



**HAL**  
open science

# Etude de différents protocoles d'exercice chez la souris et dans un modèle préclinique de lésion médullaire cervicale

Isley De Jesus

► **To cite this version:**

Isley De Jesus. Etude de différents protocoles d'exercice chez la souris et dans un modèle préclinique de lésion médullaire cervicale. Autre [q-bio.OT]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASW005 . tel-03414402

**HAL Id: tel-03414402**

**<https://theses.hal.science/tel-03414402>**

Submitted on 4 Nov 2021

**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.

Etude de différents protocoles d'exercice chez la souris et  
dans un modèle préclinique de lésion médullaire cervicale

*Study of different exercise protocols in mice and in  
a preclinical model of cervical spinal cord injury*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 566 : sciences du sport, de la motricité et du  
mouvement humain (SSMMH)

Spécialité de doctorat : Sciences du Sport et du Mouvement Humain

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000,  
Versailles, France

Référent : Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 14/12/2020**

**Isley DE JESUS**

**Composition du Jury**

**Pr Isabelle SIEGLER**

Dr, HDR, directrice de l'ED 566,  
Université Paris Saclay

Présidente

**Pr Anne CHARLOUX**

PU-PH, Les Hôpitaux Universitaire  
de Strasbourg

Rapporteur et examinatrice

**Pr Laurent PLANTIER**

PU-PH, UMR INSERM U1100, CHRU  
de Tours

Rapporteur et examinateur

**Dr Ana FERREIRO**

DR INSERM, UMR 8251, Sorbonne  
Université, Paris 7

Examinatrice

**Dr Yves FROMES**

MD, PhD, Institut de Myologie,  
Sorbonne Université, Paris 6

Examineur

**Direction de la thèse**

**Pr Marcel BONAY**

PU-PH, INSERM U1179, Université  
de Versailles

Directeur de thèse



**Titre :** Etude de différents protocoles d'exercice chez la souris et dans un modèle préclinique de lésion médullaire cervicale

**Mots clés :** Locomotion-lésion médullaire-Plasticité-Inflammation-Infection

**Résumé :** Un traumatisme de la moelle épinière est un événement qui laisse la plupart des patients affaiblis ou paralysés tout au long de leur vie. Lors d'une lésion dans la région haute de la moelle épinière, l'insuffisance respiratoire est une complication courante et responsable d'une proportion importante de la morbidité et de la mortalité des patients blessés médullaires. Les seuls traitements disponibles de cette insuffisance respiratoire sont la ventilation mécanique et la stimulation du nerf phrénique. Les programmes de réentraînement à l'effort contribuent à l'amélioration de la forme physique et à la réduction des complications de santé à long terme des patients blessés médullaires. La possibilité de reproduire la récupération post-traumatique de la lésion médullaire par une intervention thérapeutique dans les modèles animaux, aide à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents menant à ces améliorations durables. Ainsi, mes travaux de thèse ont consisté à étudier l'intérêt de l'exercice physique avec deux objectifs : 1) utiliser un programme d'exercice physique modéré après traumatisme de la moelle épinière cervicale chez la souris pour déterminer son effet au niveau de la récupération fonctionnelle respiratoire et motrice ; et, 2) investiguer l'impact de l'exercice physique intense sur les réponses inflammatoires dans le tissu musculaire et les défenses anti-infectieuses respiratoires chez la souris saine. Dans la première partie de ces travaux de thèse a consisté faire une étude sur le rôle d'un programme d'entraînement physique de faible intensité de 6 semaines dans la physiopathologie de la lésion médullaire haute chez la souris. Pour cela, nous développons un modèle d'hémisection spinale cervicale entraînant une insuffisance motrice et respiratoire chez la souris dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans la restauration après lésion. Nos données montrent que l'entraînement physique de faible intensité pourrait être une bonne stratégie non invasive afin de maintenir la plasticité des muscles locomoteurs et respiratoires après une lésion de la moelle épinière cervicale. Cependant, 6 semaines d'exercice de faible intensité n'améliorent pas l'activité électromyographique du diaphragme affecté et n'aboutissent pas à la récupération fonctionnelle respiratoire. Nous avons émis l'hypothèse de l'implication de la voie du facteur de transcription Nrf2. Des données disponibles dans la littérature montrent que le Nrf2 participe à la récupération motrice dans des modèles de contusion chez le rat blessé médullaire. En revanche, l'effet de Nrf2 dans des modèles d'hémisection au niveau cervicale n'avait pas encore été investigué. Nos résultats préliminaires montrent une tendance à une récupération minimale de la capacité des courses même à 51 jours après lésion dans le groupe Nrf2 KO sédentaires. Après 6 semaines d'entraînement, la capacité de course était plus élevée dans les groupes entraînés y compris dans le groupe entraîné Nrf2 KO. La récupération de l'activité électromyographique diaphragmatique chez la souris Nrf2 KO sédentaire se montre limitée en comparaison avec les souris sauvages sédentaires. En contrepartie, dans le groupe Nrf2 KO soumis à 6 semaines d'exercice physique modérée, nous observons une tendance d'une meilleure récupération fonctionnelle respiratoire. Dans la deuxième partie de ces travaux de thèse, nous avons pu établir un protocole d'exercice suffisamment stressant au niveau de la capacité physique pour engendrer une altération de la réponse bactéricide des macrophages alvéolaires. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer à quels temps l'inflammation induite par ce protocole d'exercice pourrait s'installer dans les muscles squelettiques. L'ensemble de nos résultats suggère que l'utilisation de l'exercice physique est une bonne stratégie pour investiguer les mécanismes d'adaptation au stress dans des situations physiologiques et pathologiques.

**Title:** Study of different exercise protocols in mice and in a preclinical model of cervical spinal cord injury

**Keywords :** Locomotion-Spinal cord injury-Plasticity-Inflammation-Infection

**Abstract:** Cervical spinal cord injury results in permanent life-altering motor and respiratory deficits. Other than mechanical ventilation for respiratory insufficiency secondary to cervical SCI, effective treatments are lacking and the development of animal models to explore new therapeutic strategies are needed. The stimulation of fore/hindlimb muscles by rehabilitation exercise is used as a strategy to enhance stepping ability and respiratory recovery post cervical spinal cord injury in both animal models and clinical studies. Thus, my thesis work consisted in studying the interest of physical exercise with two objectives: 1) to use a low-intensity physical exercise program after cervical spinal cord injury in mice to determine its effect on the respiratory and motor functional recovery. In the first part of this thesis, the aim was investigating the impact of cervical spinal cord injury on locomotor/respiratory plasticity and recovery followed by 6 weeks in mouse model. We developed a model of cervical spinal hemisection leading to motor and respiratory deficit in mice. Our data show that low-intensity physical training may be a good non-invasive strategy to maintain plasticity of locomotor and respiratory muscles after cervical spinal cord injury. However, 6 weeks of low-intensity exercise does not improve electromyographic activity of the affected diaphragm and does not result in respiratory functional recovery. In addition, we hypothesized the involvement of the Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Data available in the literature show that Nrf2 participates in motor recovery in models of contusion in rats. In contrast, the effect of Nrf2 in models of cervical hemisection had not yet been investigated. Our preliminary results show a tendency for minimal recovery of running ability even at 51 days post injury in the sedentary Nrf2 KO group. Six weeks of training, recovery running capacity in the trained groups including the Nrf2 KO trained group. The recovery of electromyography diaphragmatic activity in sedentary Nrf2 KO mice appears to be limited in comparison with sedentary no injured mice. This preliminary result suggest that Nrf2 plays a possible role in respiratory recovery following cervical spinal cord injury. On the other hand, in trained Nrf2 KO group, 6 weeks of low-intensity physical exercise appear enhance respiratory functional recovery. This shows us that despite the ablation of Nrf2, aerobic exercise may contribute, by other ways, to functional respiratory recovery. In the second part of this thesis work, we were able to establish an exercise protocol that was stressful enough in terms of physical capacity to cause an alteration in the bactericidal response of alveolar macrophages. More experiments are needed to determine what times the inflammation induced by this exercise protocol might take hold in the skeletal muscles. All of our findings suggest that the use of physical exercise is a good strategy to investigate the mechanism of stress adaptation in physiological and pathological situations.

## Table des matières

Titre : Etude de différents protocoles d'exercice chez la souris et dans un modèle préclinique de lésion médullaire cervicale.....	3
ABREVIATIONS.....	9
REMERCIEMENTS.....	11
PREAMBULE.....	14
Etude de l'intérêt de l'exercice physique dans la récupération fonctionnelle locomotrice et respiratoire chez la souris blessée médullaire haute .....	16
1 GENERALITES .....	17
1.1 Lésion médullaire .....	17
1.2 Anatomie de la moelle épinière .....	17
1.3 Incidences des lésions médullaires.....	19
1.4 Comorbidités .....	20
1.5 Physiopathologie de la lésion médullaire.....	21
1.5.1 Mécanismes physiopathologiques d'une lésion médullaire .....	21
1.5.2 Réponse inflammatoire dans la lésion médullaire .....	23
1.6 Conséquences d'une lésion médullaire haute .....	26
1.6.1 Réorganisation des connexions neuronales post lésion médullaire .....	28
1.6.2 Plasticité post lésion médullaire.....	29
1.6.3 Plasticité musculaire post-lésion médullaire.....	30
1.7 Modèles précliniques de lésion médullaire.....	31
1.7.1 Protocoles de réhabilitation utilisés chez des modèles précliniques de trauma médullaire..	32
1.7.2 Etude de la physiopathologie des traumas médullaires chez des modèles précliniques .....	34
1.8 Rôle de l'exercice dans la lésion médullaire.....	36
1.8.1 Bénéfices secondaires de l'exercice post-lésion médullaire .....	36
1.8.2 L'exercice physique et récupération fonctionnelle des muscles post lésion médullaire .....	37
2 OBJECTIF DE L'ETUDE .....	39
3 MATÉRIEL ET METHODES .....	40
3.1 Modèle préclinique de souris hémi-lésée médullaire (in vivo) .....	40
3.2 Protocole d'exercice incrémental.....	40
3.3 Hémisection chronique C2 .....	42
3.4 Protocole d'entraînement physique sur roue d'exercice forcé.....	43
3.5 Enregistrements électrophysiologiques .....	44

3.6	Immunofluorescence des tissus musculaires .....	45
3.6	Mesures morphométriques des muscle squelettiques .....	46
3.7	Reconstitution histologique de l'étendue des blessures au C2.....	46
3.8	Traitement des données et analyses statistiques .....	47
4	RESULTATS.....	49
4.1	Analyse comportementale et étendue de la lésion d'hémisection médullaire cervicale C2 .....	49
4.2	Analyse morphométrique du muscle locomoteur .....	50
4.3	Analyse de la vascularisation du muscle locomoteur.....	53
4.4	Evaluation de l'activité du diaphragme 51 jours post-médullaire cervicale .....	56
4.5	Analyses morphométriques des muscles respiratoires.....	58
4.6	Analyse de la vascularisation du muscle respiratoire .....	61
5	Résultats supplémentaires .....	63
6	DISCUSSION .....	70
7	CONCLUSION .....	75
8	COMMUNICATION SCIENTIFIQUE .....	76
	Effets d'un exercice de faible intensité sur la plasticité musculaire dans un modèle murin d'hémisection de la moelle épinière cervicale .....	76
	Etude de l'intérêt de l'exercice physique dans la récupération fonctionnelle locomotrice et respiratoire chez la souris KO Nrf2 blessée médullaire cervicale.....	103
9	GENERALITES .....	104
9.1	NRF2 ET LESIONS MEDULLAIRES .....	104
9.2	Facteur de transcription Nrf2 .....	104
9.3	Nrf2 en réponse à l'exercice aigu .....	106
9.4	Nrf2 en réponse à l'exercice chronique .....	107
9.5	Système antioxydant dans la physiopathologie de lésion médullaires.....	109
9.6	Nrf2 et lésion médullaire chez des modèles animaux.....	110
10	OBJECTIF DE L'ETUDE .....	113
11	MATÉRIEL ET METHODES .....	114
11.1	Modèle préclinique de souris hémi-lésée médullaire Nrf2 KO .....	114
11.2	Génotypage de souris Nrf2 KO .....	114
11.3	Protocole d'exercice incrémental.....	114
11.4	Hémisection chronique C2 .....	115
11.5	Protocole d'entraînement physique sur roue d'exercice forcé.....	117
11.6	Enregistrements électrophysiologiques .....	117
	RESULTATS PRELIMINAIRES.....	119

12	DISCUSSION .....	122
13	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	124
	Etude de différents protocoles d'exercice physique aigu sur l'inflammation tissulaire et la bactéricidie de macrophage alvéolaires .....	125
14	GENERALITES .....	126
14.1	Exercice physique et système immunitaire .....	126
14.2	Mécanisme de l'inflammation .....	126
14.3	Inflammation à l'exercice .....	128
14.4	Immunosurveillance et exercice physique :Théorie de la courbe J.....	129
14.5	Réponse immunitaire après une séance d'exercice physique de charge modérée .....	131
14.6	Réponse immunitaire après une séance d'exercice physique de charge élevée .....	132
14.7	Incidences des infections respiratoires hautes post-exercice exhaustif .....	134
15	OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	136
15.1	MATERIELS ET METHODES .....	137
15.2	Modèle des souris soumises à l'exercice aigu répété .....	137
15.3	Protocole d'exercice incrémental.....	137
15.4	Protocole d'exercice de longue durée en pente négative -10° .....	138
15.5	Protocole d'exercice de longue durée en pente de -5° .....	139
15.6	Culture ex vivo des macrophages alvéolaires souris .....	140
15.7	Purification de l'ARN et analyse de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel....	141
16	RESULTATS.....	143
16.1	Résultats du protocole d'exercice incrémental.....	143
16.1.1	Résultats des performances .....	143
16.1.2	Analyse de l'expression génique de cytokines pro inflammatoires .....	143
16.1.3	Analyse de la bactéricidie des macrophages alvéolaires .....	146
16.2	Résultats du protocole d'exercice de charge modéré de longue durée en pente négative (-10°)	146
16.2.1	Résultats des performances .....	147
16.2.2	Analyse de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires.....	147
16.3	Résultats du protocole d'exercice de charge modéré de longue durée en pente négative (-5°) .	149
16.3.1	Résultats des performances .....	149
16.3.2	Analyse de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires.....	150
16.3.3	Analyse de bactéricide des macrophages alvéolaires des souris soumises à l'exercice de charge intense de courte durée .....	151
17	DISCUSSION .....	152
18	CONCLUSION ET PERSPECTIVE .....	158

19	CONCLUSION GENERALE .....	160
20	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	163
21	TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES .....	172
	Effets prometteurs de l'exercice physique sur le système cardiovasculaire, métabolique et immunitaire pendant l'épidémie de COVID-19 .....	173
	L'entrainement contrecarre la raréfaction microvasculaire induite par la dexaméthasone en améliorant l'équilibre entre les protéines apoptotiques et angiogéniques chez le rat.....	178
22	ANNEXE.....	22-187
22.1	Activités complémentaires .....	22-187
22.2	Publication .....	188
22.3	Posters .....	222
22.4	CV.....	224

## ABREVIATIONS

BBB score : Basso, Beattie, Bresnahan score  
Bcl-2 : lymphome à cellules B  
BTRC : protéine  $\beta$ -TrCP  
bZIP : domaine basique de la leucine zipper  
Cat : catalase  
CFU : comptage des unités formant des colonies  
CK : créatine kinase  
CNC : cap'n'collar  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
COX-2 : cyclooxygénase-2  
CSPG : protéoglycanes de sulfate de chondroïtine  
eNOS : oxyde nitrique synthase endothéliale  
GFAP : fibrillaire gliale protéine acide  
GPx : glutathion peroxidase  
GR : glutathion réductase  
HO-1 : Hème oxygénase 1  
IL : interleukines  
I $\kappa$ B $\alpha$  : sous-unité inhibitrice  
Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1  
LBA : lavage broncho-alvéolaire  
LPS : lipopolysaccharides  
MAF : musculoaponeurotic fibrosarcoma  
MMP-9 : métalloprotéinase matricielle-9  
NADPH : adénine dinucléotide la phosphate oxydase  
Neh : Nrf2-ECH homology  
NF : Nuclear factor-kappa B  
NK : cellules natural killer  
NO : oxyde nitrique  
NQO1 : NAD (P) H déshydrogénase [quinone] 1  
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
O<sub>2</sub> : oxygène  
Pi : phosphate inorganique  
PI3k : phosphoinositide 3-kinase  
PLC : phospholipase C  
RNS : espèces réactives de l'azote  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
S.aureus : Staphylococcus aureus  
SNC : système nerveux central  
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3  
TLR4 : récepteur 4 de type Toll  
TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale alpha

VCAM : molécule d'adhésion des cellules vasculaires

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VST : tractus vestibulospinal

## REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement le Pr. Marcel Bonay pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche. Cette aventure qu'est la thèse m'a fait grandir scientifiquement, mais aussi humainement, je me sens désormais capable d'envisager la suite et vous serai reconnaissant toute ma vie.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury : le Pr Isabelle Siegler, le Pr Anne Charloux et le Pr Laurent Plantier qui ont accepté de consacrer du temps et d'être rapporteurs pour ces travaux. Je remercie également Dr Yves Fromes et le Dr Ana Ferreira qui me font l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie les différents organismes qui ont participé financièrement à l'élaboration de ces travaux (Chancellerie des Universités de Paris, Université de Versailles St Quentin/Paris Saclay, Inserm, LVL-Médical, Isis-Médical).

Je remercie le Dr. Thérèse Deramaut, une chercheuse très compétente et sérieuse qui m'a appris les techniques d'analyse biomoléculaire et leurs astuces. Merci encore pour ton support scientifique et technique.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Stéphane Vinit, qui m'a tutoré en expérimentations animales. C'est grâce à toi que j'ai pu apprendre des techniques sophistiquées comme la chirurgie d'hémisection cervicale chez la souris et cela a contribué énormément pour que ce travail de thèse arrive jusqu'au bout. Entre autres, tu m'as présenté des personnes de renommée dans le domaine et cela m'a ouvert une fenêtre d'opportunités envisageables pour la suite de ma carrière scientifique. De plus, je te remercie pour ton amitié et l'aide que tu m'as apportées pendant ces trois ans. J'apprécie ta bonne humeur et ta manière d'apprendre les choses. J'ai appris avec toi que les pastèques grillées sont au menu d'un barbecue français.

Je tiens à remercier chaleureusement ma petite sœur Pauline Michel-Flutôt (POPO). J'ai eu la chance de pouvoir partager ces années avec toi. Tu m'as également beaucoup apporté pour ce travail de thèse. De plus, tu es devenue une grande amie et je t'admire pour ton grand cœur et ton intelligence. Continue d'être cette personne exceptionnelle que tu es. Merci aussi pour les gâteaux qui m'ont sauvé plusieurs fois la vie.

Je remercie énormément Aude Robert responsable de la plateforme d'animalerie. Une excellente professionnelle qui a toujours été disponible pour aider et résoudre les difficultés techniques à propos de l'expérimentation animale. Grâce à l'organisation et à la structure excellentes de la plateforme que tu diriges, la qualité de ce travail de thèse

a été assurée. Je remercie également ton équipe compétente qui fait partie de cette excellente plateforme d'animalerie.

Je remercie tous les responsables de plateformes, et particulièrement Olivier Le Coz, responsable de la plateforme d'Histopathologie, pour avoir toujours été disponible, soit pour résoudre des soucis soit pour me prêter des anticorps ou réactifs. Un remercie aussi pour Aude Malfait-Jobart et Benoit Maury, responsables de la plateforme Imagerie / Microscopie.

Je remercie Valentin qui m'a beaucoup aidé dans la phase finale de mon travail. Je te souhaite du succès pour la suite de ton doctorat. J'espère aussi que tu manges moins de Bo Bun.

