à une diminution de la libération de neurotransmetteurs à la synapse (**Figure 28, mécanisme n°5**). Parce que le rythme et le patron inspiratoire sont en partie dépendants de la connectivité excitatrice glutamatergique des neurones du préBötC (Smith et al. 2009), une réduction progressive de l'exocytose de glutamate synaptique aurait pour conséquence une diminution continue de la commande respiratoire centrale (**Figure 28, mécanisme n°6**). En l'absence de changement de l'excitabilité cellulaire en présence de NPs ZnO, cette diminution de la commande inspiratoire centrale associée à l'impossibilité de générer des potentiels d'action pourrait au final être responsable de l'arrêt de toute activité rythmique dans les centres respiratoires.

À ce jour, de nombreuses études effectuées principalement sur le réseau hippocampique de rongeurs ont permis d'identifier les effets de diverses nanoparticules (nano-or (Jung et al. 2014, Salinas et al. 2014), nano-argent (Liu et al. 2009), nano-dioxyde de titane (Hong et al. 2015), nano-carbure de tungstène (Shan et al. 2012), nano-oxyde de cuivre (Xu et al. 2009, Liu et al. 2011), et nano-oxyde de zinc (Zhao et al. 2009)) sur les propriétés bioélectriques individuelles des neurones. Malgré tout, peu de choses sont connues de l'impact de l'exposition aux nanoparticules sur le fonctionnement de l'ensemble d'un réseau de neurone, capable de générer une activité motrice organisée et impliquée dans une fonction vitale telle

que la respiration. À notre connaissance, cette étude est la première à démontrer le possible effet délétère de l'exposition aux NPs sur les centres respiratoires de mammifères nouveau-nés. De plus, sur la base d'études récentes s'intéressant au lien existant entre taille des NPs et neurotoxicité, ainsi que sur la vulnérabilité périnatale liée à l'exposition à divers types de nanoparticules métalliques chez le rat ([Sharma et al. 2013](#)), il est maintenant bien établi d'une part, que les nanoparticules de taille comprise entre 20 et 30 nm induisent bien plus de dommages neuronaux que les NPs de taille supérieure, et d'autre part, que les animaux plus jeunes sont susceptibles de présenter plus d'altérations neuronales que les plus âgés. Même si ceci n'est pas directement démontré dans notre étude, ces observations renforcent l'idée que la taille moyenne des NPs ZnO utilisées dans nos expériences ( $\approx 34\text{nm}$ ) est un élément clé de la neurotoxicité observée sur le système respiratoire central.

# Chapitre III: Transmission verticale des NPs ZnO: étude *in vivo*

## Résumé

La gestation est une étape clé du développement d'un organisme. Lors de cette étape, le fœtus est protégé du milieu extérieur par la barrière placentaire. Or cette dernière n'est pas parfaitement imperméable. Ainsi, si la mère se retrouve exposée à des molécules de petite taille (médicaments, pesticides...), ces dernières peuvent passer cette barrière et ainsi rejoindre l'organisme en développement. Au vu de l'action potentiellement délétères des NPs ZnO démontrée *in vitro*, il est nécessaire de déterminer si l'exposition d'une mère à ces particules représente un danger pour les fœtus pendant la gestation, en particulier sur la mise en place de réseaux vitaux, tels que le réseau respiratoire. L'exposition chronique de rattes gestantes à différentes doses de NPs ZnO couplée à l'enregistrement de l'activité ventilatoire des nouveau-nés par pléthysmographie, nous ont permis de montrer une altération de la fréquence respiratoire ainsi qu'une augmentation de la durée des pauses respiratoires chez les rats nouveau-nés. Ces données semblent donc montrer qu'une exposition chronique aux NPs ZnO au cours de la gestation affecte le développement normal du système respiratoire des fœtus, se traduisant après la naissance par des altérations ventilatoires affectant la fréquence et les pauses respiratoires.

## Introduction

Étape cruciale de la vie, la gestation correspond à la période pendant laquelle l'organisme se développe. De par son importance, une perturbation de cette période prénatale peut avoir de graves conséquences à court ou long terme. En effet, l'état de la mère ou la prise de certaines substances, telles les drogues, peuvent agir indirectement (via une action sur la mère perturbant le bon déroulement de la gestation) ou directement sur le fœtus malgré la présence de la barrière placentaire ([Behnke et al. 2013](#)), et induire des malformations (tératogénicité) ou perturber le fonctionnement normal de certains organes comme le cerveau. Il est donc important de savoir si un élément est capable de passer la barrière placentaire et d'agir sur le développement fœtal. C'est le cas de certains médicaments ([Beghin 2014](#)), de pesticides ([Joly Condette et al. 2015](#)) ou encore des nanoparticules ([Keelan 2011](#)).

En effet, plusieurs études ont montré que les NPs pouvaient passer la barrière placentaire et perturber le développement du fœtus. Par ailleurs, les NPs de cadmium réduisent la capacité de l'œuf à s'implanter dans la muqueuse utérine, altèrent le développement du placenta et des fœtus (Blum et al. 2012). Autre exemple, les NPs de dioxyde de titane provoquent des malformations fœtales, une perturbation de la mémoire, de l'apprentissage et du système dopaminergique chez le nouveau-né (pour revue, (Rollerova et al. 2015)). Les NPs ZnO quant-à-elles augmentent la mortalité fœtale, diminuent le poids des animaux et s'accumulent dans les organes (Jo et al. 2013), perturbant ainsi leur fonctionnement postnatal (foie, (Hao et al. 2017) ; cerveau, (Okada et al. 2013)).

Le but de ce travail a donc été d'étudier les effets d'une exposition chronique des rattes gestantes aux NPs ZnO sur le développement et la mise en place des réseaux respiratoires chez les rats nouveau-nés. Pour cela, des injections répétées de NPs ont été réalisées sur des femelles gestantes et l'utilisation de la pléthysmographie corps entier nous a permis d'évaluer l'impact sur l'activité ventilatoire des animaux nouveau-nés.

## Matériels et méthodes

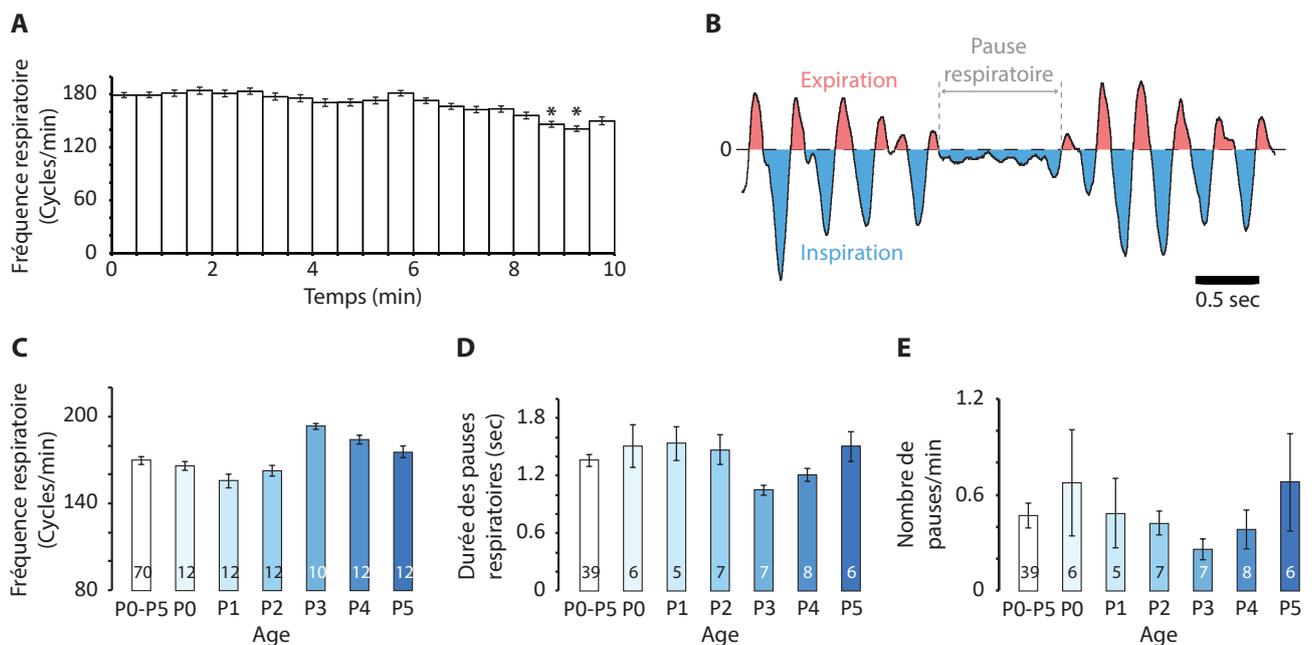
*L'ensemble des protocoles est détaillé dans le chapitre "Matériels et Méthodes" général (page 73).*

### *Injection de rattes gestantes*

Des rattes adultes Sprague Dawley ont été utilisées lors de ces expériences. Au sein de notre animalerie, les femelles ont été mises en présence du male pendant une nuit. Ceci permettait de déterminer avec précision, en cas de reproduction, le jour de fécondation et donc le premier jour de gestation, le contrôle du stade reproducteur des femelles (œstrus) étant réalisé par frotti vaginal. Quatre groupes de femelles gestantes ont ainsi été constitués:

- Le groupe témoin (n=7), les mères n'ayant fait l'objet d'aucune manipulation
- Le groupe sham (n=2), les mères ayant reçu des injections de sérum physiologique
- Le groupe exposé aux NPs ZnO 20 (n=5), les mères ayant reçu des doses de 20 mg/kg
- Le groupe exposé aux NPs ZnO 40 (n=4), les mères ayant reçu des doses de 40 mg/kg.

Pour les trois derniers groupes, les femelles ont reçu des injections intrapéritonéales aux 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 17 et 19<sup>ème</sup> jours de gestation.



### Figure 29: Caractérisation par pléthysmographie de l'activité respiratoire in vivo de rats nouveau-nés

**(A)** Histogramme montrant l'évolution de la fréquence respiratoire des rats nouveau-nés au cours du temps en condition contrôle (moyenne  $\pm$  SEM; n=70).

**(B)** Extrait d'un enregistrement pléthysmographique sur un rat nouveau-né âgé de 3 jours en condition contrôle. Les inspirations sont représentées en valeurs négatives (bleu) et les expirations en valeurs positives (rouge). Une pause respiratoire est également représentée, et définie comme un arrêt transitoire de la respiration dont la durée dépasse ad minima 3 fois le cycle respiratoire moyen.

**(C, D, E)** Diagrammes en bâtons représentant la fréquence respiratoire **(C)**, la durée **(D)** et le nombre de pauses par minutes **(E)** en fonction de l'âge des animaux. Le nombre d'animaux enregistrés est indiqué dans chaque barre (moyenne  $\pm$  SEM).

### *Enregistrements pléthysmographiques des rats nouveau-nés*

Pour tous les animaux âgés de 0 à 5 jours, des enregistrements pléthysmographiques corps entier ont été réalisés. Après mise en place et calibration de l'appareil, les animaux sont pesés puis placés dans la chambre d'enregistrement. Un temps d'attente de 2 minutes est systématiquement observé afin de laisser le temps à l'animal d'explorer l'environnement. Puis un enregistrement de 10 minutes est réalisé. L'animal est ensuite replacé auprès de sa mère et de sa fratrie. Au total, l'activité respiratoire de 232 animaux a été enregistrée, 70 en condition témoin, 56 dans le groupe sham, 71 dans le groupe NPs ZnO 20, et 35 pour le NPs ZnO 40.

## Résultats

### *Activité ventilatoire des animaux nouveau-nés*

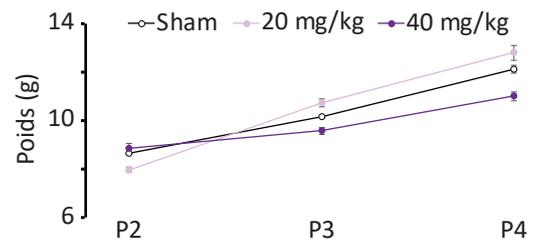
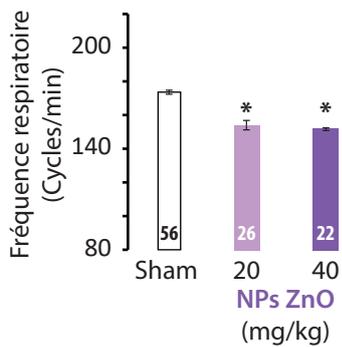
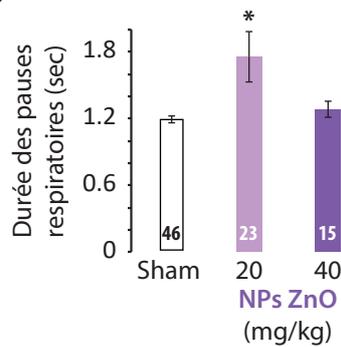
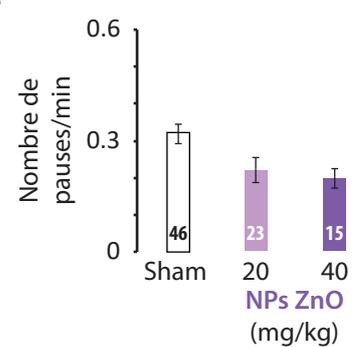
En condition témoin, c'est-à-dire en l'absence de toute injection, l'activité ventilatoire *in vivo* des rats nouveau-nés est stable pendant les 8 premières minutes d'enregistrement ( $180 \pm 3$  bouffées/min,  $n=70$ , **Figure 29A**), pour ensuite légèrement diminuer ( $148 \pm 4$  bouffées/min,  $n=70$ ,  $p<0,05$ ) jusqu'à la fin de l'enregistrement, la durée moyenne du cycle respiratoire étant de  $353 \pm 6$  msec. Il est à noter que l'âge des animaux n'influe pas sur la fréquence respiratoire moyenne observée pendant les 10 minutes d'enregistrement ( $170 \pm 3$  bouffées par minute,  $n=70$ , **Figure 29C**). Lors de cette série expérimentale, 55,7% des rats nouveau-nés (39/70) ont toutefois présenté des pauses ventilatoires. De manière arbitraire, une pause ventilatoire a été définie comme un arrêt de la respiration dont la durée est supérieure à 3 fois le cycle respiratoire moyen de l'animal, soit en moyenne  $1,06 \pm 0,018$  sec. (**Figure 29B**). Ces pauses durent en moyenne  $1,36 \pm 0,06$  secondes (**Figure 29D**) et sont observées  $0,47 \pm 0,08$  fois par minute (**Figure 29E**), sans qu'aucune corrélation n'ait été observée entre le nombre ou la durée de ces pauses et l'âge des animaux (**Figure 29D, E**).

### *Effets de l'exposition chronique maternelle aux NPs ZnO*

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux altérations respiratoires que peuvent présenter les animaux nouveau-nés suite à l'exposition chronique des mères gestantes aux NPs ZnO. Pour cela, des injections de sérum physiologique (groupe sham,  $n=2$  femelles gestantes) ou de NPs à des doses de 20 ( $n=5$ ) et 40 mg/kg ( $n=4$ ) ont été réalisées sur des rattes Sprague Dawley accouplée au sein du laboratoire. Au cours de ces expériences, l'état

**A**

	Témoin	Sham	20 mg/kg	40 mg/kg
Femelles injectées	7	2	5	4
Inflammation	0	0	5	4
Mort	0	0	1	2

**B****C****D****E**

### Figure 30: Effet d'une exposition prénatale aux NPs ZnO sur l'activité respiratoire de rats nouveau-nés

(A) Tableau récapitulant les observations effectuées sur les femelles gestantes au cours du protocole d'injection. L'inflammation était localisée au point d'injection sous forme d'un léger gonflement en surface de la paroi abdominale.

(B) Evolution du poids des animaux nouveau-nés au cours du temps, aux âges auxquels l'activité respiratoire a été enregistrée.

(C, D, E) Diagrammes en bâtons représentant la fréquence respiratoire (C), la durée (D) et le nombre de pauses par minutes (E) en fonction de l'exposition de leur mère ou non aux NPs ZnO. Le nombre d'animaux enregistrés est indiqué dans chaque barre (moyenne  $\pm$  SEM). \* $p < 0.05$ .

de la femelle gestante a régulièrement été contrôlé et aucune modification comportementale ou physiologique n'a été observée lors des injections de sérum physiologique (**Figure 30A**). Lors de l'injection des NPs, toutes les femelles sans exception ont présenté une légère inflammation au niveau du site d'injection (présence d'un œdème). Dans le groupe ayant reçu une dose de 20 mg/kg, une femelle a été sacrifiée suite à l'absence de mise-bas 4 jours après le délai théorique (21 jours de gestation en moyenne). L'état général de cet animal était dégradé, caractérisé notamment par un pelage hérissé, un état prostré et un abdomen sensible. L'autopsie post-mortem a révélé la présence de malformations des fœtus. Dans le groupe ayant reçu une dose de 40 mg/kg, une femelle est morte après 12 jours de gestation, et une seconde n'a pas survécu à la mise-bas (les nouveau-nés en bonne santé apparente ont été mis en nourrice auprès d'une autre femelle qui les a parfaitement intégrés à sa propre portée).

L'analyse pléthysmographique des nouveau-nés exposés aux NPs ZnO lors de la gestation n'a été menée que chez les animaux âgés de 2 à 4 jours. En effet, le dispositif expérimental n'a pas permis l'enregistrement des activités ventilatoires des rats les plus jeunes, leur faible taille et la très faible amplitude de leur activité respiratoire ne permettant pas de la distinguer du bruit de fond. Avant chaque enregistrement, les animaux ont été pesés et hormis une prise de poids normale liée à leur croissance, aucune différence n'a été observée entre les 3 conditions (**Figure 30B**). Chez les rats nouveau-nés exposés au cours de la gestation, l'étude pléthysmographique a révélé la présence d'une fréquence respiratoire significativement plus basse comparée à celle des animaux du groupe sham (respectivement ; sham ; n=56,  $174 \pm 1,37$  bouffées/min; NPs ZnO 20 ; n=26 ;  $154 \pm 2,7$  bouffées/min ;  $p < 0,05$ ; NPs ZnO 40 ; n=22 ;  $152 \pm 1,06$  bouffées/min ;  $p < 0,05$ ; **Figure 30C**). Il est à noter qu'aucune différence significative de la fréquence respiratoire n'a été observée pour les deux groupes d'animaux exposés à des doses différentes de NPs ZnO.

Une dernière analyse a porté sur la survenue de pauses ventilatoires dans les 3 groupes d'animaux. Si le nombre d'animaux présentant des pauses ne semblent pas être affecté par l'exposition chronique aux NPs ZnO au cours de la gestation (Sham ; 82,1% (46/56 animaux) ; NPs ZnO 20 ; 88,4% (23/26) ; NPs ZnO 40 ; 68,2% (15/22)), une augmentation significative de la durée moyenne des pauses a été observée pour le groupe NPs ZnO 20 ( $1,9 \pm 0,2$  sec ; n=23 ;  $p < 0,05$  ; **Figure 30D**) comparé au groupe sham ( $1,3 \pm 0,04$  sec ; n=46). Pour les animaux du

groupe NPs ZnO 40, il est à noter que la durée des pauses présente également une tendance à l'augmentation ( $1,40 \pm 0,08$  sec ; n=15), mais de manière non significative. Enfin, le nombre de pauses par minute ne varie pas de manière significative (**Figure 30E**), malgré une tendance à la diminution lors de l'injection des NPs aux mères gestantes (respectivement ;  $0,33 \pm 0,03$  pauses/min ; Sham ; n=46;  $0,23 \pm 0,03$  pauses/min ; NPs ZnO 20 ; n= 23 ;  $0,21 \pm 0,03$  pauses/min, NPs ZnO 40 ; n=15). La fréquence ventilatoire étant différente entre les 3 groupes expérimentaux, le ratio nombre de pauses/cycle respiratoire a donc été calculé dans le but de s'affranchir de cet effet fréquence. Toutefois, aucune variation significative n'a là encore pu être mise en évidence, malgré cette tendance à la baisse du nombre de pauses chez les animaux exposés (respectivement ;  $1,91.10^{-3} \pm 0,18.10^{-3}$  pauses/cycle ; Sham ; n=46 ;  $1,5.10^{-3} \pm 0,22.10^{-3}$  pauses/cycle ; NPs ZnO 20 ; n= 23 ;  $1,36.10^{-3} \pm 0,19.10^{-3}$  pauses/cycle, NPs ZnO 40 ; n=15).

## Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications de la fonction respiratoire chez les animaux nouveau-nés après une exposition chronique aux NPs ZnO au cours de la gestation. En effet, la mesure de l'activité ventilatoire par une technique de pléthysmographie corps entier montre une diminution de la fréquence et une augmentation de la durée des pauses respiratoires. Ces résultats suggèrent fortement que l'exposition chronique aux NPs ZnO en période prénatale engendrerait une atteinte développementale des réseaux respiratoires centraux.

Toutefois, des études antérieures montrent que la supplémentation de zinc pendant la gestation peut avoir des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire, anti-apoptotique (da Costa et al. 2013). L'exposition prénatale au zinc semble bénéfique au développement comportemental et immunologique des enfants (Surkan et al. 2012). Néanmoins, les matériaux à l'état de nanoparticules possèdent des effets biologiques et environnementaux pouvant être bien différents des composés de plus grandes tailles, même lorsque leur innocuité a été montrée (Yoshida et al. 2009). Ainsi, L'étude de la toxicité développementale devient alors une question de plus en plus importante dans le recherche des effets délétères des NPs (Fujitani et al. 2012).

Lors de cette étude, l'injection de NPs ZnO n'a pas provoqué d'effet reproducteur sur les animaux, la gestation ayant eu lieu chez toutes les femelles. En revanche, l'exposition aux NPs a systématiquement induit des phénomènes inflammatoires au niveau du point d'injection ainsi que la mort de 3 femelles gestantes. La dose la plus importante utilisée était de 40 mg/kg. Or, un rapport de 2010 du *Korean Ministry of Food and Drug Safety* ([KFDA 2010](#)) montre que la dose sans effet nocif observable (DSENO) des NPs ZnO est de 268,4 mg/kg sur le rat Sprague-Dawley, bien au-dessus des doses utilisées dans notre étude.

Lors de l'enregistrement de l'activité respiratoire des nouveau-nés, nous avons observé une baisse de la fréquence ventilatoire et une augmentation de la durée des pauses respiratoires lors de l'exposition des mères aux NPs ZnO. Ces résultats montrent que les NPs ZnO présentes chez des animaux en cours de développement sont capables d'agir sur les structures responsables de la genèse et la mise en place de l'activité respiratoire. Néanmoins, une différence a pu être observée entre les deux protocoles, avec une diminution de la fréquence lors de l'exposition chronique *in vivo* et une augmentation lors de l'exposition aiguë *ex vivo*. Les conditions de l'expérience n'étant pas semblable, la différence pour s'expliquer.

Premièrement, le mode d'administration est différent. Lors des expériences *in vivo*, le système nerveux était exposé dès les premiers stades de développement, ce qui n'était pas le cas *ex vivo*. Or de nombreuses études montrent une différence d'effet entre une exposition prénatale ou postnatale à une substance. Par exemple la présence d'asthme chez l'enfant lors d'une exposition au tabac est fortement corrélée à l'exposition prénatale ([Pattenden \*et al.\* 2006](#)). A l'inverse, l'effet de l'alcool sur le développement de l'hippocampe semble plus important lors d'une exposition postnatale ([West et Hamre 1985](#)). Concernant le mode d'administration, il a déjà été montré que l'injection périphérique ou centrale du précurseur de la sérotonine (5-HTP) pouvait avoir des effets totalement opposés sur l'activité respiratoire ([Millhorn \*et al.\* 1983](#)). Ainsi chez le chat, le 5-HTP provoque une augmentation prolongée de l'activité respiratoire lorsqu'il est administré dans le troisième ventricule, mais conduit en revanche à une inhibition prolongée lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse. Ces résultats montrent la difficulté d'interprétation (et la prudence nécessaire pour les discuter) après l'administration d'agents exogènes. Enfin, la dose d'exposition dans nos séries expérimentales était également différente. En effet, l'action des NPs peut différer selon qu'elles soient administrées de façon aiguë ou chronique. Par exemple, l'exposition de drosophiles aux NPs

d'argent provoquent un arrêt du développement des larves lors d'une application aigüe, et une baisse de la fertilité lors d'une application chronique (Panacek et al. 2011)

Deuxièmement, les modèles exposés aux NPs n'étaient pas identiques. En effet, les préparations *ex vivo* sont réduites et ne disposent d'aucun retour sensoriel ni de structure supra-pontique modulatrice présente *in vivo*. Or ces structures ont de puissants effets inhibiteurs sur la respiration comme par exemple via les nerfs laryngées et vagues (Sessle et al. 1978), ou le noyau adrénérgique A5 (Errchidi et al. 1991). Il n'est donc pas exclu qu'une action excitatrice des NPs ZnO (voir chapitre II) sur ces nombreuses structures puisse rendre compte de la diminution de fréquence ventilatoire observée sur les rats nouveau-nés exposés au cours de la gestation. Enfin, si les résultats issus de l'étude *ex vivo* montrent clairement une action des NPs ZnO sur le complexe pré-Bötzinger, nous ne disposons actuellement d'aucune donnée concernant les effets de ces NPs sur l'activité du pFRG, noyau également impliqué dans la genèse du rythme respiratoire et présent chez les animaux se comportant.

# Chapitre IV: Effets des NPs ZnO sur l'activité locomotrice

## Résumé

La locomotion est un comportement moteur essentiel pour un organisme, lui permettant de réaliser des tâches fondamentales comme la recherche de nourriture, d'habitat ou encore d'un partenaire. La production de cette activité est sous la dépendance des générateurs centraux du rythme locomoteur (CPGs) qui permettent l'obtention d'une activité rythmique, complexe et organisée entre les différents muscles effecteurs des membres. Dans le cadre de l'étude des effets des NPs ZnO sur le fonctionnement des réseaux de neurones moteurs et compte-tenu des interactions et des couplages étroits existant entre les fonctions respiratoire et locomotrice, le but de cette partie expérimentale a été d'étudier la potentielle neurotoxicité de ces NPs sur la commande centrale de l'activité locomotrice. Pour cela, des préparations de tronc cérébral/moelle épinière isolés *ex vivo* de rats nouveau-nés ont été exposées de manière aiguë aux NPs ZnO. Ces expériences ont permis de montrer que les NPs induisaient un ralentissement du rythme locomoteur et perturbaient l'organisation temporelle de cette activité. L'ensemble de ces données expérimentales tend à montrer qu'une exposition aiguë et/ou chronique aux NPs ZnO est suivie de nombreux effets délétères sur l'activité de différents réseaux de neurones moteurs engagés dans la genèse et le contrôle d'importantes fonctions vitales telles que la respiration et la locomotion.

## Introduction

Les résultats exposés précédemment (chapitres II et III des résultats) ont permis de mettre en évidence les effets potentiellement neurotoxiques et délétères des NPs ZnO sur le système nerveux central, et en particulier sur l'activité des réseaux centraux rythmogènes de la respiration. De nombreuses études portant sur les interactions entre CPGs impliqués dans différentes fonctions somatiques ou végétatives chez les mammifères ont clairement montré l'existence de coordinations étroites entre les activités des centres respiratoires et celles d'autres fonctions motrices rythmiques tels que la déglutition (Martin *et al.* 1994), la mastication (McFarland et Lund 1993), le vomissement (Grélot et Miller 1994), ou encore la locomotion (Morin et Viala 2002, Giraudin *et al.* 2008, Giraudin *et al.* 2012, Le Gal *et al.* 2014,

Le Gal et al. 2016). Ainsi la déglutition, dont les centres sont aussi situés dans le tronc cérébral, induit un arrêt temporaire de l'activité respiratoire, suivi d'une grande expiration de manière à limiter les risques de fausse route. La mastication va entraîner une diminution de la fréquence respiratoire, mais sans corrélation avec la fréquence masticatoire. Le vomissement, qui peut être déclenché par de nombreuses afférences (buco-pharyngées, cardiaques, digestives, vestibulaires, de l'*area prostrama*...), possède un patron complexe généré par un centre de coordination dans le bulbe rachidien du tronc cérébral (Borison et Wang 1949). Ce patron révèle une coordination de nombreux éléments telles une co-contraction des muscles inspiratoires (diaphragme) et expiratoires (abdominaux), augmentant la pression intra-abdominale, et aboutissant à l'évacuation du bol alimentaire par ouverture de l'œsophage et la fermeture des voies respiratoires. Le vomissement est suivi de la contraction des muscles du cou et d'un réflexe de mastication permettant le nettoyage de la cavité pharyngée. La co-contraction des muscles respiratoires montre une forte coordination entre les centres respiratoires et celui du vomissement, les centres inspiratoires et expiratoires s'activant de manière synchrone lors de cette activité (Bianchi et al. 1992). La locomotion et la respiration sont deux activités étroitement liées, puisqu'un couplage de leur fréquence intervient (par exemple un cheval au gallop respire une fois par cycle locomoteur, (Bramble et Carrier 1983)). Ce dernier couplage présente l'intérêt de limiter les "conflits" biomécaniques et donc de réduire la dépense énergétique, tout en contribuant à l'amélioration des échanges gazeux lors d'un exercice soutenu (Banzett et Lehr 1982). Ce couplage repose chez certains animaux sur le phénomène de piston viscéral (le mouvement des organes pendant la course entraîne chez certaines espèces des mouvements du diaphragme (Bramble et Jenkins 1993)) mais des structures nerveuses semblent également impliquées, la stimulation des afférences sensorielles impliqués dans la locomotion permettant d'influer sur le rythme respiratoire (Giraudin et al. 2012). Dans ces conditions, on ne peut exclure que des altérations des activités respiratoires lors d'une exposition aux NPs puissent indirectement transformer et/ou dégrader les activités rythmiques d'autres fonctions. De plus, lors d'une exposition systémique aux NPs et compte-tenu des effets connus de ces particules sur les CPGs respiratoires, des altérations directes sur l'activité d'autres générateurs de rythme peuvent être envisagées. Toutefois, aucune donnée n'est actuellement disponible, notamment concernant les effets potentiellement neurotoxiques des NPs sur le fonctionnement et les activités de type locomoteur.

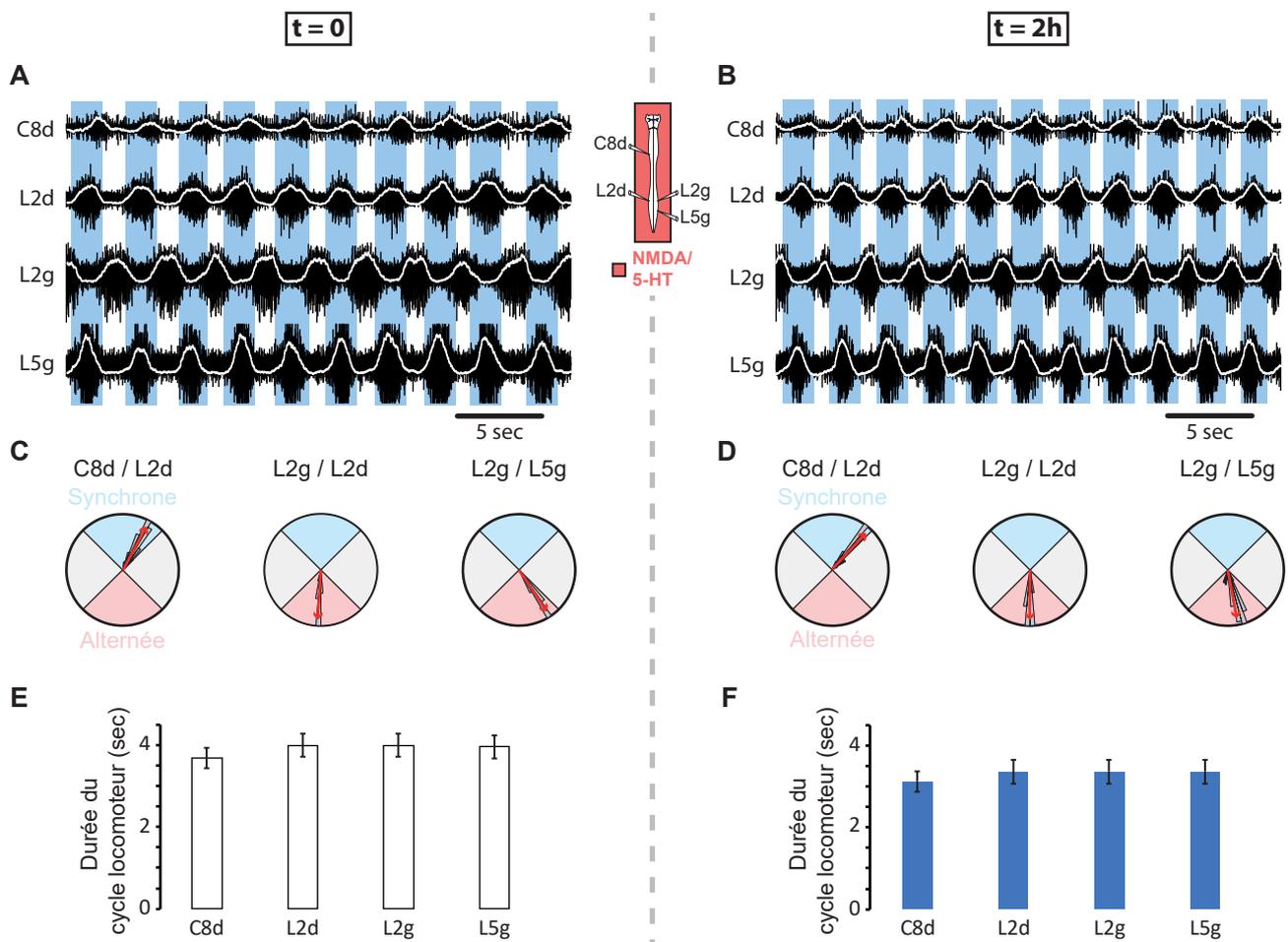
Interconnectés et localisés aux niveaux cervical et lombaire de la moelle épinière, les CPGs locomoteurs permettent l'obtention d'une activité organisée et alternée entre les membres postérieurs et antérieurs, les membres d'une même ceinture appendiculaire, et les muscles antagonistes d'une même articulation (Cazalets et al. 1995, Kjaerulff et Kiehn 1996, Ballion et al. 2001, Juvin et al. 2007, Juvin et al. 2012).

Le but de ce travail est l'étude des effets d'une exposition aiguë aux NPs ZnO sur l'activité locomotrice. L'utilisation d'une préparation de moelle épinière/tronc cérébral isolés *ex vivo* de rats nouveau-nés, et de technique d'électrophysiologie extracellulaire, ont permis d'étudier les effets des NPs ZnO lors de l'induction pharmacologique d'un épisode de locomotion fictive. Ce travail, encore préliminaire, montre donc une baisse de la fréquence locomotrice et une perturbation des phases d'activité lors d'une exposition aiguë aux NPs ZnO.

## Matériels et méthodes

*L'ensemble des protocoles est détaillé dans le chapitre "Matériels et Méthodes" général (page 66).*

Afin d'étudier l'effet des nanoparticules sur l'activité locomotrice, la préparation de tronc cérébral/moelle épinière de rat nouveau-né isolés *ex vivo* a été utilisée. L'activité locomotrice a été enregistrée à l'aide de techniques d'électrophysiologie extracellulaire, des électrodes de succion ayant été placées au niveau des racines spinales ventrales cervicales C8, lombaires L2 et L5. En condition témoin, un épisode de locomotion fictive de 10 min est induit pharmacologiquement (15  $\mu$ M 5-HT ; 7,5  $\mu$ M NMDA), puis un second est de nouveau provoqué après un temps d'attente de 2h. À noter que lors de la première application, les préparations dont les phases locomotrices étaient spontanément perturbées ou dont la période était supérieure à 5 secondes ont été systématiquement écartées. Pour les préparations exposées aux NPs ZnO, un premier épisode de locomotion fictive a été déclenché en l'absence de NPs (épisode témoin), puis les NPs ZnO ont été appliquées à la concentration de 10  $\mu$ g/mL. Après 2h d'exposition, un second épisode de locomotion fictive est pharmacologiquement induit. Une barrière étanche de Vaseline a parfois été mise en place afin d'appliquer sélectivement les NPs sur le tronc cérébral ou la moelle épinière.



**Figure 31: Caractérisation de l'activité locomotrice fictive d'une préparation ex vivo de rats nouveau-nés**

(A, B) Enregistrements de l'activité locomotrice fictive pharmaco-induite (NMDA  $7.5\mu\text{M}$ /5-HT  $15\mu\text{M}$ ) au niveau des racines ventrales cervicales (C8d) et lombaires (L2d, L2g, L5g), au début de l'expérience ( $t=0$ , A) et après 2h sans application pharmacologique ( $t=2h$ , B). Sur chaque tracé sont visibles le signal brut (noir) et le signal intégré (blanc). L'insert illustre les conditions d'enregistrement de la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée ex vivo de rat nouveau-né.

(C, D) Diagrammes représentant les relations de phases entre les différentes racines locomotrices à  $t=0$  (C) et  $t=2h$  (D). La zone bleue indique 2 racines dont les activités sont synchrones (C8d/L2d), et la zone rouge, des activités alternées (L2g/L2d et L2g/L5g). La flèche rouge indique la relation de phase moyenne sur les 60 secondes d'enregistrement ayant servies à l'analyse.

(E, F) Diagrammes en bâtons représentant la durée moyenne ( $\pm$  SEM) du cycle locomoteur par racine sur l'ensemble des préparations enregistrés ( $n=7$ ) à  $t=0$  (E) et  $t=2h$  (F).

## Résultats

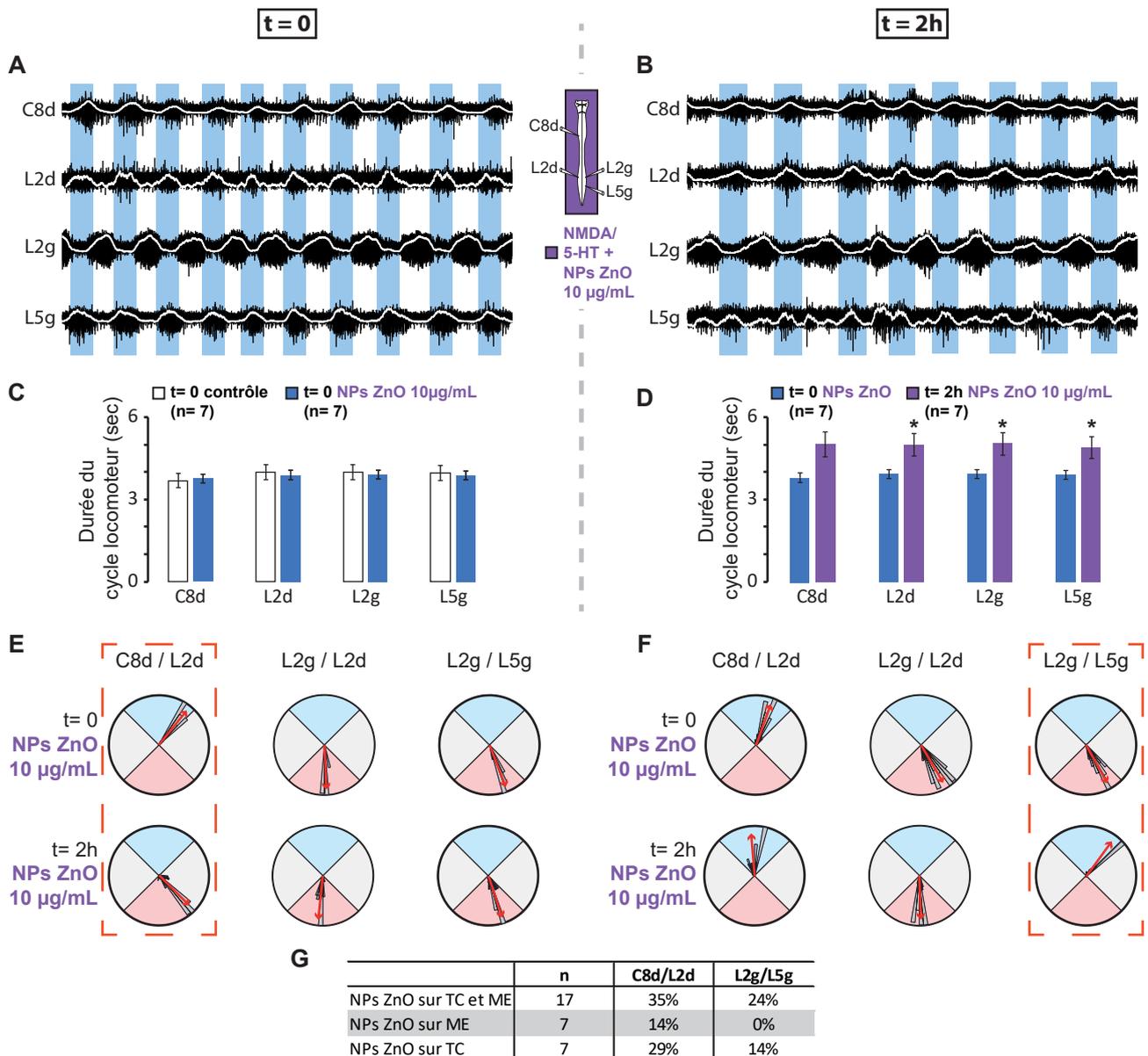
### *L'activité locomotrice fictive*

L'activité locomotrice fictive est déclenchée par l'ajout simultané de sérotonine (5-HT ; 15  $\mu$ M) et de N-méthyl D-aspartate (NMDA ; 7,5  $\mu$ M) dans le milieu de survie de la préparation tronc cérébral/moelle épinière *ex vivo* de rat nouveau-né. Après une période pendant laquelle l'excitabilité neuronale est progressivement accrue en présence de ce cocktail pharmacologique, des épisodes de locomotion fictive stables sont observés au niveau des racines spinales ventrales C8 droite (extenseur), L2 droite et gauche (fléchisseur), et L5 gauche (extenseur ; **Figure 31A**). Cette activité est caractérisée par des bouffées de potentiels d'action d'une période moyenne de  $4 \pm 0,28$  sec ( $n=7$  ; **Figure 31E**), synchrones entre les racines spinales C8d et L2d, et alternées entre les racines L2g/L2d et L5g/L2g (**Figure 31C**).

Après deux heures de repos pendant lesquelles aucune activation pharmacologique n'est effectuée, une seconde application de NMDA/5-HT est réalisée (**Figure 31B**). Sur les 7 préparations, aucune variation significative de la période n'est observée entre les 2 applications (période moyenne de L2d ;  $3,36 \pm 0,29$  sec ;  $n=7$ ;  $p=0,08$ ; **Figure 31F**). De plus, les phases locomotrices sont restées stables (**Figure 31D**), exceptée dans le cas d'une préparation, pour laquelle la synchronie classiquement décrite entre les activités des racines C8d et L2d a fait place à une alternance.

### *Effet des NPs ZnO sur l'activité locomotrice fictive*

Avant l'application des NPs ZnO, une première application pharmacologique NMDA/5-HT est effectuée afin de déclencher un épisode de locomotion fictive. L'activité était en tout point comparable à celle observée dans le groupe témoin, présentant une alternance bilatérale (L2d/L2g), une alternance de type fléchisseur/extenseur (L2g/L5g), ainsi qu'une activité synchrone entre les racines C8d/L2d sur l'ensemble des préparations ( $n=17$ , **Figure 32A**). De plus, aucune différence significative de la période locomotrice ( $3,89 \pm 0,16$  sec ;  $n=17$ ;  $p=0,77$ ; **Figure 32C**) n'a été décelée. À la suite de cette première application pharmacologique, les NPs ZnO ont été ajoutées au milieu de perfusion à une concentration de 10  $\mu$ g/mL. Après 2h d'incubation, une seconde application pharmacologique NMDA/5-HT a été réalisée (**Figure 32B**). Dans ces conditions expérimentales, la période locomotrice est significativement augmentée en présence de NPs ZnO (période moyenne ;  $4,94 \pm 0,40$  sec ;  $p<0,05$  ;  $n=17$  ;



**Figure 32: Effets d'une application aiguë de NPs ZnO sur la période et les relations de phase de l'activité locomotrice fictive**

(A, B) Enregistrements de l'activité locomotrice fictive pharmacologiquement induite (NMDA 7.5µM/5-HT 15µM) au niveau des racines ventrales cervicales (C8d) et lombaires (L2d, L2g, L5g), au début de l'expérience (t= 0, A) et après 2h d'application d'une concentration de 10 µg/mL de NPs ZnO (t= 2h, B). Sur chaque tracé sont visibles le signal brut (noir) et le signal intégré (blanc). L'insert illustre les conditions d'enregistrement de la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolée ex vivo de rat nouveau-né.

(C, D) Diagrammes en bâtons comparant la durée moyenne (± SEM) du cycle locomoteur par racine à t= 0 entre le groupe contrôle (n= 7) et le groupe exposé par la suite aux NPs ZnO (n= 17; C) et entre t= 0 et après 2h d'exposition à une dose de 10 µg/mL de NPs ZnO (n= 17; D). \*p<0.05.

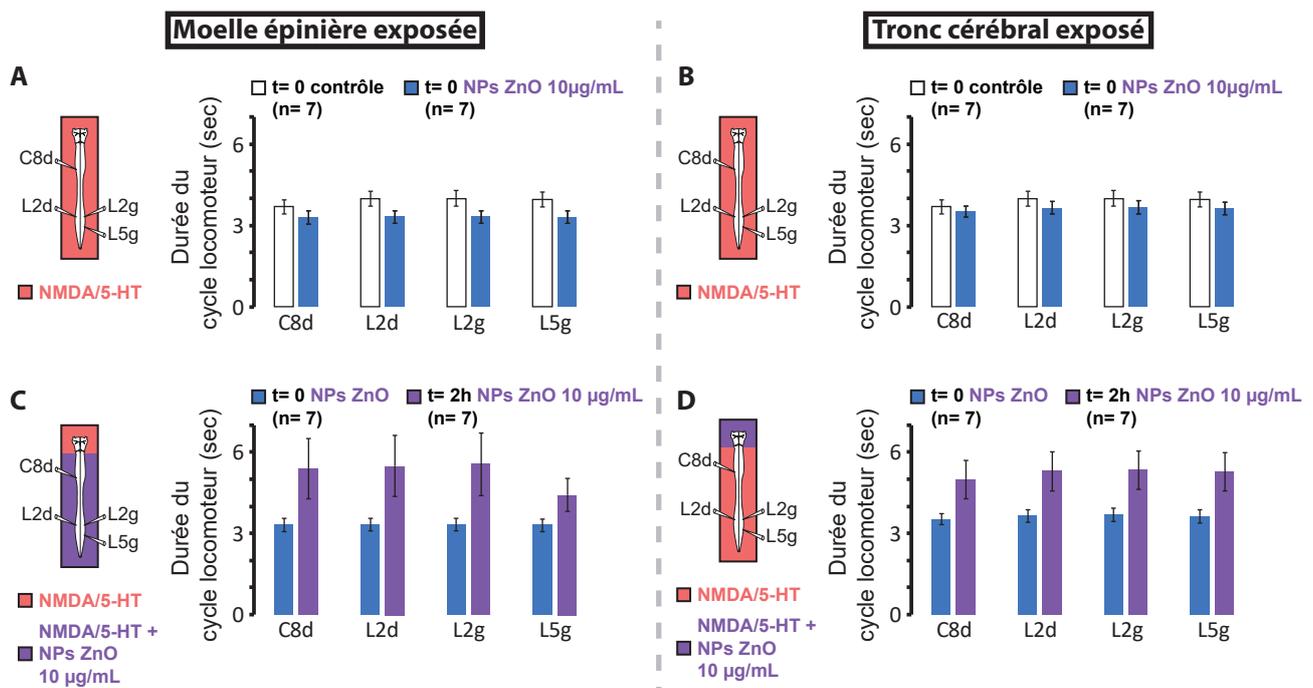
(E, F) Diagrammes représentant un exemple de changement de phase, suite à l'application sur la préparation pendant 2h des NPs ZnO, entre les racines C8d et L2d (E) et les racines L2g et L5g (F). La zone bleue indique 2 racines dont les activités sont synchrones, et la zone rouge, des activités alternées. La flèche rouge indique la relation de phase moyenne sur les 60 secondes d'enregistrement ayant servi à l'analyse.

(G) Tableau présentant le pourcentage de changements de phase observés entre les racines C8d/L2d et L2g/L5g ainsi que le nombre de préparations pour chaque condition expérimentale. TC: Tronc cérébral, ME: Moelle épinière.

**Figure 32D**), traduisant un ralentissement du rythme locomoteur. Des altérations du patron sont également observées. Ainsi, 35% des préparations (6/17, **Figure 32G**), présentent un changement de phase entre les activités des racines C8d et L2d, d'activités synchrones à alternées (**Figure 32E**). De plus, 24% des préparations exposées (4/17) montrent une disparition de l'alternance de type fléchisseur/extenseur au niveau lombaire (L2g et L5g, **Figure 32F, G**).

#### *Une cible préférentielle des NPs ZnO dans le système nerveux ?*

Bien que les CPGs locomoteurs soient situés dans la moelle épinière, des structures supraspinales telles que la MLR ou la formation réticulée sont aussi impliquées dans le déclenchement et l'organisation de l'activité locomotrice (Atsuta et al. 1990). Afin de déterminer si les NPs ZnO agissent préférentiellement sur telle ou telle structure locomotrice dans le système nerveux central, les NPs ZnO ont été appliquées de manière différentielle sur le tronc cérébral (TC) ou sur la moelle épinière (ME) grâce à l'utilisation d'une barrière étanche de Vaseline. Lors d'épisodes locomoteurs déclenchés par une première application de NMDA/5-HT (sans NPs ZnO), les périodes locomotrices étaient de nouveau comparables à celles observées lors des conditions témoin, que ce soit dans le groupe ME (période moyenne de L2d;  $3,31 \pm 0,23$  sec; n=7; **Figure 33A**) ou le groupe TC (période moyenne de L2d;  $3,65 \pm 0,23$  sec; n=7; **Figure 33B**). Après deux heures d'incubation en présence des NPs ZnO à une dose de 10 µg/mL, une seconde application pharmacologique de NMDA/5-HT déclenche des activités rythmiques de locomotion fictive dont la période n'est pas modifiée de manière significative, malgré une tendance à l'augmentation (groupe ME; période moyenne L2d;  $5,48 \pm 1,12$  sec; n=7; p=0,113; **Figure 33C**; groupe TC; période moyenne L2d;  $5,29 \pm 0,72$  sec; n=7; p=0,085; **Figure 33D**). De plus, des modifications du patron locomoteur ont pu être observées dans les 2 groupes expérimentaux (**Figure 32G**). De manière intéressante, au sein du groupe TC exposé aux NPs ZnO, 29% des préparations testées (2/7) montrent une perte de synchronie entre les racines C8 et L2 ipsilatérales, et 14% ont vu l'activité des racines L2 et L5 ipsilatérales devenir synchrones (**Figure 32G**).



**Figure 33: Implication des structures du tronc cérébral et de la moelle épinière dans l'effet sur l'activité locomotrice ex vivo d'une application aiguë de NPs ZnO**

(A, C) Diagrammes en bâtons comparant la durée moyenne ( $\pm$  SEM) du cycle locomoteur par racine à t=0 entre le groupe contrôle (n= 7) et le groupe exposé par la suite aux NPs ZnO (n= 17; A) et entre t=0 et après 2h d'exposition uniquement de la moelle épinière à une dose de 10 µg/mL de NPs ZnO (n= 7; C).

(B, D) Diagrammes en bâtons comparant la durée moyenne ( $\pm$  SEM) du cycle locomoteur par racine à t=0 entre le groupe contrôle (n= 7) et le groupe exposé par la suite aux NPs ZnO (n= 17; B) et entre t=0 et après 2h d'exposition uniquement du tronc cérébral à une dose de 10 µg/mL de NPs ZnO (n= 7; D).

## Discussion

Les données préliminaires de cette étude ont mis en évidence que l'exposition aiguë aux NPs ZnO peut engendrer des perturbations des générateurs de rythme impliqués dans la production des activités locomotrices. Les principaux résultats se concentrent autour d'un allongement de la période locomotrice (effet rythme) et d'une perturbation des relations de phase entre les activités de différentes sorties motrices (effet patron).

Plusieurs études se sont déjà intéressées à l'effet des NPs sur la locomotion. Ainsi, les NPs d'argent induisent chez le rat une diminution du poids et de l'activité locomotrice ([Zhang et al. 2013](#)). Les NPs de titane réduisent la vitesse de nage et l'activité générale chez le *zebrafish* (*Danio rerio*) lors d'une exposition embryonnaire ([Chen et al. 2011](#)). Enfin, les NPs ZnO, toujours lors d'une exposition embryonnaire chez le *zebrafish*, augmentent le délai avant éclosion, et diminuent également l'activité locomotrice des animaux ([Chen et al. 2014](#)). Malgré ces résultats sur le comportement locomoteur des animaux, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet direct des NPs sur les réseaux générant et organisant l'activité locomotrice chez le mammifère nouveau-né.

Des études antérieures ont montré que les NPs métalliques peuvent interférer avec le métabolisme du glutamate (diminution de la libération synaptique) et induire une diminution du nombre de récepteurs NMDA ([Ma et al. 2010](#), [Hong et al. 2015](#), [Begum et al. 2016](#)). Or, la commande supra-spinale excitatrice projetant sur les CPGs lombaires est de type glutamatergique, la concentration de glutamate libéré permettant de réguler le rythme locomoteur ([Cazalets et al. 1992](#), [Talpalar et Kiehn 2010](#)). Ainsi, les NPs pourraient provoquer une diminution de la commande supra-spinale par diminution du taux de glutamate synaptique (effet présynaptique, application sur le tronc cérébral) ou du nombre de récepteurs NMDA disponibles (effet post-synaptique, application sur la moelle épinière), aboutissant au ralentissement du rythme observé lors de nos expériences. De plus, l'effet pro-apoptotique des NPs ZnO via l'induction de ROS ([Lai et al. 2008](#), [Deng et al. 2009](#), [Guo et al. 2013](#), [Valdiglesias et al. 2013](#), [Sruthi et Mohanan 2015](#)) pourrait diminuer le nombre de neurones actifs au sein du CPG locomoteur, influençant aussi le rythme de l'activité locomotrice, mais également le couplage entre les différentes composantes de cette activité. Comme évoqué en introduction, l'activité locomotrice est intimement liée à l'activité respiratoire. Au vu des effets que peuvent avoir les NPs ZnO sur le couplage intrinsèque des

réseaux locomoteurs (i.e., coordinations inter-segmentaires), ces dernières pourraient également agir sur le couplage de l'activité locomotrice avec d'autres fonctions telles que la respiration. Une perturbation de ce couplage pourrait augmenter la dépense énergétique de l'organisme, mais aussi diminuer les performances à l'effort, de par la baisse de la qualité de l'échange gazeux au niveau pulmonaire. L'effet possible sur ces couplages, ajoutés aux effets démontrés dans cette étude sur les réseaux respiratoires et locomoteurs, pourraient fortement impacter un organisme dès les premiers stades de son développement.

## **Discussion générale**

L'ensemble des résultats ayant été discuté au fur et à mesure de leur présentation, je m'attacherai dans cette dernière partie à reprendre de manière succincte les principales données expérimentales de mon travail de thèse, puis à évoquer la vulnérabilité pré- et post-natale notamment des fonctions cérébrales vis-à-vis de l'exposition à différentes substances neuroactives, pour continuer sur une réflexion personnelle concernant l'évaluation du risque chimique lié à l'exposition aux nanoparticules, et terminer par les avancées majeures que permettront les NPs dans le domaine médical.

## Rappel des principaux résultats

Ce travail de thèse a permis de montrer que les NPs ZnO pouvaient exercer une action modulatrice, devenant rapidement délétère, sur le fonctionnement de 2 réseaux moteurs du système nerveux central. Sachant que les voies d'entrée des NPs ZnO dans l'organisme sont multiples (Choi *et al.* 2010, Kao *et al.* 2012) et que ces particules ont la capacité de passer la barrière hématoencéphalique pour rejoindre le SNC (Cho *et al.* 2013), nous avons fait le choix d'étudier les effets potentiellement neurotoxiques que pourraient avoir les NPs ZnO lors d'une exposition aiguë sur le système nerveux. Cela a déjà été rapporté sur l'hippocampe (Zhao *et al.* 2009) ou sur des cultures de neurones (Deng *et al.* 2009, Valdiglesias *et al.* 2013). À notre connaissance, ce travail est le premier à montrer les effets neurotoxiques des NPs ZnO sur le fonctionnement de réseaux moteurs neuronaux engagés dans des fonctions vitales que sont la respiration et la locomotion.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques des NPs ZnO utilisées dans ce travail doctoral. L'utilisation de la microscopie électronique en transmission a permis d'observer leur forme ovoïde et de mesurer leur taille moyenne de 34 nm (**Figure 21**). Bien que potentiellement insolubles (les NPs ZnO étant en suspension dans le milieu), les données obtenues par spectrométrie atomique de flamme ont révélé qu'une faible fraction (**Figure 21D**) pouvait se dissocier en zinc libre, cette fraction étant vraisemblablement insuffisante pour induire des effets neuronaux (Marin *et al.* 2000, Valdiglesias *et al.* 2013).

L'utilisation de la préparation de tronc cérébral/moelle épinière isolés *ex vivo* de rat nouveau-né nous a alors permis de déterminer les effets des NPs ZnO sur l'activité respiratoire centrale. L'application aiguë des NPs sur la préparation induit une accélération du rythme respiratoire, suivi d'un arrêt précoce et définitif de toute activité (**Figure 23**). L'application

limitée au tronc cérébral (**Figure 25**) et l'utilisation de tranches contenant le générateur du rythme inspiratoire (**Figure 26**) montrent que l'action des NPs cible en particulier le complexe pre-Bötzing. Enfin les enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp précisent les effets cellulaires de l'exposition à ces NPs et montrent une dépolarisation spécifique des neurones inspiratoires du préBötC, mécanisme probable à la base de l'accélération du rythme sur préparations exposées, ainsi qu'une baisse progressive de l'amplitude des potentiels d'action qui contribuerait à l'arrêt de l'activité respiratoire (**Figure 27**).

Sur la base de ces résultats, notre travail a intégré une étude chez l'animal *in vivo* en période prénatale, les fœtus de rats étant alors exposés aux NPs ZnO par le biais d'injections répétées chez les femelles gestantes tout au long de la gestation. Nous avons ainsi évalué les effets d'une application chronique des NPs sur le développement et la mise en place des réseaux respiratoires, grâce à l'utilisation de la pléthysmographie corps entier chez le rat nouveau-né. A l'instar des données *ex vivo*, les résultats montrent une altération de l'activité ventilatoire chez les animaux âgés de 2 à 4 jours, se traduisant cette fois par une baisse de la fréquence respiratoire moyenne (**Figure 30C**), ainsi qu'un allongement des pauses respiratoires (**Figure 30D**). Ces données expérimentales d'exposition chronique au cours de la gestation confortent l'hypothèse d'une transmission verticale materno-fœtale des NPs ZnO via la barrière placentaire et leur action modulatrice sur le système respiratoire.

Enfin, sur la base de notre contribution à l'étude des effets de ces NPs sur le système nerveux central en général et sur le fonctionnement des réseaux neuronaux moteurs en particulier, une partie de notre étude s'est concentrée sur le fonctionnement d'autres générateurs de rythmes dans les conditions normales et lors d'une exposition aiguë aux NPs de ZnO. Ainsi, des résultats préliminaires montrent que ces particules altèrent également le fonctionnement des réseaux spinaux locomoteurs, induisant sur préparations isolées *ex vivo* un ralentissement du rythme associé à une profonde désorganisation du patron locomoteur (**Figure 32**).

## Période périnatale et vulnérabilité

Pendant la grossesse, l'organisme en développement présente une vulnérabilité accrue à de nombreuses substances, surtout pendant les premières semaines de développement. En effet chez l'Humain, les 8 premières semaines de développement embryonnaire (après fécondation, soit 10 semaines d'aménorrhée) correspondent aux étapes d'organogenèse pendant lesquelles l'ensemble des organes se différencie et se met en place. En parallèle, le placenta n'entre réellement en fonction qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de développement, moment où les bourgeons primitifs d'organes sont déjà différenciés, et ne sera totalement formé qu'à partir de la 18<sup>ème</sup> semaine de développement. Malgré la présence du placenta, dont le rôle ne se limite pas à celui de barrière (nutrition, respiration, excrétion, fonction endocrine), de nombreux éléments sont capables d'agir sur l'embryon, que ce soit indirectement, par un effet sur la physiologie maternelle, ou directement par le biais d'un passage placentaire (transmission verticale). En effet, le placenta n'est pas une barrière stricte et laisse passer de nombreux éléments vers l'embryon tels les nutriments, les virus, les substances toxiques, ou encore les médicaments. Ces derniers peuvent agir sur le développement de nombreuses structures dont le cerveau et avoir des conséquences sur l'ensemble de la vie de l'individu. Le stress de la mère par exemple est connu pour avoir de nombreux effets délétères sur le développement de l'enfant, augmentant le risque d'avortement et de naissance prématurée, mais pouvant aussi perturber leur système endocrinien (le rendant plus susceptible au stress) et provoquer des troubles du comportement (tels des troubles moteurs, un retard mental, une hyperactivité), les hormones du stress (corticostéroïdes) étant capables de passer la barrière placentaire et agir directement sur le fœtus (pour revue, [\(Mulder \*et al.\* 2002\)](#)).

Ainsi, le système nerveux central reste vulnérable aux facteurs extérieurs tout au long de son développement, que ce soit en période prénatale ou en période postnatale. En effet, la mise en place et le fonctionnement du système nerveux d'un nouveau-né est encore immature, la myélinisation [\(Ballesteros \*et al.\* 1993\)](#), les synapses [\(Huttenlocher et de Courten 1987\)](#) et certains courants ioniques [\(Swann \*et al.\* 1989\)](#) n'étant pas encore totalement opérationnels après la naissance. Les divers polluants atmosphériques, dont les nanoparticules font partie, pourraient donc agir sur ces processus développementaux et

perturber la mise en place et le bon fonctionnement des réseaux neuronaux, à l'instar de nombreuses substances dont les effets périnataux sont maintenant bien connus. En effet, au cours de la gestation, le fœtus peut être exposé à de nombreux éléments extérieurs, que ce soit lors d'une exposition choisie par la mère (alcool, tabac, cannabis...), ou lors d'une exposition subie (pesticides, particules ultrafines atmosphériques...).

Par exemple, l'absorption d'alcool par la mère peut provoquer chez l'enfant des troubles de l'intelligence, de l'attention et de la mémoire, même pour de faibles doses ingérées. Les effets de l'alcool peuvent être directs (l'alcool passant la barrière placentaire) ou indirects (induction d'une hypoxie, apparition de ROS), les deux entraînant des atteintes cérébrales chez le fœtus (West et al. 1994). En effet, une fois passé la barrière placentaire, l'alcool se retrouve stocké dans le liquide amniotique, augmentant la durée d'exposition du fœtus et provoquant des phénomènes vasoconstricteurs qui diminuent les échanges de nutriments et d'oxygène entre la mère et l'enfant (Pollard). Les effets de l'alcool sur le système nerveux en développement sont multiples, allant de l'altération de la prolifération et de la migration neuronale, de l'induction de mort cellulaire jusqu'à une modification de l'arborisation dendritique (West et al. 1994). Les effets peuvent également être plus spécifiques, l'alcool pouvant agir directement au niveau de la neurotransmission. À faible concentration, il altère l'activité des récepteurs GABA (Zorumski et al.) et est un inhibiteur compétitif des récepteurs NMDA, perturbant alors les phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme, processus impliqués dans tous les processus mnésiques et d'apprentissage.

Autre exemple, le cannabis est l'une des substances psychoactives illicites les plus consommées dans le monde (UNODC 2014). Il est souvent considéré comme un agent récréatif plutôt inoffensif malgré les preuves évidentes d'un impact délétère sur les systèmes nerveux adultes ou en cours de développement. Le corps humain possède ses propres endocannabinoïdes, impliqués dans de nombreuses fonctions telles que le mouvement, la mémoire, l'appétit, la thermorégulation, la douleur ou le système immunitaire (Jaques et al. 2014). Ces récepteurs sont exprimés tôt au cours du développement et sont impliqués dans les phénomènes de prolifération et de migration neuronale, mais également dans la synaptogenèse. Ainsi, l'exposition aux cannabinoïdes exogènes au cours du développement perturbe ces processus développementaux impliquant les récepteurs aux cannabinoïdes (Jutras-Aswad et al. 2009). Indirectement, le cannabis perturbe également le développement

du système dopaminergique, agissant sur la tyrosine hydroxylase, enzyme de synthèse de la dopamine, impactant alors la maturation des neurones dopaminergiques. Les conséquences connues sont une augmentation du risque de maladie neuropsychiatriques comme la dépression ou la schizophrénie (Seeman 2006, Volkow et al. 2007). De part ces mécanismes, l'exposition prénatale au cannabis induit à long terme des troubles de l'apprentissage et de l'attention (El Marroun et al. 2011), mais également des troubles moteurs (Glass et al. 1997) ou encore des pathologies liées à l'alimentation telles le diabète, des troubles de l'appétit, ou une dyslipidémie (Fried et al. 2001).

Une autre forme d'exposition subie en période prénatale et choisie par la mère est la consommation de tabac (il est à noter que près de 26% des mères américaines n'arrêtent pas de fumer pendant leur grossesse (CDC 2004)). Les nombreuses substances toxiques contenues dans la fumée de cigarette (nicotine, monoxyde de carbone, acétone, arsenic, plomb, mercure...) peuvent se retrouver et s'accumuler dans le compartiment fœtal dès la 7<sup>ème</sup> semaine de grossesse, que ce soit pour les fumeuses actives ou passives (Jauniaux et al. 1999). L'un des plus grands risques de l'exposition prénatale au tabac est l'augmentation de la survenue de mort subite du nourrisson (Prabhu et al. 2010). À plus long terme, cette exposition peut provoquer des troubles dans la régulation du rythme cardiaque, augmentant le risque de maladies cardiovasculaires (Stephan-Blanchard et al. 2016), mais également des altérations de l'apprentissage, de la mémoire, de l'ouïe, du comportement, voire une atteinte génétique (Zhou et al. 2014). Ces altérations peuvent s'expliquer par l'hypertrophie et la perte neuronale induite par la fumée de tabac (Slotkin et Seidler 2010), mais aussi par l'action de la nicotine sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique qui jouent un rôle crucial dans le développement du cerveau fœtal tel que la pousse axonale, la formation de synapses et la survie cellulaire (Changeux 2010). De plus, l'exposition à la nicotine réduit le nombre de cellules et de projections neuronales dans certaines zones cérébrales, telles que le noyau caudé, augmentant la susceptibilité à la tachycardie ou à l'hypoxie fœtale (Zhou et al. 2014). En plus de ces effets neuronaux, l'exposition prénatale au tabac augmente le risque pour l'enfant de développer des pathologies respiratoires, telles que des infections ou de l'asthme (Prabhu et al. 2010), mais aussi un surpoids ou de l'obésité (Wells 2007), ou encore de présenter des troubles de la reproduction (Zhang et al. 2015). À noter qu'après la naissance, l'enfant peut encore se trouver exposé aux éléments toxiques du tabac via le tabagisme passif,

ou le lait maternel (Zhou et al. 2014), renforçant les mécanismes délétères déjà mis en place pendant la grossesse.

En parallèle, une mère peut également subir l'influence d'éléments environnementaux qui peuvent impacter le développement du fœtus. C'est le cas par exemple des pesticides organophosphatés. Présents dans notre alimentation (mais aussi aérosolisés dans l'atmosphère), ces produits chimiques sont déjà connus pour induire des effets cancéreux, neurologiques, reproductifs, immunologiques et génotoxiques y compris pour de faibles taux d'exposition (Koureas et al. 2012). Au-delà de l'exposition périnatale qui nous intéresse ici, notons que certains produits de cette famille, comme le glyphosate, sont au cœur de problématiques de santé publique au vu de leurs effets à long terme notamment chez les agriculteurs (perte de poids, maladie neurodégénérative de Parkinson..., (Duke 2017)) dont les conséquences de l'exposition ont été reconnues comme maladie professionnelle en France dès 2012. Dans le cas de mères enceintes, ces molécules aux propriétés hydrophobes sont capables de passer la barrière placentaire et d'agir sur le fœtus en développement (Abdel-Rahman et al. 2002). L'exposition périnatale aux pesticides induit chez les nourrissons une réduction du poids et de la taille à la naissance (Perera et al. 2002, Mayhoub et al. 2014), puis chez l'enfant des troubles cognitifs, moteurs et de l'attention (Rauh et al. 2006), une diminution de la mémoire de travail et du quotient intellectuel (Rauh et al. 2011), l'apparition de tremblements (Rauh et al. 2015) mais peut aussi toucher d'autres organes tels que les intestins (Darwiche et al. 2017). Certains des effets des pesticides sur le développement peuvent s'expliquer par leur action inhibitrice sur l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme jouant un rôle important dans le système nerveux en dégradant l'acétylcholine libérée au niveau synaptique. Cette inhibition a pour effet l'accumulation d'acétylcholine dans les terminaisons nerveuses, sur-stimulant les récepteurs nicotiques et muscariniques (Ecobichon 2001) et interférant dès les premiers stades dans le développement du cerveau (Rice et Barone Jr. 2000). Même si dans de nombreux cas le taux d'exposition des mères et des enfants n'est pas suffisant pour induire cette inhibition enzymatique, d'autres mécanismes d'action des pesticides ont pu être mis récemment en évidence *in vitro* (Androutopoulos et al. 2013). Ainsi l'exposition périnatale aux pesticides à des concentrations n'inhibant pas l'AChE induit tout de même une diminution du nombre de neurites, une inhibition de la synthèse d'ADN et une altération de la différenciation des

cellules gliales (Flaskos 2012), mais également une phosphorylation des facteurs de transcription impliqués dans le développement cérébral, perturbant les fonctions cognitives (Schuh 2002).

Les polluants atmosphériques comprenant les particules fines, très fines et ultrafines<sup>1</sup> constituent un autre exemple d'exposition materno-fœtale subie. Chez un adulte, l'exposition à cette pollution provoque des effets à différents niveaux. Inhalées, elles induisent des inflammations au niveau pulmonaire, potentialisent l'apparition de cancers pulmonaires et augmenteraient le risque de maladies cardiovasculaires (Cesaroni et al. 2013). Lors d'une exposition postnatale, les enfants vivant dans des zones fortement polluées peuvent présenter à terme, en plus des effets inflammatoires au niveau pulmonaire, des déficits cognitifs, des lésions au niveau du cortex préfrontal ainsi que l'expression de facteurs de risque à la maladie d'Alzheimer (Calderon-Garciduenas et al. 2008), potentiellement dus à un ralentissement de la maturation neuronale chez les enfants exposés (Pujol et al. 2016). En effet, des études *in vitro* ont montré que les particules inhalées par des mères gestantes pouvaient se retrouver dans le cerveau de leur descendance (Sugamata et al. 2006b). D'un point de vue comportemental, les animaux dont la mère a été exposée présentaient une activité locomotrice réduite, induite par des perturbations de la neurotransmission, variant selon les zones du cerveau. Ainsi le taux de dopamine est diminué dans le striatum et le noyau accumbens (Yokota et al. 2009), mais augmenté, tout comme la noradrénaline, dans le complexe préfrontal (Suzuki et al. 2010). A l'inverse, le taux de noradrénaline est diminué dans le cervelet (Yokota et al. 2013). L'expression des récepteurs glutamatergiques de type NMDA est également réduite dans l'hippocampe, impactant la mémoire spatiale (Yokota et al. 2015). Enfin, des phénomènes apoptotiques ont pu être observés au niveau des cellules cérébelleuses de Purkinje (Sugamata et al. 2006a).

Le dernier exemple d'exposition subie concerne les nanoparticules de métaux ou d'oxyde de métaux. Présentes dans notre quotidien sous différentes formes et dans de nombreux

---

<sup>1</sup> On distingue en métrologie les PM<sub>10</sub> (PM ou "Particulate Matter" pour matières particulaires), les PM<sub>2,5</sub> ou encore les PM<sub>0,1</sub> selon la taille des particules en micromètre:

- PM<sub>10</sub> particules en suspension dans l'air, d'un diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm;
- PM<sub>2,5</sub> dont le diamètre est inférieur à 2,5 µm, appelées particules fines;
- PM<sub>1,0</sub> dont le diamètre est inférieur à 1,0 µm, appelées particules très fines;
- PM<sub>0,1</sub> dont le diamètre est inférieur à 0,1 µm, appelées particules ultrafines ou nanoparticules.

produits (voir "*Propriétés nouvelles et applications des nanoparticules*" – page 54), de nombreux effets délétères ont pu être démontrés, dont le passage des barrières biologiques telles que la barrière placentaire (voir "*Toxicologie des nanoparticules*" – page 57). Les mères, et par extension les fœtus, y sont donc fortement exposés. Le recul n'étant pas encore suffisant, les effets développementaux des NPs chez l'Homme restent pour le moment inconnus. Néanmoins, plusieurs études, dont la nôtre, ont pu s'intéresser à leurs effets sur le développement du cerveau de mammifères et ce à plusieurs niveaux.