Je remercie toutes les personnes de l'U1179 qui ont contribué directement et indirectement à ce travail doctoral. Les échanges scientifiques et techniques, le partage de matériels et équipements ont été très importants pour le déroulement de ma thèse.

Je tiens à remercier tous les participants du journal club. Même si parfois je ne pouvais pas être présent en raison des manips, cette réunion entre les étudiants était le moment d'échanger scientifiquement et de se détendre. Cela a pris de la valeur pendant la quarantaine avec les réunions par visio.

Je remercie les filles : Laurie, Graziella et Aude encore. J'aime échanger avec vous. Les gâteaux le matin, les barbeucs, les « after-works » et les rigolades vont me manquer. J'espère pouvoir continuer à vous côtoyer pour longtemps.

Je remercie mes collègues du bureau d'en face, Flavien, Amel, Adrien et encore Valentin pour les échanges scientifiques mais aussi pour les rigolades. J'ai bien aimé partager ces moments avec vous.

Je remercie les personnes du 3ème étage : Simon, mon jumeau Hamadoun, Marion, Bilade, ma compatriote Luiza, Hendrick, Arnaud, Adeline ma voisine d'Antony, Julie, Elodie et Gina. C'était un plaisir de partager des moments d'échange scientifique et de détente avec vous tous.

Je n'oublie pas ma famille, même avec toutes ces années de distance, vous avez toujours démontré votre fierté pour moi. Ma mère Maria, ma sœur Kathya et mon petit frère Matheus, je vous dédie ce travail, je vous aime. Vous avez toujours soutenu mes rêves et cela me motive d'aller toujours plus loin dans mes objectifs.

Je n'oublie pas non plus ma famille en France, je dédie aussi ce travail à mes beaux-parents Agnès et Jean-Marc, vous nous avez toujours aidés, principalement lors de

notre arrivé en France. Vous êtes des personnes exceptionnelles et d'un cœur d'une taille incommensurable, je vous aime tous les deux. Un grand merci aussi à ma cunhada (belle-sœur) et Julien. J'espère pouvoir passer à nouveau de bons moments ensemble dans la vie.

Enfin, je remercie la personne la plus importante dans l'aboutissement de cette thèse, même si elle n'y a pas participé directement, Laurianne, mon épouse. L'opportunité d'être en France, d'apprendre une autre langue et une autre culture et enfin faire une thèse, sont une chance incommensurable et c'est grâce à toi mon amour. Même dans les moments où je suis rentré du labo tard et parfois très tard, tu as réussi à me soutenir. Si je suis en train d'écrire ces remerciements, c'est grâce à toi. Je suis sûr que l'on se dirige vers un bel avenir professionnel et personnel maintenant, on l'aura bien mérité. Je t'aime très fort MOMO.

## **PREAMBULE**

L'exercice physique est devenu un outil clé pour étudier *in vivo* les mécanismes neuronaux entraînant des améliorations motrices suite à une lésion médullaire.

Un traumatisme de la moelle épinière est un événement qui laisse la plupart des patients affaiblis ou paralysés tout au long de leur vie en raison de la capacité limitée du système nerveux central à guérir et du nombre restreint d'options thérapeutiques actuellement disponibles. Lors d'une lésion dans la région haute de la moelle épinière, l'insuffisance respiratoire est une complication courante (1, 2) et responsable d'une proportion importante de la morbidité et de la mortalité des patients blessés médullaires (3). Les seuls traitements disponibles de cette insuffisance respiratoire sont la ventilation mécanique et la stimulation du nerf phrénique (3). Après lésion médullaire, le réentraînement à l'effort permet d'activer les circuits neuronaux de manière localisée (muscles striés squelettiques des membres) ou plus générale (muscles des membres et muscles respiratoires). Le réentraînement physique renforce les muscles utilisés, stimule la rétroaction afférente et stimule la plasticité neuronale (4, 5). Les programmes de réentraînement à l'effort contribuent à l'amélioration de la forme physique et à la réduction des complications de santé à long terme des patients blessés médullaires. La possibilité de reproduire la récupération post-traumatique de la lésion médullaire par une intervention thérapeutique dans les modèles animaux, aide à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents menant à ces améliorations durables. Une des stratégies est l'activation du facteur de transcription Nrf2. Considéré comme un grand protecteur de multiples organes, cette protéine est considérée comme neuroprotectrice dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson et lors des lésions médullaires.

Dans un autre contexte, l'adoption d'un régime d'exercice est souvent une stratégie précoce pour inverser ou prévenir la progression des maladies. Les effets bénéfiques de l'exercice sont le résultat de sa capacité à induire des modifications du métabolisme, du tonus cardiovasculaire et de la fonction pulmonaire. Cependant, un exercice excessif qui épuise la réserve adaptative du corps, ou la capacité à répondre positivement à un stimulus d'entraînement, peut être dommageable. Ainsi, des études ont démontré qu'il est très important de prendre en compte la charge de l'exercice (durée, intensité et fréquence) pour obtenir des bénéfices sur la santé. L'exercice physique à très haute intensité pourrait affaiblir le système immunitaire (7). L'immunosurveillance est une réponse qui participe à l'adaptation induite par exercice physique. Plusieurs données suggèrent que la pratique de l'exercice physique de charge modérée pourrait protéger un individu contre les infections des voies respiratoires hautes, tandis qu'un exercice

prolongé de haute intensité augmenterait le nombre d'épisodes infectieux (6). Le mécanisme immunologique à l'origine de la sensibilité accrue aux infections des voies respiratoires supérieures après un exercice physique intense est mal connu (7). Dans ce contexte, il serait intéressant de tester l'effet de plusieurs types d'exercice de haute intensité sur l'inflammation et les défenses immunitaires chez la souris

Au sein du laboratoire où j'ai effectué mon travail doctoral, nous développons des stratégies pour le traitement de l'insuffisance respiratoire consécutive à une lésion médullaire. Nous étudions également le rôle de l'inflammation, du stress oxydant (e.g., recrutement des macrophages et activation de la microglie) à des fins thérapeutiques. Durant mes 3 ans de travail de thèse, j'ai ainsi étudié l'intérêt de l'exercice physique avec deux objectifs : 1) utiliser un programme d'exercice physique après un traumatisme de la moelle épinière cervicale chez la souris pour déterminer son effet au niveau de la récupération fonctionnelle respiratoire et motrice; et 2) investiguer l'impact de l'exercice physique exagéré sur les réponses inflammatoires dans le tissu musculaire et les défenses anti-infectieuses respiratoires chez la souris saine.

**-A-**

**Etude de l'intérêt de l'exercice physique dans la  
récupération fonctionnelle locomotrice et respiratoire  
chez la souris blessée médullaire haute**

# **1 GENERALITES**

## **1.1 Lésion médullaire**

Un traumatisme de la moelle épinière est un événement qui laisse la plupart des patients affaiblis ou paralysés tout au long de leur vie en raison de la capacité limitée du système nerveux central à guérir et du nombre restreint d'options thérapeutiques disponibles jusqu'à aujourd'hui.

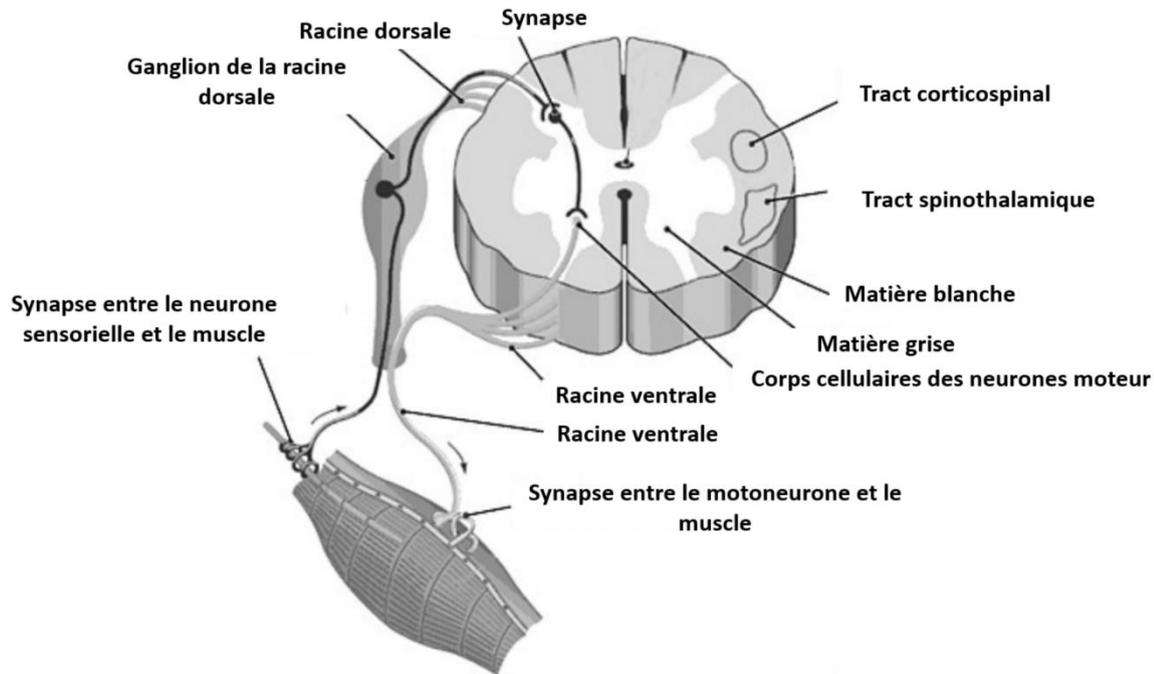
## **1.2 Anatomie de la moelle épinière**

La moelle épinière constitue la région la plus caudale de la structure du système nerveux central. Chez l'adulte, sa longueur peut varier entre 43 et 45 cm segmentée en parties : cervicale (8 segments), thoracique (12 segments), lombaire (5 segments), sacrée (5 segments) et coccygienne (1 segment) (8). Certaines variations existent entre souches et / ou espèces. Chez la souris, il existe généralement 7 segments cervicaux, 13 segments thoraciques, 6 segments lombaires et 4 segments sacrés ainsi qu'une longue série de segments plus caudaux correspondant à la queue (9).

Chez toutes les espèces, chaque segment vertébral est associé à une paire de nerfs (et de racines) situés bilatéralement. Chaque paire de nerfs est fonctionnellement divisée en deux : une partie dorsale constituée de fibres sensorielles pénétrant dans la moelle épinière par une racine dorsale bilatérale, et une partie ventrale, constituée de fibres motrices émergeant de la moelle épinière bilatéralement (8). Plusieurs couches de tissus protecteurs appelés méninges entourent la moelle épinière : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. La moelle épinière est organisée en matière blanche et grise

(Figure 1). Le rôle principal de la matière blanche est essentiellement de véhiculer des informations entre neurones (corps cellulaires dans la matière grise) de la moelle épinière ou du cerveau (10, 11). Elle est composée de cellules gliales (des oligodendrocytes formant des feuilles de myéline) ainsi que des faisceaux de fibres nerveuses (axones myélinisés) formant plusieurs voies (12). La matière grise, plus centralement située dans la moelle épinière, se caractérise par sa forme de papillon, qui contient des astrocytes et des oligodendrocytes, des synapses, des capillaires, et les cellules non myélinisées (corps cellulaires et dendrites) ainsi que des noyaux parasympathiques et des arcs réflexes (8).

Les voies ascendantes fournissent des signaux sensoriels associés avec le sens de la douleur, de la température, du toucher, de la pression, de la proprioception, et les vibrations à différentes structures cérébrales (par exemple thalamus, cervelet), alors que les voies descendantes transportent des informations motrices du cerveau vers la moelle épinière. La voie réticulospinale envoie des projections à tous les niveaux de la moelle épinière pour le contrôle autonome des fonctions cardiovasculaires et respiratoires, la locomotion, l'éjaculation, la miction et la défécation. De plus, la moelle épinière dispose d'un système qui participe au contrôle des muscles du cou et de la position de la tête. Ce système nommé le tractus vestibulospinal médial est l'un des tractus rachidiens descendant du funicule ventromédial de la moelle épinière. Il ne se trouve que dans la colonne cervicale et au-dessus. La partie médiale du tractus vestibulospinal est la partie la plus petite et principalement constituée de fibres du noyau vestibulaire médial. Ce noyau se projette bilatéralement le long de la moelle



épinière et déclenche dans la corne ventrale des circuits cervicaux spinaux, en contrôlant notamment les motoneurons inférieurs associés au nerf spinal accessoire (CN XI) (9). Ce dernier innerve le muscle sterno-cléido-mastoïdien et le faisceau supérieur du muscle trapèze.

### 1.3 Incidences des lésions médullaires

En 2016, les lésions de la moelle épinière ont une incidence de 130 cas par million de personnes et par an dans le monde (13). En outre, 50% des cas sont le plus souvent causés par des accidents de la voie publique (14). Les résultats cliniques dépendent de la gravité et de l'emplacement de la lésion qui peuvent inclure une perte partielle ou complète de la fonction sensorielle et / ou motrice en dessous du niveau de blessure.

*Figure 1: Illustration simplifiée d'une section transversale de la moelle épinière et ses connexions avec le muscle squelettique d'après Johnson et collaborateurs (10).*

Les lésions thoraciques inférieures peuvent provoquer une paraplégie tandis que les lésions au niveau cervical sont associées à la quadriplégie (15). En ce qui concerne le niveau de la lésion médullaire, l'endroit le plus communément affecté est la région cervicale, plus particulièrement au niveau du segment métamérique C5 (16). Les patients atteints d'une lésion médullaire, survivent souvent à ces blessures traumatiques pendant plusieurs décennies (17). Les patients qui ont besoin d'un fauteuil roulant pour les activités quotidiennes ont environ 75% d'espérance de vie normale, tandis que les patients qui n'ont pas besoin de fauteuil roulant et de cathétérisme vésical peuvent avoir une espérance de vie plus élevée, jusqu'à 90% d'un individu normal (18). Cependant, l'espérance de vie des personnes atteintes de lésion médullaire dépend fortement du niveau de la blessure et des fonctions préservées (18). D'après une méta-analyse réalisée par Kang et ses collaborateurs (en 2018), il a été observé que le coût de la vie d'un patient atteint d'une lésion médullaire au Canada est de 3,03 millions de dollars (19).

## **1.4 Comorbidités**

Chez les patients blessés médullaires, la prévalence des comorbidités est plus élevée que dans la population générale. Selon une revue bibliographique de Hamid et ses collaborateurs, il a été constaté que l'hypertension artérielle touchait 49% des patients atteints contre 26% dans la population générale, que l'hypercholestérolémie touchait 47% des patients atteints contre 30%, et que le diabète de type 2 touchait 19% des patients atteints contre 7% dans la population (14). En outre, les individus avec une lésion médullaire ont généralement un pourcentage de graisse corporelle plus élevé

(20). L'admission aux urgences liée à une cause infectieuse est également très fréquente chez les patients blessés médullaires, et responsable d'une mortalité importante (16).

## **1.5 Physiopathologie de la lésion médullaire**

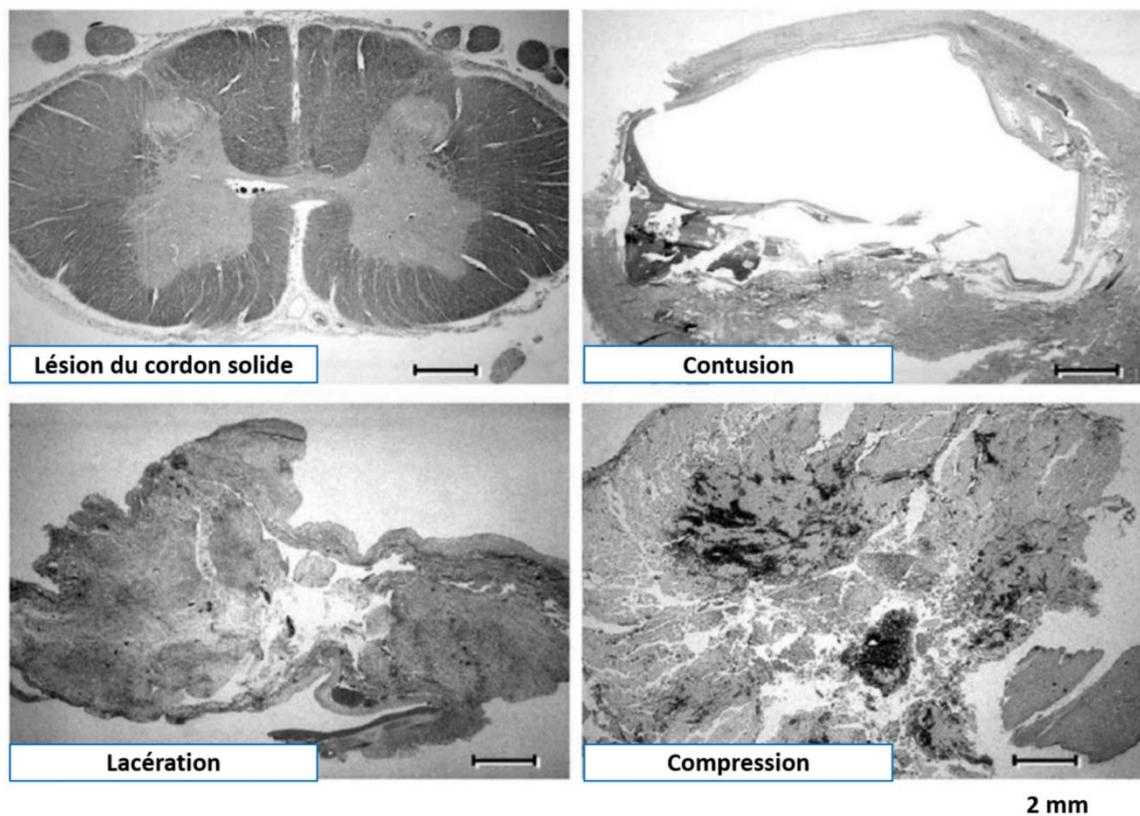
L'impact de la blessure dépend du type de traumatisme initial et de la condition sous-jacente de la moelle épinière. La différence entre compression et contusion réside dans le taux de déformation (21). Dans la contusion de la moelle, la force de compression conduit à une perturbation des axones et à des dommages au niveau des corps cellulaires des neurones, des cellules myélinisantes et de l'endothélium vasculaire. Une défaillance mécanique de la structure de la colonne vertébrale osseuse et ligamentaire peut entraîner une déformation physique de la substance du cordon (contusion) et / ou par lacération / compression directe par des fragments d'os (22).

### *1.5.1 Mécanismes physiopathologiques d'une lésion médullaire*

Les lésions de la moelle épinière peuvent être secondaires à une compression, une contusion, une lacération ou lésion vasculaire (23). Sur la base des résultats macroscopiques de tissu post-mortem humain (Figure 2), les blessures peuvent être classées en quatre groupes: (a) une lésion du cordon solide, type le moins courant, qui est associée à l'apparence normale du cordon après une blessure; (b) la contusion, type le plus courant, qui est associée à des sections d'hémorragie et à une nécrose ou cavitation en expansion, mais sans perturbation de la surface du cordon; (c) la

lacération, où se trouve une perturbation nette de l'anatomie de la surface; et (d) une compression massive, où le cordon est macéré à des degrés divers (24).

En dehors des cellules gliales, il y a très peu de tissu conjonctif dans la moelle épinière par rapport aux nerfs périphériques, qui sont beaucoup plus résistants. La



*Figure 2 : Section transversal de la moelle épinière de différents type de trauma d'après Norenberg et collaborateurs (24)*

structure principalement lipidique de la moelle épinière explique en partie sa vulnérabilité aux blessures. Après le trauma, un déficit neurologique maximal est observé immédiatement après une lésion médullaire car la transmission axonale est perturbée ou bloquée par des lésions cellulaires neuronales brusques, des lésions endothéliales et des vaisseaux sanguins, une hémorragie et des changements massifs du potentiel membranaire et des concentrations ioniques (22).