Au niveau comportemental et physiologique, plusieurs effets induits par l'exposition prénatale aux NPs ont pu être démontrés. Ainsi, l'inhalation maternelle de dioxyde de titane induit dans la descendance des troubles sensorimoteurs (Hougaard *et al.* 2010) et de la mémoire (Mohammadipour *et al.* 2014), ainsi qu'une plus grande susceptibilité à développer des pathologies respiratoires de type asthme (Fedulov *et al.* 2008), ou encore des troubles dépressifs (Cui *et al.* 2014). Concernant les NPs ZnO, l'exposition prénatale induit dans la descendance des troubles de l'apprentissage et de la mémoire (Xiaoli *et al.* 2017), tout comme lors d'une exposition périnatale à l'alcool, au tabac, aux pesticides ou à la pollution aux particules. À cela s'ajoute les troubles respiratoires (diminution de la fréquence et augmentation de la durée des pauses), observés lors de cette étude.

Au niveau des mécanismes d'action des NPs lors d'une exposition prénatale, le dioxyde de titane induit des troubles de la plasticité synaptique au niveau hippocampique (Gao *et al.* 2011) et une augmentation de la concentration en dopamine au niveau préfrontal (Takahashi *et al.* 2010), alors que l'induction d'apoptose au niveau cérébral (Xiaoli *et al.* 2017) ont été mis en avant lors de l'exposition prénatale aux NPs ZnO.

Malgré ce faible nombre de données lors d'une exposition maternelle, de nombreuses études ont déjà montrées les effets délétères des NPs *in vitro* lors d'une exposition plus tardive (voir "*Toxicologie des nanoparticules*" – page 57), certains de ces effets étant comparables à ceux observés lors de l'exposition prénatale à d'autres substances. Ainsi l'application aigüe de NPs *in vitro* est capable d'interférer avec les récepteurs de type NMDA (Ma *et al.* 2010, Hong *et al.* 2015, Begum *et al.* 2016) ou d'induire la production de ROS et des phénomènes apoptotiques (Shrivastava *et al.* 2014), tout comme l'exposition prénatale à l'alcool ou aux particules atmosphériques. Les NPs peuvent également perturber de manière plus générale la neurotransmission (Zhao *et al.* 2009, Yang *et al.* 2010), à l'instar de l'alcool, du tabac, du

cannabis, des pesticides ou des particules atmosphériques. Certaines NPs étant capables de passer la barrière placentaire, nous pouvons supposer que les effets observés *in vitro* pourraient se produire dans les conditions *in vivo* pendant la période de développement embryonnaire. Ainsi, l'ensemble de ces données bibliographiques (alcool, tabac, cannabis, pesticides, pollution...) et des résultats rapportés dans mon travail doctoral (NPs ZnO) mettent en évidence certains processus similaires de vulnérabilité périnatale impliquant des mécanismes centraux comparables aboutissant à des effets délétères sur le développement et le fonctionnement du système nerveux central.

## Nanomatériaux et nanoparticules: vers une évaluation du risque

Si mes travaux de thèse ont comme objectif central d'étudier la neurotoxicité potentielle des NPs ZnO en période périnatale, ils s'inscrivent également dans une démarche expérimentale visant humblement à participer à l'évaluation du risque chimique. Ce que l'on appelle risque pour la santé humaine traduit la probabilité, faible ou forte, qu'une personne soit atteinte par un danger (de la Moricière 2006, Lesbats 2012). Le risque résulte donc de la combinaison d'un danger (la toxicité qui est une propriété intrinsèque du composé) et de l'exposition. Une bonne connaissance de l'exposition, qui inclut celle sur les moyens de protection collective et individuelle, est un élément essentiel à la gestion du risque, ainsi qu'à la mise en place d'actions adaptées de prévention. La connaissance quantitative des expositions est donc un élément capital des études cherchant à associer par exemple une pollution particulaire de l'air à des effets sur la santé. Concernant le risque sanitaire, il est maintenant clairement admis qu'il existe trois voies possibles d'exposition que sont l'ingestion, le contact cutané et l'inhalation. Cette dernière est considérée comme la voie la plus probable d'exposition et les connaissances accumulées au cours des quinze dernières années dans les domaines des effets sur la santé des populations exposées, notamment aux pollutions aériennes (aérosol urbain) et de la toxicologie, témoignent d'effets néfastes liés aux propriétés spécifiques des nanomatériaux (taille des particules, composition, morphologie, concentration en masse, surface ou nombre des particules, réactivité chimique de surface ; (Lahmani et Marano 2015)). Ainsi, afin de prévenir la survenue de pathologies dues à l'exposition à tel ou tel produit chimique (qu'il soit ou pas à l'état nanoparticulaire), il est

nécessaire de réduire le plus possible et de fixer une limite à celle-ci. C'est ce que l'on appelle les valeurs limites d'exposition (VLE)<sup>2</sup>.

Produites naturellement (volcans, érosion...), de manière manufacturée (productions industrielles) ou de façon secondaire (processus de combustion tels les fumées de diesel ou de soudage), les NPs sont présentes dans notre environnement et dans de nombreux produits de consommation. Comme cela a déjà été évoqué à de nombreuses reprises, l'exposition de la population générale est donc en constante progression. Compte tenu de ces différentes sources de production et des différents temps d'exposition, il est par conséquent extrêmement difficile d'établir pour l'ensemble de la population des VLE pour chaque composé nanoparticulaire, en se basant sur des données toxicologiques ou médicales. Ainsi, seules les particules atmosphériques PM10 et PM2,5 (particules de diamètre moyen inférieur respectivement à 10 et 2,5  $\mu\text{m}$ ; PM signifiant "*Particulate Matter*" pour matières particulaires) font l'objet d'une surveillance depuis une vingtaine d'années, dans la mesure où elles correspondent à des particules dites respirables susceptibles d'atteindre la fraction thoracique et/ou alvéolaire de l'appareil respiratoire. Les normes européennes et françaises de la qualité de l'air relatives aux particules portent donc uniquement sur les PM10 et les PM2,5. Pour exemple, fixées par la directive européenne n°1999/30/CE du 22 avril 1999 relative aux VLE pour l'anhydride sulfureux, le dioxyde d'azote et les oxydes d'azote, ainsi que pour les particules de plomb dans l'air ambiant, les valeurs limites pour la protection de la santé concernant les PM10 s'établissent à 40  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (annuel) et à 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (pic sur 24h, sans dépasser plus de 35 jours par an). Pour les PM2,5 la VLE est de 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (annuel). Toutefois, la réglementation internationale est plus stricte que la réglementation européenne, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconisant une valeur annuelle de 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour les particules PM10 et de 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  pour les PM2,5. Bien qu'aucune VLE ne soit disponible pour les particules atmosphériques ultrafines (PM0,1 dont le diamètre est inférieur à 100 nm = nanoparticule), nous pouvons toutefois proposer une projection arbitraire qui fixerait cette valeur à 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  soit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Dans ces conditions, la DL<sub>50</sub> déterminée dans nos expériences pour les NPs ZnO (soit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) serait près de 2 000 000 de fois plus importante que cette

---

<sup>2</sup> La première valeur limite concernant la pollution de l'air dans les lieux de travail n'a été introduite en France que lors de la transposition de la convention de l'Organisation Internationale du Travail relative au benzène (décret du 9 novembre 1973). Ce texte ne comprenait cependant aucune obligation de contrôle et de fréquence. Le décret n° 77-949 du 17 août 1977 relatif à l'amiante a apporté un progrès puisqu'il a introduit les premières valeurs limites assorties de contrôles périodiques précis.

valeur limite et nous conduirait donc à conclure à l'existence d'un risque sanitaire extrêmement faible, voire nul. Toutefois, il est bien entendu impossible de consolider cette conclusion dans la mesure où i) cette projection de VLE pour les nanoparticules n'est que spéculative, ii) les valeurs réglementaires ne s'appliquent que pour des expositions chroniques (annuelles) ou aiguës (mais sur 24h) sur organisme entier, ce qui s'éloigne très fortement de nos conditions expérimentales (exposition aiguë pendant 2h sur tissu isolé), et iii) les VLE réglementaires concernent des concentrations massiques de particules présentes dans l'air ambiant (ou aérosolisées), et non des concentrations de particules dissoutes dans un milieu liquidien, ce qui est le cas dans nos expériences.

Il est cependant un domaine dans lequel l'accès aux valeurs limites d'exposition des composés chimiques est plus étendu. C'est celui lié à l'exposition professionnelle. Ainsi, le développement des nanomatériaux manufacturés implique l'exposition d'une population de travailleurs de plus en plus importante, le secteur des nanomatériaux employant entre 300 000 et 400 000 personnes en Europe. En France, on compte près de 7 000 chercheurs dans les laboratoires et 5 000 salariés dans l'industrie potentiellement exposés aux NPs. Il existe par exemple plusieurs situations professionnelles où les travailleurs sont exposés à des particules ultrafines (=nanoparticules), en plus de celles naturellement présentes dans l'atmosphère et liées à l'activité humaine. C'est le cas notamment des émissions produites par les projections thermiques ou le polissage des métaux, par les moteurs diesels ou encore par les fumées de soudage. Dans ce dernier cas, tous les procédés de soudage (tels le soudage à l'arc électrique ou encore le soudage par faisceaux d'électrons ou par laser) émettent des fumées hautement toxiques pour l'opérateur lui-même et pour les personnes travaillant à proximité. Parmi les principaux polluants présents dans ces fumées se trouvent le chrome hexavalent et le cobalt (cancérogènes), le titane, le fer et l'étain (surcharge pulmonaire), le monoxyde d'azote et de carbone (toxiques), ou encore le plomb, le manganèse et le zinc (irritants, toxiques ou allergisants). La présence d'oxyde de zinc dans ces fumées est notamment responsable d'une pathologie aiguë appelée "fièvre des métaux"<sup>3</sup> dont les

---

<sup>3</sup> Les symptômes décrits sous le nom de la « fièvre des métaux » interviennent 4 à 8 heures après le début de l'exposition avec une irritation au niveau de la gorge, un malaise général avec sensation de soif intense, une asthénie, des céphalées, parfois une confusion mentale, des douleurs lombaires, une toux sèche accompagnée de douleurs thoraciques; Puis 10 à 12 heures après l'exposition, une fièvre importante apparaît, pouvant dépasser les 40 °C. Elle s'accompagne des signes classiques d'un syndrome grippal (frissons, myalgies, irritation pharyngolaryngée avec sensation de gêne respiratoire, constriction thoracique, toux non productive, céphalées). Des troubles gastriques avec douleurs, nausées et vomissements peuvent compléter le tableau.

symptômes sont comparables à ceux de la grippe. L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) a récemment publié un document exhaustif listant les valeurs limites d'exposition professionnelles (VLEP) aux agents chimiques en France ([INRS 2016](#)). Ces valeurs limites sur 8 heures (VLEP-8h) ou valeur limite de moyenne d'exposition (VME) sont destinées à protéger les travailleurs des effets à terme, mesurées ou estimées sur une durée de 8 heures au poste de travail. Ainsi, la VLEP-8h concernant l'oxyde de zinc présent dans les fumées de soudage (pouvant produire des NPs ZnO sous l'effet thermique du procédé) a été fixée à 5 mg/m<sup>3</sup> (soit 5 ng/ml). Dans ces conditions, la DL<sub>50</sub> déterminée dans nos expériences pour les NPs ZnO (soit 2 µg/ml) serait près de 400 fois plus importante que cette valeur limite, nous conduisant là encore à conclure à l'existence d'un risque sanitaire très faible.

Cependant, l'évaluation des niveaux d'exposition professionnelle à des substances chimiques passe par différentes approches complémentaires : mesure des substances dans l'atmosphère de travail, mesure de la contamination surfacique des postes de travail et surveillance biologique des travailleurs. Dans ce dernier cas, un suivi d'indicateurs biologiques reflétant l'exposition des travailleurs est réalisé. C'est ainsi que l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), en complément des VLEP atmosphériques, propose des Valeurs Limites Biologiques (VLB) sur la base de données scientifiques examinant notamment les relations dose/réponse. Ainsi, l'article R.4412-152 (décret de mars 2008) du Code du Travail précise les VLB à ne pas dépasser pour les travailleurs exposés au plomb et à ses composés, à savoir 400 µg/litre de sang pour les hommes et 300 µg/litre de sang pour les femmes. Comme indiqué précédemment, le plomb est présent dans les fumées de soudage au même titre que l'oxyde de zinc. Toutefois, sa VLEP-8h (0,1 mg/m<sup>3</sup> soit 0,1 ng/ml) est 50 fois inférieure à celle du ZnO (5 mg/m<sup>3</sup> soit 5 ng/ml). La VLB pour le ZnO étant indéterminée à l'heure actuelle, nous pouvons là encore proposer une projection arbitraire qui fixerait cette valeur à 50 fois celle du plomb, à savoir 20 mg/litre de sang (ou 20 µg/ml). Dans ces conditions, la DL<sub>50</sub> déterminée dans nos expériences pour les NPs ZnO (soit 2 µg/ml) serait près de 10 fois inférieure à cette valeur limite biologique, nous conduisant cette fois à conclure à l'existence d'un risque sanitaire élevé.

Il est ainsi extrêmement difficile d'établir des VLE compte-tenu de la multiplicité des types d'exposition et des différentes voies d'entrée des NPs dans l'organisme. Il est donc indispensable de multiplier les études toxicologiques sur différents modèles pour permettre

la confrontation des données et la détermination de ces valeurs limites. Cependant, le respect des valeurs limites n'implique pas l'absence de risque. En effet, l'état des connaissances scientifiques est en perpétuelle évolution, les difficultés liées à la fixation des VLEP n'étant pas parfaitement résolues (par exemple la transposition à l'homme des effets observés sur l'animal). De plus, les valeurs ne sont valables que pour un produit unique et seule la pénétration dans l'organisme par la voie respiratoire est prise en compte, alors qu'en situation de travail ou dans la vie courante, les voies cutanée et digestive peuvent également jouer un rôle important. Difficulté supplémentaire pour certaines substances comme la plupart des cancérigènes, il n'existe pas de valeur seuil en deçà de laquelle l'exposition ne présente plus aucun risque. C'est pourquoi le respect des VLE doit toujours être considéré comme un objectif minimal de prévention de la santé des populations, que ce soit dans le cadre de la vie de tous les jours ou dans un cadre professionnel.

## Nanoparticules et nano-médecine

Pourquoi utiliser les NPs si elles peuvent représenter un danger pour l'environnement et pour la santé humaine ? Cette question légitime doit pouvoir trouver une réponse se situant entre intérêt économique, intérêt stratégique sociétal dans le développement de nouvelles technologies et intérêt pour la protection de l'environnement et de la santé. Si l'utilisation des NPs se développe de manière exponentielle (voir "*Propriétés nouvelles et applications des nanoparticules*" – page 54), c'est en partie grâce à leur faible coût de production, mais surtout à leur grande malléabilité, permettant aux scientifiques le développement de nouvelles technologies en particulier dans le domaine médical. Par exemple, les NPs pourraient permettre à terme de proposer des traitements contre de nombreux fléaux tels que le SIDA, le cancer ou même certaines maladies neurodégénératives. Ainsi, il est déjà possible d'encapsuler des médicaments dans des nanoparticules biodégradables (polymère d'acide lactique et glycolique par exemple, PLGA), se dissolvant une fois dans la cellule cible (De Jong et Borm 2008). Pour cibler un type cellulaire particulier, les chercheurs ont réussi à enrober ces NPs d'une membrane cellulaire (bicouche lipidique) comportant des éléments (antigènes, ligand) spécifiques du type cellulaire cible, que cette cellule soit cancéreuse, bactérienne ou infectée par le VIH (Gao et Zhang 2015). Ainsi, une fois la membrane fixée à sa cellule cible, la NP et son contenu éventuel peuvent être délivrés dans le cytoplasme. Cet enrobage des NPs

leur permet également de passer encore plus facilement les barrières biologiques, comme la barrière hématoencéphalique ([Saraiva et al. 2016](#)), les rendant plus efficaces pour délivrer leur médicament à leur cible. Cette capacité à passer les barrières biologiques peut être également utile pour le diagnostic. En effet, l'utilisation de NPs d'oxyde de fer, connues pour passer la BHE, permet l'augmentation du contraste en IRM dans les vaisseaux sanguins, aidant à préciser par exemple la source du problème lors d'un AVC ([Winer et al. 2011](#)).

Certaines NPs (appelées NPs de Janus tel le dieu romain à deux têtes) possèdent deux "faces". Il s'agit de NPs asymétriques dont chaque côté peut posséder des propriétés très différentes: face hydrophile/face hydrophobe, ou encore face chargée positivement/face chargée négativement (NPs magnétiques). De fait, il existe une multitude de possibilités à leur utilisation (pour revue, [Lattuada et Hatton 2011](#)), et là encore dans le domaine médical. Ainsi, un côté de la NP peut permettre le ciblage d'un type cellulaire (de la même manière que précédemment), comme des cellules cancéreuses, lui permettant dans un premier d'accéder au compartiment cytoplasmique de la cellule d'intérêt. Une fois la NP intégrée, l'autre face est capable d'absorber la lumière infrarouge afin de la transformer en chaleur dans le but de tuer la cellule cible ([Wu et al. 2017](#)). Une autre application peut être envisagée dans la mesure où l'une des faces peut se comporter tel un vecteur de médicament (voir précédemment), l'autre face disposant de marqueurs fluorescents permettant de suivre la répartition du médicaments dans les cellules, mais aussi l'évolution de la maladie par visualisation du nombre de cellules fluorescentes ([Geng et al. 2017](#)).

Le dernier exemple est celui des particules ultrafines émises par les moteurs diesels, le chauffage au bois et les industries. Au cœur des inquiétudes des autorités pour leurs effets néfastes sur la santé humaine (Chio et Liao 2008), ces particules essentiellement carbonées pourraient être utilisées pour la production de "biopiles". Une structure faite de NPs de carbone et d'or dont la surface est recouverte d'une matrice sol-gel contenant des enzymes comme la glucose oxydase, permet la production d'énergie à partir d'éléments simples comme le glucose. À terme, cette technologie permettrait de pouvoir alimenter des dispositifs implantés dans le corps, comme un pacemaker, même si à l'heure actuelle la "biopile" ne permet qu'une autonomie de 7 jours (Liu et al. 2010).

Alors, *in nano veritas*? A l'heure actuelle, il est à mon avis très difficile de statuer sur ce point, tant la balance entre avantages et inconvénients des NPs n'est à ce jour connu de

personne. Déjà utilisées depuis des temps anciens pour leurs propriétés extraordinaires, elles sont maintenant connues et représentent l'avenir technologique de par la diversité de leurs applications et l'impact qu'elles pourraient avoir sur notre quotidien. Néanmoins, il est nécessaire de demeurer prudent et de s'intéresser d'un peu plus près à l'aspect "possiblement" délétère de certaines NPs. Capables de pénétrer, de s'accumuler et d'agir sur notre corps, elles pourraient aussi représenter le prochain danger technologique de notre siècle. Reste à savoir si les doses rencontrées dans notre vie quotidienne sont suffisantes pour devenir dangereuses à court, moyen ou long terme, surtout pour les personnes travaillant à leur production et donc potentiellement exposées à de très fortes concentrations. En conclusion, les avancées de la recherche, à la fois dans le domaine de la toxicologie et de l'utilisation des NPs nous permettront dans les prochaines années d'évaluer le risque mais aussi les avantages potentiels qu'elles pourraient apporter à notre quotidien.

## **Perspectives**

Les résultats de ce travail doctoral ont permis d'apporter de nouveaux éléments sur la toxicologie des nanoparticules d'oxyde de zinc, et leur mécanisme d'action sur les réseaux moteurs (respiratoire et locomoteur). Mais comme évoqué dans les différentes parties de la discussion, cette étude ne représente qu'une étape préliminaire, de nombreuses questions étant restées sans réponse.

Concernant l'effet *ex vivo* des NPs ZnO sur l'activité respiratoire, le mécanisme d'action de ces particules sur les neurones reste à définir. Pour cela, il est nécessaire de poursuivre les études en patch-clamp sur les tranches de tronc cérébral afin de déterminer les conductances et canaux affectés par les NPs. Il pourrait également être intéressant de regarder la répartition cellulaire des NPs, ceci étant possible via la microscopie électronique. De plus, le préBötC n'est pas la seule structure impliquée dans la genèse du rythme respiratoire. À ce titre, d'autres séries expérimentales sont à prévoir afin d'observer l'effet sur d'autres assemblées neuronales comme le pFRG, ceci étant également possible via l'utilisation de tranches de tronc cérébral.

Une des limites concernant l'utilisation des préparations réduites de système nerveux central est qu'elle n'autorise qu'une exposition de type aiguë aux NPs. C'est pourquoi nous avons initié un nouveau modèle d'étude permettant d'isoler les centres respiratoires chez la souris nouveau-né et de les conserver actifs pendant plusieurs jours. Au sein du laboratoire et sur la base de travaux récemment publiés ([Phillips et al. 2016](#)), la mise au point de tranches organotypiques de bulbe rachidien a permis de montrer qu'il était possible de conserver pendant plus de 8 jours une activité rythmique spontanée de type respiratoire, à la fois au niveau du préBötC mais aussi au niveau des motoneurons du nerf hypoglosse. Cette avancée nous permettra dans un futur proche de tester les effets d'exposition chroniques aux NPs sur ces tranches organotypiques et d'étudier notamment la production probable de facteurs apoptotiques responsables de la mort cellulaire des neurones exposés.

Concernant l'exposition chronique au cours de la gestation, il est nécessaire de poursuivre cette étude en augmentant le nombre de femelles injectées de manière à s'assurer que les différences observées n'étaient pas le seul fait de la variabilité interindividuelle. Lors des injections nous avons également observé la présence d'une inflammation locale. Il est important de vérifier que les marqueurs biologiques inflammatoires ne sont pas à même de déclencher les effets observés dans notre étude *in vivo*. En effet, une inflammation périnatale peut perturber le développement des poumons ([Kramer et al. 2009](#)), mais également du

système nerveux (Graciarena et al. 2010). Il est donc nécessaire de vérifier l'influence de l'inflammation observée lors de l'injection sur le développement des nouveau-nés, via l'injection par exemple de lipopolysaccharide (LPS) selon les mêmes protocoles. Les observations semblent indiquer que les NPs peuvent agir sur le développement des animaux au cours de la gestation. Même si le passage des NPs ZnO au travers de la barrière placentaire a déjà pu être démontré (Keelan 2011, Jo et al. 2013), il peut être intéressant de doser les NPs dans les différents organes, que ce soit chez la mère ou chez les nouveau-nés, afin de déterminer leur passage et leur répartition dans nos conditions d'exposition. Il est également envisageable d'effectuer des injections chroniques directement sur les nouveau-nés, permettant ainsi l'étude des effets postnataux des NPs.

La dernière partie de mon travail doctoral concernait l'étude des effets des NPs ZnO sur le réseau locomoteur *ex vivo*. Bien que préliminaires, ces résultats montrent la présence d'un effet potentiellement délétère des NPs ZnO sur l'activité locomotrice. Néanmoins, aucun élément ne permet de déterminer avec certitude les mécanismes impliqués dans ces effets. Il pourrait donc être intéressant d'utiliser des approches de type intracellulaire (patch-Clamp) afin d'aborder les mécanismes d'action des NPs ZnO sur les motoneurones, ainsi que les interneurones composant les CPGs locomoteurs.

L'ensemble de ces résultats montrent que les NPs ZnO sont capables d'induire des dysfonctionnements de plusieurs réseaux moteurs au sein du SNC. Au vu des effets comportementaux (Han et al. 2011) et cellulaires (Lai et al. 2008, Zhao et al. 2009) des NPs ZnO, l'étude pourrait être étendue à d'autres réseaux neuronaux, comme le système végétatif ou encore les systèmes sensoriels afin d'évaluer au plus juste l'impact potentiel de ces nouveaux éléments de notre quotidien.

## **Bibliographie**

- (CDC), C. f. D. C. a. P. (2004). Smoking during pregnancy—United States, 1990–2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **53**: 911-915.
- (UNODC), U. N. O. o. D. a. C. (2014). "World Drug Report, 2014." from [http://www.unodc.org/documents/wdr2014/World\\_Drug\\_Report\\_2014\\_web.pdf](http://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf).
- Abdel-Rahman, A. A., G. M. Blumenthal, S. A. Abou-Donia, F. A. Ali, A. Abdel-Monem and M. B. Abou-Donia (2002). "Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of [14C]chlorpyrifos in pregnant rats." *Archives of Toxicology* **76**(8): 452-459.
- Abourachid, A. (2003). "A new way of analysing symmetrical and asymmetrical gaits in quadrupeds." *Comptes Rendus Biologies* **326**(7): 625-630.
- Afifi, M., O. A. Abu Zinada, H. Ali and M. Couderchet (2016). *Zinc nanoparticles induced brain lesions and behavioral changes in Tilapia nilotica and Tilapia. Zillii*.
- Akay, T., W. G. Tourtellotte, S. Arber and T. M. Jessell (2014). "Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(47): 16877-16882.
- Alarifi, S., D. Ali, S. Alkahtani, A. Verma, M. Ahamed, M. Ahmed and H. A. Alhadlaq (2013). "Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles." *Int J Nanomedicine* **8**: 983-993.
- Alheid, G. F., W. Jiao and D. R. McCrimmon (2011). "Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla." *Neuroscience* **190**: 207-227.
- An, L., S. Liu, Z. Yang and T. Zhang (2012). "Cognitive impairment in rats induced by nano-CuO and its possible mechanisms." *Toxicol Lett* **213**(2): 220-227.
- Anderson, T. M., A. J. Garcia, 3rd, N. A. Baertsch, J. Pollak, J. C. Bloom, A. D. Wei, . . . J. M. Ramirez (2016). "A novel excitatory network for the control of breathing." *Nature* **536**(7614): 76-80.
- Anderson, T. M. and J. M. Ramirez (2017). "Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis." *F1000Res* **6**: 139.
- Androustopoulos, V. P., A. F. Hernandez, J. Liesivuori and A. M. Tsatsakis (2013). "A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides." *Toxicology* **307**: 89-94.
- Arata, A., H. Onimaru and I. Homma (1990). "Respiration-related neurons in the ventral medulla of newborn rats in vitro." *Brain Res Bull* **24**(4): 599-604.
- Arbas, E. and R. Calabrese (1987). "Ionic conductances underlying the activity of interneurons that control heartbeat in the medicinal leech." *The Journal of Neuroscience* **7**: 3945-3952.
- Arshavsky, Y. I., M. B. Berkinblit, O. I. Fukson, I. M. Gelfand and G. N. Orlovsky (1972). "Recordings of neurones of the dorsal spinocerebellar tract during evoked locomotion." *Brain Res* **43**(1): 272-275.
- Asare, N., C. Instanes, W. J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski and G. Brunborg (2012). "Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells." *Toxicology* **291**(1-3): 65-72.
- Athinarayanan, J., V. S. Periasamy, M. A. Alsaif, A. A. Al-Warthan and A. A. Alshatwi (2014). "Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells." *Cell Biol Toxicol* **30**(2): 89-100.
- Atsuta, Y., R. D. Garcia-Rill E Fau - Skinner and R. D. Skinner (1990). "Characteristics of electrically induced locomotion in rat in vitro brain stem-spinal cord preparation." (0022-3077 (Print)).
- Ayali, A. and R. M. Harris-Warrick (1999). "Monoamine control of the pacemaker kernel and cycle frequency in the lobster pyloric network." *J Neurosci* **19**(15): 6712-6722.
- Balis, U. J., K. F. Morris, J. Koleski and B. G. Lindsey (1994). "Simulations of a ventrolateral medullary neural network for respiratory rhythmogenesis inferred from spike train cross-correlation." *Biol Cybern* **70**(4): 311-327.
- Ballanyi, K., H. Onimaru and I. Homma (1999). "Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats." *Prog Neurobiol* **59**(6): 583-634.
- Ballesteros, M. C., P. E. Hansen and K. Soila (1993). "MR imaging of the developing human brain. Part 2. Postnatal development." *Radiographics* **13**(3): 611-622.

- Ballion, B., D. Morin and D. Viala (2001). "Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat." *Eur J Neurosci* **14**(10): 1727-1738.
- Banzett, R. B. and J. L. Lehr (1982). "Gas exchange during high-frequency ventilation of the chicken." *Journal of Applied Physiology* **53**(6): 1418.
- Bardoni, R. and O. Belluzzi (1994). "Modifications of A-current kinetics in mammalian central neurones induced by extracellular zinc." *J Physiol* **479 ( Pt 3)**: 389-400.
- Barik, T. K., B. Sahu and V. Swain (2008). "Nanosilica—from medicine to pest control." *Parasitology Research* **103**(2): 253.
- Becheri, A., M. Dürr, P. Lo Nostro and P. Baglioni (2008). "Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers." *Journal of Nanoparticle Research* **10**(4): 679-689.
- Beek, W. J. E., M. M. Wienk and R. A. J. Janssen (2004). "Efficient Hybrid Solar Cells from Zinc Oxide Nanoparticles and a Conjugated Polymer." *Advanced Materials* **16**(12): 1009-1013.
- Beghin, D. (2014). "Le passage placentaire des médicaments." *Revue de médecine périnatale* **6**(1): 12-20.
- Begum, A. N., J. S. Aguilar, L. Elias and Y. Hong (2016). "Silver nanoparticles exhibit coating and dose-dependent neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells." *Neurotoxicology* **57**: 45-53.
- Behnke, M., V. C. Smith, A. Committee on Substance, F. Committee on and Newborn (2013). "Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus." *Pediatrics* **131**(3): e1009-1024.
- Bergin, I. L. and F. A. Witzmann (2013). "Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps." *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol* **3**(1-2).
- Bertrand, F., A. Hugelin and J. F. Vibert (1973). "Quantitative study of anatomical distribution of respiration related neurons in the pons." *Exp Brain Res* **16**(4): 383-399.
- Bettini, S., E. Boutet-Robinet, C. Cartier, C. Comera, E. Gaultier, J. Dupuy, . . . E. Houdeau (2017). "Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon." *Sci Rep* **7**: 40373.
- Bhatia, S. (2016). "Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications." 33-93.
- Bhosale, R. R., A. Kumar, F. AlMomani and I. Alxneit (2016). "Propylene oxide assisted sol-gel synthesis of zinc ferrite nanoparticles for solar fuel production." *Ceramics International* **42**(2): 2431-2438.
- Bianchi, A. L. (1971). "[Localization and study of respiratory medullary neurons. Antidromic starting by spinal cord or vagal stimulation]." *J Physiol (Paris)* **63**(1): 5-40.
- Bianchi, A. L., M. Denavit-Saubie and J. Champagnat (1995). "Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters." *Physiol Rev* **75**(1): 1-45.
- Bianchi, A. L., L. Grélot, D. Miller and G. L. King (1992). *Mechanisms and Control of Emesis*. Montrouge, France, Libbey Eurotext.
- Bjursten, L.-M., K. Norrsell and U. Norrsell (1976). "Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy." *Exp Brain Res* **25**: 115-130.
- Blouet, C. (2013). "[Role of the nucleus of the solitary tract in the detection and integration of multiple metabolic signals]." *Med Sci (Paris)* **29**(5): 449-452.
- Blum, J. L., J. Q. Xiong, C. Hoffman and J. T. Zelikoff (2012). "Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth." *Toxicol Sci* **126**(2): 478-486.
- Bode, G. H., G. Coue, C. Freese, K. E. Pickl, M. Sanchez-Purra, B. Albaiges, . . . P. Martinez-Martinez (2017). "An in vitro and in vivo study of peptide-functionalized nanoparticles for brain targeting: The importance of selective blood-brain barrier uptake." *Nanomedicine* **13**(3): 1289-1300.
- Bohm, K. J. (2017). "Toxic effects of zinc ions on kinesin - Potential molecular cause of impaired intracellular transport." *Toxicol Lett* **268**: 58-62.
- Borison, H. L. and S. C. Wang (1949). "Functional localization of central coordinating mechanism for emesis in cat." *J Neurophysiol* **12**(5): 305-313.

- Borowska, J., C. T. Jones, H. Zhang, J. Blacklaws, M. Goulding and Y. Zhang (2013). "Functional subpopulations of V3 interneurons in the mature mouse spinal cord." J Neurosci **33**(47): 18553-18565.
- Bourzac, K. (2013). "Quantum dots go on display." Nature **493**(7432): 283.
- Bouyer, L. J. and S. Rossignol (2003a). "Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion. I. Intact cats." J Neurophysiol **90**(6): 3625-3639.
- Bouyer, L. J. and S. Rossignol (2003b). "Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion. II. Spinal cats." J Neurophysiol **90**(6): 3640-3653.
- Braidy, N., A. Poljak, C. Marjo, H. Rutledge, A. Rich, B. E. Jugder, . . . P. S. Sachdev (2017). "Identification of Cerebral Metal Ion Imbalance in the Brain of Aging Octodon degus." Front Aging Neurosci **9**: 66.
- Bramble, D. M. and D. R. Carrier (1983). "Running and breathing in mammals." Science **219**(4582): 251-256.
- Bramble, D. M. and F. A. Jenkins, Jr. (1993). "Mammalian locomotor-respiratory integration: implications for diaphragmatic and pulmonary design." Science **262**(5131): 235-240.
- Bresink, I., B. Ebert, C. G. Parsons and E. Mutschler (1996). "Zinc changes AMPA receptor properties: results of binding studies and patch clamp recordings." Neuropharmacology **35**(4): 503-509.
- Britz, O., J. Zhang, K. S. Grossmann, J. Dyck, J. C. Kim, S. Dymecki, . . . M. Goulding (2015). "A genetically defined asymmetry underlies the inhibitory control of flexor-extensor locomotor movements." Elife **4**.
- Brockhaus, J., K. Ballanyi, J. C. Smith and D. W. Richter (1993). "Microenvironment of respiratory neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats." J Physiol **462**: 421-445.
- Brown, T. G. (1911). "The Intrinsic Factors in the Act of Progression in the Mammal." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **84**(572): 308-319.
- Brownstone, R. M. and J. M. Wilson (2008). "Strategies for delineating spinal locomotor rhythm-generating networks and the possible role of Hb9 interneurons in rhythmogenesis." Brain Res Rev **57**(1): 64-76.
- Bumbudsanpharoke, N., J. Choi and S. Ko (2015). "Applications of Nanomaterials in Food Packaging." J Nanosci Nanotechnol **15**(9): 6357-6372.
- Buzea, C., Pacheco, II and K. Robbie (2007). "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity." Biointerphases **2**(4): MR17-71.
- Calderon-Garciduenas, L., A. Mora-Tiscareno, E. Ontiveros, G. Gomez-Garza, G. Barragan-Mejia, J. Broadway, . . . R. W. Engle (2008). "Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs." Brain Cogn **68**(2): 117-127.
- Calzolari, L., D. Gilliland and F. Rossi (2012). "Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess **29**(8): 1183-1193.
- Carroll, M. S. and J. M. Ramirez (2013). "Cycle-by-cycle assembly of respiratory network activity is dynamic and stochastic." J Neurophysiol **109**(2): 296-305.
- Cazalets, J. R., M. Borde and F. Clarac (1995). "Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4943-4951.
- Cazalets, J. R., Y. Sqalli-Houssaini and F. Clarac (1992). "Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat." J Physiol **455**: 187-204.
- Cesaroni, G., C. Badaloni, C. Gariazzo, M. Stafoggia, R. Sozzi, M. Davoli and F. Forastiere (2013). "Long-term exposure to urban air pollution and mortality in a cohort of more than a million adults in Rome." Environ Health Perspect **121**(3): 324-331.
- Changeux, J. P. (2010). "Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice." Nat Rev Neurosci **11**(6): 389-401.
- Chen, T. H., C. C. Lin and P. J. Meng (2014). "Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*)." J Hazard Mater **277**: 134-140.
- Chen, T. H., C. Y. Lin and M. C. Tseng (2011). "Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*)." Mar Pollut Bull **63**(5-12): 303-308.