### *1.5.2 Réponse inflammatoire dans la lésion médullaire*

Contrairement à d'autres tissus, la moelle épinière n'est pas exposée à l'inflammation. Les cellules endothéliales forment normalement une barrière qui exclut les composants sanguins du système nerveux central (SNC) (21). Cette barrière hématoencéphalique est caractérisée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et de fortes interactions entre les processus environnants des astrocytes et de la lame basale. Ainsi, les macrophages, les lymphocytes sont rarement observés dans la moelle épinière normale et la microglie intrinsèque est au repos, en d'autres mots, ces cellules sont quiescentes (21, 25). Cependant, lors d'un trauma de la moelle épinière, les dommages endothéliaux sont les principaux événements qui déclenchent la cascade d'inflammation médullaire (Figure 3). Des lacunes mécaniques entre les cellules endothéliales se développent dans les 1 à 5 minutes suivant la blessure, entraînant des dommages de la membrane basale, une extravasation des globules rouges, une agrégation plaquettaire et un dépôt de fibrine. Les agrégats plaquettaires obstruent les vaisseaux conduisant à une ischémie. Les lacunes endothéliales favorisent l'afflux de liquide et de protéines, provoquant ainsi un œdème (21, 25, 26). Ces événements favorisent l'activation de la microglie et l'infiltration par des leucocytes. Les lamelles basales sont encore dégradées en raison de l'expression endothéliale accrue de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM) (27, 28). Ces événements aggravent encore la perte d'intégrité endothéliale, augmentant la perméabilité vasculaire et l'afflux de leucocytes. Les cytokines proéminentes présentes après le trauma médullaire comprennent IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et TGF-1. L'expression

précoce du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 par la microglie améliore le recrutement de cellules inflammatoires sur le site de la lésion tandis qu'IL-1 $\beta$  est régulée à la hausse dans l'heure suivant la blessure et peut persister au moins sept jours (29). Les cellules inflammatoires qui répondent à cette situation sont la microglie, les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Les neutrophiles pénètrent dans la moelle épinière endommagée immédiatement après une blessure. La microglie, les neutrophiles, les macrophages offrent donc, une immunité innée et les lymphocytes une immunité adaptative (22).

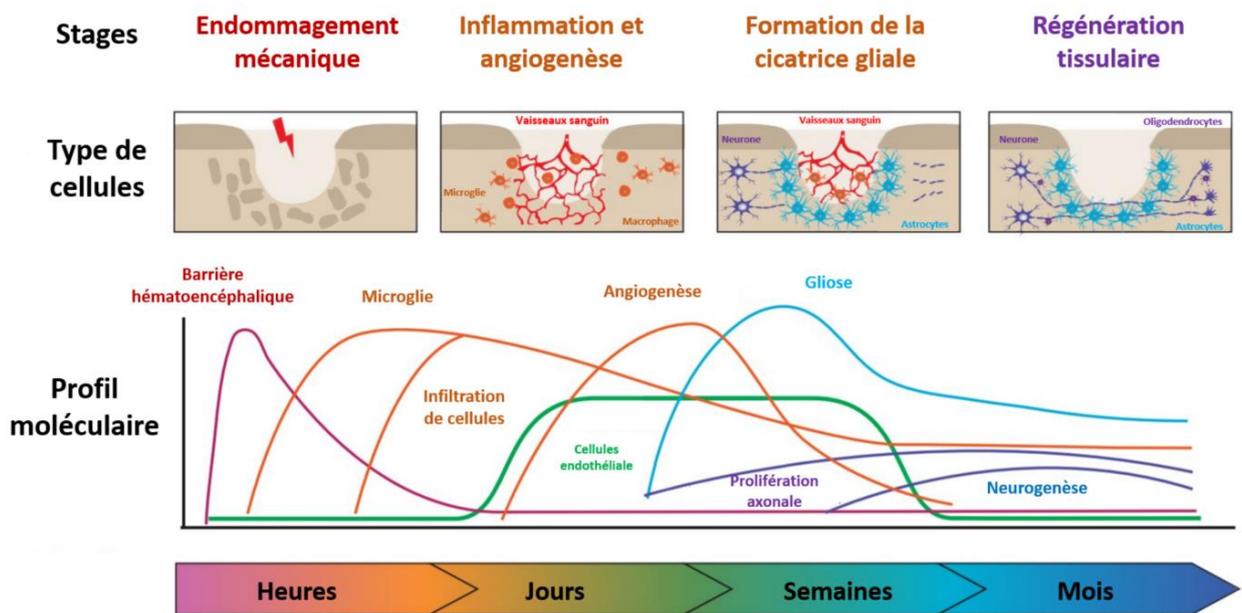
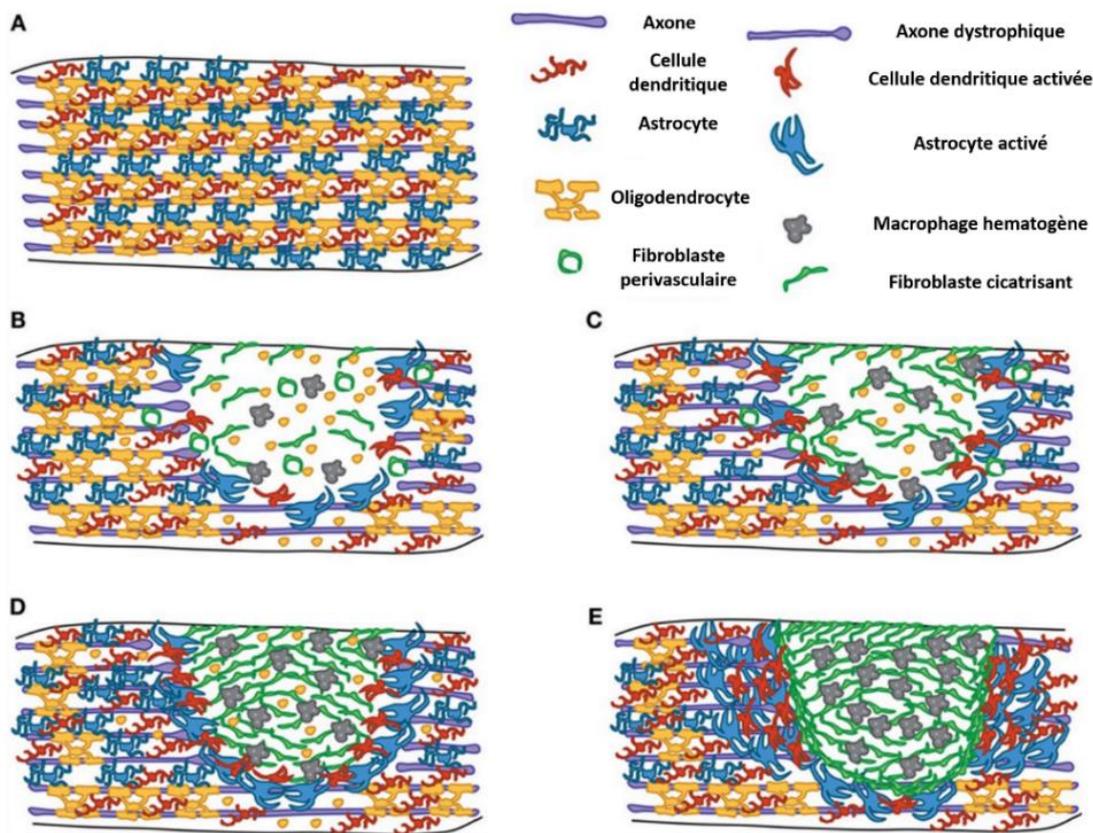


Figure 3 : Processus moléculaire après lésion médullaire au cours du temps d'après Rust et Kaiser (29)

Une lésion médullaire, par exemple de type contusion, conduit à une mort à grande échelle des cellules neuronales et gliales sur le site de la blessure, un cisaillement des axones ascendants et descendants, et des dommages du système vasculaire. L'hémorragie causée induite par le trauma conduit à la libération de facteurs

contribuant à la réponse immunitaire et aux réponses de la glie résidente (30, 31). En dehors de la microglie qui s'accumule autour du site de la lésion et qui sécrète des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, les astrocytes prolifèrent également et deviennent « réactifs ». Ainsi, ils s'hypertrophient et régulent l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), sécrètent des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, et surexpriment des chondroïtines sulfate protéoglycanes (CSPG). Ces dernières vont contribuer à la formation de cicatrice gliale, agissant comme une barrière contre les nouveaux axones en croissance dans le site de la lésion. Cela expliquerait pourquoi la moelle épinière n'a pas d'auto régénération (31). Les événements de la formation cicatricielle sont détaillés dans la Figure 4 (32).



4 : Schéma illustrant les événements de formation de cicatrice après une lésion médullaire contusive chez la souris d'après Hackett et Lee (29). (A) Astrocytes (bleu), cellules dendritiques (rouge) et oligodendrocytes myélinisants (jaunes) dans la substance blanche de la moelle épinière indemne. (B) Bien après le trauma médullaire, la mort cellulaire se produit dans le site lésionnel et les axones sont endommagés. La microglie (non représentée) et les astrocytes répondent en sécrétant des cytokines et des chimiokines. Les cellules dendritiques réagissent et prolifèrent autour du site de la lésion. Les macrophages (en gris) commencent à s'infiltrer au site de la lésion et les fibroblastes périvasculaires (verts) commencent à se délaminer des vaisseaux sanguins. (C) L'inflammation provoque la mort secondaire des oligodendrocytes et des neurones, conduisant à une accumulation de débris de myéline dans le site de la lésion. (D) Le pic de densité des macrophages et des fibroblastes peut durer de 7 jours à 2 semaines après post-lésionnel. (E) Formation de la cicatrice fibrotique (constituée de fibroblastes et de macrophages) et de la cicatrice gliale (constituée des astrocytes réactifs, des cellules dendritiques et de la microglie).

## 1.6 Conséquences d'une lésion médullaire haute

Lors d'une lésion dans la région haute de la moelle épinière, l'insuffisance respiratoire est une complication courante (1, 2). Cela représente une proportion importante de la morbidité et de la mortalité (3). Plus le niveau de blessure est élevé,

plus le degré de dysfonction ventilatoire est prononcé (2). Ces conditions font que les patients sont : soit placés sous ventilation mécanique, soit stimulés au niveau du nerf phrénique des muscles respiratoires (diaphragme, intercostaux) pour leur garantir une ventilation nécessaire à leur survie (3).

Dans cette structure, les motoneurons qui innervent les muscles respiratoires sont répartis dans toute la moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire (innervant respectivement le diaphragme, les intercostaux et les abdominaux) (33). Toutefois, une lésion dans ces sites peut affecter la fonction respiratoire. Pour les blessures aux niveaux thoracique et lombaire, les voies motrices contrôlant les muscles intercostaux et abdominaux sont touchées. Cependant, c'est au niveau cervical que les voies médiées par le système moteur phrénique et le diaphragme seront largement impactés et aboutiront à des déficits de comportements respiratoires (Figure 5) (34, 35). Une altération du drainage des voies respiratoires (toux, expectoration) peut contribuer à des infections respiratoires secondaires potentiellement mortelles (36). Les déficits respiratoires les plus graves surviennent donc à la suite d'une lésion médullaire cervicale, qui non seulement dénature partiellement ou complètement les circuits respiratoires aux niveaux rachidiens thoracique et lombaire, mais compromet directement les circuits moteurs phréniques. Les motoneurons phréniques spinaux innervent le diaphragme, qui est le muscle inspiratoire principal (37, 38). Ainsi, les blessures compromettant la fonction motrice phrénique entraînent une paralysie / parésie du diaphragme et nécessitent généralement une ventilation assistée (39, 40).

Malgré ces résultats dévastateurs, des recherches approfondies ont montré un certain potentiel de plasticité respiratoire et de récupération fonctionnelle spontanée après une lésion dans cette région (41). Alors que la quantité de récupération attribuable à la plasticité est limitée, plusieurs études ont montré que le début et l'étendue de la plasticité peuvent être améliorés à l'aide d'interventions thérapeutiques (41, 42).

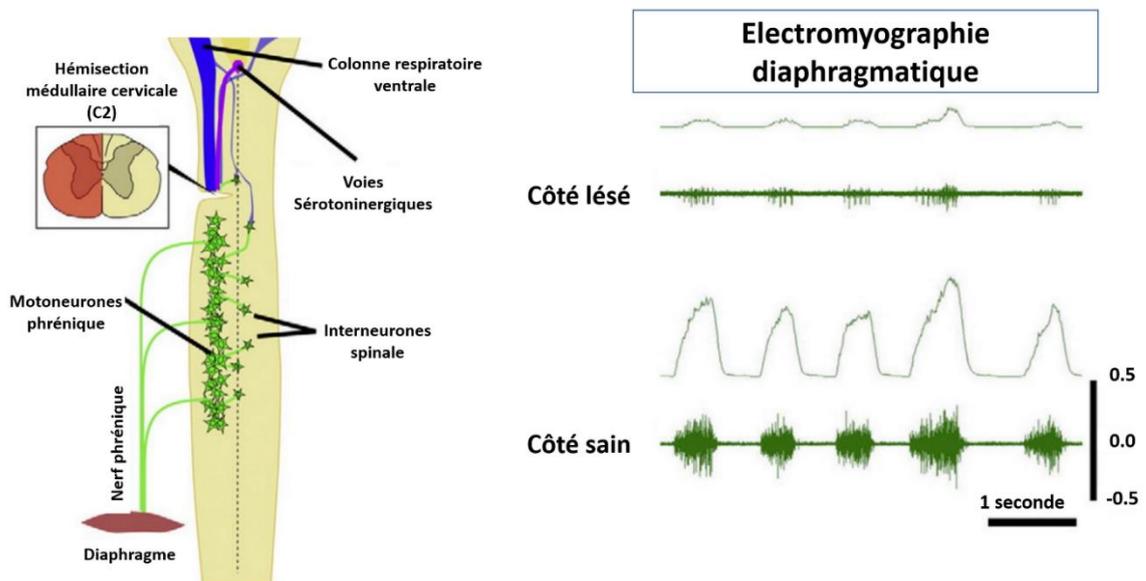


Figure 5: Illustration schématique d'une hémisection de la moelle épinière cervicale et son impact dans l'activité diaphragmatique. Figure adaptée de Lane 2011 et adapté d'après Hormigo et ses collaborateurs (42).

### 1.6.1 Réorganisation des connexions neuronales post lésion médullaire

Suite à une lésion médullaire, il y a une réorganisation des connexions neuronales et activation des voies latentes épargnées qui peuvent conduire à une plasticité fonctionnelle, par exemple, une restauration de l'activité dans les voies endommagées, une augmentation de l'activité dans les voies épargnées pour compenser les dommages, ou encore un renforcement synaptique. Une lésion de la moelle épinière peut entraîner

une plasticité dans le cerveau, le tronc cérébral, la moelle épinière, les nerfs périphériques et les muscles (33, 43-46). En contrepartie les changements neuroplastiques ne se traduisent pas toujours par des améliorations fonctionnelles et peuvent même entraîner des fonctions inadaptées, comme par exemple des douleurs et de la spasticités (24).

La région la plus commune de lésion médullaire est la partie haute, cervicale. Il s'agit d'une région où la formation et la rétention de connexions neuronales sont en partie pour l'activité respiratoire, l'activité motrice haute et l'activité sensorielle. Une activité augmentée et / ou répétitive dans les voies matures renforce les circuits neuronaux existants (augmentant la croissance synaptique et dendritique), affine et élague la connectivité non pertinente par la compétition synaptique, et peut favoriser le recrutement de neurones supplémentaires dans ces voies tout en préservant la sélectivité. En conséquence, ces changements neuroplastiques peuvent être exploités par un gain thérapeutique. Les traitements conçus pour stimuler l'activité neuronale peuvent contribuer à la formation de nouvelles voies neuronales et à la réparation de celles qui sont endommagées, entraînant finalement une amélioration de la fonction après une lésion de la moelle épinière (41, 47).

### *1.6.2 Plasticité post lésion médullaire*

La neuroplasticité peut être définie comme la capacité du système nerveux à effectuer des changements anatomiques et fonctionnels qui entraînent des altérations persistantes de la fonction sensori-motrice. Ces changements peuvent être médiés par une série de facteurs, tels qu'une expérience (par exemple, l'apprentissage), une activité

persistante (par exemple, l'exercice physique) ou une blessure (48). De plus, cette plasticité peut survenir « spontanément » (sans interférence extérieure) suite à une lésion médullaire traumatique et / ou suite à une intervention thérapeutique (induite par des influences extérieures) (46).

### *1.6.3 Plasticité musculaire post-lésion médullaire*

Une lésion de la moelle épinière entraîne des déficits neuromoteurs permanents qui modifient la vie en raison de la capacité de récupération limitée du système nerveux central. Lorsque la blessure est située au niveau cervical, les fonctions sensori-motrices en dessous du site de la lésion sont perdues et l'insuffisance respiratoire permanente est induite (2, 49). Pour l'étude de cette pathologie, le rat est le modèle le plus utilisé (50) tandis que, le modèle de lésions cervicales chez la souris vient d'être étudié pour évaluer la récupération post-traumatique spontanée locomotrice et la récupération des muscles respiratoires (50-52). En ce sens, les études moléculaires sont importantes pour améliorer les connaissances sur les mécanismes impliqués dans la lésion médullaire cervicale. Cependant, le modèle de rat est limité en raison de la faible disponibilité des spécimens génétiquement modifiés. D'autre part, les souris, avec un grand nombre de souches génétiquement modifiées peuvent être utilisées pour déchiffrer les interactions moléculaires et cellulaires (53, 54). Caractérisée pour induire une insuffisance respiratoire, après lésion dans la région cervicale, la récupération du diaphragme est assez limitée chez la souris (55-57). Nous avons montré pour la première fois que la récupération du diaphragme reste significativement réduite 30 jours après une blessure dans le modèle souris (58). En fait, le diaphragme est le

principal muscle responsable de la respiration et participe également à des comportements non-ventilatoires, tels que la toux ou les éternuements (37, 59, 60). En outre, les lésions de de la moelle épinière affectent d'autres composants de l'unité motrice de diaphragme : principalement au niveau de la jonction neuromusculaire, mais aussi le type et la taille des fibres musculaires (56). Ainsi, il a été démontré chez le rat qu'au niveau morphologique, un jour après la lésion, il y a une réduction de la section transversale du diaphragme ipsilatéral (c'est-à-dire du côté de la lésion) de myofibres du type I et IIa, tandis que les myofibres du type IIb/x sont réduits (pour leur surface transversale) à 1 et à 7 jours (61). En outre, à 42 jours, la taille des myofibres de type IIb/x est réduite, et l'hypertrophie n'est plus évidente dans les myofibres de type I ou II (56). Ces résultats suggèrent que les rats blessés médullaire présentent une grande capacité de remodelage musculaire après lésion. De plus, l'affaiblissement et la paralysie des muscles squelettiques, qui sont innervés en dessous du niveau de lésion, s'accompagne d'un « switch » de myofibres de phénotype oxydatif à un phénotype fortement glycolytique, et donc fatigable chez les animaux et les humains (61-63). Autrement dit, la capacité mitochondriale du muscle squelettique est fortement réduite après lésion médullaire avec raréfaction capillaire du muscle, (64). Cette raréfaction altère la capacité à fournir de l'oxygène et des nutriments aux muscles qui travaillent, contribuant ainsi à la réduction de la résistance à l'effort et à la fatigue (65).