- Chevalier, M., N. Toporikova, J. Simmers and M. Thoby-Brisson (2016). "Development of pacemaker properties and rhythmogenic mechanisms in the mouse embryonic respiratory network." *Elife* **5**.
- Chio, C.-P. and C.-M. Liao (2008). "Assessment of atmospheric ultrafine carbon particle-induced human health risk based on surface area dosimetry." *Atmospheric Environment* **42**(37): 8575-8584.
- Cho, W. S., B. C. Kang, J. K. Lee, J. Jeong, J. H. Che and S. H. Seok (2013). "Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration." *Part Fibre Toxicol* **10**: 9.
- Choi, D. W. and J. Y. Koh (1998). "Zinc and brain injury." *Annu Rev Neurosci* **21**: 347-375.
- Choi, H. S., Y. Ashitate, J. H. Lee, S. H. Kim, A. Matsui, N. Insin, . . . A. Tsuda (2010). "Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body." *Nat Biotechnol* **28**(12): 1300-1303.
- Clemens, S., D. Combes, P. Meyrand and J. Simmers (1998). "Long-term expression of two interacting motor pattern-generating networks in the stomatogastric system of freely behaving lobster." *J Neurophysiol* **79**(3): 1396-1408.
- Cohen, A. H. and R. M. Harris-Warrick (1984). "Strychnine eliminates alternating motor output during fictive locomotion in the lamprey." *Brain Res* **293**(1): 164-167.
- Cohen, M. I. (1979). "Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal." *Physiol Rev* **59**(4): 1105-1173.
- Coleman, J. E. (1992). "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins." *Annu Rev Biochem* **61**(0066-4154 (Print)): 897-946.
- Colle, J. and J. Massion (1958). "Effet de la Stimulation du Cortex Moteur sur l'ActiviteA EAlectrique des Nerfs PhreAniques et MeAdians." *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* **66**(4): 496-514.
- Comroe, J. H. (1939). "THE LOCATION AND FUNCTION OF THE CHEMORECEPTORS OF THE AORTA."
- Connelly, C. A., E. G. Dobbins and J. L. Feldman (1992). "Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns." *Brain Res* **590**(1-2): 337-340.
- Crill, W. E. (1996). "Persistent sodium current in mammalian central neurons." *Annu Rev Physiol* **58**: 349-362.
- Crone, S. A., K. A. Quinlan, L. Zagoraiou, S. Droho, C. E. Restrepo, L. Lundfald, . . . K. Sharma (2008). "Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord." *Neuron* **60**(1): 70-83.
- Crone, S. A., G. Zhong, R. Harris-Warrick and K. Sharma (2009). "In mice lacking V2a interneurons, gait depends on speed of locomotion." *J Neurosci* **29**(21): 7098-7109.
- Cross, S. E., B. Innes, M. S. Roberts, T. Tsuzuki, T. A. Robertson and P. McCormick (2007). "Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation." *Skin Pharmacol Physiol* **20**(3): 148-154.
- Cui, Y., X. Chen, Z. Zhou, Y. Lei, M. Ma, R. Cao, . . . Y. Che (2014). "Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats." *Chemosphere* **96**: 99-104.
- da Costa, C. M., V. Brazao, C. Collins Kuehn, L. G. Rodrigues Oliveira, J. C. do Prado Junior, M. A. Sala and A. A. Carraro Abrahao (2013). "Zinc and pregnancy: Marked changes on the immune response following zinc therapy for pregnant females challenged with *Trypanosoma cruzi*." *Clin Nutr* **32**(4): 592-598.
- Dale, N. (1995). "Experimentally derived model for the locomotor pattern generator in the *Xenopus* embryo." *J Physiol* **489 ( Pt 2)**: 489-510.
- Darwiche, W., S. Delanaud, S. Dupont, H. Ghamlouch, W. Ramadan, W. Joumaa, . . . J. Gay-Quéheillard (2017). "Impact of prenatal and postnatal exposure to the pesticide chlorpyrifos on the contraction of rat ileal muscle strips: involvement of an inducible nitric oxide synthase-dependent pathway." *Neurogastroenterology & Motility* **29**(2): e12918-n/a.
- Daun, S., J. E. Rubin and I. A. Rybak (2009). "Control of oscillation periods and phase durations in half-center central pattern generators: a comparative mechanistic analysis." *J Comput Neurosci* **27**(1): 3-36.
- de Castro, D., J. Lipski and R. Kanjhan (1994). "Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat." *Brain Res* **639**(1): 49-56.

- De Jong, W. H. and P. J. Borm (2008). "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards." Int J Nanomedicine **3**(2): 133-149.
- de la Moricière, G. G. (2006). Guide du risque chimique - 4e éd.: Identification, évaluation, maîtrise, Dunod.
- Del Negro, C. A., C. Morgado-Valle and J. L. Feldman (2002). "Respiratory rhythm: an emergent network property?" Neuron **34**(5): 821-830.
- Del Negro, C. A., C. Morgado-Valle, J. A. Hayes, D. D. Mackay, R. W. Pace, E. A. Crowder and J. L. Feldman (2005). "Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation." J Neurosci **25**(2): 446-453.
- Delcomyn, F. (1980). "Neural basis of rhythmic behavior in animals." Science **210**(4469): 492-498.
- Delgado, R., C. Vergara and D. Wolff (2006). "Divalent cations as modulators of neuronal excitability: Emphasis on copper and zinc." Biol Res **39**: 173-182.
- Deng, X., Q. Luan, W. Chen, Y. Wang, M. Wu, H. Zhang and Z. Jiao (2009). "Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis." Nanotechnology **20**(11): 115101.
- Di Lorenzo, P. M., D. Platt and J. D. Victor (2009). "Information processing in the parabrachial nucleus of the pons." Ann N Y Acad Sci **1170**: 365-371.
- Dietz, V. (2002). "Proprioception and locomotor disorders." Nat Rev Neurosci **3**(10): 781-790.
- Dougherty, K. J., L. Zagoraïou, D. Satoh, I. Rozani, S. Doobar, S. Arber, . . . O. Kiehn (2013). "Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons." Neuron **80**(4): 920-933.
- Duivenvoorden, R., J. Tang, D. P. Cormode, A. J. Mieszawska, D. Izquierdo-Garcia, C. Ozcan, . . . W. J. Mulder (2014). "A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation." Nat Commun **5**: 3065.
- Duke, S. O. (2017). "The history and current status of glyphosate." Pest Management Science.
- Durán, N., P. D. Marcato, G. I. H. De Souza, O. L. Alves and E. Esposito (2007). "Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment." Journal of Biomedical Nanotechnology **3**(2): 203-208.
- Dutschmann, M. and T. E. Dick (2012). "Pontine mechanisms of respiratory control." Compr Physiol **2**(4): 2443-2469.
- Dyck, J., G. M. Lanuza and S. Gosgnach (2012). "Functional characterization of dl6 interneurons in the neonatal mouse spinal cord." J Neurophysiol **107**(12): 3256-3266.
- Easaw, J. C., B. S. Jassar, K. H. Harris and J. H. Jhamandas (1999). "Zinc modulation of ionic currents in the horizontal limb of the diagonal band of Broca." Neuroscience **94**(3): 785-795.
- Eccles, J. C. and C. Sherrington (1931). "Studies on the Flexor Reflex.--V. General Conclusions." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character **107**(754): 597-605.
- Ecobichon, D. J. (2001). "Pesticide use in developing countries." Toxicology **160**: 27-33.
- Edgerton, V. R., S. Grillner, A. Sjörröm and P. Zangger (1976). "Central Generation of Locomotion in Vertebrates." Advances in Behavioral Biology **18**.
- Ekimov, A. I. and A. A. Onushchenko (1982). "Quantum Size Effect in Three-Dimensional Microscopic semiconductor crystals." JETP Lett **34**(6): 345-349.
- El Marroun, H., J. J. Hudziak, H. Tiemeier, H. Creemers, E. A. Steegers, V. W. Jaddoe, . . . A. C. Huizink (2011). "Intrauterine cannabis exposure leads to more aggressive behavior and attention problems in 18-month-old girls." Drug Alcohol Depend **118**(2-3): 470-474.
- Elder, A., R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, L. Opanashuk, J. Carter, . . . G. Oberdorster (2006). "Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system." Environ Health Perspect **114**(8): 1172-1178.
- Elkhenany, H., S. Bourdo, S. Hecht, R. Donnell, D. Gerard, R. Abdelwahed, . . . M. Dhar (2017). "Graphene nanoparticles as osteoinductive and osteoconductive platform for stem cell and bone regeneration." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **13**(7): 2117-2126.
- Eltzschig, H. K. and P. Carmeliet (2011). "Hypoxia and inflammation." N Engl J Med **364**(7): 656-665.

- Errchidi, S., R. Monteau and G. Hilaire (1991). "Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study." *J Physiol* **443**: 477-498.
- Espitia, P. J. P., N. d. F. F. Soares, J. S. d. R. Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz and E. A. A. Medeiros (2012). "Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications." *Food and Bioprocess Technology* **5**(5): 1447-1464.
- Ezure, K., I. Tanaka and Y. Saito (2003). "Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat." *Neurosci Res* **45**(1): 41-51.
- Faraday, M. (1857). "The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **147**(0): 145-181.
- Farley, C. T. and C. R. Taylor (1991). "A mechanical trigger for the trot-gallop transition in horses." *Science* **253**(5017): 306-308.
- Fedulov, A. V., A. Leme, Z. Yang, M. Dahl, R. Lim, T. J. Mariani and L. Kobzik (2008). "Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility." *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**(1): 57-67.
- Feldman, J. L., C. A. Del Negro and P. A. Gray (2013). "Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far." *Annu Rev Physiol* **75**: 423-452.
- Feldman, J. L., J. C. Smith and G. Liu (1991). "Respiratory pattern generation in mammals: in vitro en bloc analyses." *Curr Opin Neurobiol* **1**(4): 590-594.
- Feldman, J. L., U. Windhorst, K. Anders and D. W. Richter (1992). "Synaptic interaction between medullary respiratory neurones during apneusis induced by NMDA-receptor blockade in cat." *J Physiol* **450**: 303-323.
- Fernandes Azevedo, B., L. Barros Furieri, F. M. Pecanha, G. A. Wiggers, P. Frizera Vassallo, M. Ronacher Simoes, . . . D. Valentim Vassallo (2012). "Toxic effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems." *J Biomed Biotechnol* **2012**: 949048.
- Flaskos, J. (2012). "The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: a direct role for the oxon metabolites." *Toxicol Lett* **209**(1): 86-93.
- Flourens, P. (1858). "Nouveaux details sur le noeud vital." *Compt Rend Acad Sci.* **47**: 6.
- Forno, L. (1982). "Pathology of Parkinson's disease." *Movement disorders* **2**: 25-40.
- Fosmire, G. J. (1990). "Zinc toxicity." *Am J Clin Nutr* **51**(2): 225-227.
- Frank, E. A., V. S. Carreira, M. E. Birch and J. S. Yadav (2016). "Carbon Nanotube and Asbestos Exposures Induce Overlapping but Distinct Profiles of Lung Pathology in Non-Swiss Albino CF-1 Mice." *Toxicol Pathol* **44**(2): 211-225.
- Frederickson, C. J., J. Y. Koh and A. I. Bush (2005). "The neurobiology of zinc in health and disease." *Nat Rev Neurosci* **6**(6): 449-462.
- French, C. R., P. Sah, K. J. Buckett and P. W. Gage (1990). "A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons." *J Gen Physiol* **95**(6): 1139-1157.
- Fried, P. A., D. S. James and B. Watkinson (2001). "Growth and pubertal milestones during adolescence in offspring prenatally exposed to cigarettes and marihuana." *Neurotoxicol Teratol* **23**(5): 431-436.
- Fujitani, T., K. Ohyama, A. Hirose, T. Nishimura, D. Nakae and A. Ogata (2012). "Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice." *J Toxicol Sci* **37**(1): 81-89.
- Funke, F., M. Muller and M. Dutschmann (2008). "Reconfiguration of respiratory-related population activity in a rostrally tilted transversal slice preparation following blockade of inhibitory neurotransmission in neonatal rats." *Pflugers Arch* **457**(1): 185-195.
- Fye, W. B. (1995). "Julien Jean Cesar Legallois." *Clin Cardiol* **18**(10): 599-600.
- Gandevia, S. C. and J. C. Rothwell (1987). "Activation of the human diaphragm from the motor cortex." *J Physiol* **384**: 109-118.
- Gao, W. and L. Zhang (2015). "Coating nanoparticles with cell membranes for targeted drug delivery." *J Drug Target* **23**(7-8): 619-626.
- Gao, X., S. Yin, M. Tang, J. Chen, Z. Yang, W. Zhang, . . . M. Wang (2011). "Effects of developmental exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on synaptic plasticity in hippocampal dentate gyrus area: an in vivo study in anesthetized rats." *Biol Trace Elem Res* **143**(3): 1616-1628.

- Geng, Y., P. Zhang, Q. Wang, Y. Liu and K. Pan (2017). "Novel PAN/PVP Janus ultrafine fiber membrane and its application for biphasic drug release." *Journal of Materials Chemistry B* **5**(27): 5390-5396.
- Geraets, L., A. G. Oomen, P. Krystek, N. R. Jacobsen, H. Wallin, M. Laurentie, . . . W. H. de Jong (2014). "Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats." *Part Fibre Toxicol* **11**: 30.
- Giraudin, A., M. J. Cabirol-Pol, J. Simmers and D. Morin (2008). "Intercostal and abdominal respiratory motoneurons in the neonatal rat spinal cord: spatiotemporal organization and responses to limb afferent stimulation." *J Neurophysiol* **99**(5): 2626-2640.
- Giraudin, A., M. Le Bon-Jego, M. J. Cabirol, J. Simmers and D. Morin (2012). "Spinal and pontine relay pathways mediating respiratory rhythm entrainment by limb proprioceptive inputs in the neonatal rat." *J Neurosci* **32**(34): 11841-11853.
- Glass, M., M. Dragunow and R. L. Faull (1997). "Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain." *Neuroscience* **77**(2): 299-318.
- Gosgnach, S., G. M. Lanuza, S. J. Butt, H. Saueressig, Y. Zhang, T. Velasquez, . . . M. Goulding (2006). "V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs." *Nature* **440**(7081): 215-219.
- Goslow, G. E., Jr., R. M. Reinking and D. G. Stuart (1973). "The cat step cycle: hind limb joint angles and muscle lengths during unrestrained locomotion." *J Morphol* **141**(1): 1-41.
- Goulding, M. (2009). "Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction." *Nat Rev Neurosci* **10**(7): 507-518.
- Graciarena, M., A. M. Depino and F. J. Pitossi (2010). "Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGFbeta1 downregulation." *Brain Behav Immun* **24**(8): 1301-1309.
- Gray, P. A., W. A. Janczewski, N. Mellen, D. R. McCrimmon and J. L. Feldman (2001). "Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons." *Nat Neurosci* **4**(9): 927-930.
- Gray, P. A., J. C. Reikling, C. M. Bocchiaro and J. L. Feldman (1999). "Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex." *Science* **286**(5444): 1566-1568.
- Greer, J. J. (2012). "Control of breathing activity in the fetus and newborn." *Compr Physiol* **2**(3): 1873-1888.
- Greer, J. J., J. C. Smith and J. L. Feldman (1991). "Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat." *J Physiol* **437**: 727-749.
- Grélot, L. and A. Miller (1994). "Vomiting - Its Ins and Outs." *Physiology* **9**(3): 142-147.
- Grillner, S. (1999). "Bridging the gap - from ion channels to networks and behaviour." *Curr Opin Neurobiol* **9**(6): 663-669.
- Grillner, S. (2003). "The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks." *Nat Rev Neurosci* **4**(7): 573-586.
- Grillner, S. (2011). "Control of Locomotion in Bipeds, Tetrapods, and Fish." *Comprehensive Physiology*.
- Grillner, S., J. Halbertsma, J. Nilsson and A. Thorstensson (1979). "The adaptation to speed in human locomotion." *Brain Res* **165**(1): 177-182.
- Grillner, S. and P. Wallen (1985). "Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates." *Annu Rev Neurosci* **8**: 233-261.
- Grillner, S. and P. Zangger (1979). "On the central generation of locomotion in the low spinal cat." *Exp Brain Res* **34**(2): 241-261.
- Gu, J., K. Al-Bayati and E. A. Ho (2017). "Development of antibody-modified chitosan nanoparticles for the targeted delivery of siRNA across the blood-brain barrier as a strategy for inhibiting HIV replication in astrocytes." *Drug Delivery and Translational Research* **7**(4): 497-506.
- Guillerm R Fau - Radziszewski, E. and E. Radziszewski (1979). "Effects on man of 30-day exposure to a PICO<sub>2</sub> of 14 torr (2 %): application to exposure limits." (0093-5387 (Print)).

- Guo, D., H. Bi, D. Wang and Q. Wu (2013). "Zinc oxide nanoparticles decrease the expression and activity of plasma membrane calcium ATPase, disrupt the intracellular calcium homeostasis in rat retinal ganglion cells." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(8): 1849-1859.
- Haji, A., J. E. Remmers, C. Connelly and R. Takeda (1990). "Effects of glycine and GABA on bulbar respiratory neurons of cat." *J Neurophysiol* **63**(5): 955-965.
- Haldane, J. S. and J. G. Priestley (1905). "The regulation of the lung-ventilation." *J Physiol* **32**(3-4): 225-266.
- Han, D., Y. Tian, T. Zhang, G. Ren and Z. Yang (2011). "Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in hippocampus of Wistar rats." *Int J Nanomedicine* **6**: 1453-1461.
- Hanley, C., J. Layne, A. Punnoose, K. M. Reddy, I. Coombs, A. Coombs, . . . D. Wingett (2008). "Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles." *Nanotechnology* **19**(29): 295103.
- Hanot-Roy, M., E. Tubeuf, A. Guilbert, A. Bado-Nilles, P. Vigneron, B. Trouiller, . . . G. Lacroix (2016). "Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier in vitro." *Toxicology in Vitro* **33**(Supplement C): 125-135.
- Hao, Y., J. Liu, Y. Feng, S. Yu, W. Zhang, L. Li, . . . Y. Zhao (2017). "Molecular evidence of offspring liver dysfunction after maternal exposure to zinc oxide nanoparticles." *Toxicol Appl Pharmacol* **329**: 318-325.
- He, Y., Z. J. Chen and A. C. Evans (2007). "Small-world anatomical networks in the human brain revealed by cortical thickness from MRI." *Cereb Cortex* **17**(10): 2407-2419.
- Hernández Battez, A., R. González, J. L. Viesca, J. E. Fernández, J. M. Díaz Fernández, A. Machado, . . . J. Riba (2008). "CuO, ZrO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles as antiwear additive in oil lubricants." *Wear* **265**(3): 422-428.
- Heymans, J. F. and C. Heymans (1927). "Sur les modifications directes et sur la regulation réflexe de l'activité du centre respiratoire de la tête isolée du chien." *Arch. Int. Pharmacodyn.* **33**: 273-372.
- Hilaire, G., R. Monteau and S. Errchidi (1989). "Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat." *Brain Res* **485**(2): 325-332.
- Hilaire, G., R. Monteau, P. Gauthier, P. Rega and D. Morin (1990). "Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: in vivo and in vitro studies." *Neurosci Lett* **111**(1-2): 133-138.
- Hinckley, C. A., R. Hartley, L. Wu, A. Todd and L. Ziskind-Conhaim (2005). "Locomotor-like rhythms in a genetically distinct cluster of interneurons in the mammalian spinal cord." *J Neurophysiol* **93**(3): 1439-1449.
- Holstege, G. and H. G. Kuypers (1977). "Propriobulbar fibre connections to the trigeminal, facial and hypoglossal motor nuclei. I. An anterograde degeneration study in the cat." *Brain* **100**(2): 239-264.
- Hong, F., L. Sheng, Y. Ze, J. Hong, Y. Zhou, L. Wang, . . . X. Ze (2015). "Suppression of neurite outgrowth of primary cultured hippocampal neurons is involved in impairment of glutamate metabolism and NMDA receptor function caused by nanoparticulate TiO<sub>2</sub>." *Biomaterials* **53**: 76-85.
- Hougaard, K. S., P. Jackson, K. A. Jensen, J. J. Sloth, K. Loschner, E. H. Larsen, . . . U. Vogel (2010). "Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice." *Part Fibre Toxicol* **7**: 16.
- Hrabeta, J., T. Eckschlager, M. Stiborova, Z. Heger, S. Krizkova and V. Adam (2016). "Zinc and zinc-containing biomolecules in childhood brain tumors." *J Mol Med (Berl)* **94**(11): 1199-1215.
- Hu, R., X. Gong, Y. Duan, N. Li, Y. Che, Y. Cui, . . . F. Hong (2010). "Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles." *Biomaterials* **31**(31): 8043-8050.
- Huerta-Garcia, E., J. A. Perez-Arizti, S. G. Marquez-Ramirez, N. L. Delgado-Buenrostro, Y. I. Chirino, G. G. Iglesias and R. Lopez-Marure (2014). "Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells." *Free Radic Biol Med* **73**: 84-94.

- Hultborn, H. (1976). "Transmission in the pathway of reciprocal Ia inhibition to motoneurons and its control during the tonic stretch reflex." *Prog Brain Res* **44**: 235-255.
- Huttenlocher, F. and C. de Courten (1987). "The development of synapses in striate cortex of man." *Hum Neurobiol.*(0721-9075 (Print)).
- Iijima, S. (1991). "Helical microtubules of graphitic carbon." *Nature* **354**(6348): 56-58.
- INRS (2016). "Valeurs limites d'exposition professionnelles (VLEP) aux agents chimique en France." **ED 984**.
- Janczewski, W. A. and J. L. Feldman (2006). "Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat." *J Physiol* **570**(Pt 2): 407-420.
- Jani, P., G. W. Halbert, J. Langridge and A. T. Florence (1990). "Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency." *J Pharm Pharmacol* **42**(12): 821-826.
- Jankowska, E. (2008). "Spinal interneuronal networks in the cat: elementary components." *Brain Res Rev* **57**(1): 46-55.
- Jankowska, E., M. G. Jukes, S. Lund and A. Lundberg (1967a). "The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors." *Acta Physiol Scand* **70**(3): 369-388.
- Jankowska, E., M. G. Jukes, S. Lund and A. Lundberg (1967b). "The effect of DOPA on the spinal cord. 6. Half-centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents." *Acta Physiol Scand* **70**(3): 389-402.
- Jaques, S. C., A. Kingsbury, P. Henshcke, C. Chomchai, S. Clews, J. Falconer, . . . J. L. Oei (2014). "Cannabis, the pregnant woman and her child: weeding out the myths." *J Perinatol* **34**(6): 417-424.
- Jauniaux, E., B. Gulbis, G. Acharya, P. Thiry and C. Rodeck (1999). "Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy." *Obstet Gynecol* **93**(1): 25-29.
- Jessell, T. M. (2000). "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." *Nat Rev Genet* **1**(1): 20-29.
- Jo, E., G. Seo, J. T. Kwon, M. Lee, B. Lee, I. Eom, . . . K. Choi (2013). "Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats." *J Toxicol Sci* **38**(4): 525-530.
- Johnson, S. M., N. Koshiya and J. C. Smith (2001). "Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Botzinger complex "island"." *J Neurophysiol* **85**(4): 1772-1776.
- Johnson, S. M., J. C. Smith, G. D. Funk and J. L. Feldman (1994). "Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat." *J Neurophysiol* **72**(6): 2598-2608.
- Joly Condette, C., V. Bach, C. Mayeur, J. Gay-Queheillard and H. Khorsi-Cauet (2015). "Chlorpyrifos Exposure During Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated With Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **61**(1): 30-40.
- Jordan, D. (1996). "Central nervous mechanisms in cough." *Pulm Pharmacol* **9**(5-6): 389-392.
- Jung, S., M. Bang, B. S. Kim, S. Lee, N. A. Kotov, B. Kim and D. Jeon (2014). "Intracellular gold nanoparticles increase neuronal excitability and aggravate seizure activity in the mouse brain." *PLoS One* **9**(3): e91360.
- Jutras-Aswad, D., J. A. DiNieri, T. Harkany and Y. L. Hurd (2009). "Neurobiological consequences of maternal cannabis on human fetal development and its neuropsychiatric outcome." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **259**(7): 395-412.
- Juvin, L., J. P. Le Gal, J. Simmers and D. Morin (2012). "Cervicolumbar coordination in mammalian quadrupedal locomotion: role of spinal thoracic circuitry and limb sensory inputs." *J Neurosci* **32**(3): 953-965.
- Juvin, L., J. Simmers and D. Morin (2007). "Locomotor rhythmogenesis in the isolated rat spinal cord: a phase-coupled set of symmetrical flexion extension oscillators." *J Physiol* **583**(Pt 1): 115-128.
- Kalia, M. and M. M. Mesulam (1980). "Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches." *J Comp Neurol* **193**(2): 467-508.

- Kam, K., J. W. Worrell, W. A. Janczewski, Y. Cui and J. L. Feldman (2013). "Distinct inspiratory rhythm and pattern generating mechanisms in the preBotzinger complex." *J Neurosci* **33**(22): 9235-9245.
- Kang, J., S. Zhang, Q. Zhang and Y. Wang (2009). "Ruthenium Nanoparticles Supported on Carbon Nanotubes as Efficient Catalysts for Selective Conversion of Synthesis Gas to Diesel Fuel." *Angewandte Chemie* **121**(14): 2603-2606.
- Kao, Y. Y., T. J. Cheng, D. M. Yang, C. T. Wang, Y. M. Chiung and P. S. Liu (2012). "Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo." *J Mol Neurosci* **48**(2): 464-471.
- Kawashima, S., P. Hou, D. J. Corr and S. P. Shah (2013). "Modification of cement-based materials with nanoparticles." *Cement and Concrete Composites* **36**: 8-15.
- Keelan, J. A. (2011). "Nanotoxicology: nanoparticles versus the placenta." *Nat Nanotechnol* **6**(5): 263-264.
- Kesarkar, R., G. Oza, S. Pandey, R. Dahake, S. Mukherjee, A. Chowdhary and M. Sharon (2017). "Gold nanoparticles: effective as both entry inhibitors and virus neutralizing agents against HIV." *Journal of Microbiology and Biotechnology Research; Vol 2, No 2 (2012)*.
- KFDA (2010). Single dose and repeated dose toxicity studies of manufactured nanoparticles. Korea, Korean Food and Drug Administration.
- Kiehn, O. (2011). "Development and functional organization of spinal locomotor circuits." *Curr Opin Neurobiol* **21**(1): 100-109.
- Kilburn, K. H. and R. H. Warshaw (1991). "Abnormal lung function associated with asbestos disease of the pleura, the lung, and both: a comparative analysis." *Thorax* **46**(1): 33.
- Kim, J., J. Lee, D. Son, M. K. Choi and D. H. Kim (2016). "Deformable devices with integrated functional nanomaterials for wearable electronics." *Nano Converg* **3**(1): 4.
- Kim, J. S., E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, . . . M.-H. Cho (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**(1): 95-101.
- Kim, Y. H., E. Y. Kim, B. J. Gwag, S. Sohn and J. Y. Koh (1999). "Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals." *Neuroscience* **89**(1): 175-182.
- Kjaerulf, O. and O. Kiehn (1996). "Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study." *J Neurosci* **16**(18): 5777-5794.
- Kokura, S., O. Handa, T. Takagi, T. Ishikawa, Y. Naito and T. Yoshikawa (2010). "Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **6**(4): 570-574.
- Kole, M. and T. K. Dey (2010). "Viscosity of alumina nanoparticles dispersed in car engine coolant." *Experimental Thermal and Fluid Science* **34**(6): 677-683.
- Konduru, N. V., K. M. Murdaugh, G. A. Sotiriou, T. C. Donaghey, P. Demokritou, J. D. Brain and R. M. Molina (2014). "Bioavailability, distribution and clearance of tracheally-instilled and gavaged uncoated or silica-coated zinc oxide nanoparticles." *Part Fibre Toxicol* **11**: 44.
- Koshiya, N. and J. C. Smith (1999). "Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro." *Nature* **400**(6742): 360-363.
- Koureas, M., A. Tsakalof, A. Tsatsakis and C. Hadjichristodoulou (2012). "Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes." *Toxicol Lett* **210**(2): 155-168.
- Kramer, B. W., S. Kallapur, J. Newnham and A. H. Jobe (2009). "Prenatal inflammation and lung development." *Semin Fetal Neonatal Med* **14**(1): 2-7.
- Kreyling, W. G. (2016). "Discovery of unique and ENM- specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats." *Toxicol Appl Pharmacol* **299**: 41-46.
- Kreyling, W. G., S. Hirn, W. Moller, C. Schleh, A. Wenk, G. Celik, . . . M. Semmler-Behnke (2014). "Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size." *ACS Nano* **8**(1): 222-233.
- Kriellaars, D. J., R. M. Brownstone, B. R. Noga and L. M. Jordan (1994). "Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat." *Journal of Neurophysiology* **71**: 2074-2086.

- Kroto, H. W., J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl and R. E. Smalley (1985). "C60: Buckminsterfullerene." Nature **318**(6042): 162-163.
- Kurmann-Schwarz, B. and C. Lautier (2009). The Medieval stained-glass window in Europe: 10 years of abundant research.
- Kuzum, D., R. G. Jeyasingh, B. Lee and H. S. Wong (2012). "Nanoelectronic programmable synapses based on phase change materials for brain-inspired computing." Nano Lett **12**(5): 2179-2186.
- Kwan, A. C., S. B. Dietz, W. W. Webb and R. M. Harris-Warrick (2009). "Activity of Hb9 interneurons during fictive locomotion in mouse spinal cord." J Neurosci **29**(37): 11601-11613.
- Lahmani, M. and F. Marano (2015). Les nanosciences (Tome 4) - Nanotoxicologie et nano éthique: Nanotoxicologie et nano éthique, Humensis.
- Lai, J. C., M. B. Lai, S. Jandhyam, V. V. Dukhande, A. Bhushan, C. K. Daniels and S. W. Leung (2008). "Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts." Int J Nanomedicine **3**(4): 533-545.
- Lambe, T. W. and R. V. Whitman (1969). Soil Mechanics.
- Lanone, S. and J. Boczkowski (2010). "Les sources de nanoparticules." Revue Française d'Allergologie **50**(3): 211-213.
- Lanuza, G. M., S. Gosgnach, A. Pierani, T. M. Jessell and M. Goulding (2004). "Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements." Neuron **42**(3): 375-386.
- Larese, F. F., F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi and G. Maina (2009). "Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin." Toxicology **255**(1): 33-37.
- Lattuada, M. and T. A. Hatton (2011). "Synthesis, properties and applications of Janus nanoparticles." Nano Today **6**(3): 286-308.
- Le Gal, J. P., L. Juvin, L. Cardoit and D. Morin (2016). "Bimodal Respiratory-Locomotor Neurons in the Neonatal Rat Spinal Cord." J Neurosci **36**(3): 926-937.
- Le Gal, J. P., L. Juvin, L. Cardoit, M. Thoby-Brisson and D. Morin (2014). "Remote control of respiratory neural network by spinal locomotor generators." PLoS One **9**(2): e89670.
- Leite-Silva, V. R., M. L. Lamer, W. Y. Sanchez, D. C. Liu, W. H. Sanchez, I. Morrow, . . . M. S. Roberts (2013). "The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **84**(2): 297-308.
- Leonhardt, U. (2007). "Optical metamaterials: Invisibility cup." Nature photonics **1**: 207-208.
- Lesbats, M. (2012). Précis de gestion des risques: Cours et exercices corrigés, Dunod.
- Lewis, G. W., P. L. Miller and P. S. Mills (1973). "NEURO-MUSCULAR MECHANISMS OF ABDOMINAL PUMPING IN THE LOCUST." Journal of Experimental Biology **59**: 149-168.
- Li, A., M. Randall and E. E. Nattie (1999). "CO(2) microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep." J Appl Physiol (1985) **87**(3): 910-919.
- Li, J. and J. J. Zhu (2013). "Quantum dots for fluorescent biosensing and bio-imaging applications." Analyst **138**(9): 2506-2515.
- Li, T., T. Shi, X. Li, S. Zeng, L. Yin and Y. Pu (2014). "Effects of Nano-MnO2 on dopaminergic neurons and the spatial learning capability of rats." Int J Environ Res Public Health **11**(8): 7918-7930.
- Li, Y., J. Yan, W. Ding, Y. Chen, L. M. Pack and T. Chen (2017). "Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles." Mutagenesis **32**(1): 33-46.
- Lin, D. C., S. Liu, T. M. Guo, G. X. Wang, T. S. Srivatsan and M. Petraroli (2003). "An investigation of nanoparticles addition on solidification kinetics and microstructure development of tin-lead solder." Materials Science and Engineering: A **360**(1): 285-292.
- Lin, D. D., A. S. Cohen and D. A. Coulter (2001). "Zinc-induced augmentation of excitatory synaptic currents and glutamate receptor responses in hippocampal CA3 neurons." J Neurophysiol **85**(3): 1185-1196.

- Lipski, J. (1979). "[Electrophysiological studies on the neuronal organization of the arterial chemoreceptors' reflex]." *Neurol Neurochir Pol* **13**(6): 671-673.
- Liu, C., S. Alwarappan, Z. Chen, X. Kong and C. Z. Li (2010). "Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets." *Biosens Bioelectron* **25**(7): 1829-1833.
- Liu, Z., S. Liu, G. Ren, T. Zhang and Z. Yang (2011). "Nano-CuO inhibited voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons via reactive oxygen species but independent from G-proteins pathway." *J Appl Toxicol* **31**(5): 439-445.
- Liu, Z., G. Ren, T. Zhang and Z. Yang (2009). "Action potential changes associated with the inhibitory effects on voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons by silver nanoparticles." *Toxicology* **264**(3): 179-184.
- Lockman, P. R., J. M. Koziara, R. J. Mumper and D. D. Allen (2004). "Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability." *J Drug Target* **12**(9-10): 635-641.
- Lockman, P. R., R. J. Mumper and D. D. Allen (2003a). "Evaluation of blood-brain barrier thiamine efflux using the in situ rat brain perfusion method." *J Neurochem* **86**(3): 627-634.
- Lockman, P. R., M. O. Oyewumi, J. M. Koziara, K. E. Roder, R. J. Mumper and D. D. Allen (2003b). "Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles." *J Control Release* **93**(3): 271-282.
- Loeschcke, H. H. (1982). "CENTRAL CHEMOSENSITIVITY AND THE REACTION THEORY." *J. Physiol.* **332**: 1-24.
- Lumsden, T. (1923). "THE REGULATION OF RESPIRATION. Part I." *Journal of Physiology* **58**(1): 81-91.
- Lundberg, A. (1965). "[Interaction between the spinal reflex pathways]." *Actual Neurophysiol (Paris)* **6**: 121-137.
- Lundberg, A. (1971). "Function of the ventral spinocerebellar tract. A new hypothesis."
- Lundquist, P. and P. Artursson (2016). "Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues." *Adv Drug Deliv Rev* **106**(Pt B): 256-276.
- Lynch, J. J., 3rd, S. P. Yu, L. M. Canzoniero, S. L. Sensi and D. W. Choi (1995). "Sodium channel blockers reduce oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal injury when combined with glutamate receptor antagonists." *J Pharmacol Exp Ther* **273**(1): 554-560.
- Ma, L., J. Liu, N. Li, J. Wang, Y. Duan, J. Yan, . . . F. Hong (2010). "Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity." *Biomaterials* **31**(1): 99-105.
- Machado, B. H. and M. J. Brody (1988). "Role of the nucleus ambiguus in the regulation of heart rate and arterial pressure." *Hypertension* **11**(6 Pt 2): 602-607.
- MacKay-Lyons, M. (2002). "Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence." *Phys Ther* **82**(1): 69-83.
- Madison, D. V. and R. A. Nicoll (1984). "Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro." *J Physiol* **354**: 319-331.
- Maiorov, D. N., E. R. Wilton, E. Badoer, D. Petrie, G. A. Head and S. C. Malpas (1999). "Sympathetic response to stimulation of the pontine A5 region in conscious rabbits." *Brain Res* **815**(2): 227-236.
- Malisoux, L., C. Jamart, K. Delplace, H. Nielens, M. Francaux and D. Theisen (2007). "Effect of long-term muscle paralysis on human single fiber mechanics." *J Appl Physiol (1985)* **102**(1): 340-349.
- Marano, F., S. Hussain, F. Rodrigues-Lima, A. Baeza-Squiban and S. Boland (2011). "Nanoparticles: molecular targets and cell signalling." *Arch Toxicol* **85**(7): 733-741.
- Marder, E. and R. L. Calabrese (1996). "Principles of rhythmic motor pattern generation." *Physiol Rev* **76**(3): 687-717.
- Marin, P., M. Israel, J. Glowinski and J. Premont (2000). "Routes of zinc entry in mouse cortical neurons: role in zinc-induced neurotoxicity." *Eur J Neurosci* **12**(1): 8-18.
- Martin, B. J., J. A. Logemann, R. Shaker and W. J. Dodds (1994). "Coordination between respiration and swallowing: respiratory phase relationships and temporal integration." *Journal of Applied Physiology* **76**(2): 714.

- Mayer, M. L., L. Vyklicky, Jr. and G. L. Westbrook (1989). "Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones." *J Physiol* **415**: 329-350.
- Mayhoub, F., T. Berton, V. Bach, K. Tack, C. Deguines, A. Floch-Barneaud, . . . K. Chardon (2014). "Self-reported parental exposure to pesticide during pregnancy and birth outcomes: the MecExpo cohort study." *PLoS One* **9**(6): e99090.
- McCormick, D. A. and H. C. Pape (1990). "Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones." *J Physiol* **431**: 291-318.
- McCrea, D. A. and I. A. Rybak (2008). "Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation." *Brain Res Rev* **57**(1): 134-146.
- McFarland, D. H. and J. P. Lund (1993). "An investigation of the coupling between respiration, mastication, and swallowing in the awake rabbit." *Journal of Neurophysiology* **69**(1): 95.
- McKay, L. C., W. A. Janczewski and J. L. Feldman (2005). "Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBotzinger complex neurons." *Nat Neurosci* **8**(9): 1142-1144.
- Mehta, R. S. and P. C. Wainwright (2007). "Raptorial jaws in the throat help moray eels swallow large prey." *Nature* **449**(7158): 79-82.
- Mellen, N. M., W. A. Janczewski, C. M. Bocchiaro and J. L. Feldman (2003). "Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation." *Neuron* **37**(5): 821-826.
- Michalet, X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, . . . S. Weiss (2005). "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics." *Science* **307**(5709): 538-544.
- Miller, S., J. Van Der Burg and F. Van Der Meche (1975). "Locomotion in the cat: basic programmes of movement." *Brain Res* **91**(2): 239-253.
- Millhorn, D. E., F. L. Eldridge, T. G. Waldrop and L. E. Klingler (1983). "Centrally and peripherally administered 5-HTP have opposite effects on respiration." *Brain Res* **264**: 349-354.
- Mohammadipour, A., A. Fazel, H. Haghiri, F. Motejaded, H. Rafatpanah, H. Zabihi, . . . A. E. Bideskan (2014). "Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring." *Environ Toxicol Pharmacol* **37**(2): 617-625.
- Moran-Rivard, L., T. Kagawa, H. Saueressig, M. K. Gross, J. Burrill and M. Goulding (2001). "Evx1 is a postmitotic determinant of v0 interneuron identity in the spinal cord." *Neuron* **29**(2): 385-399.
- Morin, D., A. Bonnot, B. Ballion and D. Viala (2000). "alpha1-adrenergic receptor-induced slow rhythmicity in nonrespiratory cervical motoneurons of neonatal rat spinal cord." *Eur J Neurosci* **12**(8): 2950-2966.
- Morin, D. and D. Viala (2002). "Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs." *J Neurosci* **22**(11): 4756-4765.
- Morris, C. G. and J. Low (2008). "Metabolic acidosis in the critically ill: part 1. Classification and pathophysiology." *Anaesthesia* **63**(3): 294-301.
- Mu, L. and R. L. Sprando (2010). "Application of nanotechnology in cosmetics." *Pharm Res* **27**(8): 1746-1749.
- Mulder, E. J., P. G. Robles de Medina, A. C. Huizink, B. R. Van den Bergh, J. K. Buitelaar and G. H. Visser (2002). "Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child." *Early Hum Dev* **70**(1-2): 3-14.
- Mulkey, D. K., R. L. Stornetta, M. C. Weston, J. R. Simmons, A. Parker, D. A. Bayliss and P. G. Guyenet (2004). "Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats." *Nat Neurosci* **7**(12): 1360-1369.
- Murakoshi, T., T. Suzue and S. Tamai (1985). "A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat." *Br J Pharmacol* **86**(1): 95-104.
- Neubert, J. and J. Glumm (2016). "Promoting neuronal regeneration using extracellular vesicles loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles." *Neural Regeneration Research* **11**(1): 61-63.
- Ng, C. T., L. Q. Yong, M. P. Hande, C. N. Ong, L. E. Yu, B. H. Bay and G. H. Baeg (2017). "Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*." *Int J Nanomedicine* **12**: 1621-1637.

- Nilsson, J., A. Thorstensson and J. Halbertsma (1985). "Changes in leg movements and muscle activity with speed of locomotion and mode of progression in humans." Acta Physiol Scand **123**(4): 457-475.
- Nunez-Abades, P. A., F. Portillo and R. Pasaro (1990). "Characterisation of afferent projections to the nucleus ambiguus of the rat by means of fluorescent double labelling." J Anat **172**: 1-15.
- Oberdorster, G. (2001). "Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles." Int Arch Occup Environ Health **74**(1): 1-8.
- Oberdorster, G., A. Elder and A. Rinderknecht (2009). "Nanoparticles and the brain: cause for concern?" J Nanosci Nanotechnol **9**(8): 4996-5007.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling and C. Cox (2004). "Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain." Inhal Toxicol **16**(6-7): 437-445.
- Ogilvie, M. D., A. Gottschalk, K. Anders, D. W. Richter and A. I. Pack (1992). "A network model of respiratory rhythmogenesis." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **263**(4): R962.
- Okada, Y., K. Muckenhoff, G. Holtermann, H. Acker and P. Scheid (1993). "Depth profiles of pH and PO<sub>2</sub> in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat." Respir Physiol **93**(3): 315-326.
- Okada, Y., K. Tachibana, S. Yanagita and K. Takeda (2013). "Prenatal exposure to zinc oxide particles alters monoaminergic neurotransmitter levels in the brain of mouse offspring." J Toxicol Sci **38**(3): 363-370.
- Onimaru, H., A. Arata and I. Homma (1987). "Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats." Neurosci Lett **78**(2): 151-155.
- Onimaru, H., A. Arata and I. Homma (1988). "Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat." Brain Res **445**(2): 314-324.
- Onimaru, H. and I. Homma (1992). "Whole cell recordings from respiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats." Pflugers Arch **420**(3-4): 399-406.
- Onimaru, H. and I. Homma (2003). "A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla." J Neurosci **23**(4): 1478-1486.
- Onimaru, H. and I. Homma (2008). "Two modes of respiratory rhythm generation in the newborn rat brainstem-spinal cord preparation." Adv Exp Med Biol **605**: 104-108.
- Onimaru, H., I. Homma and K. Iwatsuki (1992). "Excitation of inspiratory neurons by preinspiratory neurons in rat medulla in vitro." Brain Res Bull **29**(6): 879-882.
- Ono, S.-I. and M. G. Cherian (1999). "Regional distribution of metallothionein, zinc, and copper in the brain of different strains of rats." Biological Trace Element Research **69**(2): 151-159.
- Pagliardini, S., W. A. Janczewski, W. Tan, C. T. Dickson, K. Deisseroth and J. L. Feldman (2011). "Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats." J Neurosci **31**(8): 2895-2905.
- Palmiter, R. D., T. B. Cole, C. J. Quaife and S. D. Findley (1996). "ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14934-14939.
- Pamphlett, R. and S. Kum Jew (2013). "Heavy metals in locus ceruleus and motor neurons in motor neuron disease." Acta Neuropathol Commun **1**: 81.
- Panacek, A., R. Prucek, D. Safarova, M. Dittrich, J. Richtrova, K. Benickova, . . . L. Kvitek (2011). "Acute and chronic toxicity effects of silver nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*." Environ Sci Technol **45**(11): 4974-4979.
- Panaitescu, B., A. Ruangkittisakul and K. Ballanyi (2010). "Depression by Ca<sup>2+</sup> and stimulation by K<sup>+</sup> of fictive inspiratory rhythm in newborn rat brainstem slices." Adv Exp Med Biol **669**: 91-95.
- Park, Y.-H., H. C. Bae, Y. Jang, S. H. Jeong, H. N. Lee, W.-I. Ryu, . . . S. W. Son (2013). "Effect of the size and surface charge of silica nanoparticles on cutaneous toxicity." Molecular & Cellular Toxicology **9**(1): 67-74.
- Passagne, I., M. Morille, M. Rousset, I. Pujalté and B. L'Azou (2012). "Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells." Toxicology **299**(2): 112-124.

- Pattenden, S., T. Antova, M. Neuberger, B. Nikiforov, M. De Sario, L. Grize, . . . T. Fletcher (2006). "Parental smoking and children's respiratory health: independent effects of prenatal and postnatal exposure." *Tob Control* **15**(4): 294-301.
- Pena, F., M. A. Parkis, A. K. Tryba and J. M. Ramirez (2004). "Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia." *Neuron* **43**(1): 105-117.
- Peng, X., K. Cheng, J. Kang, B. Gu, X. Yu, Q. Zhang and Y. Wang (2015). "Impact of Hydrogenolysis on the Selectivity of the Fischer-Tropsch Synthesis: Diesel Fuel Production over Mesoporous Zeolite-Y-Supported Cobalt Nanoparticles." *Angew Chem Int Ed Engl* **54**(15): 4553-4556.
- Perera, F. P., V. Rauh, W.-Y. Tsai, P. Kinney, D. Camann, D. Barr, . . . R. M. Whyatt (2002). "Effects of Transplacental Exposure to Environmental Pollutants on Birth Outcomes in a Multiethnic Population." *Environmental Health Perspectives* **111**(2): 201-205.
- Perret, C. and J. M. Cabelguen (1980). "Main characteristics of the hindlimb locomotor cycle in the decorticate cat with special reference to bifunctional muscles." *Brain Res* **187**(2): 333-352.
- Pette, D. and R. S. Staron (2000). "Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions." *Microsc Res Tech* **50**(6): 500-509.
- Phillips, W. S., M. Herly, C. A. Del Negro and J. C. Reikling (2016). "Organotypic slice cultures containing the preBotzinger complex generate respiratory-like rhythms." *J Neurophysiol* **115**(2): 1063-1070.
- Piao, M. J., K. A. Kang, I. K. Lee, H. S. Kim, S. Kim, J. Y. Choi, . . . J. W. Hyun (2011). "Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis." *Toxicology Letters* **201**(1): 92-100.
- Pierani, A., L. Moran-Rivard, M. J. Sunshine, D. R. Littman, M. Goulding and T. M. Jessell (2001). "Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1." *Neuron* **29**(2): 367-384.
- Pollard, I. (2007). "Neuropharmacology of drugs and alcohol in mother and fetus." *Semin Fetal Neonatal Med* **12**(2): 106-113.
- Poon, C.-S. and G. Song (2017). "The Norepinephrine-dependent 'Postinspiratory Complex' is NOT an Autonomous Generator of the Postinspiratory Rhythm." *The FASEB Journal* **31**(1 Supplement): 729.722.
- Poulsen, M. S., T. Mose, L. L. Maroun, L. Mathiesen, L. E. Knudsen and E. Rytting (2015). "Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta." *Nanotoxicology* **9 Suppl 1**: 79-86.
- Prabhu, N., N. Smith, D. Campbell, L. C. Craig, A. Seaton, P. J. Helms, . . . S. W. Turner (2010). "First trimester maternal tobacco smoking habits and fetal growth." *Thorax* **65**(3): 235-240.
- Pujol, J., G. Martinez-Vilavella, D. Macia, R. Fenoll, M. Alvarez-Pedrerol, I. Rivas, . . . J. Sunyer (2016). "Traffic pollution exposure is associated with altered brain connectivity in school children." *Neuroimage* **129**: 175-184.
- Radulovacki, M., S. Pavlovic and D. W. Carley (2004). "Pontine intertrigeminal region attenuates sleep apneas in rats." *Sleep* **27**(3): 383-387.
- Radulovacki, M., S. Pavlovic, J. Saponjic and D. W. Carley (2003). "Intertrigeminal region attenuates reflex apnea and stabilizes respiratory pattern in rats." *Brain Res* **975**(1-2): 66-72.
- Raghupathi, K. R., R. T. Koodali and A. C. Manna (2011). "Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles." *Langmuir* **27**(7): 4020-4028.
- Ramirez, J. M., A. Doi, A. J. Garcia, 3rd, F. P. Elsen, H. Koch and A. D. Wei (2012). "The cellular building blocks of breathing." *Compr Physiol* **2**(4): 2683-2731.
- Ramirez, J. M., U. J. A. Quellmalz and D. W. Richter (1996). "Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice." *Journal of Physiology* **491**(3): 799-812.
- Ramirez, J. M. and D. W. Richter (1996). "The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation." *Curr Opin Neurobiol* **6**(6): 817-825.
- Rauh, V., S. Arunajadai, M. Horton, F. Perera, L. Hoepner, D. B. Barr and R. Whyatt (2011). "Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide." *Environ Health Perspect* **119**(8): 1196-1201.

- Rauh, V. A., W. E. Garcia, R. M. Whyatt, M. K. Horton, D. B. Barr and E. D. Louis (2015). "Prenatal exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos and childhood tremor." Neurotoxicology **51**: 80-86.
- Rauh, V. A., R. Garfinkel, F. P. Perera, H. F. Andrews, L. Hoepner, D. B. Barr, . . . R. W. Whyatt (2006). "Impact of Prenatal Chlorpyrifos Exposure on Neurodevelopment in the First 3 Years of Life Among Inner-City Children." Pediatrics **118**(6): e1845.
- Re, F., R. Moresco and M. Masserini (2012). "Nanoparticles for neuroimaging." Journal of Physics D: Applied Physics **45**(7): 073001.
- Reddy, A. R. N., Y. N. Reddy, D. R. Krishna and V. Himabindu (2010). "Multi wall carbon nanotubes induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells." Toxicology **272**(1): 11-16.
- Reed, R. B., D. A. Ladner, C. P. Higgins, P. Westerhoff and J. F. Ranville (2012). "Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices." Environ Toxicol Chem **31**(1): 93-99.
- Rekling, J. C. and J. L. Feldman (1998). "PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation." Annu Rev Physiol **60**: 385-405.
- Rekling, J. C., X. M. Shao and J. L. Feldman (2000). "Electrical Coupling and Excitatory Synaptic Transmission between Rhythmogenic Respiratory Neurons in the PréBöttinger Complex." The Journal of Neuroscience **20**: RC113-RC113.
- Rice, D. and S. Barone Jr. (2000). "Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models birth." Environ. Health Perspect **108**: 511-533.
- Richter, D. W. (1982). "Generation and maintenance of the respiratory rhythm." J Exp Biol **100**: 93-107.
- Roberts, A. (2000). "Early functional organization of spinal neurons in developing lower vertebrates." Brain Res Bull **53**(5): 585-593.
- Rollerova, E., J. Tulinska, A. Liskova, M. Kuricova, J. Kovriznych, A. Mlynarcikova, . . . S. Scsukova (2015). "Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development." Endocrine Regulations **49**(02): 97-112.
- Rossignol, S., L. Bouyer, C. Langlet, D. Barthélemy, C. Chau, N. Giroux, . . . T. A. Reader (2004). "Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat." **143**: 163-172.
- Ruangkittisakul, A., L. Secchia, T. D. Bornes, D. M. Palathinkal and K. Ballanyi (2007). "Dependence on extracellular Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> antagonism of inspiratory centre rhythms in slices and en bloc preparations of newborn rat brainstem." J Physiol **584**(Pt 2): 489-508.
- Rybak, I. A., J. F. Paton and J. S. Schwaber (1997). "Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. II. Network models of the central respiratory pattern generator." J Neurophysiol **77**(4): 2007-2026.
- Rybak, I. A., N. A. Shevtsova, J. F. Paton, T. E. Dick, W. M. St-John, M. Morschel and M. Dutschmann (2004). "Modeling the ponto-medullary respiratory network." Respir Physiol Neurobiol **143**(2-3): 307-319.
- Saito, K. (1979). "Development of spinal reflexes in the rat fetus studied in vitro." J Physiol **294**: 581-594.
- Salata, O. (2004). "Applications of nanoparticles in biology and medicine." J Nanobiotechnology **2**(1): 3.
- Salinas, K., Z. Kereselidze, F. DeLuna, X. G. Peralta and F. Santamaria (2014). "Transient extracellular application of gold nanostars increases hippocampal neuronal activity." J Nanobiotechnology **12**: 31.
- Sanders, T., Y. Liu, V. Buchner and P. B. Tchounwou (2009). "Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review." Rev Environ Health **24**(1): 15-45.
- Sant'ambrogio, G. and E. Camporesi (1973). "Contribution of various inspiratory muscles to ventilation and the immediate and distant effect of diaphragmatic paralysis." Acta Neurobiol Exp (Wars) **33**(1): 401-409.
- Saraiva, C., C. Praca, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira and L. Bernardino (2016). "Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases." J Control Release **235**: 34-47.

- Sarkar, A., I. Fatima, Q. M. Jamal, U. Sayeed, M. K. Khan, S. Akhtar, . . . M. H. Siddiqui (2017). "Nanoparticles as a Carrier System for Drug Delivery Across Blood Brain Barrier." Curr Drug Metab.
- Sato, M., J. W. Severinghaus and A. I. Basbaum (1992). "Medullary CO<sub>2</sub> chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry." J Appl Physiol (1985) **73**(1): 96-100.
- Satterlie, R. A., T. P. Norekian and T. J. Pirtle (2000). "Serotonin-induced spike narrowing in a locomotor pattern generator permits increases in cycle frequency during accelerations." J Neurophysiol **83**(4): 2163-2170.
- Schmid, K., G. Bohmer and K. Gebauer (1991a). "GABAA receptor mediated fast synaptic inhibition in the rabbit brain-stem respiratory system." Acta Physiol Scand **142**(3): 411-420.
- Schmid, K., G. Bohmer and K. Gebauer (1991b). "Glycine receptor-mediated fast synaptic inhibition in the brainstem respiratory system." Respir Physiol **84**(3): 351-361.
- Schreiber, I., B. Hesse, C. Seim, H. Castillo-Michel, J. Villanova, P. Laux, . . . A. Luch (2017). "Synchrotron-based nu-XRF mapping and mu-FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin." Sci Rep **7**(1): 11395.
- Schuh, R. (2002). "Noncholinesterase Mechanisms of Chlorpyrifos Neurotoxicity: Altered Phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/cAMP Response Element Binding Protein in Cultured Neurons." Toxicology and Applied Pharmacology **182**(2): 176-185.
- Schwarzacher, S. W., U. Rub and T. Deller (2011). "Neuroanatomical characteristics of the human pre-Botzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases." Brain **134**(Pt 1): 24-35.
- Sciau, P. (2012). Nanoparticles in Ancient Materials: The Metallic Lustre Decorations of Medieval Ceramics. The Delivery of Nanoparticles. D. A. A. Hashim, InTech: 525-540.
- Sebastien, P., A. Fondimare, J. Bignon, G. Monchoux, J. Desbordes and G. Bonnaud (1975). "Topographic distribution of asbestos fibres in human lung in relation to occupational and non-occupational exposure." Inhaled Part 4 Pt 2: 435-446.
- Seeman, P. (2006). "Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia." Expert Opin Ther Targets **10**(4): 515-531.
- Seil, J. T. and T. J. Webster (2008). "Decreased astroglial cell adhesion and proliferation on zinc oxide nanoparticle polyurethane composites." Int J Nanomedicine **3**(4): 523-531.
- Sela, H., H. Cohen, P. Elia, R. Zach, Z. Karpas and Y. Zeiri (2015). "Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB)." Journal of Nanobiotechnology **13**(1).
- Sessle, B. J., L. F. Greenwood, J. P. Lund and G. E. Lucier (1978). "Effects of upper respiratory tract stimuli on respiration and single respiratory neurons in the adult cat." Exp Neurol **61**(2): 245-259.
- Shan, D., Y. Xie, G. Ren and Z. Yang (2012). "Inhibitory effect of tungsten carbide nanoparticles on voltage-gated potassium currents of hippocampal CA1 neurons." Toxicol Lett **209**(2): 129-135.
- Shao, X. M. and J. L. Feldman (1997). "Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Botzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission." J Neurophysiol **77**(4): 1853-1860.
- Sharma, A., D. F. Muresanu, R. Patnaik and H. S. Sharma (2013). "Size- and age-dependent neurotoxicity of engineered metal nanoparticles in rats." Mol Neurobiol **48**(2): 386-396.
- Sharma, H. S., A. Patnaik R Fau - Sharma, P.-O. Sharma A Fau - Sjoquist, J. V. Sjoquist Po Fau - Lafuente and J. V. Lafuente "Silicon dioxide nanoparticles (SiO<sub>2</sub>, 40-50 nm) exacerbate pathophysiology of traumatic spinal cord injury and deteriorate functional outcome in the rat. An experimental study using pharmacological and morphological approaches." (1533-4880 (Print)).
- Sherrington, C. S. (1906). "Observations on the scratch-reflex in the spinal dog." J Physiol **34**(1-2): 1-50.
- Sherrington, C. S. (1913). "REFLEX INHIBITION AS A FACTOR IN THE CO-ORDINATION OF MOVEMENTS AND POSTURES." Quarterly Journal of Experimental Physiology **6**(3): 251-310.
- Shevtsova, N. A., A. E. Talpalar, S. N. Markin, R. M. Harris-Warrick, O. Kiehn and I. A. Rybak (2015). "Organization of left-right coordination of neuronal activity in the mammalian spinal cord: Insights from computational modelling." J Physiol **593**(11): 2403-2426.

- Shik, M. F., F. V. Severin and G. N. Orlovskii (1966). "[Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]." (0006-3029 (Print)).
- Shim, K. H., K. H. Jeong, S. O. Bae, M. O. Kang, E. H. Maeng, C. S. Choi, . . . S. S. An (2014). "Assessment of ZnO and SiO<sub>2</sub> nanoparticle permeability through and toxicity to the blood-brain barrier using Evans blue and TEM." *Int J Nanomedicine* **9 Suppl 2**: 225-233.
- Shrivastava, R., S. Raza, A. Yadav, P. Kushwaha and S. J. Flora (2014). "Effects of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub>, ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain." *Drug Chem Toxicol* **37**(3): 336-347.
- Simko, M. and M. O. Mattsson (2010). "Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review." *Part Fibre Toxicol* **7**: 42.
- Sipos, A., R. H. Chow, Z. Borok, K.-J. Kim and E. D. Crandall (2017). Mechanisms of Nanoparticle Flow Across Alveolar Epithelial Cells. **B29. AUTOPHAGY: MECHANISMS AND THERAPEUTIC OPPORTUNITIES**, American Thoracic Society: A3121-A3121.
- Skinner, F. K., N. Kopell and E. Marder (1994). "Mechanisms for oscillation and frequency control in reciprocally inhibitory model neural networks." *J Comput Neurosci* **1**(1-2): 69-87.
- Slotkin, T. A. and F. J. Seidler (2010). "Mimicking maternal smoking and pharmacotherapy of preterm labor: interactions of fetal nicotine and dexamethasone on serotonin and dopamine synaptic function in adolescence and adulthood." *Brain Res Bull* **82**(1-2): 124-134.
- Smart, T. G., X. Xie and B. J. Krishek (1994). "Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc." *Prog Neurobiol* **42**(3): 393-441.
- Smijs, T. G. and S. Pavel (2011). "Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness." *Nanotechnol Sci Appl* **4**: 95-112.
- Smith, J. C., A. P. Abdala, A. Borgmann, I. A. Rybak and J. F. Paton (2013). "Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits." *Trends Neurosci* **36**(3): 152-162.
- Smith, J. C., A. P. Abdala, I. A. Rybak and J. F. Paton (2009). "Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1529): 2577-2587.
- Smith, J. C., A. P. L. Abdala, H. Koizumi, I. A. Rybak and J. F. R. Paton (2007). "Spatial and Functional Architecture of the Mammalian Brain Stem Respiratory Network: A Hierarchy of Three Oscillatory Mechanisms." *Journal of Neurophysiology* **98**(6): 3370-3387.
- Smith, J. C., K. Ballanyi and D. W. Richter (1992). "Whole-cell patch-clamp recordings from respiratory neurons in neonatal rat brainstem in vitro." *Neurosci Lett* **134**(2): 153-156.
- Smith, J. C., R. J. Butera, N. Koshiya, C. Del Negro, C. G. Wilson and S. M. Johnson (2000). "Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model." *Respir Physiol* **122**(2-3): 131-147.
- Smith, J. C., H. H. Ellenberger, K. Ballanyi, D. W. Richter and J. L. Feldman (1991). "Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals." *Science* **254**: 726-729.
- Smith, J. C. and J. L. Feldman (1987). "In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion." *J Neurosci Methods* **21**(2-4): 321-333.
- Smith, J. C., J. L. Feldman and B. J. Schmidt (1988). "Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro." *FASEB J* **2**(7): 2283-2288.
- Smith, J. C., J. J. Greer, G. S. Liu and J. L. Feldman (1990). "Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity." *J Neurophysiol* **64**(4): 1149-1169.
- Solanki, A., S. T. Chueng, P. T. Yin, R. Kappera, M. Chhowalla and K. B. Lee (2013). "Axonal alignment and enhanced neuronal differentiation of neural stem cells on graphene-nanoparticle hybrid structures." *Adv Mater* **25**(38): 5477-5482.
- Sruthi, S. and P. V. Mohanan (2015). "Investigation on cellular interactions of astrocytes with zinc oxide nanoparticles using rat C6 cell lines." *Colloids Surf B Biointerfaces* **133**: 1-11.

- Stephan-Blanchard, E., K. Chardon, D. D. Djeddi, A. Leke, S. Delanaud, V. Bach and F. Telliez (2016). "The dynamics of cardiac autonomic control in sleeping preterm neonates exposed in utero to smoking." Clin Neurophysiol **127**(8): 2871-2877.
- Subramanian, H. H. and G. Holstege (2009). "The nucleus retroambiguus control of respiration." J Neurosci **29**(12): 3824-3832.
- Sugamata, M., T. Ihara, M. Sugamata and K. Takeda (2006a). "Maternal Exposure to Diesel Exhaust Leads to Pathological Similarity to Autism in Newborns." Journal of Health Science **52**(4): 486-488.
- Sugamata, M., T. Ihara, H. Takano, S. Oshio and K. Takeda (2006b). "Maternal diesel exhaust exposure damages newborn murine brains." Journal of Health Science **52**(1): 82-84.
- Sukwong, P., K. Somkid, S. Kongseng, D. Pissuwan and K. Yoovathaworn (2016). "Respiratory tract toxicity of titanium dioxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes on mice after intranasal exposure." IET Micro & Nano Letters **11**(4): 183-187.
- Sun, H. R., N. Zhang, X. W. Chen, G. H. An, C. X. Xu and Q. Ma (2016). "Effect of nano-SiO<sub>2</sub> exposure on spatial learning and memory and LTP of hippocampal dentate gyrus in rats." Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi **32**(1): 78-81.
- Surkan, P. J., M. Shankar, J. Katz, E. H. Siegel, S. C. Leclercq, S. K. Khatry, . . . J. M. Tielsch (2012). "Beneficial effects of zinc supplementation on head circumference of Nepalese infants and toddlers: a randomized controlled trial." Eur J Clin Nutr **66**(7): 836-842.
- Suzue, T. (1984). "Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat." J Physiol **354**: 173-183.
- Suzuki, T., S. Oshio, M. Iwata, H. Saburi, T. Odagiri, T. Udagawa, . . . K. Takeda (2010). "In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice." Part Fibre Toxicol **7**: 7.
- Swann, J. W., R. J. Brady and D. L. Martin (1989). "Postnatal development of GABA-mediated synaptic inhibition in rat hippocampus." Neuroscience **28**(3): 551-561.
- Takahashi, Y., K. Mizuo, Y. Shinkai, S. Oshio and K. Takeda (2010). "Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice." J Toxicol Sci **35**(5): 749-756.
- Takakura, A. C., T. S. Moreira, E. Colombari, G. H. West, R. L. Stornetta and P. G. Guyenet (2006). "Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats." J Physiol **572**(Pt 2): 503-523.
- Talpalar, A. E., J. Bouvier, L. Borgius, G. Fortin, A. Pierani and O. Kiehn (2013). "Dual-mode operation of neuronal networks involved in left-right alternation." Nature **500**(7460): 85-88.
- Talpalar, A. E. and O. Kiehn (2010). "Glutamatergic mechanisms for speed control and network operation in the rodent locomotor CpG." Front Neural Circuits **4**.
- Tang, J., L. Xiong, S. Wang, J. Wang, L. Liu, J. Li, . . . T. Xi (2009). "Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats." J Nanosci Nanotechnol **9**(8): 4924-4932.
- Tang, P. C. (1953). "Localization of the pneumotoxic center in the cat." Am J Physiol **172**(3): 645-652.
- Taniguchi, N. (1974). "On the Basic concept of Nanotechnology." Proceedings of the International Conference on Production Engineering: 18-23.
- Tankhiwale, R. and S. K. Bajpai (2012). "Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging." Colloids Surf B Biointerfaces **90**: 16-20.
- Thoby-Brisson, M. and J. M. Ramirez (2001). "Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice." J Neurophysiol **86**(1): 104-112.
- Thoby-Brisson, M., P. Telgkamp and J. M. Ramirez (2000). "The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice." J Neurosci **20**(8): 2994-3005.
- Thoby-Brisson, M., J. B. Trinh, J. Champagnat and G. Fortin (2005). "Emergence of the pre-Botzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo." J Neurosci **25**(17): 4307-4318.
- Trappe, S., N. Luden, K. Minchev, U. Raue, B. Jemiolo and T. A. Trappe (2015). "Skeletal muscle signature of a champion sprint runner." J Appl Physiol (1985) **118**(12): 1460-1466.

- Trombley, P. Q. and G. M. Shepherd (1996). "Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons." *Journal of Neurophysiology* **76**(4): 2536.
- Valdiglesias, V., C. Costa, G. Kilic, S. Costa, E. Pasaro, B. Laffon and J. P. Teixeira (2013). "Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles." *Environ Int* **55**: 92-100.
- Vaseem (2010). "ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications."
- Vaseem, M., A. Umar and Y. B. Hahn (2010). ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. *Metal Oxide Nanostructures and Their Applications*. A. Umar and Y. B. Hahn, American Scientific Publishers. **5**: 1-36.
- Vaughn, J. E. and J. A. Grieshaber (1973). "A morphological investigation of an early reflex pathway in developing rat spinal cord." *J Comp Neurol* **148**(2): 177-209.
- Voituron, N., A. Frugiere, F. Gros, J. M. Macron and L. Bodineau (2005). "Diencephalic and mesencephalic influences on ponto-medullary respiratory control in normoxic and hypoxic conditions: an in vitro study on central nervous system preparations from newborn rat." *Neuroscience* **132**(3): 843-854.
- Volkow, N. D., J. S. Fowler, G. J. Wang, J. M. Swanson and F. Telang (2007). "Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications." *Arch Neurol* **64**(11): 1575-1579.
- Wallen-Mackenzie, A., H. Gezelius, M. Thoby-Brisson, A. Nygard, A. Enjin, F. Fujiyama, . . . K. Kullander (2006). "Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation." *J Neurosci* **26**(47): 12294-12307.
- Wang, B., W. Feng, M. Wang, T. Wang, Y. Gu, M. Zhu, . . . J. Wang (2007). "Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice." *Journal of Nanoparticle Research* **10**(2): 263-276.
- Wang, D. H., D. Y. Kim, K. W. Choi, J. H. Seo, S. H. Im, J. H. Park, . . . A. J. Heeger (2011). "Enhancement of Donor-Acceptor Polymer Bulk Heterojunction Solar Cell Power Conversion Efficiencies by Addition of Au Nanoparticles." *Angewandte Chemie* **123**(24): 5633-5637.
- Wang, J., X. Deng, F. Zhang, D. Chen and W. Ding (2014). "ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes." *Nanoscale Res Lett* **9**(1): 117.
- Wang, J., Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, . . . C. Chen (2008). "Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles." *Toxicology* **254**(1-2): 82-90.
- Wang, L., C. Hu and L. Shao (2017). "The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future." *Int J Nanomedicine* **12**: 1227-1249.
- Wang, S., Y. Shi, S. Shu, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss (2013). "Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H<sup>+</sup> and CO<sub>2</sub>." *J Neurosci* **33**(18): 7756-7761.
- Wang, X.-J. and J. Rinzel (1992). "Alternating and Synchronous Rhythms in Reciprocally Inhibitory Model Neurons." *Neural Computation* **4**(1): 84-97.
- Wang, Z. L. (2008). "Splendid one-dimensional nanostructures of zinc oxide: a new nanomaterial family for nanotechnology." *ACS Nano* **2**(10): 1987-1992.
- Watt, N. T., I. J. Whitehouse and N. M. Hooper (2010). "The role of zinc in Alzheimer's disease." *Int J Alzheimers Dis* **2011**: 971021.
- Weir, A., P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski and N. von Goetz (2012). "Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products." *Environ Sci Technol* **46**(4): 2242-2250.
- Wells, J. C. (2007). "The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect." *Biol Rev Camb Philos Soc* **82**(1): 143-172.
- Wenninger, J. M., L. G. Pan, L. Klum, T. Leekley, J. Bastastic, M. R. Hodges, . . . H. V. Forster (2004). "Large lesions in the pre-Botzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats." *J Appl Physiol* (1985) **97**(5): 1629-1636.
- West, J. R., W. J. Chen and N. J. Pantazis (1994). "Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage." *Metab Brain Dis* **9**(4): 291-322.

- West, J. R. and K. M. Hamre (1985). "Effects of alcohol exposure during different periods of development: changes in hippocampal mossy fibers." *Brain Res* **349**(1-2): 280-284.
- Whelan, P. J. (1996). "Control of locomotion in the decerebrate cat." *Prog Neurobiol* **49**(5): 481-515.
- Wilson, D. M. (1961). "THE CENTRAL NERVOUS CONTROL OF FLIGHT IN A LOCUST." *Journal of Experimental Biology* **38**(2): 471-490.
- Wilson, J. M., R. Hartley, D. J. Maxwell, A. J. Todd, I. Lieberam, J. A. Kaltschmidt, . . . R. M. Brownstone (2005). "Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein." *J Neurosci* **25**(24): 5710-5719.
- Winer, J. L., P. E. Kim, M. Law, C. Y. Liu and M. L. Apuzzo (2011). "Visualizing the future: enhancing neuroimaging with nanotechnology." *World Neurosurg* **75**(5-6): 626-637; discussion 618-629.
- Winlow, W. and M. S. Laverack (1972). "The control of hindgut motility in the lobster, *Homarus gammarus* (L.)." *Marine Behaviour and Physiology* **1**(1-4): 1-27.
- Winterstein, H. (1949). "The "reaction theory" of respiratory regulation." *Experientia* **5**(6): 221-226.
- Wolak, D. J. and R. G. Thorne (2013). "Diffusion of macromolecules in the brain: implications for drug delivery." *Mol Pharm* **10**(5): 1492-1504.
- Wu, Q., Y. Lin, F. Wo, Y. Yuan, Q. Ouyang, J. Song, . . . K.-T. Yong (2017). "Novel Magnetic-Luminescent Janus Nanoparticles for Cell Labeling and Tumor Photothermal Therapy." *Small*: 1701129-n/a.
- Xavier, J. R., P. Desai, V. G. Varanasi, I. Al-Hashimi and A. K. Gaharwar (2015). *Advanced Nanomaterials: Promises for Improved Dental Tissue Regeneration. Nanotechnology in Endodontics: Current and Potential Clinical Applications*. A. Kishen. Cham, Springer International Publishing: 5-22.
- Xiaoli, F., W. Junrong, L. Xuan, Z. Yanli, W. Limin, L. Jia and S. Longquan (2017). "Prenatal exposure to nanosized zinc oxide in rats: neurotoxicity and postnatal impaired learning and memory ability." *Nanomedicine* **12**(7): 777-795.
- Xing, J., F. Yan, Y. Zhao, S. Chen, H. Yu, Q. Zhang, . . . Q. Xiong (2016). "High-Efficiency Light-Emitting Diodes of Organometal Halide Perovskite Amorphous Nanoparticles." *ACS Nano* **10**(7): 6623-6630.
- Xu, L. J., J. X. Zhao, T. Zhang, G. G. Ren and Z. Yang (2009). "In vitro study on influence of nano particles of CuO on CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus potassium currents." *Environ Toxicol* **24**(3): 211-217.
- Yacobi, N. R., N. Malmstadt, F. Fazlollahi, L. DeMaio, R. Marchelletta, S. F. Hamm-Alvarez, . . . E. D. Crandall (2010). "Mechanisms of alveolar epithelial translocation of a defined population of nanoparticles." *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**(5): 604-614.
- Yan, G., Y. Huang, Q. Bu, L. Lv, P. Deng, J. Zhou, . . . Y. Zhao (2012). "Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **47**(4): 577-588.
- Yang, Z., Z. W. Liu, R. P. Allaker, P. Reip, J. Oxford, Z. Ahmad and G. Ren (2010). "A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system." *J R Soc Interface* **7** *Suppl 4*: S411-422.
- Yokota, S., K. Mizuo, N. Moriya, S. Oshio, I. Sugawara and K. Takeda (2009). "Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice." *Neurosci Lett* **449**(1): 38-41.
- Yokota, S., N. Moriya, M. Iwata, M. Umezawa, S. Oshio and K. Takeda (2013). "Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice." *J Toxicol Sci* **38**(1): 13-23.
- Yokota, S., A. Sato, M. Umezawa, S. Oshio and K. Takeda (2015). "In utero exposure of mice to diesel exhaust particles affects spatial learning and memory with reduced N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male offspring." *Neurotoxicology* **50**: 108-115.
- Yokoyama, M., J. Koh and D. W. Choi (1986). "Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons." *Neuroscience Letters* **71**: 351-355.
- Yoshida, R., D. Kitamura and S. Maenosono (2009). "Mutagenicity of water-soluble ZnO nanoparticles in Ames test." *J Toxicol Sci* **34**(1): 119-122.
- Yu, L. E., L.-Y. L. Yung, C.-N. Ong, Y.-L. Tan, K. S. Balasubramaniam, D. Hartono, . . . W.-Y. Ong (2007). "Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats." *Nanotoxicology* **1**: 235-242.