## **1.7 Modèles précliniques de lésion médullaire**

Malgré la richesse des données disponibles dans la littérature sur la physiopathologie de la lésion médullaire, de nombreuses questions restent encore sans

réponse. La possibilité de reproduire la récupération post-traumatique de la lésion médullaire par une intervention thérapeutique, aide à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces améliorations. Ainsi, des stratégies utilisant par exemple, le réentraînement à l'effort dans des modèles animaux de lésion médullaire, peuvent être utiles pour améliorer les protocoles de réhabilitation chez les patients blessés médullaire.

### *1.7.1 Protocoles de réhabilitation utilisés chez des modèles précliniques de trauma médullaire*

De manière générale, les modèles de réhabilitation des membres postérieurs chez les rongeurs après lésion médullaire peuvent être classés en paradigmes volontaires et forcés (47). L'entraînement volontaire englobe les environnements enrichis et la course sur roues, tandis que les options d'entraînement forcé impliquent par exemple la marche sur un tapis roulant, le vélo ou la natation (Figure 6). L'entraînement sur tapis roulant avec ou sans assistance de poids corporel est le paradigme de locomotion forcée le plus couramment utilisé expérimentalement. Les rongeurs montrent une récupération fonctionnelle accrue avec un entraînement sur tapis roulant après une lésion médullaire incomplète (66). Des études ont montré qu'une faible intensité d'entraînement semble être plus bénéfique sur tapis roulant en améliorant la commande synaptique excitatrice des voies de la colonne dorsale et l'activité motrice spontanée (67, 68). Par rapport à l'activité motrice ou récupération fonctionnelle, ces paramètres sont habituellement évalués par la méthode de plein champ, nommée score de Basso, Beattie, Bresnahan (69).

D'autres stratégies de réadaptation forcée sont moins couramment utilisées. Le vélo est une méthode forcée mais passive assez rarement utilisée chez les rongeurs. Dans ce modèle de rééducation, les membres postérieurs de l'animal sont généralement déplacés par un appareil sur mesure. D'après la revue de Loy et Bareyre en 2019, d'autres types d'interventions comme la nage est limitée aux blessures incomplètes de la moelle épinière, et fournit également un support de poids corporel à l'animal, analogue à l'entraînement sur tapis roulant. Cette approche d'entraînement est plutôt non physiologique et inhabituelle pour les rongeurs et n'induit pas directement la capacité de progression qui se traduit par de légères améliorations après une blessure lésion médullaire.

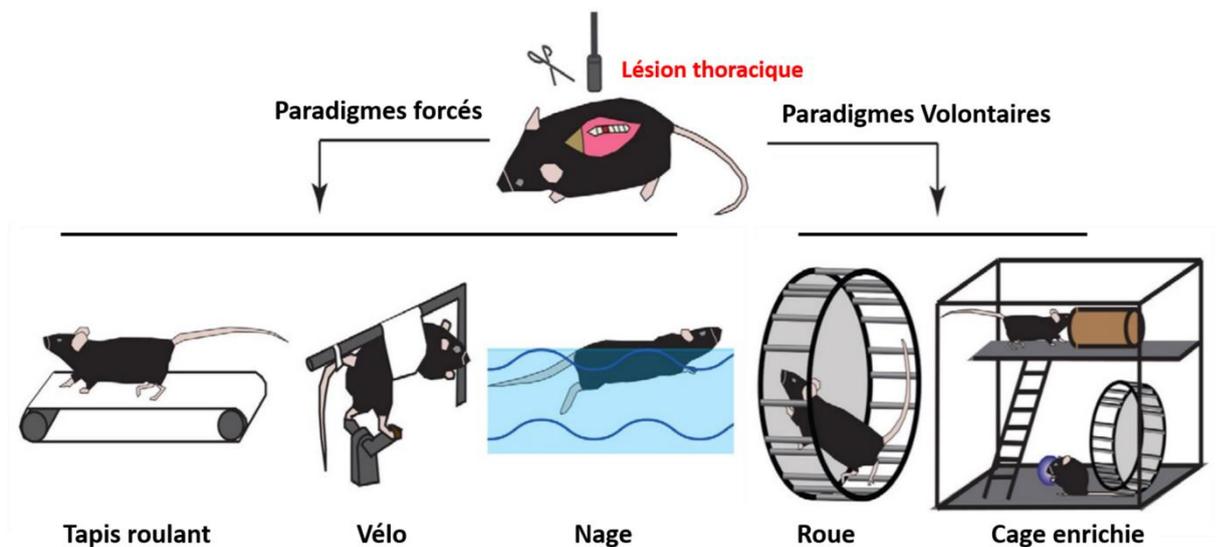


Figure 6: Stratégies de rééducation chez le rongeur blessé médullaire divisée en paradigme forcé et volontaire d'après Loy et Bareyre (47)

### *1.7.2 Etude de la physiopathologie des traumatismes médullaires chez des modèles précliniques*

L'utilisation de modèles précliniques a permis de nombreuses avancées dans ce domaine. Des expériences réalisées chez le chat spinalisé montrent une récupération de la capacité de marcher avec un entraînement sur tapis roulant (70, 71). De plus, l'entraînement sur tapis roulant favorise à la récupération locomotrice après une lésion partielle de la moelle épinière chez le chat (72). Cependant, la plupart des recherches animales sont réalisées sur des rongeurs, rats ou souris, en raison de leur large disponibilité et de la possibilité d'interventions génétiques et chirurgicales. Une publication parue en 2017 a constaté que sur 2228 études utilisant des modèles animaux (Figure 7), le rat est le modèle le plus utilisé (72,4%). Ce modèle est peu coûteux, avec des infections chirurgicales relativement rares et dispose de techniques d'analyse fonctionnelle. En ce qui concerne le site lésionnel le plus étudié, la région vertébrale la plus couramment étudiée est la région thoracique (81%), suivie par la région cervicale (12%) (50).

Des modèles de lésion médullaire chez la souris sont de plus en plus mis en œuvre pour étudier la biologie cellulaire et moléculaire des lésions médullaires. Il est estimé que 16% des modèles de lésion médullaire utilisent des souris (50). Les avantages chez la souris incluent un génome similaire à l'homme, la facilité de manipulation, un taux de reproduction élevé et de faibles coûts d'utilisation. Cependant, la petite taille de l'animal augmente la difficulté des procédures chirurgicales et d'implantations d'appareils.

Cependant, malgré la faible utilisation et la difficulté de ce type d'intervention chez la souris, j'ai acquis, au sein de mon laboratoire d'accueil, la capacité de développer un modèle de lésion médullaire cervicale haute chez cette espèce. En effet, nous sommes un des rares laboratoires dans le monde à travailler sur ce type de modèle préclinique. Par conséquent, il n'y a pas de données disponibles à ce jour qui montrent

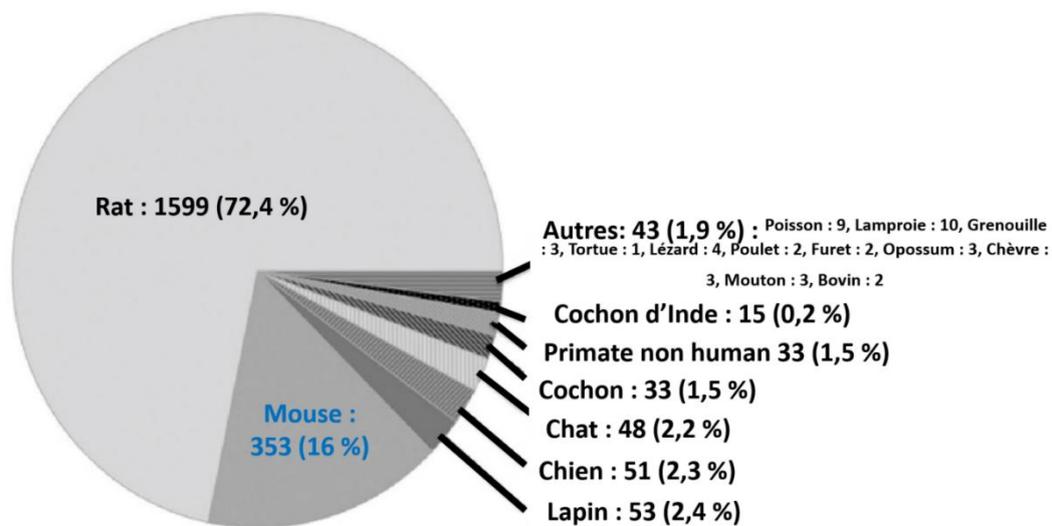


Figure 7: Les espèces animales utilisées dans 2209 études de lésions de la moelle épinière d'après Sharif-Alhoseini (54)

le rôle d'une intervention thérapeutique avec exercice chronique chez la souris. Ainsi, une étude sur ce sujet est de grande importance, car comme déjà mentionné précédemment, les lésions cervicales peuvent entraîner des troubles respiratoires et sont associées à un taux de mortalité élevé. De plus, les personnes souffrant d'une lésion médullaire peuvent aussi souffrir d'une paralysie spastique caudale au niveau de la blessure, avec une perte sensorielle, des douleurs chroniques, ainsi que des dysfonctions gastro-intestinales, cardiovasculaires et sexuelles.

## 1.8 Rôle de l'exercice dans la lésion médullaire

Une rupture complète de la moelle épinière entraîne une perte permanente et irréversible de toutes les connexions neuronales caudales au niveau de la blessure et la récupération fonctionnelle est hautement improbable. Cependant, les blessures incomplètes, par exemple dans laquelle une partie des tissus de la moelle épinière ont été épargnés, ont un potentiel de récupération dont l'étendue dépend de l'emplacement et de l'ampleur des tissus non lésés. Environ 42% de toutes les lésions de la moelle épinière sont considérées comme fonctionnellement complètes, le patient se présentant sans aucune fonction motrice et sensorielle en dessous de la section affectée. D'après une étude de Kakulas et ses collaborateurs (2004), environ 25 à 30% de toutes les blessures jugées fonctionnellement complètes ont également une certaine étendue de connexions épargnées qui pourraient potentiellement être récupérées avec une intervention adéquate (73).

### *1.8.1 Bénéfices secondaires de l'exercice post-lésion médullaire*

La réadaptation locomotrice est une des interventions les plus bénéfiques pour les personnes touchées. En revanche, la compréhension des mécanismes neuronaux sous-jacents entraînant des améliorations motrices induit par l'exercice locomoteur ne sont pas encore totalement comprises (74). De plus, une intervention locomotrice pour ré-entraîner une personne blessée médullaire ne suffit pas pour réaliser les activités de la vie quotidienne. Par conséquent, le risque de problèmes de santé liés à l'inactivité physique comme la prise de poids et l'obésité, les dyslipidémies, l'hyperglycémie, les maladies cardiovasculaires sera toujours présent. Un programme d'exercice est

nécessaire pour améliorer la forme physique et réduire les complications de santé à long terme après une lésion médullaire. C'est pour cette raison que des recommandations d'exercice pour améliorer la santé cardiovasculaire, la force, l'endurance musculaires et la souplesse de ces personnes atteintes de lésion médullaire ont été publiées en 2015. Ces recommandations visent à réduire les complications de santé en évitant une possible ré-hospitalisation des patients blessés médullaires (75). L'utilisation d'un programme de réentraînement lié avec une autre stratégie thérapeutique, comme par exemple, la stimulation épидurale et l'entraînement locomoteur, peut être très efficace. Ce type d'intervention active également les circuits neuronaux de manière localisée ou plus générale. Ainsi, la persistance de ce réentraînement physique renforce les muscles utilisés, stimule la rétroaction afférente et stimule la plasticité neuronale (4, 5).

### *1.8.2 L'exercice physique et récupération fonctionnelle des muscles post lésion médullaire*

La littérature a bien établi que l'exercice améliore la récupération fonctionnelle après des blessures médullaires chez les rongeurs (41, 76, 77). Récemment, il a été montré que la stimulation musculaire électrique, qui mime les contractions musculaires de l'exercice physique, associée à un traitement par la testostérone a entraîné une hypertrophie des fibres musculaires et des modifications bénéfiques des marqueurs mitochondriaux et de la fonction motrice chez les personnes atteintes de lésion médullaire (78). Dans les modèles animaux et dans les études cliniques, la stimulation des muscles squelettiques par l'exercice lors de la réadaptation est une excellente

stratégie pour améliorer la capacité de récupération de mouvement des membres, et de la fonction respiratoire après lésion médullaire haute (76, 77, 79). Ces données renforcent l'hypothèse que la stimulation des muscles des membres peut être utile à la récupération fonctionnelle respiratoire après lésion médullaire. La modulation du réseau microvasculaire du muscle diaphragmatique par l'exercice physique après lésion médullaire cervicale est peu connue. Chez la souris, l'effet d'un entraînement par exercice physique prolongé sur la plasticité locomotrice et des muscles respiratoires n'a pas encore été évalué après une lésion médullaire cervicale.

## **2 OBJECTIF DE L'ETUDE**

L'objectif de cette étude est de démontrer la faisabilité d'employer un modèle souris d'hémisection cervicale partielle de la colonne vertébrale au du deuxième segment métamérique cervical (C2) pour étudier l'impact de l'entraînement physique sur la plasticité des muscles locomoteurs/respiratoires.

Pour ce faire, j'ai mis au point un programme d'exercice physique de 6 semaines après traumatisme de la moelle épinière cervicale chez la souris pour déterminer son effet au niveau de la récupération fonctionnelle respiratoire et motrice. Ainsi, la roue d'exercice forcée a été utilisée comme outil d'entraînement. J'ai également évalué sur le système de roue d'exercice forcé, la capacité de course de l'animal (à différents temps post-lésion).

Après la fin du protocole d'entraînement physique de 6 semaines, j'ai enregistré l'électromyogramme diaphragmatique pour déterminer la récupération de l'activité du diaphragme des souris à 51 jours après lésion.

J'ai réalisé des analyses biomoléculaires sur le membre antérieur locomoteur (extenseur digitorum communis (EDC)), les membres postérieurs (tibialis antérieur (TA) et soléaire (SOL), et le muscle respiratoire (diaphragme : DIA).

### **3 MATÉRIEL ET METHODES**

#### **3.1 Modèle préclinique de souris hémi-lésée médullaire (in vivo)**

L'espèce animale choisie est le modèle de souris transgénique Nrf2 KO commercialisé par la société RIKEN Biosource dont la reproduction a été effectuée à l'UFR de Sciences de la Santé Simone Veil – Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines sous la licence APAFIS\_2018011916127707\_v4 approuvée par le Comité de protection et d'utilisation des animaux en vigueur et par le Ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Innovation. Ces expériences ont été réalisées sur des souris mâles et femelles adultes C57BL/6 hétérozygotes Nrf2 (Nrf2+/-) (8-10 semaines). Les animaux étaient logés dans des cages ventilées individuellement dans un établissement de soins aux animaux à la fine pointe de la technologie (2CARE, accréditation A78-322-3, France), avec accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum* sur un cycle léger/foncé de 12 h. Nous avons notre propre centre d'élevage de souris et nous avons toujours été prudents sur la séparation d'un nombre animal égal par sexe entre les groupes. Cependant, des décès se sont produits après la procédure d'hémisection C2, et par conséquent les groupes n'ont pas été uniformément assortis en fonction du sexe.

#### **3.2 Protocole d'exercice incrémental**

Au total, 36 animaux ont été familiarisés avec le système de roues d'exercice forcé (Lafayette Inst., Lafayette, IN) pendant 1 semaine (6 m/min, 10 min par jour). Après la période d'acclimatation, toutes les souris ont effectué un test d'exercice incrémental

adapté au système de roue d'exercice forcé (voir Jesus et *coll.* (80). Pour ce faire, des incréments de 2 m/min toutes les 2 m/min, jusqu'à épuisement, défini comme le moment où les animaux étaient incapables de maintenir le rythme dans la roue ou l'animal a cessé de courir spontanément. Une barrière en polystyrène sur mesure a été mise au point pour motiver l'animal à continuer à courir. Après un premier test d'exercice incrémentiel (avant la chirurgie de la SCI), les souris ont été séparées au hasard en 3 groupes : NAIVE (sans chirurgie; n=12, 6 femelles et 6 mâles), SHAM (avec chirurgie mais sans hémisection C2; n=12, 8 femelles et 4 mâles) et SCI (avec la chirurgie d'hémisection C2; n=12, 5 femelles et 7 mâles). Par la suite, chaque groupe NAIVE, SHAM et SCI a été réparti de façon égale (n=6 à chaque groupe) à des sous-groupes sédentaires (sans entraînement) ou entraînés (SED ou TR). Aucune différence dans les résultats des tests incrémentaux n'a été observée entre les sexes. Un deuxième test d'exercice incrémental a été effectué 7 jours après la chirurgie pour les groupes SCI et SHAM pour déterminer l'intensité du protocole d'exercice (60% de la vitesse maximale atteinte). À la fin du protocole d'exercice de 6 semaines, des souris

sédentaires et entraînées ont effectué un troisième test incrémental pour évaluer leur capacité de course à 49 jours après la chirurgie SCI/SHAM (Figure 8).

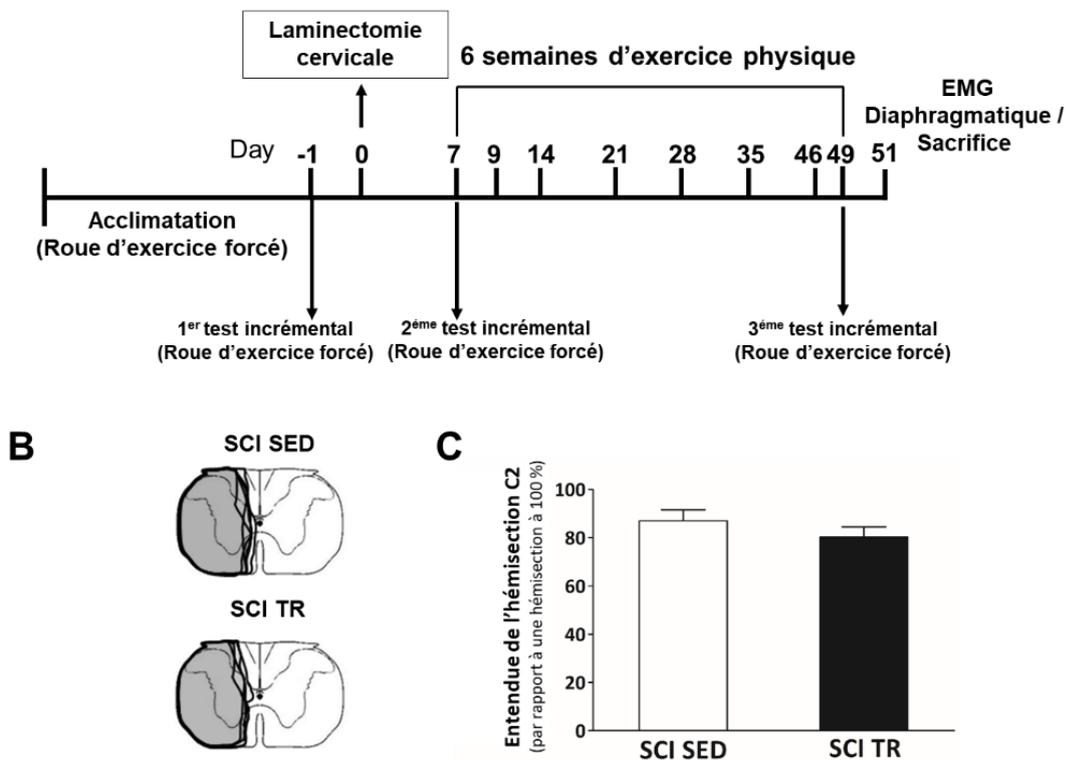


Figure 8 : A Schéma expérimental de l'étude. B Représentation schématique de l'étendue des blessures pour chaque animal dans les groupes SCI SED et SCI TR. C Quantification de l'étendue des blessures en pourcentage par rapport à une moelle épinière 100% hémisection

### 3.3 Hémisection chronique C2

La lésion spinale cervicale est obtenue en effectuant une hémisection spinale au niveau du deuxième segment métamérique (C2) qui interrompt de manière unilatérale les projections respiratoires bulbospinales avec pour conséquence une abolition de l'activité phrénique et diaphragmatique du côté lésé. Le côté controlatéral sain permet la survie de l'animal. La fonction locomotrice est également interrompue pendant

quelques jours. Au bout d'une semaine, l'animal retrouve une certaine mobilité. Pour développer le modèle préclinique d'hémisection médullaire, l'animal est anesthésié à l'isoflurane (Vetlurane 2.5% dans 100% O<sub>2</sub>) puis placé en decubitus ventral sur une plaque chauffante afin de maintenir sa température à environ 37,5 °C. Une fois la partie dorsale rasée et désinfectée (bétadine puis alcool 70°x3), une incision dorsale rostro-caudale de la peau est pratiquée, suivie d'une incision de muscles acromiotrapezius, rhomboïdes et spinaux entourant la vertèbre cervicale C2. Une laminectomie dorsale au niveau de la vertèbre C2 est pratiquée, puis la dure-mère est disséquée afin d'atteindre la moelle épinière. Une section spinale latérale sous la racine C2 est pratiquée à l'aide d'un microscalpel. Les muscles et la peau sont ensuite recousus, puis l'animal reçoit une injection sous-cutanée d'antibiotique (Borgal 30 mg/kg) et d'antidouleur (Buprecare 0.03 mg/kg) puis est placé dans une cage de réveil. Les animaux sont sous surveillance constante ont accès à l'eau et à la nourriture standard ad libitum. Aucune détresse respiratoire postopératoire n'est observée car un seul côté de l'animal est paralysé, le côté épargné permet la survie. Une paralysie transitoire des pattes avant et arrière du côté lésé est observée. L'animal retrouve une certaine mobilité après environ une semaine.