- Zhang, B., H. Shi, Q. Wang, Z. Zhang and M. Li (2015). "Maternal Passive Smoking During Pregnancy and Age of Menarche in Daughters: A Study of Elementary and Middle School Students in Shanghai." *Asia Pacific Journal of Public Health* **27**(2\_suppl): 14S-20S.
- Zhang, J., G. M. Lanuza, O. Britz, Z. Wang, V. C. Siembab, Y. Zhang, . . . M. Goulding (2014a). "V1 and v2b interneurons secure the alternating flexor-extensor motor activity mice require for limbed locomotion." *Neuron* **82**(1): 138-150.
- Zhang, L. H., X. Wang, M. Stoltenberg, G. Danscher, L. Huang and Z. Y. Wang (2008a). "Abundant expression of zinc transporters in the amyloid plaques of Alzheimer's disease brain." *Brain Res Bull* **77**(1): 55-60.
- Zhang, Y., W. Bai, X. Cheng, J. Ren, W. Weng, P. Chen, . . . H. Peng (2014b). "Flexible and Stretchable Lithium-Ion Batteries and Supercapacitors Based on Electrically Conducting Carbon Nanotube Fiber Springs." *Angewandte Chemie International Edition* **53**(52): 14564-14568.
- Zhang, Y., S. A. Ferguson, F. Watanabe, Y. Jones, Y. Xu, A. S. Biris, . . . S. F. Ali (2013). "Silver nanoparticles decrease body weight and locomotor activity in adult male rats." *Small* **9**(9-10): 1715-1720.
- Zhang, Y., S. Narayan, E. Geiman, G. M. Lanuza, T. Velasquez, B. Shanks, . . . M. Goulding (2008b). "V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking." *Neuron* **60**(1): 84-96.
- Zhang, Y., Q. Xiao, Y. Bao, Y. Zhang, S. Bottle, S. Sarina, . . . H. Zhu (2014c). "Direct Photocatalytic Conversion of Aldehydes to Esters Using Supported Gold Nanoparticles under Visible Light Irradiation at Room Temperature." *The Journal of Physical Chemistry C* **118**(33): 19062-19069.
- Zhang, Z. and K. Friedrich (2005). Tribological Characteristics of Micro- and Nanoparticle Filled Polymer Composites. *Polymer Composites: From Nano- to Macro-Scale*. K. Friedrich, S. Fakirov and Z. Zhang. Boston, MA, Springer US: 169-185.
- Zhao, J., L. Xu, T. Zhang, G. Ren and Z. Yang (2009). "Influences of nanoparticle zinc oxide on acutely isolated rat hippocampal CA3 pyramidal neurons." *Neurotoxicology* **30**(2): 220-230.
- Zheng, Y., D. Riche, J. C. Rekling, A. S. Foutz and M. Denavit-Saubié (1998). "Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (rVRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin." *Brain Research* **782**(1-2): 113-125.
- Zhou, K.-Y., G.-Y. Chen, J.-A. Liu, Z.-P. Zhang, P. Sun, W.-Z. Zhang, . . . J.-C. Liang (2016). "Cobalt nanoparticles encapsulated in N-doped graphene nanoshells as an efficient cathode electrocatalyst for a mechanical rechargeable zinc-air battery." *RSC Advances* **6**(93): 90069-90075.
- Zhou, S., D. G. Rosenthal, S. Sherman, J. Zelikoff, T. Gordon and M. Weitzman (2014). "Physical, behavioral, and cognitive effects of prenatal tobacco and postnatal secondhand smoke exposure." *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **44**(8): 219-241.
- Zhou, Y., M. Yamamoto and J. D. Engel (2000). "GATA2 is required for the generation of V2 interneurons." *Development* **127**(17): 3829-3838.
- Ziskind-Conhaim, L. and C. A. Hinckley (2008). "Hb9 versus type 2 interneurons." *J Neurophysiol* **99**(2): 1044-1046; author reply 1047-1049.
- Zorumski, C. F., S. Mennerick and Y. Izumi (2014). "Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity." *Alcohol* **48**(1): 1-17.

## **Annexe**

### Publications dans des revues à comité de lecture :

- **A. Nicolosi**, L. Cardoit, Pierrick Pasquereau, C. Jaillet, M. Thoby-Brisson, L. Juvin, D. Morin (soumis) Acute exposure to zinc oxide nanoparticles critically disrupts the operation of respiratory neural network in the neonatal rat. *Scientific Reports*.
- J.P. Le Gal, **A. Nicolosi**, L. Juvin, D. Morin (2016) In vitro brainstem-spinal cord preparation of newborn rat. *Bio-protocol*.

### Autres Publications :

- **A. Nicolosi**, L. Juvin, C. Jaillet-Bartholome, M. Thoby-Brisson, D. Morin (2015) Effets des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité respiratoire centrale chez le rat nouveau-né. *Revue des Maladies Respiratoires, Volume 32, Supplement, January 2015*, Pages A151-A152.

### Communications affichées:

- **A. Nicolosi**, L. Juvin, C. Jaillet-Bartholome, M. Thoby-Brisson, D. Morin (2015) Effets des nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité respiratoire centrale chez le rat nouveau-né. *Congrès de Pneumologie en Langue Française*, Lille.
- **A. Nicolosi**, L. Juvin, C. Jaillet-Bartholome, M. Thoby-Brisson, D. Morin (2016) Nanoparticles effect on central respiratory activity. *Journée de l'école doctorale (preselection for the best poster award)*, Arcachon.
- **A. Nicolosi**, L. Juvin, C. Jaillet-Bartholome, M. Thoby-Brisson, D. Morin (2016) Nanoparticles effect on central respiratory activity. *Journée Bordeaux Neurocampus (Prix du meilleur poster)*, Talence.
- **A. Nicolosi**, L. Juvin, C. Jaillet-Bartholome, M. Thoby-Brisson, D. Morin (2016) Nanoparticles effect on central respiratory activity. *Rencontres Scientifiques de l'ANSES: 10 ans du PNR-EST*, Maisons-Alfort.
- **A. Nicolosi**, L. Juvin, C. Jaillet-Bartholome, M. Thoby-Brisson, D. Morin (2016) Nanoparticles effect on central respiratory activity. *Third INT neuroscience conference in tribute to Laurent Vinay*, Marseille.
- **A. Nicolosi**, L. Cardoit, Pierrick Pasquereau, C. Jaillet, M. Thoby-Brisson, L. Juvin, D. Morin (2017) Zinc oxide nanoparticles affect central respiratory activity. *Journée de l'école doctorale*, Talence.

### Communications orales:

- **A. Nicolosi** (2016) Nanoparticules et réseaux respiratoires. *Journée scientifique de l'INCLIA ("Ma thèse en 360s")*, Bordeaux
- **A. Nicolosi** (2017) Effets des nanoparticules d'oxyde de zinc sur le réseau respiratoire central. *Colloque du CLMR/MN*. Bordeaux

# **Acute exposure to zinc oxide nanoparticles critically disrupts operation of the respiratory neural network in neonatal rat.**

*Angelo Nicolosi<sup>1</sup>, Laura Cardoit<sup>1</sup>, Pierrick Pasquereau<sup>3</sup>, Christèle Jaillet<sup>2,3</sup>,  
Muriel Thoby-Brisson<sup>1</sup>, Laurent Juvin<sup>1</sup>, Didier Morin<sup>1,3,\*</sup>*

<sup>1</sup> University of Bordeaux, CNRS, UMR 5287, INCIA, Bordeaux, France.

<sup>2</sup> University of Bordeaux, Centre de Recherche Paul Pascal, Pessac, France.

<sup>3</sup> Bordeaux Institute of Technology, Department of Health, Safety & Environment, Gradignan, France.

\* Corresponding author

Text pages :	32
Figures:	7
Table:	1
Abstract:	200 words
Introduction:	710 words
Results:	2 079 words
Discussion and Conclusion:	2 015 words

## **Abstract**

Due to their extremely small size that gives them unique physicochemical properties, nanoparticles (NPs) are used in the production of everyday materials. However, NPs that cross biological membranes such as the blood-brain barrier can accumulate in the brain and potentially produce neuronal damage. Here, we aimed to evaluate the effects of an acute exposure to zinc oxide (ZnO) NPs on the central neural networks responsible for mammalian respiratory rhythm generation. Using an isolated *ex vivo* brainstem-spinal cord preparation from neonatal rat in which the circuitry for the central respiratory command remained intact, we show that ZnO NPs accelerate, then profoundly disrupt respiratory-related activity produced by the pre-Bötzinger complex (preBötC) responsible for inspiratory rhythm generation. Consequently, a sudden and definitive premature cessation of respiratory-related activity occurs in ZnO NPs-exposed preparations. Furthermore, using brainstem slice preparations containing the isolated preBötC network, whole-cell patch-clamp recordings revealed that ZnO NPs depolarize preBötC inspiratory neurons and affect their bioelectrical properties by reducing the amplitude of action potentials, thereby leading to a drastic depression of intra-network activity and the ultimate complete termination of respiratory rhythmogenesis. These findings thus support the conclusion that ZnO NPs may have deleterious effects on the central respiratory centers of newborn mammals.

## Introduction

Research in the field of nanotechnology and nanoparticles (NPs) has been developing rapidly, almost exponentially, during the last decades. The unique properties of NPs has enabled the development of products with specialized features, allowing significant innovations in a variety of human activities such as computer technology, electronics, energy, aerospace, automobile manufacturing, the food processing industry, cosmetics, pharmacy and medicine <sup>1</sup>. However, due to their extremely small size (<100 nm), NPs can easily enter the human body through different pathways (the respiratory system, for example, considered as one of the major routes of entry, and the olfactory neuronal pathway <sup>2-4</sup>), and can cross most biological membranes including the blood-brain barrier <sup>5-7</sup>. Subsequently, NPs can accumulate in the brain <sup>8</sup> and could be at the origin of cerebral dysfunctions and diseases. The development of suitable animal experimental models is therefore crucial for assessing the neurotoxicity of NPs.

Among many types of nanomaterials, NPs of zinc oxide (ZnO) have widespread potential applications and are one of the most abundantly used metal-based nano-sized materials. For instance, due to their controlled growth <sup>9</sup> and electrical properties <sup>10</sup>, ZnO nanowires are considered to have equivalent importance as carbon nanotubes and silicon nanowires for nanotechnology in the field of nanoelectronics, sensors, light-emitting diodes and nanopiezotronics <sup>11</sup>. Several studies have also reported that ZnO NPs show selective toxicity to different bacterial systems <sup>12</sup> and could therefore be used for food packaging material to prevent bacterial contamination <sup>13</sup>. Furthermore, ZnO NPs offer a number of properties that are of great interest to the field of medicine. Indeed, ZnO NPs exhibit a strong preferential ability to kill cancerous T cells <sup>14</sup>, they exert a selective cytotoxic action on rapidly proliferating benign or malignant cells <sup>15,16</sup>, and may be combined with biodegradable chitosan for tumor-targeted drug delivery <sup>17</sup>. They also have promising applications as a nerve guidance channel substrate to promote nervous tissue regeneration <sup>18</sup>. Additionally, ZnO NPs are widely used in textiles <sup>19</sup>, dyes and cosmetics <sup>20</sup>, and are present in sunscreens as a protective ingredient to reflect or to scatter ultraviolet light radiation <sup>21,22</sup>. Consequently, these ubiquitous applications lead to increasing occupational and consumer exposure to ZnO NPs, although the

adverse consequences for human health in general, and for the functioning of the central nervous system (CNS) in particular, remain poorly documented.

Recently, a number of experimental studies have reported that ZnO NPs can cross the blood-brain barrier<sup>23</sup> and, therefore, have the potential ability to reach the CNS where neurotoxic effects could develop. For example, in cell cultures, exposure of human neuronal<sup>24</sup> and astrocyte-like<sup>25</sup> cells to ZnO NPs has been found to induce a dose-dependent decrease in cell survival through genotoxic effects (DNA damage) and apoptosis. Similarly, when mouse neural stem cells were treated with ZnO NPs, an increasing number of apoptotic and necrosis cells has been observed<sup>26</sup>. Moreover, after a 3 week chronic exposure to ZnO NPs, an increased brain oxidative stress has been detected in mice, with this effect being considered as the main mechanism involved in NP-induced toxic manifestations<sup>27</sup>. It is also noteworthy that ZnO NPs may interact with diverse cerebral proteins and alter their biological functions<sup>28</sup>. Recently, studies conducted on hippocampal neurons have demonstrated that ZnO NPs alter the activity of various voltage-gated ion channels (for review see<sup>29</sup>), contributing to significant alterations in the peak amplitude of action potentials and in cell excitability<sup>30</sup>. Consequently, and as observed in ZnO NP-treated rats, an alteration in synaptic plasticity occurs and participates in the attenuation of spatial learning and memory capability<sup>31</sup>. However to date, there is still a lack of information concerning the effects of these NPs on the activity of an entire neural network engaged in a vital motor function such as respiration.

The overall aim of the present study was therefore to determine the effects of an acute exposure to ZnO NPs on the bioelectrical activity of neurons belonging to the respiratory centers that control rhythmic diaphragm muscle contraction in mammals. Using an *ex vivo* isolated brainstem–spinal cord and brainstem slice preparations from neonatal rat, we report for the first time deleterious and neurotoxic influences of ZnO NPs on the operation of the central respiratory network, leading to an abrupt and definitive arrest of respiratory-related activity.

## Results

*Ex vivo* preparations from the neonatal rodent (Fig. 1A), such as the isolated brainstem-spinal cord<sup>32</sup> (Fig. 1B) and medullary slice<sup>33</sup> (Fig. 6A) are powerful experimental models for studying the operation of the mammalian respiratory neural network using both electrophysiological and pharmacological tools. A key feature of such preparations is that respiratory-related motor activity continues to be spontaneously generated and can be recorded from identified spinal and medullary motor roots (or nerves) and individual neurons engaged in the actual rhythm and motor pattern generation. Thus, isolated brainstem-spinal cord and slice preparations offer the valuable opportunity to directly assess the toxicity or innocuousness of drugs, neuroactive substances and materials (including nanoparticles) on the respiratory neural network.

### **Cranial and spinal respiratory-related activities**

Under control conditions, respiratory-related motor activity generated by the isolated brainstem-spinal cord preparation (Fig. 1B,C) consists of spontaneous episodes of rhythmic impulse bursting occurring in cranial (hypoglossal, XII) nerves and spinal (cervical C4, lumbar L2) ventral roots (Fig. 1D1). Similar to respiratory activity expressed in freely moving animals, cranial/cervical inspiratory- and lumbar expiratory-related burst activities are generated in alternation during fictive respiration (Fig. 1D2). In functional terms, it is considered that inspiration and expiration result from a coupling between two anatomically separate rhythm generators located in the medulla oblongata, namely the pre-Bötzinger complex (for inspiratory phase) and the parafacial respiratory group (for expiration,<sup>34</sup>). However, contrary to the situation *in vivo*, the mean respiratory burst frequency produced during the first 6 hours of recording *in vitro* is generally low ( $2.5 \pm 0.2$  burst/min; n=7 preparations; Fig. 1E,F). Ultimately, a permanent cessation of respiratory-related activities occurs after a mean time interval of  $9\text{h}48\text{min} \pm 47\text{min}$  (n=7 preparations; Fig. 1G). In control experimental conditions, therefore, the isolated brainstem-spinal cord preparation is capable of producing spontaneous episodes of fictive respiration, which although slower than actual respiratory movements *in vivo*, is robustly expressed for several hours as rhythmic inspiratory and expiratory motor output bursting along the brainstem and the spinal cord.

### **Characterization of zinc oxide nanoparticles**

The characterization of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) by transmission electron microscopy was first conducted to assess their shape and size. Transmission electron microscopy showed that the ZnO NPs are almost spherical in form (Fig. 2A, inset) and that aggregations could occur. The distribution of individual particle size displayed a narrow range from 6 to 89 nm (Fig. 2A), with an average of  $34 \pm 2$  nm, which was in accordance with the manufacturer's claimed size ( $\leq 40$  nm).

### **Zn<sup>2+</sup> ion release from nanoparticles**

The possible chemical decomposition of ZnO NPs could contribute to increasing the free Zn<sup>2+</sup> ion concentration in the saline medium used in our experiments to bathe the *ex vivo* preparations. To test this possibility, we used flame atomic absorption spectrometry to determine Zn<sup>2+</sup> ion content in the liquid supernatant fraction of centrifuged saline samples (see Methods). A dose-dependent increase in Zn<sup>2+</sup> was detected in oxygenated saline containing between 1 and 50  $\mu\text{g/mL}$  ZnO NPs (Fig. 2B), with Zn<sup>2+</sup> concentrations ranging from 0.5 to 2.1  $\mu\text{g/mL}$  (i.e., from 8 and 32  $\mu\text{M}$ ; Fig. 2C), respectively. However, despite this clear positive correlation - the higher the ZnO NP quantity, the higher the dissolved Zn<sup>2+</sup> content - the concentration ratio Zn<sup>2+</sup>/ZnO NP decreased as ZnO NP content increased, to stabilize at around 4% (Fig. 2D). These data thus show that in our experimental conditions, only a very limited fraction of suspension ZnO NPs decomposes to zinc ions.

### **Effects of ZnO NPs on central respiratory activity**

To assess the global effects of ZnO NPs on central respiratory-related activity, ZnO NPs (1-50  $\mu\text{g/mL}$ ) were applied by bath superfusion to whole brainstem-spinal cord preparations. In comparison to control saline conditions (Fig. 3A1), the presence of ZnO NPs had multiple effects on C4 ventral root respiratory output. After a 30 min period of acute ZnO NP exposure (10  $\mu\text{g/mL}$ ), the frequency of spontaneous respiratory-related bursting increased significantly by  $70 \pm 17$  % ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 3A2). This excitatory effect on the ongoing respiratory rhythm persisted for 3-4 hours following the onset of NP exposure (Fig. 3A2,B), and significantly, was most pronounced in preparations initially showing a slow spontaneous respiratory rhythm (Fig. 4A,C) compared to those expressing a faster control activity (Fig. 4B,C). Secondly, ZnO NP application drastically and significantly reduced the average

viability of brainstem-spinal cord preparations (Fig. 3A2 (lower trace) and 3B). This premature and definitive cessation of respiratory-related activity occurred in a dose-dependent manner (Fig. 3C; estimate  $EC_{50} \approx 2 \mu\text{g/mL}$ ) with, for example, rhythm termination occurring significantly earlier in the ZnO NP-exposed ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) group ( $4\text{h}30 \pm 4\text{min}$ ,  $n=8$ ) than in the non-exposed group ( $9\text{h}48 \pm 47\text{min}$ ,  $n=7$ ;  $p<0.05$ ). Here, it is also important to note that this ZnO NP-induced reduction in preparation longevity was unrelated either to the initial control respiratory frequency (Fig. 4D) or to the extent of ZnO NP-induced respiratory rhythm variation (Fig. 4E). Taken together, therefore, these results show that in the neonatal rat, an acute exposure of the isolated brainstem-spinal cord to ZnO NPs can modulate and then severely disrupt the operation of central neural network engaged in respiratory rhythm generation.

We next asked whether the influence of ZnO NPs on respiratory activity resulted from a generalized effect on central nervous tissue or resulted from a preferential action on medullary neurons responsible for actual respiratory rhythm generation. To address this question, isolated brainstem-spinal cord preparations were partitioned with a single Vaseline barrier placed at the cervico-medullary junction to allow differential perfusion of the brainstem (containing the respiratory rhythm generating networks<sup>35</sup>) and the spinal cord (where downstream inspiratory and expiratory motoneurons are located<sup>36</sup>). Of 21 preparations used in this series of experiments, 7 preparations were bathed with normal artificial cerebrospinal fluid (aCSF, control conditions) and 14 for which ZnO NPs ( $EC_{50}$ ,  $2 \mu\text{g/mL}$ ) were applied either to the spinal cord ( $n=7$ ) or the brainstem ( $n=7$ ; Fig. 5A1). As previously mentioned, in control conditions brainstem-spinal cord preparations continuously superfused with a NP-free saline generated spontaneous respiratory-like activity for several hours (mean duration,  $9\text{h}48 \pm 47\text{min}$ ,  $n=7$ ; Fig. 5A2). When ZnO NPs were applied selectively to the spinal cord while the brainstem remained under normal saline, no significant changes in either respiratory frequency or preparation viability (Fig. 5A2) were detected. In contrast, in a corollary experiment in which ZnO NPs were now selectively applied to the brainstem, an increase in respiratory burst frequency occurred, which again was significantly higher in preparations initially expressing a slower respiratory rhythm ( $57 \pm 4\%$ ,  $n=3$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 5B1,B3), as compared to those generating a fast spontaneous rhythm (Fig. 5B2,B3). Importantly

also, a permanent cessation of bursting activity occurred significantly earlier ( $5\text{h}36 \pm 6\text{min}$ ,  $n=7$ ;  $p<0.05$ ) when ZnO NPs were applied to the brainstem only (Fig. 5A2). Taken together, therefore, these findings indicate that in the neonatal rat, neural components of the medullary respiratory centers are more sensitive (and therefore more vulnerable) to ZnO NPs than spinal neurons involved in driving respiratory muscle contractions.

### **ZnO NPs act directly on the pre-Bötzinger Complex inspiratory neurons**

To further investigate the mechanisms underlying ZnO NPs effects on the respiratory neural network, a series of experiments was conducted using transverse medullary slice preparations containing the central circuit kernel for rhythm generation. It is now widely accepted that in neonatal rodents, the inspiratory phase of rhythmic lung ventilation is generated by a network of neurons located in the pre-Bötzinger complex (preBötC) within the medulla oblongata's ventral respiratory group<sup>35,37</sup> (Fig. 6A, top). Located ventral to nucleus ambiguus motor neurons identifiable by their immunoreactivity to choline acetyltransferase (ChAT ; Fig. 6B), the preBötC network can be defined anatomically by a high expression of neurokinin 1 receptors (NK1R; Fig. 6B), as previously described<sup>38-40</sup>. Using these landmarks stainings, we then conducted experiments combining direct electrophysiological recording of preBötC activity and subsequent applications of ZnO NPs. When slices were continuously bathed with normal aCSF, macroelectrode extracellular recordings of the preBötC showed spontaneous rhythmic bursts of circuit activity (Fig. 6A, bottom) that resembled patterns of fictive inspiration recorded in brainstem-spinal cord preparations (see Fig. 1). After an initial period of higher frequency bursting ( $5.92 \pm 0.5$  burst/min;  $n=8$  slice preparations; Fig. 6C), the inspiratory rhythm slowed to a stable plateau after 2 hr with a mean frequency of  $2.5 \pm 0.75$  burst/min ( $n=8$ ). As already observed in brainstem-spinal cord preparations, a definitive cessation of respiratory-related activities occurred after a mean interval of  $16\text{h}44\text{min} \pm 40$  min ( $n=8$ ; Fig. 6D). These data therefore confirmed that in reduced slice preparations, a limited region of the ventrolateral medulla, the so-called preBötC, contains neurons capable of generating a spontaneous respiratory-related burst rhythm for many hours in an isolated nervous system.

On this basis, therefore, transverse medullary slice preparations offer the unique opportunity to assess the direct effects of acute exposure to ZnO NPs on the

operation of the mammalian respiratory center. Similar to previous observations in brainstem-spinal cord preparations, ZnO NPs have multiple effects on preBötC activity when applied by bath superfusion to medullary slices. After 3 hr of exposure, ZnO NPs (2 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) caused a significant and dose-dependent acceleration of respiratory burst frequency to respectively  $5.39 \pm 0.52$  ( $n=9$ ;  $p<0.05$ ) and  $7.89 \pm 1.39$  bursts/min ( $n=8$ ;  $p<0.05$ ) compared to the non-exposed group ( $2.65 \pm 0.28$  bursts/min;  $n=8$ ) (Fig. 6E). Following this initial excitatory effect, ZnO NPs drastically and significantly reduced the average longevity of medullary slice preparations (Fig. 6F). Here again, a premature and definitive termination of preBötC respiratory-related rhythmic activity occurred in a dose-dependent manner earlier in ZnO NP-exposed groups (2 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , after respectively  $12\text{h}10 \pm 18\text{min}$  ( $n=9$ ) and  $9\text{h}24 \pm 12\text{min}$  ( $n=8$ );  $p<0.05$  in both cases) than in non-exposed group ( $16\text{h}44 \pm 40\text{min}$ ,  $n=8$ ; Fig. 6F). Because slice preparations contain the preBötC network in isolation from its main known modulatory circuits, these observed effects support the conclusion that ZnO NPs act directly on preBötC circuit neurons to produce deleterious effects on the central neural production of respiratory activity.

To further investigate the ZnO NPs-induced neurotoxic effects on respiratory centers, a final series of experiments was conducted using whole-cell patch-clamp recordings from individual preBötC neurons ( $n=10$ ). These cells are directly accessible at the cut surface of slice preparations and, as mentioned above, are located ventral to the nucleus ambiguus (identified by its immunoreactivity for ChAT) and most of themselves are immunoreactive for NK1R (Fig. 7A). Under normal conditions, preBötC neurons which displayed spontaneous, large rhythmic membrane depolarizations (mean synaptic drive potential,  $12.1 \pm 1.7\text{mV}$ ;  $n=6$ ) with associated spiking occurring in phase with inspiratory-related preBötC network activity were unambiguously classified as inspiratory-modulated cells (Fig. 7B, upper traces), whereas the remaining 4 recorded preBötC neurons with flat resting membrane potentials were categorized as non-respiratory. To explore the responses of these two types of preBötC neurons to an acute exposure to ZnO NPs, the latter were bath-applied to the whole medullary slices at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 7B, lower traces). After 90 min NP application, the preBötC inspiratory neurons displayed a significant sustained depolarization of  $12.8 \pm 4.9\text{mV}$  ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ; Fig. 7C, red dots), whereas the resting membrane potential of preBötC non-respiratory

neurons remained unaffected ( $-49.9 \pm 2.8\text{mV}$  (control) vs  $-47.8 \pm 5.1\text{mV}$  (ZnO NPs);  $n=4$ ;  $p=0.725$ ; Fig. 7C, black dots). The patterns of repetitive firing of these neurons were then examined by depolarizing current pulse injection (500ms; 10pA) from resting membrane potential (in control and ZnO NP conditions). In control conditions, the positive current step was adjusted to evoke action potential discharge during the silent "expiratory" phase of the ongoing rhythmic synaptic drive (Fig. 7D, left). In the presence of ZnO NPs, the number of spikes produced remained unchanged compared to control conditions ( $p=0.444$ ; Fig. 7D, right), indicating a lack of variation in cell intrinsic excitability. After a 2 hours exposure to ZnO NPs, the mean amplitude of the inspiratory synaptic drive diminished significantly from  $12.1 \pm 1.7\text{mV}$  ( $n=6$ ) to  $4.7 \pm 1.8\text{mV}$  ( $p<0.05$ ; Fig. 7E), commensurate with a gradual depression of inspiratory synaptic current and a resultant failure of action potential generation (see Fig. 7B, lower traces). In a final step, action potential properties were examined by comparing their amplitude, maximal peak value and duration in control conditions and during exposure to ZnO NPs (see Table 1). Amplitudes and maximal peak values of evoked action potentials were significantly decreased in the presence of 10  $\mu\text{g/mL}$  ZnO NPs in both respiratory (Fig. 7D,F) and non-respiratory preBötC neurons ( $p<0.05$ ), and although not statistically significant, a trend towards an increase in spike duration was also observed ( $p=0.194$ ).

## **Discussion**

The results described in this study provide evidence indicating that in the neonate, an acute exposure to ZnO NPs can modulate then disrupt the respiratory network activity. During NPs application, the preBötC inspiratory-modulated cells are tonically depolarized and show a severe depression of inspiratory synaptic drive that could be part of neurogenic mechanisms responsible for deleterious effects of ZnO NPs on the central respiratory centers of newborn animals.

### ***Ex vivo* isolated preparations: a spontaneous respiratory-related motor activity**

The respiratory nature of the cyclic bursting activity, so-called “fictive respiration” due to the absence of the effector muscles, has long been convincingly demonstrated<sup>41,42</sup>. Motor bursts recorded from a C4 phrenic ventral root (which normally control rhythmic diaphragm contractions) and XII nerves (controlling tongue movements and participating to upper airway patency) are generated in synchrony (see Fig. 1) and are considered to closely reflect the inspiratory phase of respiration<sup>42,43</sup> generated by a network of medullary neurons located in the pre-Bötzinger complex<sup>35,39,44</sup>. Motor activities recorded from L2 ventral root (which partly carry axons of abdominal motoneurons) correspond to the expiratory phase<sup>45</sup> generated by medullary neurons belonging to the so-called parafacial respiratory group<sup>36,46</sup>. The slow spontaneous respiratory-related rhythm observed in our study is due to a combination of experimental factors such as the relatively low bath temperature<sup>47</sup>, the use of a bathing saline solution containing a low K<sup>+</sup>/high Ca<sup>2+</sup> concentration that reduces neuronal excitability<sup>46,48</sup>, the absence of inputs from higher brain regions and afferent feedback particularly resulting from the bi-vagotomy<sup>49</sup>, and finally, the presence of the pons (especially A5 adrenergic nuclei) that depresses activity of the respiratory rhythm generator<sup>50</sup>. An initial phase of stable activity is then followed by a continuous decrease in rhythm frequency, due in part to the progressive establishment of PO<sub>2</sub>, K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> gradients within the superfused tissue<sup>51,52</sup>.

### **Nanoparticles and central nervous system**

One of the important questions when considering the effects of nanoparticles on the CNS is whether they can reach the brain. It has been reported that various inhaled engineered NPs can contact the CNS by crossing the epithelial barrier along the respiratory tract and olfactory and sensory (trigeminal and vagal) neural pathways

<sup>53,54</sup>. It is also widely accepted that the rate and extent of this translocation is strongly dependent on several factors, including particle size. For example, it is known that smaller sized NPs (20-30 nm) induce a profound blood-brain barrier breakdown in rats <sup>55</sup>. Furthermore, previous studies on rodents with various nano-sized metal particles (carbon <sup>2</sup>, manganese oxide <sup>3</sup>, gold <sup>56</sup>, titanium dioxide <sup>57</sup>, zinc oxide <sup>4,58</sup>) showed that nanomaterial translocation from the respiratory tract to secondary organs such as the brain was clearly evident when particle size ranged from 30 to 100 nm. On this basis, therefore, it can be reasonably assumed that under conditions of chronic exposure by inhalation, the ZnO NPs used in our study are likely to reach the brain.

With regard to an impact on the nervous system, compelling data have already shown that neurons exposed to nanomaterials display cellular damage that in turn could affect cerebral functions. For instance, nano-copper oxide <sup>59</sup>, silicon dioxide <sup>60</sup> and ZnO NPs <sup>31</sup> have been found to induce changes in hippocampal long-term potentiation in exposed rats, associated with a significant reduction in learning and memory capabilities through alterations in synaptic plasticity. Similarly, nano-manganese dioxide causes dopaminergic neuronal dysfunction in treated rats, leading to an alteration in spatial learning capability <sup>61</sup>. To date, our study is the first to report a severe impairment in a vital motor function following an acute exposure to metal NPs.

### **Free Zn<sup>2+</sup> ions released from the ZnO NPs: responsible for respiratory effects?**

Although only a small proportion of ZnO NPs used in our experiments decomposes to zinc ions, Zn<sup>2+</sup> is known to be implicated in the pathophysiology of acute brain damage and degenerative brain diseases (for review see <sup>62</sup>) and that excess free Zn<sup>2+</sup> in body tissue is toxic <sup>63</sup>. The possibility that a toxic effect of ZnO NPs on respiratory neurons could derive, at least in part, from the production of dissolved Zn<sup>2+</sup> in the bathing saline medium, as previously shown in mouse neural stem cells <sup>26</sup>, cannot be completely excluded. However to our knowledge, Zn<sup>2+</sup>-induced cytotoxicity has been reported only for ion concentrations greater than 100 µM. For example, in cortical neurons, exposure to 100 µM Zn<sup>2+</sup> was needed to cause a 50% loss of intracellular ATP <sup>64</sup>, whereas in human neuroblastoma cells, a significant decrease in cell viability was found only at concentrations of Zn<sup>2+</sup> above 600 µM <sup>24</sup>. On the basis of these previous studies and the Zn<sup>2+</sup> concentration measured in our

experiments ( $<15 \mu\text{M}$  for  $\text{EC}_{50, \text{ZnO NP}} = 2 \mu\text{g/mL}$ ; Fig. 2C), we can reasonably conclude that the changes in respiratory activity triggered by exposure to ZnO NPs were unlikely to be due to dissolved zinc ions.

### **ZnO NPs-induced central respiratory disruption: potential cellular mechanisms**

Our results show that ZnO NPs induce an initial acceleration of the respiratory-like rhythm which is maintained during the first hours of particle application until the sudden occurrence of respiratory rhythm cessation. According to previous electrophysiological studies, several NPs (copper oxide<sup>65,66</sup>, silver<sup>67</sup>, gold<sup>68</sup>) modulate the functional properties of voltage-gated ion channels responsible for regulating cellular and neural network excitability. In rat hippocampal neurons, ZnO NPs significantly increase the peak amplitudes of the voltage-gated sodium current, leading to an increase in peak amplitude and in overshoot of action potentials<sup>30</sup>. As a consequence, the repetitive firing rate of hippocampal neurons is enhanced and their excitability in particular is increased. In a similar manner, therefore, it is likely that ZnO NPs are able to transiently augment the respiratory rhythm frequency by causing a transitory increase in excitability of medullary network involved in respiratory rhythmogenesis.

In our experiments, the most striking effect of ZnO NPs was an early and definitive termination of the respiratory rhythm and a resultant drastic reduction in preparation longevity. Although the cellular processes underlying this deleterious effect remain to be identified, already acquired evidence allows a number of predictions to be made. It is widely accepted that the central respiratory drive in mammals is generated and transmitted by medullary interneurons releasing glutamate as an excitatory neurotransmitter, which in turn activates *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA postsynaptic receptors (for review see<sup>69-72</sup>). Since numerous studies have indicated that metal NPs can induce neurotoxicity by interfering with glutamate metabolism and impairing NMDA receptor function<sup>73-75</sup>, it is likely that a reduction in the synthesis/release of glutamate and/or a down-regulation of postsynaptic glutamatergic receptors is at the origin of the ZnO NP-induced impairment and/or interruption of inspiratory synaptic drive transmission within the preBötC neuronal circuitry we observe. Moreover, ZnO NPs are known to induce cytotoxicity leading to a cell viability decrease, overproduction of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in rat retinal ganglion cells<sup>76</sup>, mouse neural stem cells<sup>26</sup>, rat astrocytes<sup>77</sup>

and human neuronal cells <sup>24,25</sup>. Consequently, ZnO NPs could act on neurons engaged in respiratory rhythm generation by increasing the production of ROS, which in turn leads to oxidative stress and cell damage, and ultimately to apoptosis. Thus, it is possible that the respiratory arrest observed under acute exposure to ZnO NPs results from the actual death of neurons belonging to the respiratory rhythm-generating networks. Future experiments will now be required to explore the possibility of a NP-induced apoptosis and cell death of inspiratory neurons.

On the basis of previous studies conducted mainly on the rat hippocampal network and our present *ex vivo* findings, we propose possible subcellular mechanisms and neural substrates for a ZnO NP-induced disruption of central respiratory activity in response to an acute NP exposure in the neonate. As reported in acutely isolated hippocampal CA3 pyramidal neurons in postnatal rats, application of ZnO NPs produces a significant increase in the peak amplitudes of sodium currents by increasing the number of opening sodium channels <sup>30</sup>. In our experiments, such a mechanism could account for the tonic depolarization observed in inspiratory neurons during exposure to ZnO NPs. Interestingly, this effect seems to be specific to this type of cell since the membrane potential of neighboring non-respiratory neurons located in the preBötC remained unchanged in the presence of the nanoparticles. Because respiratory rhythmogenesis and respiratory frequency rely on the presence of preBötC pacemaker neurons with voltage-dependent bursting properties acting in combination with an emergent network property <sup>78-81</sup>, we postulate that the ZnO NP-induced neurons' depolarization is responsible for the acceleration of the ongoing respiratory rhythm that was initially observed after the onset of NP application. Therefore, a possible specific action of NP on pacemaker neurons (in addition to the one observed on the network properties) cannot be totally excluded. It is also possible that the ZnO NP-induced depolarization activated voltage-gated calcium channels which in turn led to calcium influx. The resultant elevated intracellular calcium concentration could participate in further amplifying the initial membrane depolarization, and additionally, trigger a mitochondrial dysfunction at the origin of ROS production that is ultimately responsible for apoptosis, as already reported in rat retinal ganglion cells <sup>76</sup>. Finally, as previously found in murine cultured cortical neurons <sup>82</sup>, an abnormal accumulation of intracellular cation species can

result in neuronal cell damage, which in the case of preBötC inspiratory neurons, may lead to a sudden and irreversible respiratory arrest.

Our results also show that the amplitude and maximal peak values of action potentials are significantly decreased in the presence of ZnO NPs. Here again, these effects argue in favor of a sodium accumulation within the cytoplasmic compartment of preBötC inspiratory neurons. Indeed, an NP-induced enhancement of sodium influx and the resultant increase in intracellular sodium concentration would reduce the sodium electrochemical gradient and thereby decrease the sodium driving force and thus action potential amplitude. As a consequence, a reduction in impulse-evoked calcium influx at the nerve terminal would occur, leading to a decrease in neurotransmitter release. Because the respiratory rhythm and inspiratory patterns emerge in part from the connectivity between glutamatergic excitatory preBötC neuron populations<sup>83</sup>, a gradual reduction in glutamate release would be associated with a continuous depression of the inspiratory synaptic drive potential, eventually resulting in a failure of action potential generation. In the absence of changes in cell excitability observed during exposure to ZnO NPs, this decrease of the inspiratory central command associated with an inability to generate spikes would ultimately be responsible for a cessation of any rhythmic activity by the central respiratory centers.

## **Conclusion**

To date, a number of studies conducted mainly on the rodent hippocampal network has allowed to investigate the effects of diverse nanoparticles (nano-gold<sup>68,84</sup>, nano-silver<sup>67</sup>, nano-titanium dioxide<sup>74</sup>, nano-tungsten carbide<sup>85</sup>, nano-copper oxide<sup>65,66</sup>, nano-zinc oxide<sup>30</sup>) on the bioelectrical properties of individual neurons. However, little is hitherto known about the impact of nanoparticle exposure on the operation of an entire neuronal network capable of generating an organized motor activity involved in the control of a vital function such as respiration. To our knowledge, the present study is the first to report on the possible deleterious effects of an exposure to nanoparticles on the respiratory centers of mammalian neonates. Furthermore, on the basis of a recent investigation addressing the size- and age-dependent neurotoxicity of various metal nanoparticles in rats<sup>55</sup>, it is now established that small-sized nanoparticles (20-30 nm) induce significantly greater neuronal damage than larger ones, and that younger animals are more susceptible to neuronal injury than

older ones. Although not directly addressed in our study, these findings are in line with the idea that the mean size of ZnO NPs used in our experiments ( $\approx 34$  nm) was a key element in the observed central respiratory neurotoxicity. Moreover, the potential vulnerability of the developing central nervous system to nanoparticle toxicity constituted a major motivating factor in pursuing our investigation on the neonate. Future experiments will now be required to precisely identify the subcellular mechanisms (ion channels, intracellular signaling pathways) involved in the ZnO NP neurotoxicity of the central respiratory command and to assess the effects of perinatal exposure to nanoparticles during gestation (materno-fetal transmission) and after birth (chronic exposure).

## **Methods**

### **Rat lines and care**

Newborn (0- to 3-day-old) Sprague-Dawley rats were obtained from females raised in our laboratory's breeding facility. The experiments were conducted in accordance with guidelines of the European Communities Council Directive and the local ethics committee of the University of Bordeaux. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Bordeaux (Permit number: 5012031A).

### **Brainstem-spinal cord preparation**

The procedure for isolating the brainstem-spinal cord preparation has been previously described<sup>32,41,86</sup>. Briefly, neonatal rats (P0-2) were deeply anesthetized with 4% isoflurane for 10 minutes until the loss of reflex responsiveness to tail pinching. Animals were quickly decapitated then placed in dissection chamber filled with an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) at 4°C and containing (in mM): 125 NaCl, 3.35 KCl, 0.58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 1.15 MgCl<sub>2</sub>, 21 NaHCO<sub>3</sub>, 30 D-glucose, buffered to pH 7.4 with NaOH and saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Skin, muscles and vertebrae were removed under a binocular microscope and the brainstem-spinal cord with its ventral and dorsal roots still attached was transferred to a recording chamber. Continuously superfused with oxygenated aCSF at 22-25°C, preparations were then fixed on a Sylgard<sup>®</sup> 184 resin bloc (Dow Corning, US) with the ventral side upward.

### **Medullary slice preparation**

The procedure for obtaining medullary slices containing the pre-Böttinger complex (preBötC) from the brainstem of neonatal rat has been previously described<sup>33</sup>. Briefly, the rhombencephalon was isolated by sectioning its rostral limit and the spinal cord at the upper cervical level. The preparation was then embedded in an agar block, mounted on a vibratome and serially sliced in the transverse plane in a rostral-to-caudal direction until the posterior limit of the facial nucleus and the anterior limit of the nucleus ambiguus were reached. A 550 µm-thick slice was transferred to a recording chamber, continuously superfused with aCSF maintained at 30°C and containing (in mM): 120 NaCl, 8 KCl, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 21 NaHCO<sub>3</sub>, 0.58

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 D-glucose, buffered to pH 7.4 with NaOH and saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

### **Electrophysiological recordings**

Respiratory-related activity in spinal ventral roots and in the brainstem preBötC region was recorded using glass suction electrodes filled with aCSF solution. Signals were amplified (x10,000) by differential AC amplifiers (low cutoff, 100 Hz; high cutoff, 1 kHz; model 1700; A-M Systems), digitized and acquired via a CED 1401 interface, stored on a computer, and analyzed using Spike2 software (Cambridge Electronic Design).

Patch-clamp recordings were made from individual preBötC cells using blind whole-cell current clamp mode. Electrophysiological signals were recorded with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices), a digitizing interface (Digidata 1550A; Molecular Devices), and pCLAMP 10 software (Molecular Devices). Micropipettes (resistance 3.0 to 5.0 MΩ) were pulled with a horizontal puller (P-97 Flaming/Brown; Sutter Instrument) and filled with solution containing (in mM) potassium gluconic acid 140, CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1, EGTA 10, MgCl<sub>2</sub> 2, Na<sub>2</sub>ATP 4, Hepes 10, and 0.1% biocytin, with the pH adjusted to 7.2. Whole-cell recordings with an initial seal resistance of <1 GΩ were discarded. In current-clamp mode, a series of current pulses was used firstly to estimate current-voltage relationship (hyperpolarizing and depolarizing steps, ±10 pA, 100 ms, 1 Hz) for recorded neurons and secondly, to analyze their repetitive firing properties. In patch-clamp experiments, only neurons (i) located in the preBötC, showing (ii) stable resting membrane potentials (< -40 mV) and (iii) spike overshoots, were studied.

### **Nanoparticles characterization and application**

To examine the size and shape of ZnO NPs, transmission electron microscopy (Hitachi H-600) was used.

A stock solution of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs; 0.5 g/mL ; Sigma-Aldrich) was diluted into aCSF to obtain different final concentrations (in µg/mL: 1, 2.5, 10, 25 and 50). A control period of 30 min was observed before adding NPs in order to first record spontaneous respiratory activity in an NP-free condition (see Data analysis). When required, a barrier of syringe-ejected Vaseline (applied at the medullary-spinal level) was used to separate the recording chamber into 2

compartments, allowing differential exposure of the NPs to the brainstem or spinal cord. After each experiment, the watertightness of the compartments was tested by adding methylene blue to one side of the Vaseline bridge. When blue leakage was observed, previously acquired data were systemically discarded.

### **Measurement of Zn<sup>2+</sup> concentration**

To quantify free Zn<sup>2+</sup> ion concentrations potentially released from the ZnO NPs, aCSF (saturated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, and warmed to 30°C) containing different final concentrations of ZnO NPs (1, 2.5, 5, 10, 25 and 50 µg/mL) were collected and centrifuged (10,000 rpm, 15 min). The Zn<sup>2+</sup> content in the supernatant was analyzed by flame atomic absorption spectrometry (ThermoFisher, iCE™ 3300 AAS). The saline medium without ZnO NPs was used as a negative control.

### **Immunohistology**

To locate the preBötC and the recorded neurons in medullary slices, preparations were stained for biocytin (contained in patch electrodes), choline acetyltransferase (which labels motoneurons of the neighboring nucleus ambiguus) and NK1R (a known anatomical marker of preBötC network neurons). Brainstems were fixed by paraformaldehyde immersion (4%, 2h, 4°C), followed by a PBS-sucrose bath (20%, 12h, 4°C) and frozen in isopentane (-43°C). 30 µm-thick slices were then cut on a cryostat, rinsed in PBS (10 min, 3 times), saturated (PBS, triton 0.3%, BSA 1%, 1h30) and incubated overnight at room temperature with primary antibodies: rabbit anti-neurokinin 1 receptor (anti-NK1R, 1:10000, Sigma) and goat anti-choline acetyltransferase (anti-ChAT, 1:100, Millipore) antibodies. Then slices were rinsed (PBS, 15 min 3 times) and incubated 90 min with secondary antibodies: Streptavidin-Fluorescein (Alexa 488, 1:300), donkey anti-rabbit (Alexa 568, 1:500) and donkey anti-goat (Alexa 647, 1:500) antibodies. After a final PBS bath (15 min 3 times), slices were mounted in Vectashield Hard-Set Mounting Medium (Vector) and fluorescence visualized with an Olympus FV5-102 confocal microscope. The images were assembled and corrected with Olympus Fluoview software, Adobe Photoshop and Adobe Illustrator.

### **Data analysis**

The *ex vivo* preparation longevity (i.e. period during which spontaneous respiratory-related activity continued to be generated) and respiratory burst frequency were determined by offline analysis. Statistical analyses were then carried out using SigmaPlot 11.0 (Systat), with values being expressed as mean  $\pm$  SEM. A Student t-test or Mann-Whitey for non-normal distribution were used to compare the means of two groups. To compare more than 2 groups, an ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test, or an ANOVA on ranks (i.e. Kruskal Wallis test) followed by Dunn's post-hoc test were used. Differences were considered statistically different for a P value < 0.05.

## References

- 1 Buzea, C., Pacheco, II & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17-71 (2007).
- 2 Oberdorster, G. *et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation toxicology* **16**, 437-445, doi:10.1080/08958370490439597 (2004).
- 3 Elder, A. *et al.* Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environmental health perspectives* **114**, 1172-1178 (2006).
- 4 Kao, Y. Y. *et al.* Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo. *Journal of molecular neuroscience : MN* **48**, 464-471, doi:10.1007/s12031-012-9756-y (2012).
- 5 Lockman, P. R. *et al.* Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **93**, 271-282 (2003).
- 6 Lockman, P. R., Koziara, J. M., Mumper, R. J. & Allen, D. D. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of drug targeting* **12**, 635-641, doi:10.1080/10611860400015936 (2004).
- 7 Sarkar, A. *et al.* Nanoparticles as a Carrier System for Drug Delivery Across Blood Brain Barrier. *Current drug metabolism* (2017).
- 8 Simko, M. & Mattsson, M. O. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: a critical review. *Particle and fibre toxicology* **7**, 42, doi:10.1186/1743-8977-7-42 (2010).
- 9 Ito, D., Jespersen, M. L. & Hutchison, J. E. Selective growth of vertical ZnO nanowire arrays using chemically anchored gold nanoparticles. *ACS nano* **2**, 2001-2006, doi:10.1021/nn800438m (2008).
- 10 She, J. *et al.* Correlation between resistance and field emission performance of individual ZnO one-dimensional nanostructures. *ACS nano* **2**, 2015-2022, doi:10.1021/nn800283u (2008).
- 11 Wang, Z. L. Splendid one-dimensional nanostructures of zinc oxide: a new nanomaterial family for nanotechnology. *ACS nano* **2**, 1987-1992, doi:10.1021/nn800631r (2008).
- 12 Reddy, K. M. *et al.* Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied physics letters* **90**, 2139021-2139023, doi:10.1063/1.2742324 (2007).
- 13 Tankhiwale, R. & Bajpai, S. K. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **90**, 16-20, doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.031 (2012).
- 14 Hanley, C. *et al.* Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology* **19**, 295103, doi:10.1088/0957-4484/19/29/295103 (2008).
- 15 Taccola, L. *et al.* Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. *International journal of nanomedicine* **6**, 1129-1140, doi:10.2147/IJN.S16581 (2011).
- 16 Akhtar, M. J. *et al.* Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International journal of nanomedicine* **7**, 845-857, doi:10.2147/IJN.S29129 (2012).

- 17 Yuan, Q., Hein, S. & Misra, R. D. New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response. *Acta biomaterialia* **6**, 2732-2739, doi:10.1016/j.actbio.2010.01.025 (2010).
- 18 Seil, J. T. & Webster, T. J. Decreased astroglial cell adhesion and proliferation on zinc oxide nanoparticle polyurethane composites. *International journal of nanomedicine* **3**, 523-531 (2008).
- 19 Yuranova, T., D., L. & Kiwi, J. Synthesis activity and characterization of textiles showing self-cleaning activity under daylight irradiation. *Catal Today* **122**, 109-117 (2007).
- 20 Vaseem, M., Umar, A. & Hahn, Y. B. in *Metal Oxide Nanostructures and Their Applications* Vol. 5 (eds A. Umar & Y. B. Hahn) 1-36 (American Scientific Publishers, 2010).
- 21 Pinnell, S. R., Fairhurst, D., Gillies, R., Mitchnick, M. A. & Kollias, N. Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium dioxide. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* **26**, 309-314 (2000).
- 22 McSweeney, P. C. The safety of nanoparticles in sunscreens: An update for general practice. *Australian family physician* **45**, 397-399 (2016).
- 23 Shim, K. H. *et al.* Assessment of ZnO and SiO<sub>2</sub> nanoparticle permeability through and toxicity to the blood-brain barrier using Evans blue and TEM. *International journal of nanomedicine* **9 Suppl 2**, 225-233, doi:10.2147/IJN.S58205 (2014).
- 24 Valdiglesias, V. *et al.* Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environment international* **55**, 92-100, doi:10.1016/j.envint.2013.02.013 (2013).
- 25 Lai, J. C. *et al.* Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International journal of nanomedicine* **3**, 533-545 (2008).
- 26 Deng, X. *et al.* Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology* **20**, 115101, doi:10.1088/0957-4484/20/11/115101 (2009).
- 27 Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P. & Flora, S. J. Effects of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub>, ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug and chemical toxicology* **37**, 336-347, doi:10.3109/01480545.2013.866134 (2014).
- 28 Shim, K. H., Hulme, J., Maeng, E. H., Kim, M. K. & An, S. S. Analysis of zinc oxide nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate. *International journal of nanomedicine* **9 Suppl 2**, 217-224, doi:10.2147/IJN.S58204 (2014).
- 29 Yang, Z. *et al.* A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal Society, Interface* **7 Suppl 4**, S411-422, doi:10.1098/rsif.2010.0158.focus (2010).
- 30 Zhao, J., Xu, L., Zhang, T., Ren, G. & Yang, Z. Influences of nanoparticle zinc oxide on acutely isolated rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Neurotoxicology* **30**, 220-230, doi:10.1016/j.neuro.2008.12.005 (2009).
- 31 Han, D., Tian, Y., Zhang, T., Ren, G. & Yang, Z. Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in

- hippocampus of Wistar rats. *International journal of nanomedicine* **6**, 1453-1461, doi:10.2147/IJN.S18507 (2011).
- 32 Le Gal, J.-P., Nicolosi, A., Juvin, L. & Morin, D. In vitro brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Bio-protocol* **6**, e2003 (2016).
- 33 Funk, G. D., Smith, J. C. & Feldman, J. L. Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices: role of excitatory amino acids. *Journal of neurophysiology* **70**, 1497-1515 (1993).
- 34 Janczewski, W. A. & Feldman, J. L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *The Journal of physiology* **570**, 407-420, doi:10.1113/jphysiol.2005.098848 (2006).
- 35 Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W. & Feldman, J. L. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726-729 (1991).
- 36 Giraudin, A., Cabirol-Pol, M. J., Simmers, J. & Morin, D. Intercostal and abdominal respiratory motoneurons in the neonatal rat spinal cord: spatiotemporal organization and responses to limb afferent stimulation. *Journal of neurophysiology* **99**, 2626-2640, doi:01298.2007 [pii]10.1152/jn.01298.2007 (2008).
- 37 Rekling, J. C. & Feldman, J. L. PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annual review of physiology* **60**, 385-405, doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.385 (1998).
- 38 Gray, P. A., Rekling, J. C., Bocchiario, C. M. & Feldman, J. L. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* **286**, 1566-1568 (1999).
- 39 Gray, P. A., Janczewski, W. A., Mellen, N., McCrimmon, D. R. & Feldman, J. L. Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nature neuroscience* **4**, 927-930, doi:10.1038/nn0901-927 (2001).
- 40 Thoby-Brisson, M., Trinh, J. B., Champagnat, J. & Fortin, G. Emergence of the pre-Botzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 4307-4318, doi:10.1523/JNEUROSCI.0551-05.2005 (2005).
- 41 Suzue, T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *The Journal of physiology* **354**, 173-183 (1984).
- 42 Smith, J. C. & Feldman, J. L. In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *Journal of neuroscience methods* **21**, 321-333 (1987).
- 43 Morin, D., Bonnot, A., Ballion, B. & Viala, D. alpha1-adrenergic receptor-induced slow rhythmicity in nonrespiratory cervical motoneurons of neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **12**, 2950-2966, doi:ejn154 [pii] (2000).
- 44 Johnson, S. M., Koshiya, N. & Smith, J. C. Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Botzinger complex "island". *Journal of neurophysiology* **85**, 1772-1776 (2001).
- 45 Smith, J. C., Greer, J. J., Liu, G. S. & Feldman, J. L. Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I.

- Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *Journal of neurophysiology* **64**, 1149-1169 (1990).
- 46 Ruangkittisakul, A., Secchia, L., Bornes, T. D., Palathinkal, D. M. & Ballanyi, K. Dependence on extracellular Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> antagonism of inspiratory centre rhythms in slices and en bloc preparations of newborn rat brainstem. *The Journal of physiology* **584**, 489-508, doi:jphysiol.2007.142760 [pii] 10.1113/jphysiol.2007.142760 (2007).
- 47 Murakoshi, T., Suzue, T. & Tamai, S. A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *British journal of pharmacology* **86**, 95-104 (1985).
- 48 Panaitescu, B., Ruangkittisakul, A. & Ballanyi, K. Depression by Ca<sup>2+</sup> and stimulation by K<sup>+</sup> of fictive inspiratory rhythm in newborn rat brainstem slices. *Advances in experimental medicine and biology* **669**, 91-95, doi:10.1007/978-1-4419-5692-7\_19 (2010).
- 49 Cohen, M. I. Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiological reviews* **59**, 1105-1173 (1979).
- 50 Hilaire, G., Monteau, R. & Errchidi, S. Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. *Brain research* **485**, 325-332 (1989).
- 51 Brockhaus, J., Ballanyi, K., Smith, J. C. & Richter, D. W. Microenvironment of respiratory neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats. *The Journal of physiology* **462**, 421-445 (1993).
- 52 Okada, Y., Muckenhoff, K., Holtermann, G., Acker, H. & Scheid, P. Depth profiles of pH and PO<sub>2</sub> in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respiration physiology* **93**, 315-326 (1993).
- 53 Kreyling, W. G. Discovery of unique and ENM- specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicology and applied pharmacology* **299**, 41-46, doi:10.1016/j.taap.2016.02.004 (2016).
- 54 Oberdorster, G., Elder, A. & Rinderknecht, A. Nanoparticles and the brain: cause for concern? *Journal of nanoscience and nanotechnology* **9**, 4996-5007 (2009).
- 55 Sharma, A., Muresanu, D. F., Patnaik, R. & Sharma, H. S. Size- and age-dependent neurotoxicity of engineered metal nanoparticles in rats. *Molecular neurobiology* **48**, 386-396, doi:10.1007/s12035-013-8500-0 (2013).
- 56 Yu, L. E. *et al.* Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology* **1**, 235-242 (2007).
- 57 Wang, J. *et al.* Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology* **254**, 82-90, doi:10.1016/j.tox.2008.09.014 (2008).
- 58 Cho, W. S. *et al.* Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and fibre toxicology* **10**, 9, doi:10.1186/1743-8977-10-9 (2013).
- 59 An, L., Liu, S., Yang, Z. & Zhang, T. Cognitive impairment in rats induced by nano-CuO and its possible mechanisms. *Toxicology letters* **213**, 220-227, doi:10.1016/j.toxlet.2012.07.007 (2012).

- 60 Sun, H. R. *et al.* Effect of nano-SiO<sub>2</sub> exposure on spatial learning and memory and LTP of hippocampal dentate gyrus in rats. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology* **32**, 78-81 (2016).
- 61 Li, T. *et al.* Effects of Nano-MnO<sub>2</sub> on dopaminergic neurons and the spatial learning capability of rats. *International journal of environmental research and public health* **11**, 7918-7930, doi:10.3390/ijerph110807918 (2014).
- 62 Frederickson, C. J., Koh, J. Y. & Bush, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 449-462, doi:10.1038/nrn1671 (2005).
- 63 Choi, D. W. & Koh, J. Y. Zinc and brain injury. *Annual review of neuroscience* **21**, 347-375, doi:10.1146/annurev.neuro.21.1.347 (1998).
- 64 Marin, P., Israel, M., Glowinski, J. & Premont, J. Routes of zinc entry in mouse cortical neurons: role in zinc-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* **12**, 8-18 (2000).
- 65 Xu, L. J., Zhao, J. X., Zhang, T., Ren, G. G. & Yang, Z. In vitro study on influence of nano particles of CuO on CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus potassium currents. *Environmental toxicology* **24**, 211-217, doi:10.1002/tox.20418 (2009).
- 66 Liu, Z., Liu, S., Ren, G., Zhang, T. & Yang, Z. Nano-CuO inhibited voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons via reactive oxygen species but independent from G-proteins pathway. *Journal of applied toxicology : JAT* **31**, 439-445, doi:10.1002/jat.1611 (2011).
- 67 Liu, Z., Ren, G., Zhang, T. & Yang, Z. Action potential changes associated with the inhibitory effects on voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons by silver nanoparticles. *Toxicology* **264**, 179-184, doi:10.1016/j.tox.2009.08.005 (2009).
- 68 Jung, S. *et al.* Intracellular gold nanoparticles increase neuronal excitability and aggravate seizure activity in the mouse brain. *PloS one* **9**, e91360, doi:10.1371/journal.pone.0091360 (2014).
- 69 Ballanyi, K., Onimaru, H. & Homma, I. Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Progress in neurobiology* **59**, 583-634 (1999).
- 70 Greer, J. J. Control of breathing activity in the fetus and newborn. *Comprehensive Physiology* **2**, 1873-1888, doi:10.1002/cphy.c110006 (2012).
- 71 Smith, J. C., Abdala, A. P., Borgmann, A., Rybak, I. A. & Paton, J. F. Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends in neurosciences* **36**, 152-162, doi:10.1016/j.tins.2012.11.004 (2013).
- 72 Feldman, J. L., Del Negro, C. A. & Gray, P. A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annual review of physiology* **75**, 423-452, doi:10.1146/annurev-physiol-040510-130049 (2013).
- 73 Ma, L. *et al.* Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials* **31**, 99-105, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.028 (2010).
- 74 Hong, F. *et al.* Suppression of neurite outgrowth of primary cultured hippocampal neurons is involved in impairment of glutamate metabolism and NMDA receptor function caused by nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials* **53**, 76-85, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.067 (2015).

- 75 Begum, A. N., Aguilar, J. S., Elias, L. & Hong, Y. Silver nanoparticles exhibit coating and dose-dependent neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells. *Neurotoxicology* **57**, 45-53, doi:10.1016/j.neuro.2016.08.015 (2016).
- 76 Guo, D., Bi, H., Wang, D. & Wu, Q. Zinc oxide nanoparticles decrease the expression and activity of plasma membrane calcium ATPase, disrupt the intracellular calcium homeostasis in rat retinal ganglion cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 1849-1859, doi:10.1016/j.biocel.2013.06.002 (2013).
- 77 Sruthi, S. & Mohanan, P. V. Investigation on cellular interactions of astrocytes with zinc oxide nanoparticles using rat C6 cell lines. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **133**, 1-11, doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.041 (2015).
- 78 Thoby-Brisson, M. & Ramirez, J. M. Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *Journal of neurophysiology* **86**, 104-112 (2001).
- 79 Pena, F., Parkis, M. A., Tryba, A. K. & Ramirez, J. M. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* **43**, 105-117, doi:10.1016/j.neuron.2004.06.023 (2004).
- 80 Chevalier, M., Toporikova, N., Simmers, J. & Thoby-Brisson, M. Development of pacemaker properties and rhythmogenic mechanisms in the mouse embryonic respiratory network. *eLife* **5**, doi:10.7554/eLife.16125 (2016).
- 81 Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. & Feldman, J. L. Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron* **34**, 821-830 (2002).
- 82 Lynch, J. J., 3rd, Yu, S. P., Canzoniero, L. M., Sensi, S. L. & Choi, D. W. Sodium channel blockers reduce oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal injury when combined with glutamate receptor antagonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **273**, 554-560 (1995).
- 83 Smith, J. C., Abdala, A. P., Rybak, I. A. & Paton, J. F. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **364**, 2577-2587, doi:10.1098/rstb.2009.0081 (2009).
- 84 Salinas, K., Kereselidze, Z., DeLuna, F., Peralta, X. G. & Santamaria, F. Transient extracellular application of gold nanostars increases hippocampal neuronal activity. *Journal of nanobiotechnology* **12**, 31, doi:10.1186/s12951-014-0031-y (2014).
- 85 Shan, D., Xie, Y., Ren, G. & Yang, Z. Inhibitory effect of tungsten carbide nanoparticles on voltage-gated potassium currents of hippocampal CA1 neurons. *Toxicology letters* **209**, 129-135, doi:10.1016/j.toxlet.2011.12.001 (2012).
- 86 Morin, D. Compared effects of serotonin on the inspiratory activity of glossopharyngeal, vagal, hypoglossal and cervical motoneurons in neonatal rat brain stem-spinal cord preparations. *Neuroscience letters* **160**, 61-64 (1993).

**Acknowledgements**

This work was supported by grants from the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (2013/1/116), and from the "Fondation du Souffle et du Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire". Angelo Nicolosi was supported by a doctoral studentship from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". The authors thank J. Simmers for valuable comments on the manuscript and for English revision.

**Authors' contributions**

DM and LJ designed research; expertises of CJ and MTB in their research field contributed to design experiments; AN, LC and PP performed research; AN analysed data; DM and AN wrote the paper; all authors read and approved the final manuscript.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## Table

**Table 1** Effects of ZnO NPs on action potential properties of preBötC neurons.

<b>preBötC neurons</b>	<b>Experimental condition</b>	<b>Amplitude (mV)</b>	<b>Maximal peak value (mV)</b>	<b>Duration (ms)</b>
<b>Respiratory (n=6)</b>	Control	59.5 ± 5.6	9.5 ± 5.3	2.3 ± 0.4
	ZnO NPs	47.4 ± 6.1	-1.4 ± 5.7	3.5 ± 1.6
<b>Non-Resp. (n=4)</b>	Control	59.3 ± 3.5	11.0 ± 0.6	2.7 ± 0.3
	ZnO NPs	34.5 ± 6.4	-8.8 ± 3.5	5.4 ± 1.7
<b><i>p</i></b>		0.024 *	0.025 *	0.194

Action potential duration was measured at 25% amplitude.

## Figure legends

**Figure 1.** *Ex vivo* newborn rat preparation used to study ZnO NP neurotoxicity. **(A)** Schematic drawing of a neonate's central nervous system (brainstem-spinal cord) and **(B)** image showing the isolated brainstem-spinal cord in the recording chamber. **(C)** Schematic of isolated brainstem-spinal cord with extracellular recording locations from the hypoglossal nerve (XII), and cervical (C4) and lumbar (L2) ventral roots. **(D1)** Simultaneous multi-site recordings of raw spontaneous respiratory-related bursting in the cranial nerve (XII) and spinal ventral roots (C4, L2). Traces at right are expanded **(D2)** to show the clear alternation between spontaneous inspiratory (insp.; XII and C4) and expiratory (exp.; L2) bursts. Note that in control conditions (i.e., when preparations were bathed in normal aCSF), spontaneous respiratory-related activity can be recorded for several hours before an activity arrest occurs **(E)**. **(F)** Histograms showing the variability in spontaneous respiratory burst frequency over time under control saline conditions. Vertical bars indicate mean values, vertical lines indicate the SEM (n=7 preparations). **(G)** Bar chart showing the durations over which individual preparations expressed rhythmic respiratory related activity. The red dotted line indicates the mean viability value. aCSF, artificial cerebrospinal fluid.

**Figure 2.** Characterization of ZnO NPs and quantification of free Zn<sup>2+</sup> ion concentrations. **(A)** Size distribution of ZnO NPs and transmission electron microscopy image of nano-scaled ZnO (inset). **(B)** Bar chart showing ZnO NP concentrations and corresponding decompositions into Zn<sup>2+</sup> ions. **(C)** Bar chart illustrating Zn<sup>2+</sup> concentrations. Vertical bars indicate mean values, vertical lines indicate the SEM. **(D)** Scatter plot showing the relationship between Zn<sup>2+</sup>/ZnO NP ratio and ZnO NP concentration.

**Figure 3.** Effects of acute exposure to ZnO NPs on respiratory-related burst activity. **(A1, A2)** Schematics of the experimental procedure (*left*) and raw spontaneous inspiratory-like burst activity recorded from a cervical (C4) ventral root (*right*) in control conditions **(A1)** and during ZnO NP application at different indicated times **(A2)**. **(B)** Histograms showing variation in the spontaneous respiratory burst frequency (mean ± SEM) over time under control saline conditions (open bar) and during exposure to ZnO NPs (purple bars, n=8 preparations). **(C)** Bar chart illustrating the dose-dependent effect of ZnO NPs on preparation respiratory longevity. Vertical

bars indicate mean values, vertical lines indicate the SEM. Numbers of measured preparations are indicated in parentheses. \*  $p < 0.05$ ; aCSF, artificial cerebrospinal fluid.

**Figure 4.** Magnitude of the ZnO NP-induced increase in respiratory burst frequency is correlated to initial control rhythm frequency. **(A, B)** Raw extracellular burst activity recorded from a C4 ventral root in isolated preparations generating a slow **(A)** or fast **(B)** initial respiratory rhythm under control conditions (upper traces) and after 2 hours of ZnO NP application (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **(C)** Scatter plot showing relationship between ZnO NP-induced changes in respiratory frequency and that of the initial control rhythm ( $n=39$  preparations).  $R^2$ , coefficient of determination. **(D, E)** Scatter plots showing that preparation viability is uncorrelated either with the initial respiratory frequency **(D)** or with subsequent ZnO NP-induced changes in rhythm frequency **(E)**.

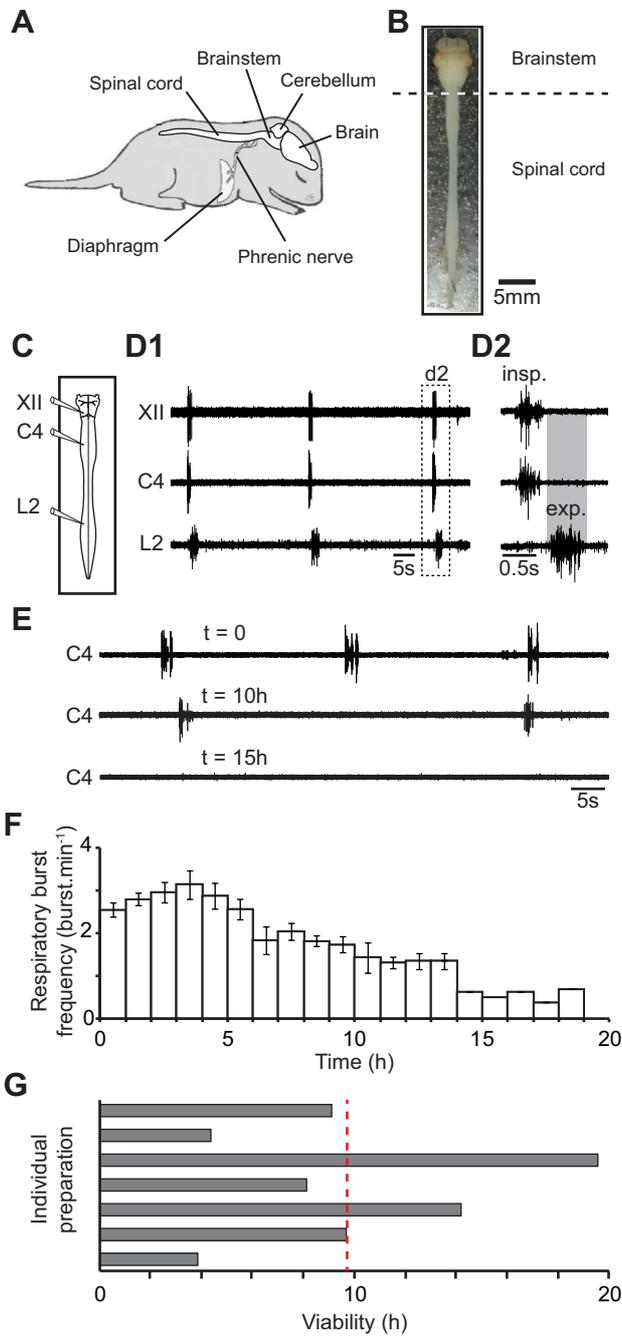
**Figure 5.** Brainstem structures are responsible for both the accelerated respiratory burst frequency and the drastic reduction in preparation longevity induced by an acute exposure to ZnO NPs. **(A1)** Schematics of the experimental procedures using a Vaseline barrier to separate the spinal cord from the brainstem in isolated CNS preparations. **(A2)** Bar chart measuring viability of preparations bathed with normal aCSF (open bar) or with ZnO NPs (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) applied selectively to either the spinal cord (left purple bar) or on the brainstem (right purple bar). Vertical bars indicate mean values, vertical lines indicate the SEM. Numbers of measured preparations are indicated in parentheses. \*  $p < 0.05$ . **(B1, B2)** Raw extracellular recordings of burst activity in cervical (C4) ventral root in preparations generating a slow **(B1)** or fast **(B2)** initial respiratory rhythm under control conditions (upper traces) and after 2 hr of ZnO NP application (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the brainstem. **(B3)** Scatter plot (left) showing relationship between ZnO NP-induced changes in respiratory burst frequency and the initial control frequency of isolated preparations ( $n=7$ ) under the experimental condition schematized at right.  $R^2$ , coefficient of determination; aCSF, artificial cerebrospinal fluid.