### **3.4 Protocole d'entraînement physique sur roue d'exercice forcé**

L'entraînement physique a été appliqué pendant 6 semaines (1 semaine après chirurgie) et consistait à courir sur un système de roue d'exercice à 60% du deuxième test incrémental (7 jours après la chirurgie de d'hémisection médullaire C2), 1 heure par jour et 5 jours par semaine. L'intensité de l'entraînement à l'exercice a été adaptée

du protocole décrit précédemment par Ferreira *et coll.* (81). Les souris sédentaires ont été maintenues dans la roue fixée pendant toute la durée de la session d'exercice.

### **3.5 Enregistrements électrophysiologiques**

Deux jours après le dernière test incrémental (49 jours après la chirurgie d'hémisection médullaire), l'anesthésie est induite en utilisant 5% d'isoflurane dans 100% d'O<sub>2</sub> et maintenue tout au long de l'expérience (2,5% dans 21% d'O<sub>2</sub>) à travers d'un cône nasal. La profondeur de l'anesthésie est vérifiée par une absence de réponse à une stimulation des coussinets au niveau de la patte. Une laparotomie est réalisée pour accéder au diaphragme. Les deux côtés (ipsilatéral et controlatéral de la lésion de la moelle épinière) du diaphragme sont testés pour leur activité (électromyographie) à l'aide d'une électrode en argent de surface bipolaire faite à la main sur le muscle pendant une asphyxie spontanée poïkilocapnique normoxique ou transitoire légère (par occlusion du nez de l'animal pour 15 s). Les électromyographies sont amplifiées (modèle 1800; gain, 100; A-M Systems, Everett, WA, USA) et filtrées passe-bande (100 Hz à 10 kHz). Les signaux sont numérisés avec un appareil d'acquisition de données Powerlab à 8 canaux (taux d'acquisition: 4 k / s; AD Instruments, Dunedin, Nouvelle-Zélande) connecté à un ordinateur et analysés à l'aide du logiciel LabChart 9 Pro (AD Instruments, Dunedin, Nouvelle-Zélande). Les électromyographies diaphragmatiques bilatérales ont été intégrées (désintégration de 50 ms). A la fin de l'expérience, les animaux sont euthanasiés humainement par du CO<sub>2</sub>, puis une perfusion intracardiaque de NaCl à 0,9% hépariné (10 ml) est réalisée pour la récolte de tissus. Le segment C1-C3 de la moelle épinière est disséqué et placé immédiatement pendant une nuit dans

du paraformaldéhyde froid à 4%, puis cryoprotégé pendant 48 h dans 30% de saccharose (dans 0,9% de NaCl) et les échantillons est conservés dans un congélateur à -80 ° C. Le muscle du membre antérieur l'Extensor Digitorum Communis et des membres postérieurs le Tibialis antérieur et le Soléaire du côté ipsilatéral, et le muscle respiratoire diaphragmatique (Ipsilatéral et controlatéral) sont ensuite disséqués et immédiatement congelés instantanément dans de l'isopentane (2-méthylbutane) refroidi à l'azote liquide. Après congélation, les échantillons musculaires sont stockés à -80 ° C pour un traitement ultérieur.

### **3.6 Immunofluorescence des tissus musculaires**

Tous les muscles squelettiques congelés ont été placés dans un cryostat de Leica et des sections transversales de 10 µm ont été exécutées. Comme décrit précédemment par Gill *et coll.* (61), les tissus ont été bloqués pendant 45 min dans le sérum de chèvre de 10% dilué dans la solution PBS 1X et incubées pendant la nuit à 4°C dans les anticorps primaires pour les isoformes suivants de chaîne lourde de Myosine (MyHC) : MyHCSlow (BA-F8, 1:100 dilution ; Études sur le développement Hybridoma Bank, Iowa City, IA), MyHC2A (SC-71, 1:100 dilution; Developmental Studies Hybridoma Bank), et Laminin (Sigma L9393, 1:200 dilution; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Les anticorps secondaires ont ensuite été incubés à une dilution de 1:2000, en utilisant Alexa Fluor Goat anti-Mouse IgG2b 647 (pour MyHCSlow), Goat anti-Mouse IgG1 555 (pour MyHC2A) et Goat anti-Rabbit 594 (pour Laminin) (61). CD 31 (PECAM-1, 1:100; L'anticorps Thermo Fisher Scientific, Inc., MA) a été incubé avec l'anticorps

Laminin et Alexa Fluor Goat anti-Rat 488 et Goat anti-Rabbit 594 ont été appliqués à 1:2000 dilution.

### **3.6 Mesures morphométriques des muscle squelettiques**

Des champs à l'intérieur de sections transversales tachées ont été capturés à  $10 \times$  grossissement sur un microscope confocal laser (Leica TCS SPE) capable d'imagerie simultanée de fluorescence multilabeled. Les images ont été capturées dans un tableau de  $1024 \times 1024$  pixels, avec des paramètres d'acquisition similaires dans les préparations. La composition des différents types de myofibers (barres d'échelle =  $200 \mu\text{m}$ ) a été mesurée en environ 200 fibres musculaires de chaque muscle dans chaque animal et a été analysée à l'aide de Fidji v1.52p (NIH Image du National Institutes of Health, USA). Les mêmes fibres sélectionnées pour les mesures transversales de la section ont également été utilisées pour déterminer la proportion de types de fibres dans chaque muscle. Basé sur le modèle de coloration, toutes les fibres de muscles squelettiques ont été classés comme type I, type IIa, type IIx et/ou IIb (61). Les cellules CD31-positives et le nombre de fibres ont été comptées alors, la densité et les rapports capillaires-fibre ont été calculés à l'aide de Fidji v1.52p (NIH Image des National Institutes of Health, USA).

### **3.7 Reconstitution histologique de l'étendue des blessures au C2**

Des sections longitudinales ( $30 \mu\text{m}$  d'épaisseur) ont été obtenues avec un cryostat leica et l'étendue de la blessure a été évaluée après coloration de violette crésyl comme décrit précédemment (58) . Des diapositives ont ensuite été numérisées à l'aide d'un

scanner Aperio AT2 (Leica, France) et une photo haute résolution de chaque diapositive a été prise pour évaluer l'étendue de la blessure et signalée sur un plan transversal stéréotaxique (C2). Chaque blessure a ensuite été numérisée et analysée avec le logiciel Image J (NIH). Le pourcentage de tissu endommagé sur le côté blessé a été calculé par référence à une hémisection complète (qui est de 100% de l'hemicord). Des sections longitudinales de la moelle épinière (30 µm d'épaisseur) ont été obtenues avec un cryostat de Leica et l'étendue de la blessure a été évaluée après coloration de violette crésyl. Un microscope léger a été utilisé pour évaluer l'étendue de la blessure et signalé sur un plan transversal stéréotaxique (C2). Chaque blessure a ensuite été numérisée et analysée avec Fiji v1.52p (NIH Image du National Institutes of Health, USA). Le pourcentage de tissu endommagé sur le côté blessé a été calculé par référence à une hémisection complète (qui est de 100% de l'hémisection).

### **3.8 Traitement des données et analyses statistiques**

Le signal d'électromyographie d'amplitude et de durée d'un minimum de 5 « Burst » traces intégrés pendant la respiration spontanée et l'asphyxie a été calculé pour chaque animal des deux côtés du diaphragme avec le logiciel LabChart 9 Pro (AD Instruments). Le test t (student) a été effectué entre les différents groupes pour l'étendue de l'évaluation de blessure ou entre les différents groupes de temps post-lésionnés de la même condition. Le test t (paired t test) a été utilisé pour les comparaisons : 1) de la capacité de fonctionnement de l'animal par essai incrémental à différents points de temps (avant SCI, 7 jours après SCI et 49 jours après SCI), 2) de l'électromyographie diaphragmatique controlatérale et ipsilatérale, et 3) de l'analyse

d'immunofluorescence. Le test two way ANOVA (test post hoc de Bonferroni) a été utilisé en considérant l'entraînement et le groupe (GROUPE NAIVE, SHAM et SCI) comme des manières différentes. Toutes les données ont été présentées comme moyennes  $\pm$  SD et les statistiques ont été considérées comme significatives lorsque  $p < 0.05$ . Le logiciel SigmaPlot 12.5 a été utilisé pour toutes les analyses.

## **4 RESULTATS**

### **4.1 Analyse comportementale et étendue de la lésion d'hémisection médullaire cervicale C2**

La taille de la lésion cervicale était semblable dans la partie latérale des deux groupes d'animaux blessés (SED SCI et TR SCI) (Figure 1B). Quantitativement, aucune différence significative dans l'étendue des blessures entre les groupes SCI SED et SCI TR ( $86,99 \pm 10,3 \%$  et  $80,23 \pm 8,5 \%$ , respectivement  $p= 0,329$ ) (Figure 8C). Après 6 semaines d'entraînement sur les roues d'exercice forcé (Figure 9A), la capacité de course exprimée en temps de course (s) était plus élevée dans tous les groupes entraînés (Figure 9B).

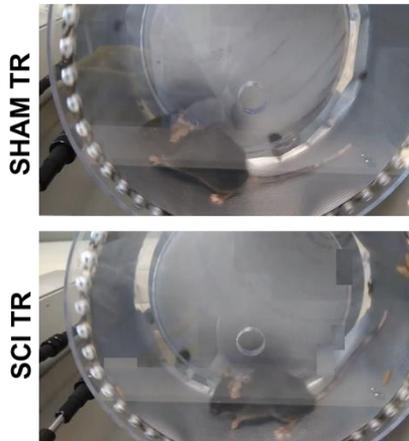
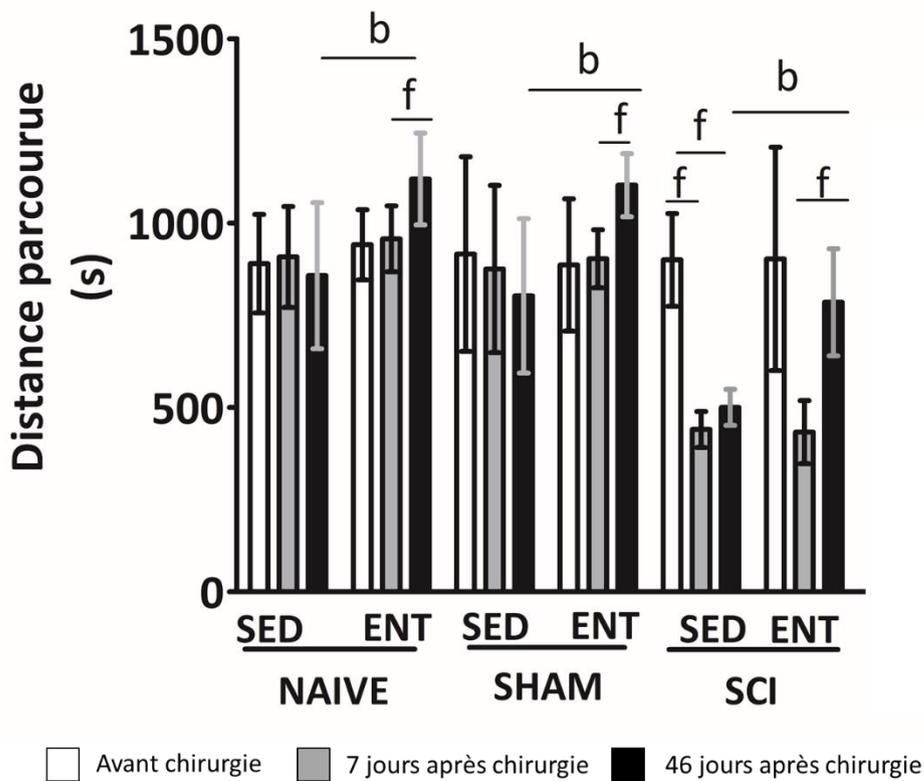
**A****B**

Figure 9: A Photo représentative d'une souris SHAM (supérieure) et SCI (ci-dessous) pendant course dans la roue d'exercice forcée. B Résultat des tests incrémentaux exprimée en temps de course (s).

## 4.2 Analyse morphométrique du muscle locomoteur

Pour déterminer si l'entraînement physique de 6 semaines sur le système d'exercice de roue forcé modifie la composition des fibres musculaires chez la souris blésée médullaire, des isoformes de chaînes lourdes dans le muscle strié squelettique

MyHC (MyHCSlow= type I, MyHC2A= type IIa et non-étiquetage= IIb/x) ont été détectés par la technique d'immunofluorescence (Figure 10). Cependant, seul le muscle SOL a présenté des myofibres du type I. Les type des myofibres prédominants dans les muscles du membre antérieur ipsilatéral à la lésion médullaire (EDC) et du membre postérieur (TA et SOL) des animaux entraînés et sédentaires ont également été comparés. Les résultats morphométriques sont décrits dans le Tableau 1 pour le muscle SOL, tandis que pour EDC et pour le TA sont représentés dans les résultats supplémentaires (Tableaux 3 et 4).

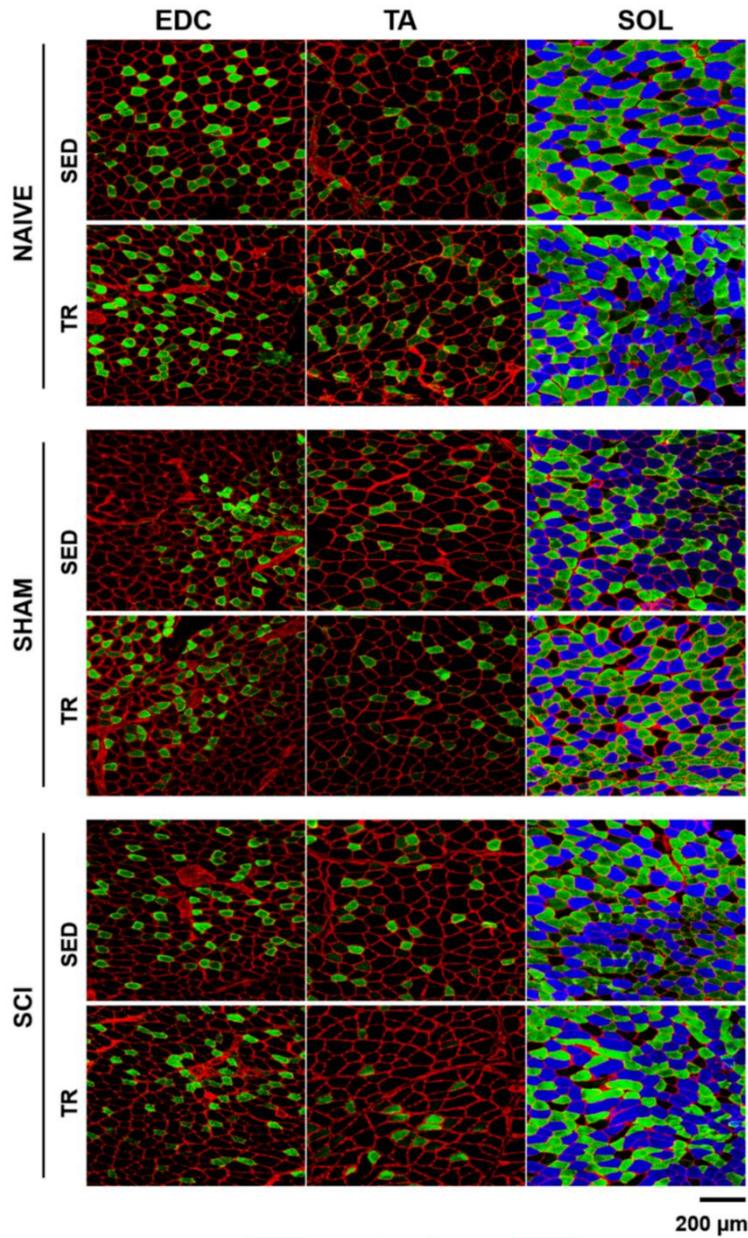


Figure 10: Images représentatives de la composition de type de fibre dans les muscles locomoteurs. Coupe transversale de muscle Extenseur des doigts (EDC), Tibialis antérieur (TA) et Soléaire (SOL) marquée pour les isoformes des myosines de chaîne lourde (MyHC): MyHC Slow (type I en bleu), MyHC2A (type IIa en vert) et la laminine pour visualiser les limites de myofibres (type IIb/x correspondant aux fibres non marquées) dans les groupes NAÏVE et SHAM (SED et TR). Barre d'échelle=200 μm.

<b>SOL</b>			
<b>NAIVE</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type I	1613.3 $\pm$ 389.3	1434.3 $\pm$ 249.4	0.242
Type IIa	1088.3 $\pm$ 329.2	926.2 $\pm$ 240.4	0.281
Type IIb/x	902.8 $\pm$ 166.9	803.8 $\pm$ 274.7	0.36
<b>%</b>			
Type I%	45.2 $\pm$ 7.7	44.4 $\pm$ 8.7	0.877
Type IIa%	42.3 $\pm$ 10.0	42.9 $\pm$ 7.9	0.907
Type IIb/x%	12.4 $\pm$ 2.8	12.5 $\pm$ 5.2	0.957
<b>SHAM</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type I	1303.9 $\pm$ 115.0	1081.5 $\pm$ 266.0	0.149
Type IIa	743.5 $\pm$ 158.8	622.4 $\pm$ 291.8	0.418
Type IIb/x	538.9 $\pm$ 138.2	645.0 $\pm$ 185.1	0.224
<b>%</b>			
Type I%	55.7 $\pm$ 4.9	51.4 $\pm$ 11.0	0.382
Type IIa%	37.0 $\pm$ 8.6	35.7 $\pm$ 10.0	0.786
Type IIb/x%	7.2 $\pm$ 4.0	12.8 $\pm$ 7.8	0.078
<b>SCI</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type I	1336.0 $\pm$ 222.7	1453.6 $\pm$ 239.3	0.439
Type IIa	837.3 $\pm$ 164.3	833.0 $\pm$ 297.3	0.977
Type IIb/x	716.7 $\pm$ 176.4	756.8 $\pm$ 221.9	0.816
<b>%</b>			
Type I%	45.3 $\pm$ 5.2	46.2 $\pm$ 7.9	0.818
Type IIa%	37.7 $\pm$ 10.1	38.9 $\pm$ 12.2	0.853
Type IIb/x%	16.9 $\pm$ 7.0	14.7 $\pm$ 6.0	0.582

Tableau 1: Composition et distribution du type de fibres du muscle Soléaire. Les valeurs sont des moyens  $\pm$  SD pour NAIVE, SHAM et SCI (SED et TR).

### 4.3 Analyse de la vascularisation du muscle locomoteur

Pour déterminer si l'entraînement physique a modifié la capillarisation des muscles squelettiques, le CD31 (vert) et la Laminine (en rouge) ont été détectés par immunofluorescence dans le muscle SOL (Figure 11). Les muscles EDC et TA ont été illustrés dans les résultats supplémentaires (Figures 17 et 18). La densité capillaire (DC) et le rapport capillaire-fibre (rapport C/F) ont été analysés et décrits dans le tableau 2 pour le SOL, tandis qu'EDC et TA sont dans les résultats supplémentaires (Tableaux 5 et 6). Six semaines d'entraînement d'exercice ont augmenté le nombre de capillaires de muscle du membre inférieur (TA et SOL) dans le groupe blessé médullaire. De plus, les souris blessées médullaires ont présenté une densité capillaire plus élevée par rapport aux animaux entraînés du groupe NAIVE. La même tendance a été observée dans le muscle SOL. Dans le groupe SCI SED, la densité capillaire du muscle TA était significativement inférieure à celle observée dans le groupe NAIVESED.

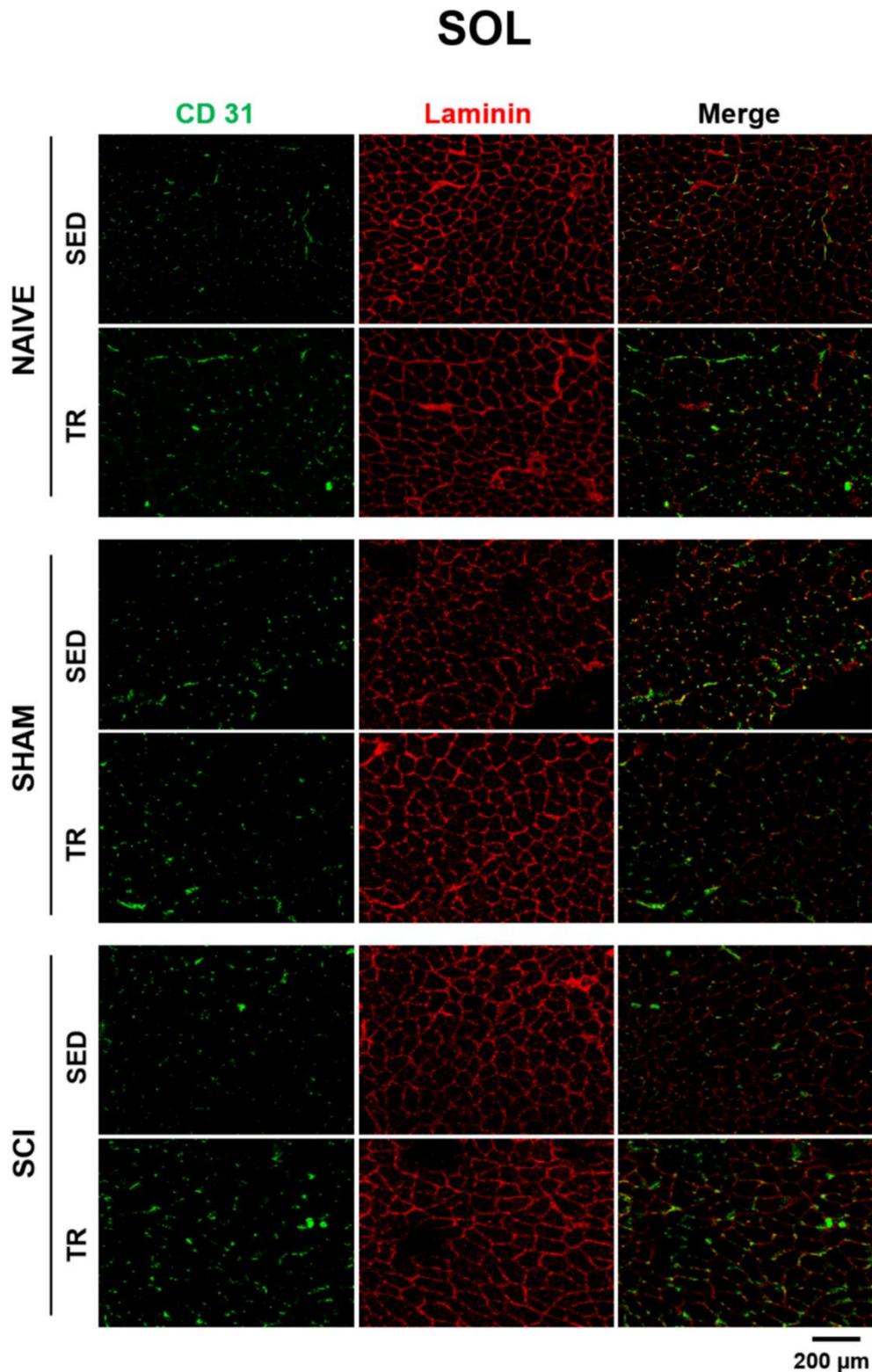


Figure 11 : Images représentatives de l'expression de CD31 et du nombre de fibres dans le muscle squelettique. Coupe transversale de muscle Soléaire (SOL), tandis que l'Extenseur des doigts (EDC), Tibialis antérieur (TA) sont illustrés dans les Figures supplémentaires 18 et 19, respectivement. Barre d'échelle=200  $\mu$ m.

<b>SOL</b>			
<b>NAIVE</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	1473.1±839.2	1319.2 ± 372.4	0.972
Capillaries/fiber	1.1±0.4	1.6 ± 0.4	0.112
<b>SHAM</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	1113.8±400.6	1777.2 ± 625.0	0.058
Capillaries/fiber	1.2±0.4	1.5 ± 0.4	0.35
<b>SCI</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	1685.3±481.0	2655.93 ± 649.6**	0.007

Tableau 2 : Composition et distribution du type de fibres du muscle Soléaire. Les valeurs sont des moyens ± SD pour NAIVE, SHAM et SCI (SED et TR). Effet de l'exercice entre les groupes SED et TR \*  $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.4 Evaluation de l'activité du diaphragme 51 jours post-médullaire cervicale

Des tracés représentatifs de l'électromyographie diaphragmatique à 51 jours après la lésion médullaire sont indiqués à la Figure 12A (animaux non blessés (NAIVE/SHAM, SED et TR) et animaux blessés de la Figure 12B (groupe SCI, diaphragme controlatéral et ipsilatéral, SED et TR). Une activité électromyographique du diaphragme réduite pendant la respiration spontanée et l'asphyxie sur le côté ipsilatéral du diaphragme (côté lésé) dans les groupes de blessés médullaire a été observée par rapport au côté controlatéral. Du côté controlatéral à la lésion médullaire,

l'amplitude de l'EMG diaphragmatique des groupes d'animaux blessés et non blessés pendant la respiration spontanée et l'asphyxie n'a montré aucune différence.

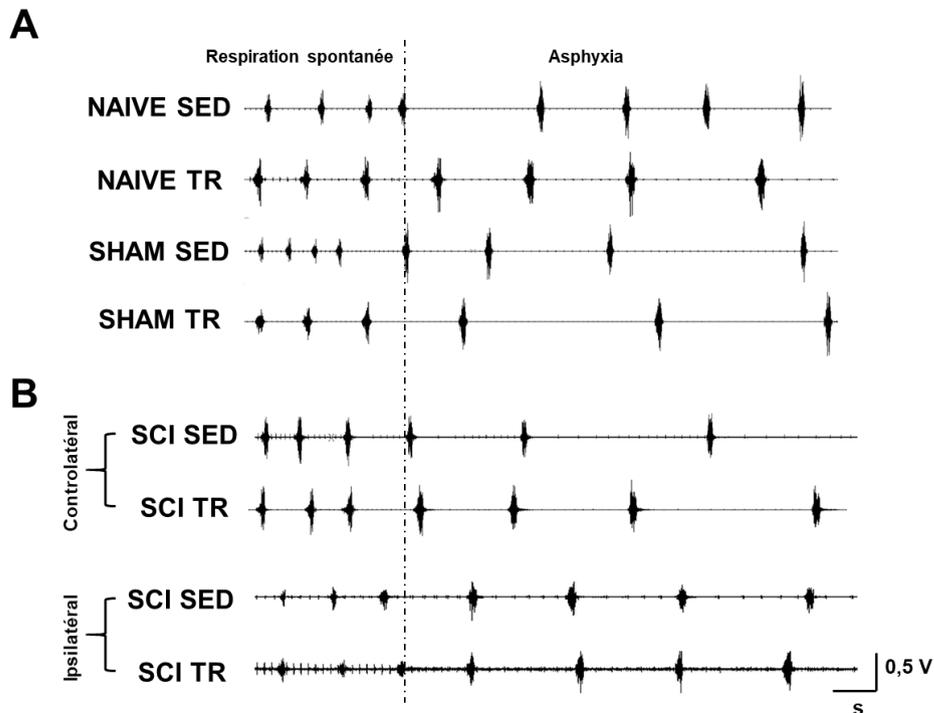


Figure 12: Activité diaphragmatique à 51 jours suivant une hémisection C2. Une trace représentative de l'électromyographie brute du diaphragme pour les animaux non blessés : A groupes NAIVE et SHAM (SED et TR) et B blessés (diaphragme controlatéral et diaphragme ipsilatéral) animaux : groupes SCI (SED et TR).

Cinquante et un jours après hémisection médullaire, l'amplitude de l'activité diaphragmatique pendant la respiration spontanée et l'asphyxie sur le côté ipsilatéral a été réduite comparés au côté controlatéral pour tous les deux groupes de souris blessés médullaire cervicale. Cependant, lorsque la largeur d'un « burst » de chaque respiration enregistrée par l'activité électromyographique est analysée, il est possible d'évaluer le temps de contraction du muscle diaphragmatique de l'animal. Ainsi, du côté ipsilatéral du diaphragme, une diminution significative du temps de contraction pendant la respiration spontanée (Figure 13C) a été observée dans le groupe blessé médullaire

sédentaire par rapport au côté controlatéral, tandis que dans le groupe entraîné, aucune différence n'a été observée entre les côtés du diaphragme. Fait intéressant, pendant l'asphyxie (Figure 13D) cette diminution a été présente dans le groupe blessé médullaire soumis au protocole de 6 semaines d'entraînement physique.

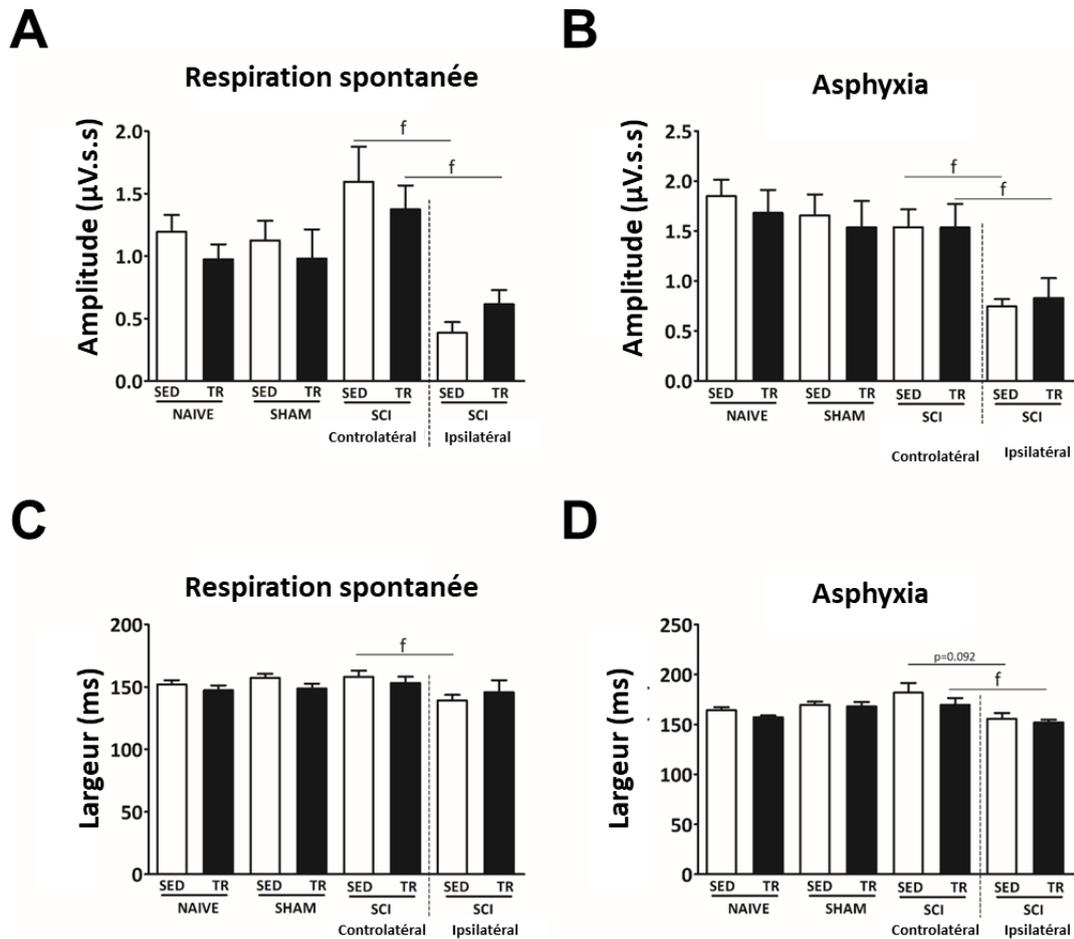


Figure 13: Analyse de l'activité diaphragmatique à 51 jours après une hémisection C2. Les graphiques montrent l'amplitude intégrée de diaphragme pendant une A respiration spontanée et B pendant asphyxie. Les graphiques représentent la largeur de chaque « Burst » du signal intégré de diaphragme d'EMG pendant C la respiration spontanée et D pendant asphyxie.

## 4.5 Analyses morphométriques des muscles respiratoires

Pour étudier l'effet de notre protocole d'entraînement forcé sur roue d'exercice dans la récupération de muscle respiratoire suivi d'une lésion médullaire cervicale, les

isoformes de chaînes lourdes MyHC (MHC I, IIa et étiquette négative IIb/x) ont été détectées en immunofluorescence (Figure 14).

Les types prédominants de fibres du côté controlatéral et ipsilatéral du diaphragme

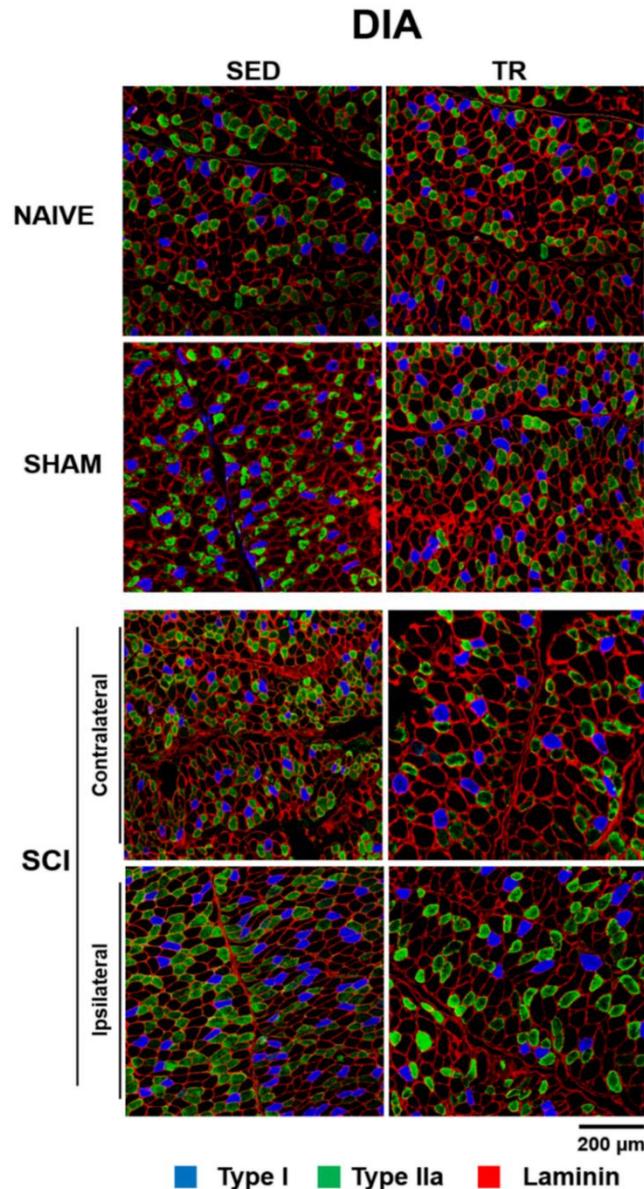


Figure 14 : Images représentatives de la composition de type de fibre dans le muscle respiratoire. Coupe transversale de muscle diaphragmatique marquée pour les isoformes des myosines de chaîne lourde (MyHC): MyHC<sub>Slow</sub> (type I en bleu), MyHC<sub>2A</sub> (type IIa en vert) et la laminine pour visualiser les limites de myofibres (type IIb/x correspondant aux fibres non marquées) dans les groupes NAÏVE et SHAM (SED et TR). Barre d'échelle=200 µm.

ont été analysés (Figure 15A-D). Dans la section transversale de myofibre du type I (Figure 15A), aucune augmentation significative n'a été observée du côté ipsilatéral du

diaphragme des deux groupes blessé médullaire, sédentaire et entraîné par rapport aux côtés controlatéraux. Dans le groupe TR SCI, la section transversale de myofibre du type IIa du côté controlatéral (Figure 14B) a été diminuée par rapport au côté du diaphragme ipsilatéral et du côté controlatéral du diaphragme du groupe SED SCI. Dans la section transversale de myofibre du type IIb/x (Figure 15C), aucune différence n'a été observée entre les groupes ou les côtés du diaphragme. La distribution relative (Figure 8D) a été modifiée entre les côtés controlatéral et ipsilatéral dans le groupe SED SCI, alors qu'aucune différence n'a été observée dans le groupe TR SCI.