**Figure 6.** Effects of ZnO NPs on respiratory-related burst activity generated by the pre-Bötzinger Complex (preBötC) network in medullary slices from neonatal rats. **(A)** *top*, Photomicrograph of a transverse medullary slice through the preBötC from a 2 day-old rat. The inset (white rectangle) delimits the ventrolateral aspect of the

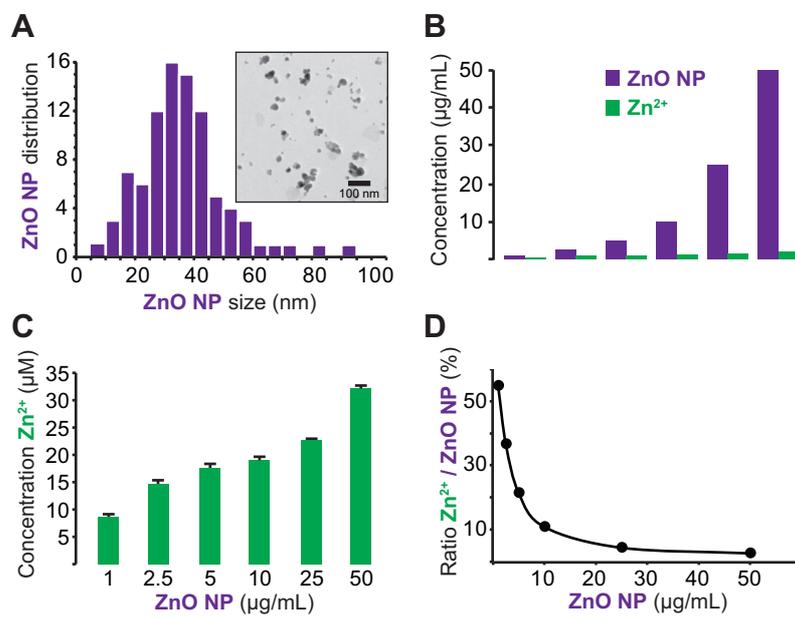
medullary slice shown at higher magnification in **B**. NA, nucleus ambiguus. *bottom*, Integrated (upper trace) and raw (lower trace) recordings of spontaneous respiratory activity recorded from the preBötC with a macroelectrode positioned on the surface of the slice. **(B)** Photomicrographs (corresponding to a z-stack of 15 images, 15  $\mu\text{m}$  in total thickness) of immunolabeling for choline acetyltransferase (ChAT, *left, top, green*) and neurokinin 1 receptor (NK1R, *left, bottom, red*) in the ventrolateral part of the medulla. *right*, Merged image. D, dorsal; M, Medial. **(C)** Histogram showing mean variability in the spontaneous respiratory burst frequency over time under control saline conditions (vertical bars, mean values; vertical lines, SEM; n=8 preparations). **(D)** Bar plots representing the viability of individual preparations. The red dotted line shows the mean longevity value. **(E, F)** Bar charts illustrating the dose-dependent effects of ZnO NPs on respiratory burst frequency **(E)** and on the preparation viability **(F)**. Vertical bars indicate mean values, vertical lines indicate the SEM. Numbers of measured preparations are indicated in parentheses. \*  $p < 0.05$ ; aCSF, artificial cerebrospinal fluid.

**Figure 7.** ZnO NPs depolarize preBötC inspiratory neurons and reduce the central inspiratory synaptic drive. **(A)** Photomicrograph (corresponding to a z-stack of 15 images, 15  $\mu\text{m}$  in total thickness) of immunolabeling for neurokinin 1 receptors (NK1R, red) in a biocytin-filled neuron (green) located in the preBötC region positioned ventrally to the choline acetyltransferase (ChAT, blue)-immunoreactive nucleus ambiguus (NA). The white arrowhead indicates the neuron recorded in **B**. The inset shows a schematic drawing of the medullary slice and the white rectangle corresponds to the area of the photomicrograph. D, dorsal; M, Medial. **(B)** Simultaneous whole-cell patch-clamp recording of a preBötC inspiratory neuron (preBötC insp. neuron) and integrated extracellularly-recorded activity of the preBötC region ( $\int$  preBötC) under control saline (normal aCSF, upper traces) and during ZnO NP application (lower traces). The dashed line indicates the resting membrane potential level measured in control conditions. **(C)** Scatter plots showing evolution of neuronal membrane potential over time during acute exposure to ZnO NPs in inspiratory (red dots) and non-respiratory (black dots) preBötC neurons. \*  $p < 0.05$ . **(D)** Firing response of a neuron to an injected depolarizing current pulse in control conditions (left) and during ZnO NP application (right). The membrane potential of the cell during nanoparticle exposure was held at the same value as in control by

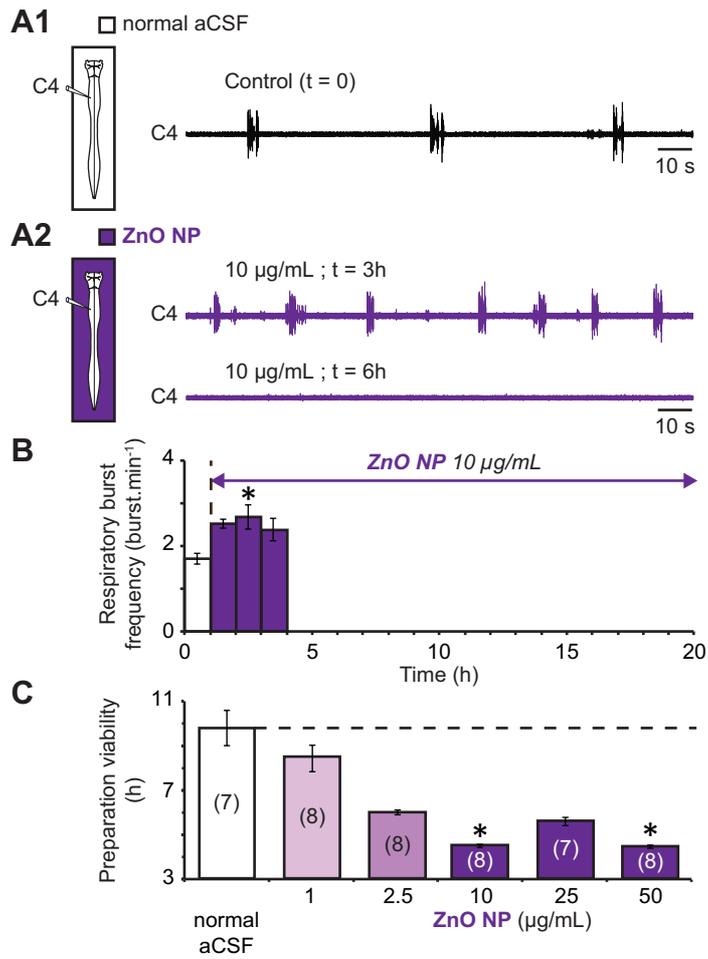
injecting constant hyperpolarizing current. **(E)** Scatter plots showing evolution over time in the amplitude of the inspiratory synaptic drive potential in preBötC neurons (n=6) during ZnO NP application. \*  $p < 0.05$ . **(F)** Representative examples of action potentials (AP) in the same neuron under normal conditions and during ZnO NP application showing the latter's effects on AP amplitude and duration. aCSF, artificial cerebrospinal fluid.



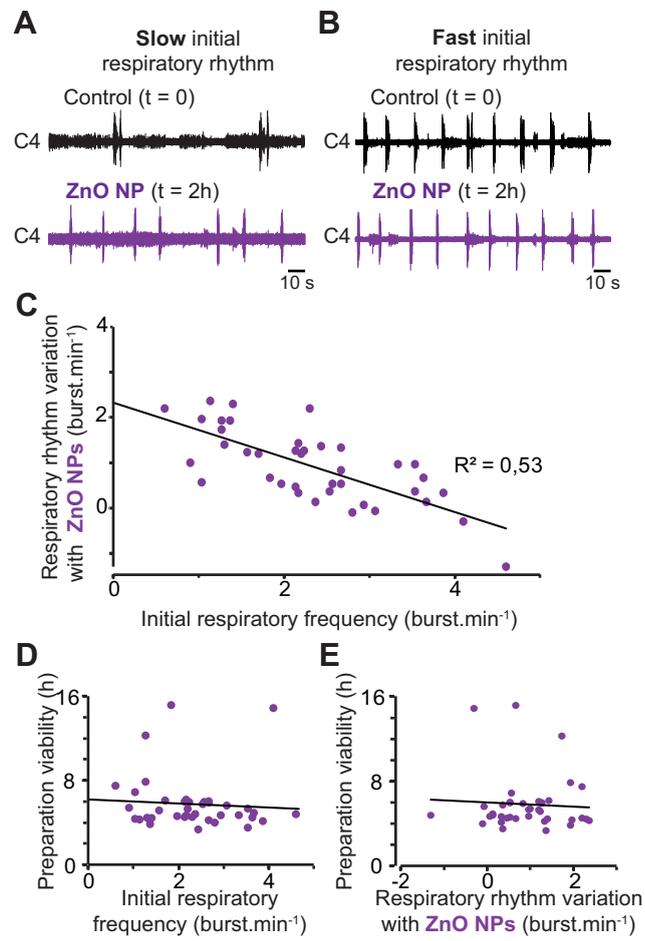
Nicolosi et al., Fig. 1



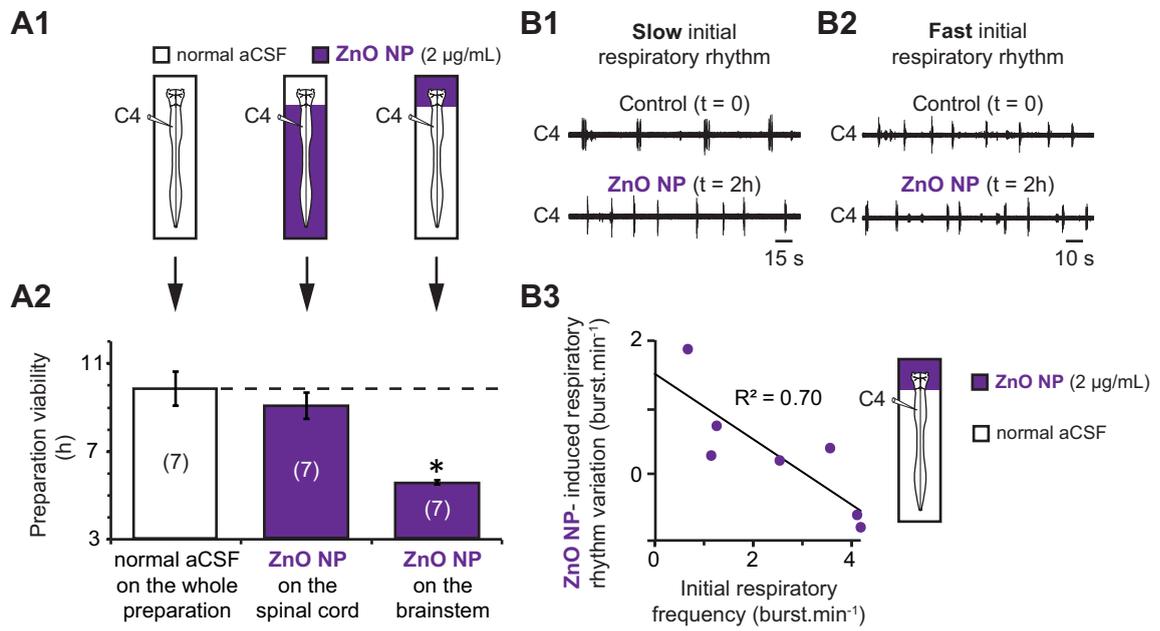
Nicolosi et al., Fig. 2



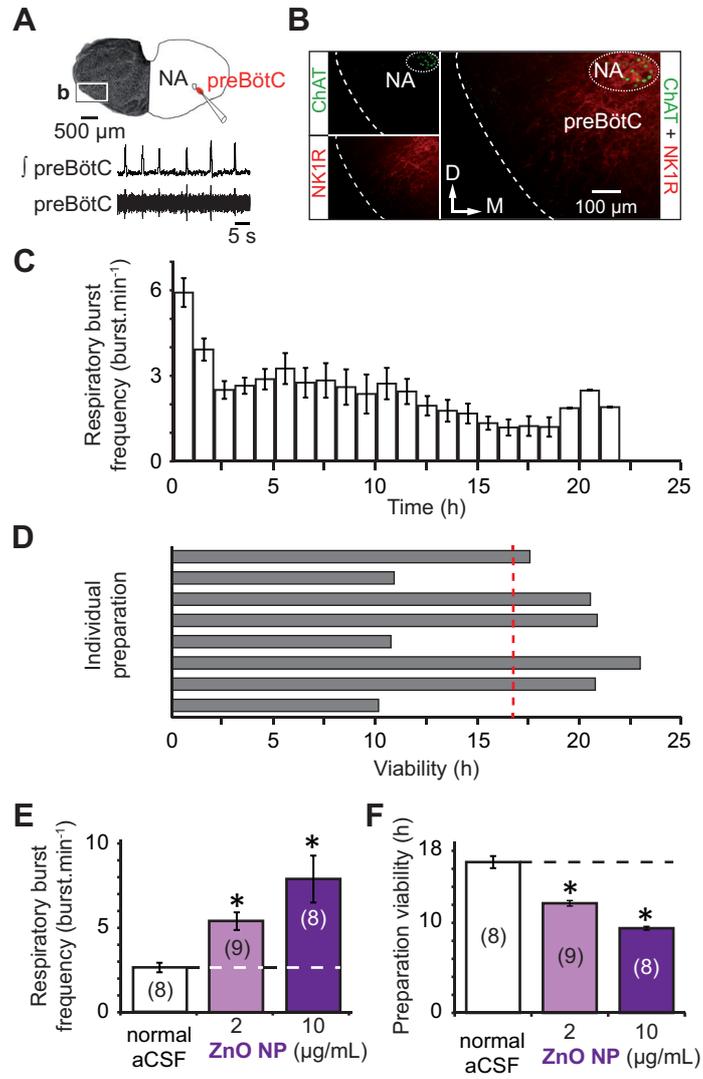
Nicolosi et al., Fig. 3



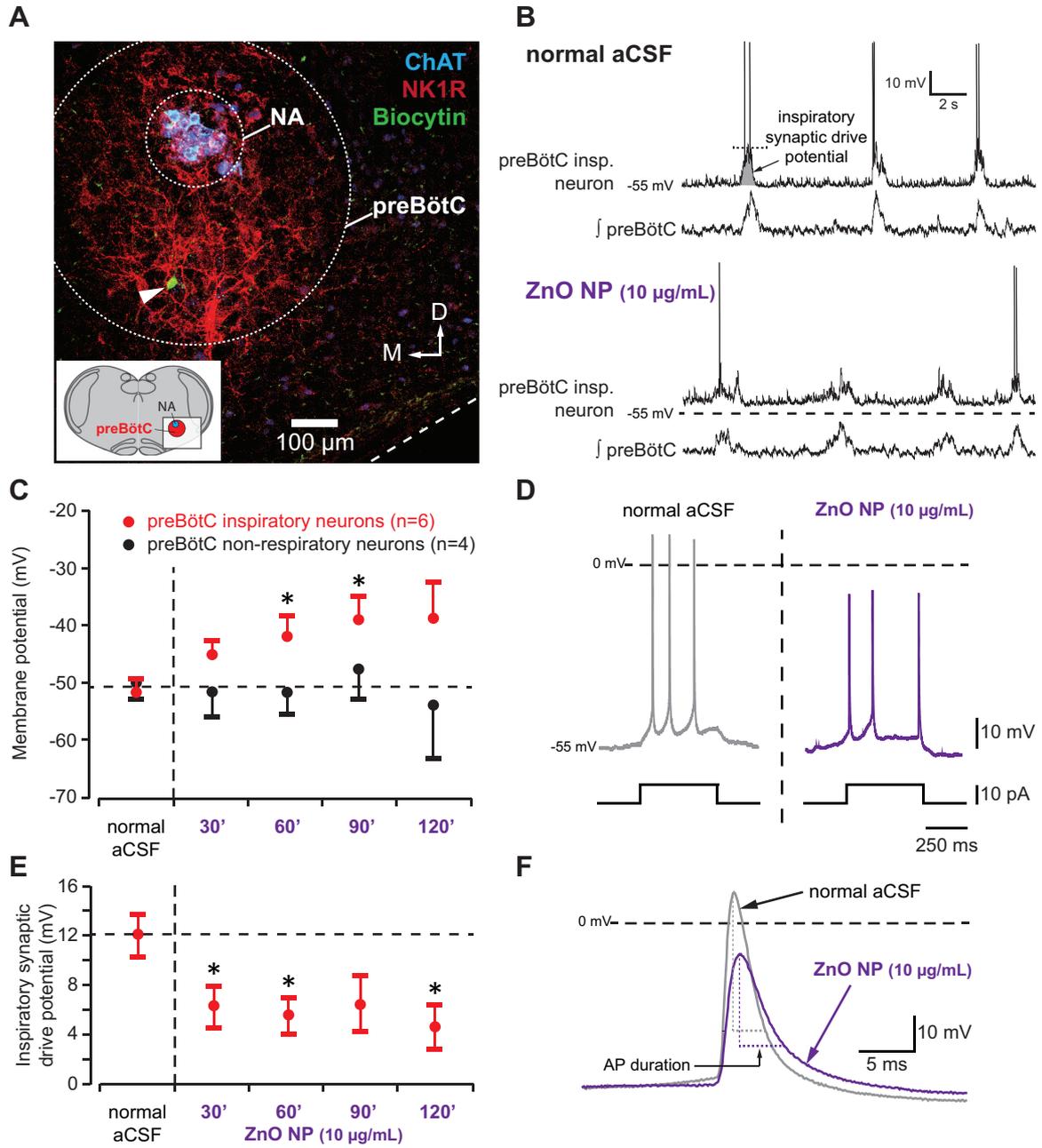
Nicolosi et al., Fig. 4



Nicolosi et al., Fig. 5



Nicolosi et al., Fig. 6



Nicolosi et al., Fig. 7

## ***In vitro* Brainstem-spinal Cord Preparation from Newborn Rat**

Jean-Patrick Le Gal, Angelo Nicolosi, Laurent Juvin and Didier Morin\*

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), Université de Bordeaux, Bordeaux, France

\*For correspondence: [didier.morin@u-bordeaux.fr](mailto:didier.morin@u-bordeaux.fr)

**[Abstract]** The brainstem-spinal cord preparation of newborn rat contains neural networks able to produce motor output in absence of sensory feedback. These neural structures, commonly called central pattern generators (CPGs), are involved in many vital functions such as respiration (Morin and Viala, 2002; Giraudin *et al.*, 2008) or locomotion (Juvin *et al.*, 2005). Here we describe a procedure for the isolation of the brainstem-spinal cord tissue of neonatal rat (0-2 days old). A surgical method under binocular microscope allows the brainstem and the spinal cord to be isolated *in vitro* and the motor outputs to be recorded. This preparation can then be used for diverse experimental approaches, such as electrophysiology, pharmacology or anatomical studies, and constitutes a useful model to study the interaction between CPGs (Juvin *et al.*, 2007; 2012; Giraudin *et al.*, 2012; Le Gal *et al.*, 2014; 2016).

**[Background]** Historically, the *in vitro* spinal cord of neonatal rodent was developed to study the spinal reflexes (Otsuka and Konishi, 1974). In 1984, Suzue was the first to develop the *in vitro* brainstem-spinal cord preparation of newborn rat. Thus, it was possible to demonstrate that an isolated central nervous system was able to generate spontaneously what is referred as fictive respiratory activity. Later, it was then possible to determine the location of the CPGs underlying the locomotor rhythm generation (Cazalets *et al.*, 1995; Kjaerulff and Kiehn, 1996; Ballion *et al.*, 2001) and those engaged in respiratory rhythm generation (Smith *et al.*, 1991; Onimaru and Homma, 2003). In our research team, this preparation has been mainly used to study the neural mechanisms underlying the interaction between CPGs. For instance, in a context of interaction between CPGs involved in the same function, our results have contributed to characterize the role played by the sensory afferents and the spinal thoracic segments in the coordination between the cervical and the lumbar locomotor CPGs (Juvin *et al.*, 2005; 2012). Similarly, this preparation allows studies on the neural mechanisms involved in coordination between CPGs engaged in different functions. Based on electrical stimulation of dorsal roots, it was shown that the proprioceptive inputs originating from both hindlimb and forelimb are involved in the respiratory rhythm entrainment observed during locomotion (Morin and Viala, 2002; Giraudin *et al.*, 2012). These ascending entraining signals from the cervical and lumbar afferents are conveyed to the brainstem respiratory centers via a brainstem pontine relay located in the parabrachial/Kölliker-Fuse complex (Giraudin *et al.*, 2012). Using pharmacological and intracellular (patch-clamp recording) approaches on the same preparation, recent results have demonstrated for the first time the existence of an ascending pathway from the lumbar locomotor CPGs to the respiratory CPGs. This central neurogenic mechanism, involving a substance P-dependent modulating mechanism, could play a crucial

role in the increased respiratory frequency observed during locomotion (Le Gal *et al.*, 2014). In addition, it was also demonstrated that the locomotor related signal from the lumbar locomotor CPGs selectively modulates the intracellular activity of spinal expiratory neurons (Le Gal *et al.*, 2016). Altogether, our results obtained on the *in vitro* brainstem spinal cord preparation of new born rat have contributed to increase our understanding of the cellular bases engaged in the coordination of rhythmic neural circuitry responsible for different functions.

### **Materials and Reagents**

1. Needles (25 G) (Henke-Sass Wolf, catalog number: 4710005016)
2. Neonatal rat (0-2 days old)
3. Sodium chloride (NaCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: S3014)
4. Potassium chloride (KCl) (Sigma-Aldrich, catalog number: P3911)
5. Sodium phosphate monobasic (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, catalog number: S0751)
6. Calcium chloride dihydrate (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich, catalog number: C5080)
7. Magnesium chloride hexahydrate (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich, catalog number: M2670)
8. Sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, catalog number: S8875)
9. D-glucose (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, catalog number: AC410950010)
10. Sodium hydroxide (NaOH) (1 N) (Sigma-Aldrich, catalog number: 795429)
11. Hydrochloric acid (HCl) (37%) (Sigma-Aldrich, catalog number: 258148)
12. Isoflurane (Piramal Enterprises, Piramal HealthCare, catalog number: Isoflurane)
13. Vaseline (Sigma-Aldrich, catalog number: 16415)
14. Artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) solution (see Recipes)

### **Equipment**

1. Fisherbrand™ beaker (1 L) (Thermo Fisher Scientific, Fisher Scientific, catalog number: 15449083)
2. Ice bucket (SP Scienceware - Bel-Art Products - H-B Instrument, catalog number: M18848-2001)
3. Induction chamber for inhalational anesthesia (TemSega, catalog number: chamber)
4. Isoflurane vaporizer (TemSega, model: Isoflurane vaporizer)
5. Carbogen, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> (The Linde Group, Linde Gaz, model: Carbogen B50)
6. Scalpel blade (LCH MEDICAL PRODUCTS, catalog number: SCX23) (Figure 1a)
7. Small scissors (Moria, model: MC26B) (Figure 1a)
8. Fine forceps (Fine Science Tools, Dumont, model: 55) (Figure 1a)
9. Dissection chamber (plastic box, 100 ml) with 2 mm layer of silicone elastomer
10. Binocular microscope (Olympus, model: SZX7)

11. Recording chamber (10 ml) composed by a standard petri dish (60 mm) with 2 mm layer of silicone elastomer
12. Peristaltic pump (Gilson, model: Minipuls® 3)

## **Procedure**

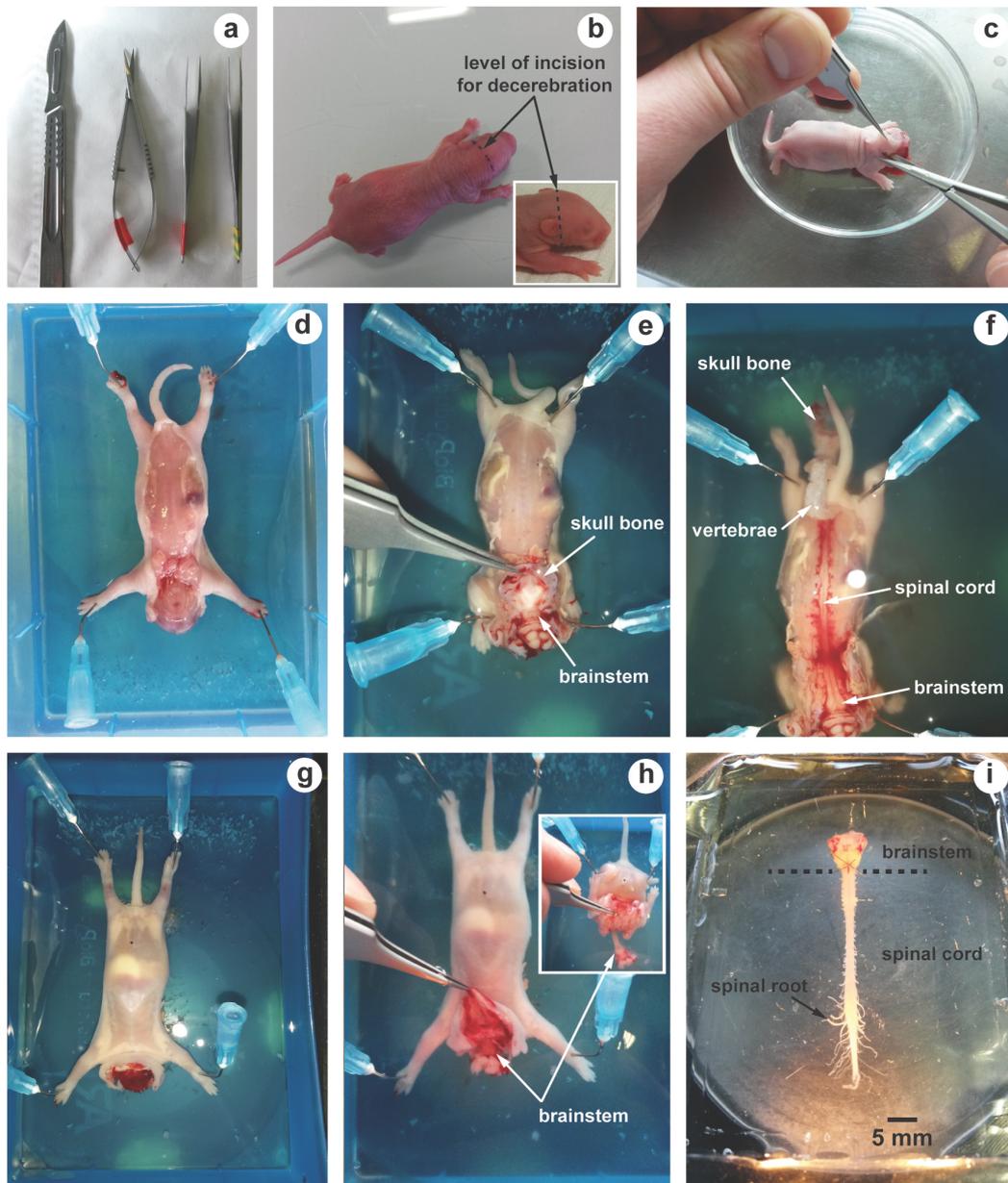
### A. Artificial cerebro-spinal fluid (aCSF)

For the preparation, see explanation in the Recipes section below. Once prepared, place a beaker containing aCSF in an ice bucket throughout experience.

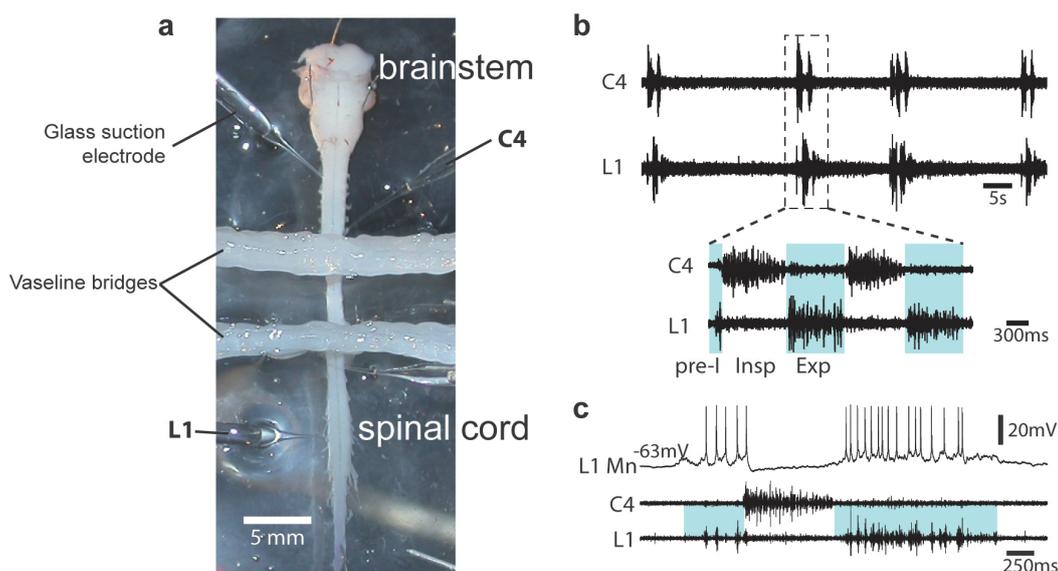
### B. Dissection and isolation of the brainstem-spinal cord

1. Place a neonatal rat (0-2 days old) in an induction chamber for inhalational anesthesia. Animal is anesthetized with 4% isoflurane until the loss of reflex responsiveness to tail pinching (during 7 to 10 min).
2. Using a scalpel, swiftly euthanize the animal by decapitation (incision must be performed in front of the ears) (Figure 1b). This allows decerebration just rostrally to the fifth cranial nerves.
3. Remove the skin and muscles covering the back with forceps and scissors (Figure 1c).
4. Transfer the preparation into a dissection chamber filled with aCSF at 4 °C and insert needle in each fore- and hind-limb to hold the preparation (slightly stretched) with the dorsal surface upwards (Figure 1d).
5. Under binocular microscope, hold and lift up the skull bones with fine forceps. Using small scissors, cut the skull bones on both sides in order to expose the brainstem (Figure 1e).
6. Using the same procedure along vertebral column, cut each vertebra on both sides to expose the spinal cord (dorsal laminectomy) (Figure 1f).
7. Turn the preparation over in order to maintain its ventral surface upwards (Figure 1g).
8. Hold and lift up the skull bones with fine forceps (Figure 1h) and cut all ventral and dorsal spinal roots leaving as much length as possible. The inset in Figure 1h shows how the skin, muscles and bones are removed to allow laminectomy to be performed. To avoid damage of brainstem and/or spinal cord, it is crucial to never hold nervous tissue with forceps.
9. Using a spoon, carefully transfer the brainstem-spinal cord with its ventral and dorsal spinal roots still attached in a 10 ml recording chamber containing circulating aCSF (flow rate, 3-5 ml/min adjusted with the peristaltic pump) (Figure 1i).
10. In order to ensure mechanical stability, the preparation is pinned down with its ventral surface upward by several pins inserted through the meninges surrounding the brainstem and the spinal cord.
11. To assess the quality of the procedure, motor output activity in spinal ventral roots is recorded with glass suction electrodes filled with aCSF solution (Figure 2a). Signals (burst of action potentials) are amplified (10,000 times) by differential AC amplifiers (low cutoff, 100 Hz; high cutoff, 1 kHz), digitized and acquired via an analogical/digital interface, and finally stored on a

computer. The dissection is successful when motor activities are spontaneously generated by the isolated preparation (Figures 2b-2c).



**Figure 1. Illustrations of brainstem-spinal cord dissection.** a. Tools used for dissection; b. Neonatal rat (2 days old) and level of incision for decerebration; c. After decerebration, skin and muscles covering the back are removed; d-f. The dorsal surface of the brainstem and the spinal cord is first exposed; g and h. The ventral surface; i. Image showing the isolated brainstem-spinal cord preparation with its spinal roots still attached.



**Figure 2. Motor output activity in spinal ventral roots from *in vitro* newborn rat preparation.** a. Image of an isolated brainstem-spinal cord (from a P2 newborn animal) in a recording chamber. When required, the recording chamber is partitioned either 2 or 3 compartments with barriers of syringe-ejected Vaseline to permit differential exposure of selected spinal cord regions to pharmacological treatment. b. Simultaneous recordings are made from the 4th cervical (C4) and the 1st lumbar (L1) ventral roots. Respiratory-like rhythm is spontaneously generated, showing clear inspiratory (Insp) C4 and pre-inspiratory/expiratory (pre-I; Exp) L1 alternated phases. c. Blind techniques (with sharp or patch electrodes) were used to record rhythmic activity of brainstem and spinal respiratory neurons. Here, the firing of the impaled neuron is in synchrony with L1 ventral root discharge and therefore is identified as an expiratory motoneuron (MN).

### Data analysis

1. Respiratory and locomotor-related activities in spinal ventral roots can be recorded using glass suction electrodes filled with aCSF solution. The motor outputs generated for these two functions consist in rhythmic bursting activities, allowing several types of analysis. Thus, by recording the respiratory motor outputs (see Giraudin *et al.*, 2008), it is possible to determine the respiratory frequency before, during and after pharmacological or lesion experiments. In order to quantify the modulation of the respiratory rhythm between different conditions, statistical analyses are performed using dedicated software, such as SigmaPlot 11.0 (Systat). The results are expressed as mean  $\pm$  SEM (or SD), and Student's *t*-test is used to compare the means of two groups, whereas repeated measures ANOVA and subsequent Tukey's post hoc tests are used to compare more than two groups. The differences are considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

2. It is also possible to establish the phase relationship between motor-related bursting activities, such as respiratory vs. locomotor, or locomotor vs. locomotor bursting activities. In order to calculate the phase relationship, several burst activities of a given ventral root are selected and taken as reference. The phase values of burst onsets in a second ventral root are calculated by dividing the duration between the onsets of two consecutive burst onsets of each motor output by the reference cycle period. The phase values are then plotted on a circular phase diagram with a scale ranging from 0 to 1. A phase value approaching 0 or 1 indicates synchrony, whereas values close to 0.5 reflects alternation.

## Recipes

1. Artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) solution
  - a. Add 7.305 g NaCl (final concentration 100 mM), 0.249 g KCl (4 mM), 0.069 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mM), 0.185 g CaCl<sub>2</sub> (2 mM), 0.233 g MgCl<sub>2</sub> (1.3 mM), 1.764 g NaHCO<sub>3</sub> (25 mM), 5.406 g D-glucose (30 mM) in a beaker filled with 1 L of distilled water
  - b. Mix the solution with a magnetic stirrer
  - c. Place the beaker in an ice bucket and perfuse the aCSF with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> for at least 30 min before use
  - d. Adjust the pH to 7.4 (use NaOH or HCl)

## Acknowledgments

This protocol was adapted from our published paper: Le Gal *et al.* (2016), J-P. Le Gal and A. Nicolosi were supported by a doctoral studentship from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". Authors thank R. Anselm for his comments and for English revision.

## References

1. Ballion, B., Morin, D. and Viala, D. (2001). [Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat](#). *Eur J Neurosci* 14(10): 1727-1738.
2. Cazalets, J. R., Borde, M. and Clarac, F. (1995). [Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat](#). *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4943-4951.
3. Giraudin, A., Cabirol-Pol, M. J., Simmers, J. and Morin, D. (2008). [Intercostal and abdominal respiratory motoneurons in the neonatal rat spinal cord: spatiotemporal organization and responses to limb afferent stimulation](#). *J Neurophysiol* 99(5): 2626-2640.
4. Giraudin, A., Le Bon-Jego, M., Cabirol, M. J., Simmers, J. and Morin, D. (2012). [Spinal and pontine relay pathways mediating respiratory rhythm entrainment by limb proprioceptive inputs in the neonatal rat](#). *J Neurosci* 32(34): 11841-11853.

5. Juvin, L., Le Gal, J. P., Simmers, J. and Morin, D. (2012). [Cervicolumbar coordination in mammalian quadrupedal locomotion: role of spinal thoracic circuitry and limb sensory inputs.](#) *J Neurosci* 32(3): 953-965.
6. Juvin, L., Simmers, J. and Morin, D. (2005). [Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion.](#) *J Neurosci* 25(25): 6025-6035.
7. Juvin, L., Simmers, J. and Morin, D. (2007). [Locomotor rhythmogenesis in the isolated rat spinal cord: a phase-coupled set of symmetrical flexion extension oscillators.](#) *J Physiol* 583(Pt 1): 115-128.
8. Kjaerulff, O. and Kiehn, O. (1996). [Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord \*in vitro\*: a lesion study.](#) *J Neurosci* 16(18): 5777-5794.
9. Le Gal, J. P., Juvin, L., Cardoit, L. and Morin, D. (2016). [Bimodal respiratory-locomotor neurons in the neonatal rat spinal cord.](#) *J Neurosci* 36(3): 926-937.
10. Le Gal, J. P., Juvin, L., Cardoit, L., Thoby-Brisson, M. and Morin, D. (2014). [Remote control of respiratory neural network by spinal locomotor generators.](#) *PLoS One* 9(2): e89670.
11. Morin, D. and Viala, D. (2002). [Coordinations of locomotor and respiratory rhythms \*in vitro\* are critically dependent on hindlimb sensory inputs.](#) *J Neurosci* 22(11): 4756-4765.
12. Onimaru, H. and Homma, I. (2003). [A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla.](#) *J Neurosci* 23(4): 1478-1486.
13. Otsuka, M. and Konishi, S. (1974). [Electrophysiology of mammalian spinal cord \*in vitro\*.](#) *Nature* 252(5485): 733-734.
14. Smith, C. J., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W. and Feldman, J. L. (1991). [Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals.](#) *Science* 254: 726-729.
15. Suzue, T. (1984). [Respiratory rhythm generation in the \*in vitro\* brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat.](#) *J Physiol* 354: 173-183.