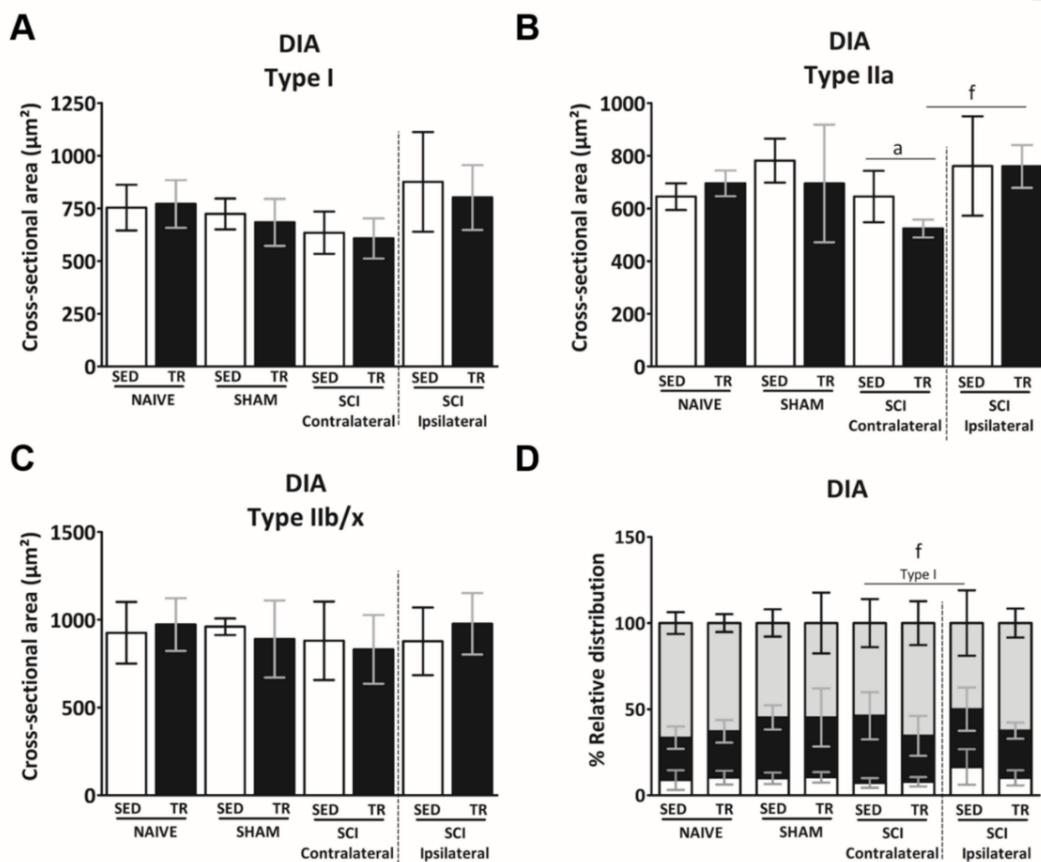


Figure 15: Analyse de la composition et de la distribution de type fibre dans le muscle respiratoire A analyse de la section transversale de myofibres du type B Type IIa et C Type IIb/x. D analyse de la distribution relative de myofibres de type I, IIa et IIb/x.

## **4.6 Analyse de la vascularisation du muscle respiratoire**

Pour évaluer la réponse capillaire à l'exercice, la densité capillaire (CD) et le rapport capillaire-fibre (rapport C/F) ont été détectés dans le diaphragme par immunofluorescence (Figure 16A et Figure 19, résultat supplémentaire pour les groupes NAIVE et les groupes SHAM). Six semaines d'entraînement physique ont effectivement augmenté la densité capillaire et le rapport capillaire-fibre (Figures 16B et C) du côté du diaphragme controlatéral du groupe SCI. D'autre part, aucune différence significative dans la densité capillaire n'a été observée entre les côtés du diaphragme ipsilatéral des groupes de SCI.

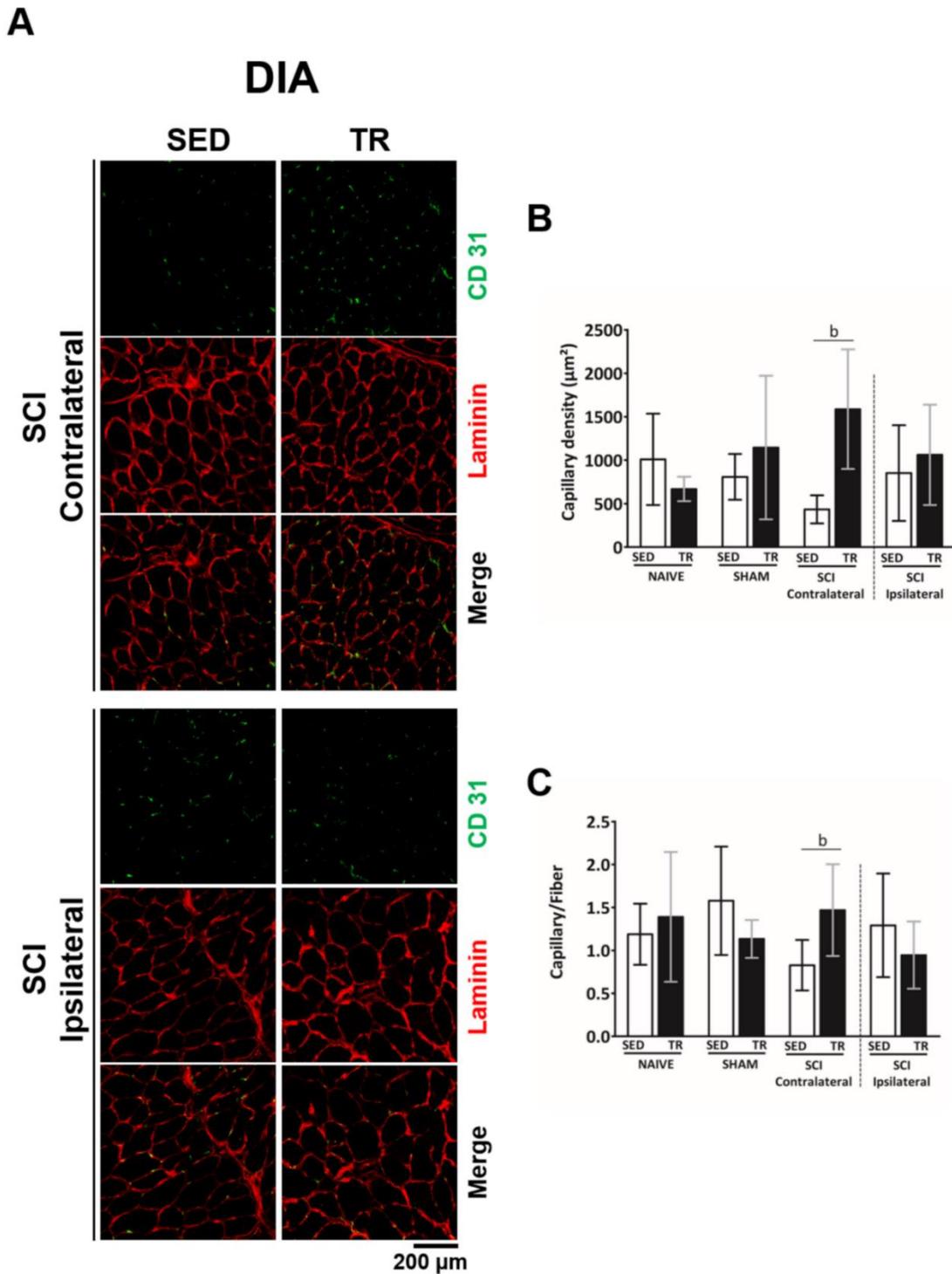


Figure 16: Analyse de la capillarisation sur le muscle respiratoire. A. Images représentatives de l'expression de CD31 et du nombre de fibres dans le muscle respiratoire. Coupe transversale de muscle diaphragmatique des groupes SCI SED et TR, tandis que les groupes NAIVE et SHAM (SED et TR) sont illustrés dans les Figures supplémentaires 21. Barre d'échelle=200  $\mu$ m. B Résultat de densité de capillaires et C rapport entre capillaire et fibre.

## 5 Résultats supplémentaires

Supplemental figure 1.

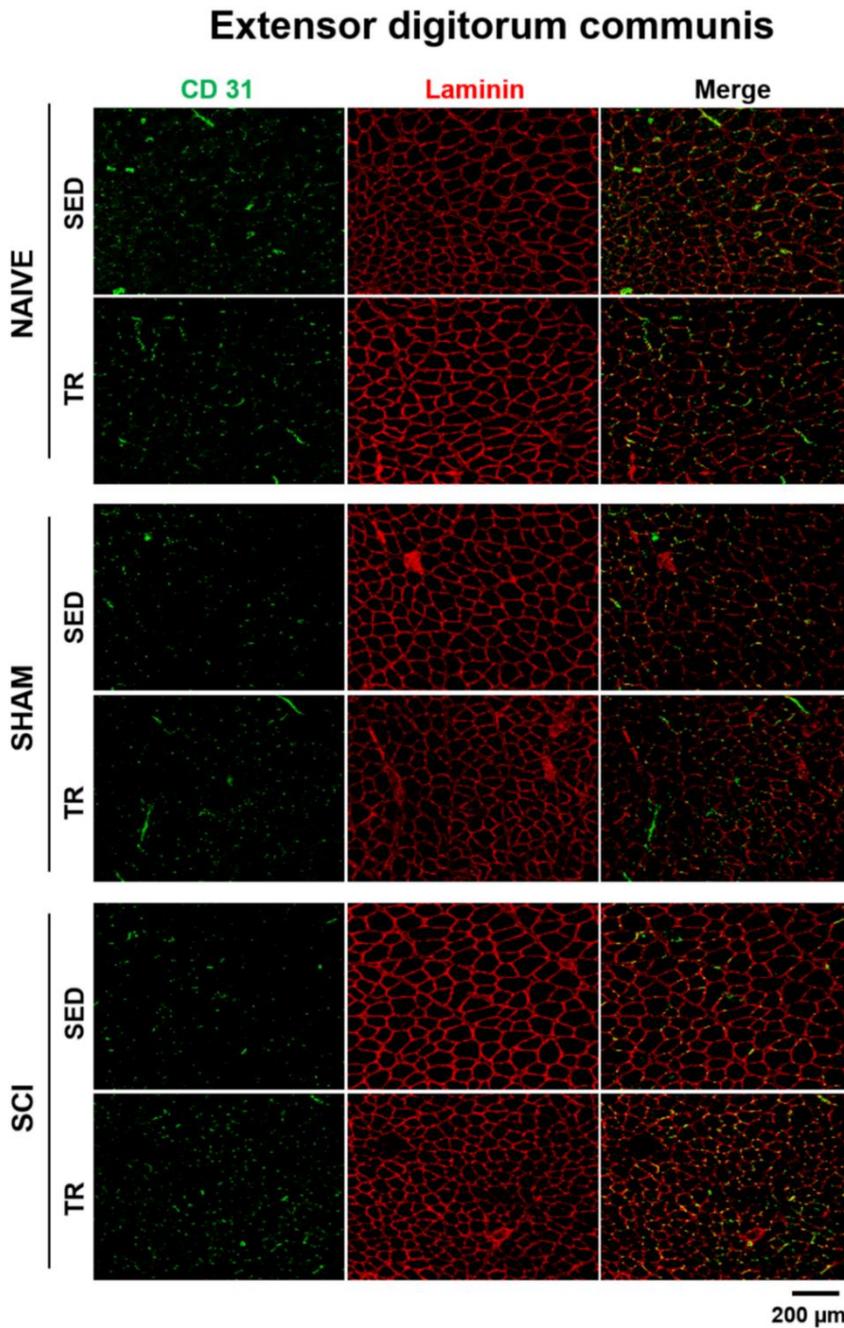


Figure 17 : Images représentatives de l'expression de CD31 et du nombre de fibres dans le muscle squelettique. Coupe transversale de muscle Extenseur des doigts marquée pour le CD31 (vert) à la laminine (rouge). Barre d'échelle=200  $\mu$ m.

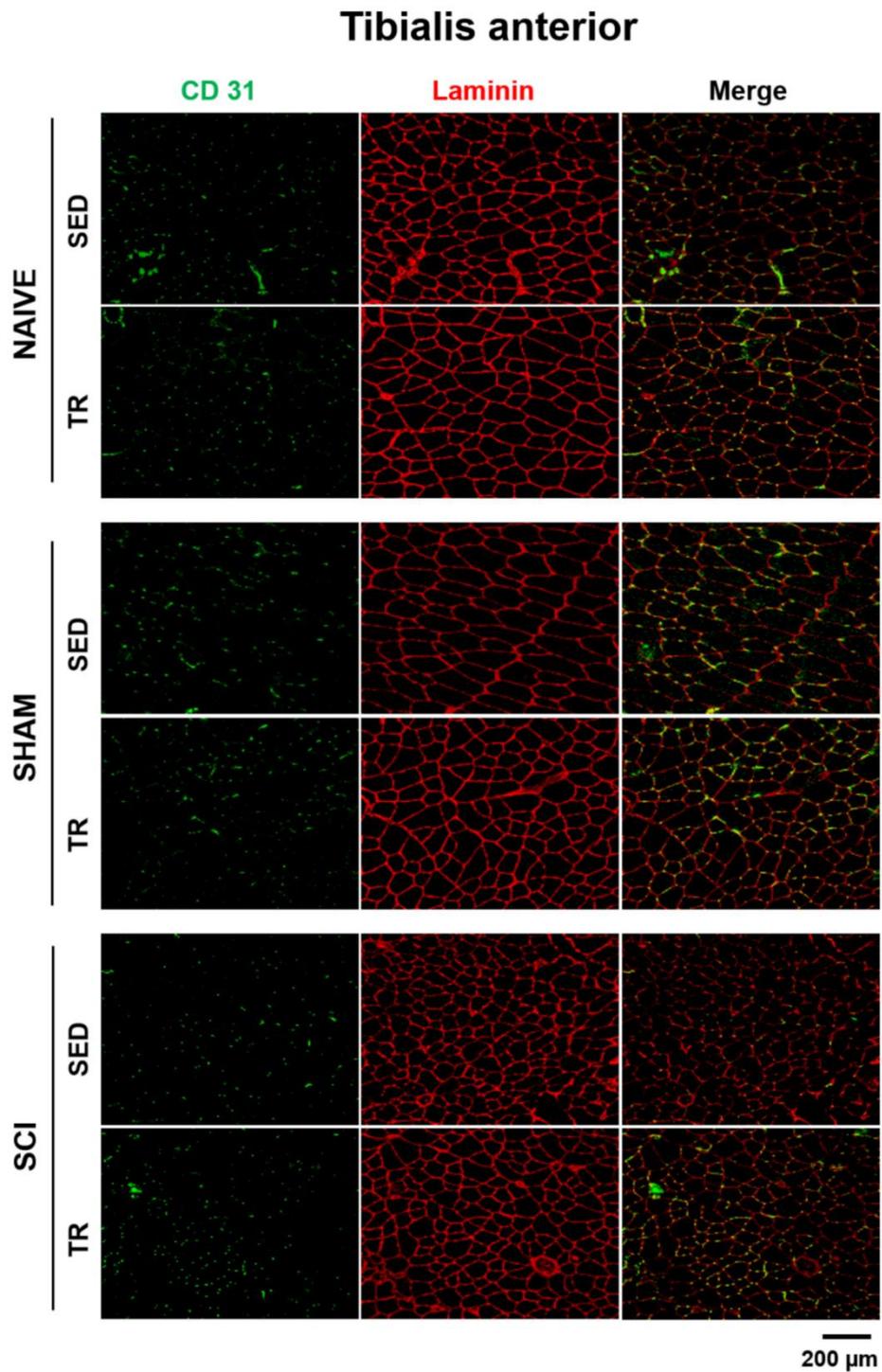
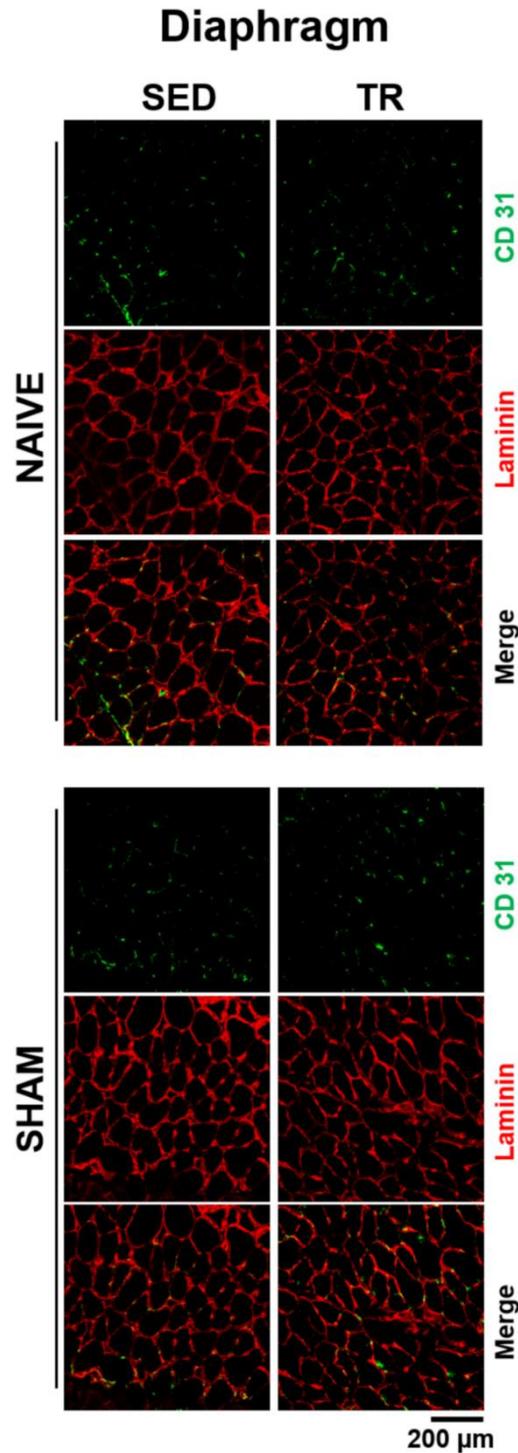


Figure 18. : Images représentatives de l'expression CD31 et du nombre de fibres dans le muscle squelettique. Coupe transversale du muscle Tibialis antérieur marquée pour le CD31 (vert) et la laminine (rouge). Barre d'échelle=200  $\mu$ m.



*Figure 19: Images représentatives de la composition de type de fibre dans le muscle respiratoire. Coupe transversale de muscle diaphragmatique a été immunostained marquée pour les isoformes des myosines de chaîne lourde (MyHC): MyHCSlow (type I en bleu), MyHC2A (type IIa en vert) et la laminine pour visualiser les limites de myofiber (type IIb/x correspondant aux fibres non marquées) dans les groupes NAÏVE et SHAM (SED et TR). Barre d'échelle=200 μm.*

<b>NAIVE</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type IIa	752.8 $\pm$ 121.9*	645.2 $\pm$ 59.7	0.026
Type IIb/x	1506.8 $\pm$ 229.3**	1127.6 $\pm$ 172.1	0.002
<b>%</b>			
Type IIa%	13.0 $\pm$ 6.3	6.3 $\pm$ 5.2	0.0709
Type IIb/x%	86.9 $\pm$ 6.3	93.6 $\pm$ 5.2	0.0709
<b>SHAM</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type IIa	625.4 $\pm$ 25.4	698.4 $\pm$ 116.1 1228.8	0.122
Type IIb/x	1005.9 $\pm$ 93.0	6 $\pm$ 127.8	0.056
<b>%</b>			
Type IIa%	8.9 $\pm$ 4.1	14.1 $\pm$ 8.1	0.485
Type IIb/x%	91.0 $\pm$ 4.1	85.8 $\pm$ 8.1	0.485
<b>SCI</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type IIa	709.1 $\pm$ 57.6	632.8 $\pm$ 43.8	0.107
Type IIb/x	1178.8 $\pm$ 207.0	1169.7 $\pm$ 274.6	0.936
<b>%</b>			
Type IIa%	10.6 $\pm$ 6.1	10.4 $\pm$ 8.1	0.936
Type IIb/x%	89.3 $\pm$ 6.1	89.5 $\pm$ 8.1	0.936

Tableau 3: Composition et distribution du type de fibres du muscle Extenseur des doigts. Les valeurs sont des moyens  $\pm$  SD pour NAIVE, SHAM et SCI (SED et TR). Effet de l'entraînement entre les groupes SED et TR \*  $p < 0.05$  et \*\* $p < 0.01$ .

<b>NAIVE</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type IIa	730.6 $\pm$ 21.8	807.5 $\pm$ 183.1	0.937
Type IIb/x	1725.8 $\pm$ 232.5	1621.04 $\pm$ 348.3	0.541
<b>%</b>			
Type IIa%	13.4 $\pm$ 8.3	9.7 $\pm$ 4.4	0.295
Type IIb/x%	86.5 $\pm$ 8.3	90.2 $\pm$ 4.4	0.295
<b>SHAM</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type IIa	884.6 $\pm$ 78.5	762.5 $\pm$ 121.3	0.041
Type IIb/x	1752.7 $\pm$ 166.4	1428.9 $\pm$ 366.1	0.057
<b>%</b>			
Type IIa%	12.5 $\pm$ 5.0	11.7 $\pm$ 9.8	0.394
Type IIb/x%	87.4 $\pm$ 5.0	88.2 $\pm$ 9.8	0.394
<b>SCI</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
<b>Area. <math>\mu\text{m}^2</math></b>			
Type IIa	802.4 $\pm$ 127.6	793.8 $\pm$ 131.9	0.911
Type IIb/x	1506.7 $\pm$ 190.7	1551.7 $\pm$ 273.7	0.748
<b>%</b>			
Type IIa%	7.0 $\pm$ 4.9	9.6 $\pm$ 5.7	0.422
Type IIb/x%	92.9 $\pm$ 4.9	90.3 $\pm$ 5.7	0.422

*Tableau 4: Composition et distribution de type de fibres du muscle Tibialis antérieur. Les valeurs sont des moyens  $\pm$  SD pour NAIVE, SHAM et SCI (SED et TR).*

<b>NAIVE</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	2333.2 ± 957.9	2980.8 ± 1511.4	0.396
Capillaries/fiber	0.8 ± 0.6	0.7 ± 0.4	0.649
<b>SHAM</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	4377.5 ± 2984.5	3989.9 ± 891.7	0.937
Capillaries/fiber	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0.802
<b>SCI</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	3420.3 ± 1735.7	5760.7 ± 4174.5	0.14
Capillaries/fiber	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.6**	0.001

*Tableau 5: Capillarisation du muscle Extenseur des doigts. Les valeurs sont des moyens ± SD pour NAIVE, SHAM et SCI (SED et TR). Effet de l'entraînement entre les groupes SED et TR \* p < 0,05 et \*\*p < 0.01.*

<b>NAIVE</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	8530.2 ± 3643.7*	5600.1 ± 1288.0	0.014
Capillaries/fiber	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.4	0.951
<b>SHAM</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	6944.3 ± 3581.6	9182.6 ± 1598.6	0.163
Capillaries/fiber	1.3 ± 0.7	1.6 ± 0.6	0.147
<b>SCI</b>			
	<b>SED</b>	<b>TR</b>	<b>p Value</b>
CD/mm <sup>2</sup>	5362.4 ± 1966.3	10602.1 ± 3859.5**	0.003
Capillaries/fiber	1.0 ± 0.6	1.7 ± 0.3*	0.029

*Tableau 6: Capillarisation du muscle Tibialis antérieur. Les valeurs sont des moyens ± SD pour NAIVE, SHAM et SCI (SED et TR). Effet de l'entraînement entre les groupes SED et TR \*  $p < 0,05$  et \*\* $p < 0.01$ .*

## 6 DISCUSSION

Ce test d'évaluation de la capacité de course n'avait jamais été testé chez les souris blessées médullaires. Mon intention avec ce type d'évaluation était de montrer que le test incrémental pouvait être agrégé avec d'autres méthodes d'évaluation des comportements pour obtenir plus d'informations sur la récupération locomotrice secondaire à une lésion médullaire. Par conséquent, 7 jours après lésion médullaire cervicale, les souris ont présenté sans surprise une capacité de course significativement réduite. D'autre part, le protocole d'entraînement physique de 6 semaines (49 jours après la lésion) a induit une récupération de la capacité de course semblable au niveau observé avant la lésion.

Dans des modèles de rongeurs, les lésions médullaires impactent de façon intéressante la morphologie musculaire dans les premières semaines suivant la blessure (82, 83). Cependant, une semaine d'entraînement peut efficacement conduire à une augmentation du processus de régénération musculaire de fibres de contraction lente (84, 85). Malgré ces données, peu d'études ont évalué les effets de longues périodes d'entraînement locomoteur sur les propriétés musculaires dans un modèle de souris avec lésion médullaire cervicale. Dans d'autres sites de blessures, Battistuzzo *et coll.* ont effectué chez la souris hémilésée au niveau thoracique un protocole d'entraînement locomoteur sur tapis roulant, avec une vitesse initialement mise en place à 6 m/min, puis, progressivement augmenté à 10-12 m/min au cours de l'entraînement. Ce protocole a conduit à une légère augmentation de la section transversale des fibres dans le muscle SOL à 10 semaines après l'entraînement (62). En comparaison avec le

paradigme d'entraînement ci-dessus, nous avons été surpris de ne pas observer de changements dans la taille des muscles des membres chez nos souris. Plusieurs paramètres pourraient expliquer ces résultats négatifs. Tout d'abord, il n'y a pas de donnée disponible dans la littérature sur l'effet de l'entraînement par le système de roue d'exercice forcé sur la morphologie musculaire. Normalement, le tapis roulant est le plus utilisé dans ce type d'étude. Cela m'a fait considérer qu'en raison de l'environnement différent entre le système de roue d'exercice forcé et tapis roulant, des intensités d'exercice plus élevées peuvent être nécessaires pour observer des changements dans la taille musculaire. Un autre point à considérer est que dans l'exercice d'endurance prolongé chez les rongeurs, l'intensité de l'exercice est ajustée pour maintenir l'intensité d'entraînement (80). L'intensité de notre protocole d'entraînement n'a été pas ajustée tout au long de l'expérience pour prévenir tout stress supplémentaire chez les animaux blessés médullaire. Cependant, compte tenu de la récupération des animaux tout au long de notre étude, nous utiliserons l'ajustement de l'intensité d'exercice lors de nos prochains travaux.

Bien que notre protocole d'exercice ne soit pas efficace pour modifier la section transversale des fibres musculaires des membres du groupe blessé médullaire, une augmentation de la microcirculation musculaire a été observée. Le réseau microvasculaire subit un remodelage, généralement sous forme de raréfaction capillaire, après lésion médullaire (65). La capacité de fournir de l'oxygène et des nutriments aux muscles qui travaillent est *de facto* altérée et contribue à réduire la résistance à la fatigue (64, 86). En outre, une raréfaction capillaire pourrait contribuer

à l'affaiblissement de la sensibilité à l'insuline et à l'intolérance au glucose, qui peut être encore aggravée par l'inflammation systémique (87) post-traumatique chez les patients blessés médullaires (88, 89).

Ce travail de thèse a été motivé par l'hypothèse que les régions du mésencéphale impliquées dans le contrôle des centres respiratoires et locomoteurs pouvaient communiquer et ainsi promouvoir un effet bénéfique à la récupération fonctionnelle du diaphragme induite par exercice physique (41, 62, 76, 90). Toutefois, les mécanismes en cause ne sont pas connus (76). C'est pourquoi nous avons étudié l'intérêt d'un protocole d'entraînement physique de 6 semaines dans la modulation de l'activité fonctionnelle du diaphragme dans un modèle d'hémisection médullaire cervicale. Notre équipe a démontré pour la première fois chez la souris, que la récupération de l'activité diaphragmatique reste encore limitée à 30 jours post-lésion médullaire cervicale (91). Ainsi, avec mon travail doctoral, j'ai pu montrer qu'à 51 jours, la récupération du diaphragme touché par la lésion médullaire cervicale, reste encore limitée chez les souris.

Le mécanisme de la plasticité post-lésionnelle est attribuée au « phénomène phrénique croisé » (CPP), qui consiste en l'activation de voies silencieuses qui traversent la ligne médiane de la moelle épinière au niveau segmentaire C3-C6 et se connecte aux motoneurones phréniques ipsilatéraux (92, 93). Ainsi, il a été suggéré que ce processus spontané de plasticité post-lésion, nommé « phénomène interphrénique spontané », pourrait être différent des voies initiales décrites comme le générateur central de rythme et de mise en forme (CPG « central pattern generator ») et devrait

impliquer le réacheminement axonal, et la formation de nouvelles connexions polysynaptiques aux motoneurones phréniques par l'intermédiaire des interneurones de la colonne vertébrale cervicale (38, 94-96). Néanmoins, le rétablissement de la fonction de motoneurones phréniques reste limité et les déficits de la respiration persistent pendant des mois après la blessure (55, 96).

En ce qui concerne l'impact de la lésion médullaire cervicale sur la morphologie des muscles diaphragmatiques, j'ai étudié l'effet d'une stratégie non invasive pour améliorer la plasticité diaphragmatique à long terme et le remodelage. L'étude à long terme dans les modèles de lésion médullaire cervicale chez le rat a déjà démontré qu'à 42 jours post-lésion, le diaphragme montre une réduction de myofibres du type IIb / x, et l'hypertrophie n'était plus évidente sur les myofibres type I ou IIa (56). En outre, la réduction de la force contractile se produit parallèlement à la diminution de section transversale des fibres musculaires. Dans cette étude, la section transversale de myofibres du type I a montré une légère augmentation du côté du diaphragme ipsilatéral dans les groupes SED et TR SCI. D'autre part, l'entraînement physique a diminué les myofibres du type IIa dans le côté controlatéral.

L'exercice physique est la procédure la plus appropriée pour réadapter les personnes avec une lésion médullaire. L'exercice physique du type aérobie est bien établi dans la littérature comme plus bénéfique dans l'amélioration de la capacité aérobie et l'augmentation de la densité mitochondriale et de l'expression de la citrate synthase (97). Récemment, j'ai pu montrer chez le rat que l'entraînement prolongé à l'exercice d'endurance conduit à une augmentation de la microcirculation des muscles

squelettiques (30). De plus, il a été suggéré que l'angiogenèse est plus rapide en réponse à une faible intensité d'entraînement physique (98). Dans ce contexte, cette stratégie pourrait être bénéfique pour le diaphragme hémiparalysé suite à une lésion médullaire cervicale. Je démontre pour la première fois l'effet de l'exercice physique aérobie sur le remodelage de capillaires dans le muscle respiratoire chez la souris blessée médullaire cervicale. Les capillaires du côté controlatéral du diaphragme du groupe entraîné ont été augmentés par rapport au groupe sédentaire. Comme précédemment démontré, cette augmentation de la densité capillaire pourrait contribuer au « switch » de fibres glycolytiques vers les fibres oxydatives (99-101). Nos résultats suggèrent que la morphologie et le remodelage vasculaire du diaphragme induits par notre protocole d'exercice, pourraient contribuer à éviter le déséquilibre de la distribution de fibres glycolytiques/oxydatives entre les 2 côtés de diaphragme dans le modèle d'hémisection en C2. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer si les changements induits par entraînement physique sur la morphologie du diaphragme et les structures vasculaires sont corrélés avec la durée de contraction analysée par électromyographie.

## 7 CONCLUSION

Nous avons montré que le test incrémental est applicable pour évaluer la capacité de course chez la souris après lésion cervicale de la moelle épinière. L'entraînement aérobie améliore la microcirculation des muscles locomoteurs et joue un rôle favorable sur la distribution des myofibres et la microcirculation du diaphragme après hémisection cervicale de moelle épinière. L'intensité employée dans notre protocole d'exercice physique de 6 semaines n'a été pas suffisante pour induire une amélioration de la fonction respiratoire après hémisection cervicale de moelle épinière. Néanmoins, ces données permettent de considérer que l'entraînement aérobie pourrait être une bonne stratégie non invasive à utiliser afin de maintenir la plasticité locomotrice et respiratoire musculaire suite à une lésion médullaire cervicale.

## 8 COMMUNICATION SCIENTIFIQUE

### **Effets d'un exercice de faible intensité sur la plasticité musculaire dans un modèle murin d'hémisection de la moelle épinière cervicale**

Article en révision : *Scientific reports*

Les lésions de la moelle épinière cervicale entraînent des déficits respiratoires et moteurs permanents. L'entraînement physique est une des stratégies la plus fréquemment utilisées pour améliorer la récupération motrice et respiratoire dans les modèles animaux et les études cliniques. Peu d'études ont utilisé le modèle murin d'une hémisection spinale cervicale partielle au deuxième segment métamérique cervical (C2HS). Nous avons donc émis l'hypothèse que 6 semaines d'entraînement physique de faible intensité peuvent fournir une récupération respiratoire et locomotrice. Pour cela, nous avons utilisée comme outil d'entraînement, la roue d'exercice forcée. Après la fin du protocole d'entraînement physique de 6 semaines, nous avons réalisé des analyses électromyographiques des diaphragmes 51 jours après lésion. Pour les analyses biomoléculaires, la composition du type de fibre et la distribution capillaire dans les muscles diaphragmatiques, l'extenseur des doigts communs, le tibialis antérieur et le soléaire ont été étudiées.

Les résultats obtenus ont démontré que 6 semaines d'entraînement sur la roue d'exercice forcé ont augmenté la capacité de course des animaux C2HS entraînés. Cependant, aucune augmentation spontanée de l'amplitude de l'activité électromyographique diaphragmatique du côté lésé n'a été observée jusqu'à 51 jours après C2HS dans les deux groupes, tandis que la durée de cette activité a été significativement diminuée dans le groupe sédentaire C2HS par rapport au groupe entraîné C2HS. Le type de fibre dans les muscles locomoteur n'a pas été modifié. Fait intéressant, une augmentation de la vascularisation de tous les muscles des membres après C2HS dans le groupe entraîné a été observée. L'aire de section transversale du type de fibre MHC IIa dans le muscle diaphragmatique dans le groupe C2HS entraîné était plus petit alors que la distribution des fibres dans le côté blessé n'était pas affectée par rapport aux animaux sédentaires C2HS. De plus, la vascularisation sur diaphragme du côté intact a été augmentée dans le groupe entraîné C2HS, ce qui pourrait suggérer une meilleure résistance à la fatigue. L'ensemble de ces résultats démontrent que notre protocole d'entraînement pourrait être une bonne stratégie non invasive pour moduler le type de fibres musculaires et la réorganisation vasculaire afin de maintenir la plasticité des muscles locomoteurs et respiratoires après une lésion de la moelle épinière cervicale.

## Your submissions

### Track your submissions

**Effects of low intensity exercise on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury**

Corresponding Author: Bonay Marcel

*Scientific Reports*

22339596-ef4f-4f0e-b792-b83095b4c827 | v.1.1

Current Status:

Paper requires revision; an email has been sent to the corresponding author

2020-10-21T09:54:18.930Z

Don't forget, if you have manuscripts with other systems, such as eJournalPress or Editorial Manager, you will only be able to see those manuscripts there. Still have a question? [Contact us](#)

SPRINGER NATURE

© 2020 Springer Nature.

[About Springer Nature](#)

[Springer Nature](#)

[Help and support](#)

[Cookie Settings](#)

[Give Feedback](#)

**Effects of low intensity exercise on muscle plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury**

*Running title: Exercise following spinal cord injury*

Authors and Affiliations:

Isley De Jesus<sup>1</sup>, Pauline Michel-Flutot<sup>1</sup>, Therese B. Deramaudt<sup>1</sup>, Alexia Paucard<sup>1</sup>, Valentin Vanhee<sup>1</sup>, Stéphane Vinit<sup>1</sup> and Marcel Bonay<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000 Versailles, France

<sup>2</sup>Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles; Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Boulogne, France

\*Corresponding author: Marcel Bonay, MD, PhD

E-mail : marcel.bonay@aphp.fr

## **ABSTRACT**

Cervical spinal cord injury (SCI) results in permanent life-altering motor and respiratory deficits. However, few studies have used the mouse model of partial cervical spinal hemisection at the second cervical metameric segment to investigate the role of exercise training on locomotor and respiratory recovery. The aim this work was demonstrate the feasibility to use a mouse model to investigate the impact of cervical spinal cord injury on locomotor/respiratory plasticity and recovery followed by 6 weeks of training on forced exercise wheel system. To assess locomotor and respiratory functions, incremental tests and diaphragmatic electromyography were done. In addition, muscle fiber type composition and capillary distribution were assessed at 51 days following chronic C2 injury in diaphragm (DIA), extensor digitorum communis (EDC), tibialis anterior (TA) and soleus (SOL). Six-week exercise training increased the running capacity in trained SCI mice. Fiber type composition in EDC, TA and SOL muscles was not altered. The vascularization was increased in all muscle limbs in SCI TR group. No spontaneous increase in diaphragmatic electromyography amplitude on the ipsilateral DIA was observed in both SCI groups, while the duration was significantly decreased in sedentary group compared to trained group. Cross-sectional area of type IIa myofiber in the contralateral DIA in SCI trained group was smaller. Fiber type distribution between contralateral and ipsilateral DIA in SCI

sedentary group was affected while no difference was observed in TR group. In addition, the vascularization on contralateral DIA was increased in SCI trained group. All these results suggest an increase in fatigue resistance and a contribution to running capacity in SCI TR group. In addition, our exercise protocol could be a good non-invasive strategy to use in order to sustain locomotor and respiratory muscle plasticity following cervical spinal cord injury.

## **INTRODUCTION**

A spinal cord injury (SCI) results in permanent life-altering neuromotor functions due to the limited recovery capacity of the central nervous system. However, injury located at the cervical level is characterized by the loss of sensory-motor functions below the site of injury and induces permanent respiratory insufficiency (2, 49). Rodents are commonly used as pre-clinical models due to their high reproducibility to investigate the effects of partial cervical spinal hemisection at the second cervical metamer segment (SCI) on motor function (57, 102-104). SCI induces a deafferentation of the bulbo-spinal descending premotor drive to phrenic motor neurons, leading to the paralysis of the diaphragm (DIA) muscle on the side of injury. The contralateral DIA of the SCI remains intact and allows the animal survival. Following SCI, impairment and paralysis of skeletal muscles, that are innervated caudal to the lesion site, are accompanied by a shift from an oxidative to a highly glycolytic, and fatigable phenotype in both animals and humans (61-63). In addition, microvascular supply undergoes remodeling, typically in the form of capillary rarefaction on the muscle. This

rarefaction impairs the capacity to deliver oxygen and fuel to working muscles, contributing to the reduced fatigue resistance (65). The diaphragm is the major muscle responsible for breathing and also participates in non-ventilatory behaviors associated with airways clearance, such as coughing or sneezing (37, 59, 60). The impact of SCI on the diaphragm has previously been studied using rat animal model. In general, diaphragm recovery is quite limited (55-57). Moreover, SCI injury impact other components of the diaphragm motor unit, mainly at the level of the neuromuscular junction and the muscle fiber types and size (56). At day 1, a reduction in ipsilateral diaphragm cross-sectional area of type I and IIa myofibers is observed, while type IIb/x myofibers have reduced cross-sectional area at both 1 and 7 days following SCI (61). At 42 days, the size of type IIb/x myofibers is reduced, and hypertrophy is no longer evident in type I or IIa myofibers (56). These previous findings suggest that rats with SCI present a tremendous capability of muscular remodeling following injury. However, little is known about the microvascular modulation and the effect of a non-invasive intervention (i.e. exercise training paradigm) in diaphragm morphology post-SCI.

The literature has well established that exercise enhances functional recovery following injury in rodents (41, 76, 77). One study has shown that 5 days of voluntary running were effective to improve skill motor function in mouse model of thoracic SCI (79). The stimulation of fore/hindlimb muscles by rehabilitation exercise is used as a strategy to enhance the stepping ability and respiratory recovery post SCI in both animal models and clinical studies (76, 77, 79). On the other hand, these evidences reinforce the hypothesis that stimulation of limb muscles may be useful to investigate respiratory rehabilitation post SCI. In this case, rat models are the most widely used to study SCI (50). However, only few studies have used the mouse model of cervical injury to assess post-traumatic spontaneous locomotor and respiratory recovery (50-52). Recently, Reinhardt et al. showed that mouse model may recover a sufficient ambulatory locomotion after 60 days of bilateral cervical spinal contusion (105). Despite that, there is no studies on SCI mouse model which investigate the role of a long-term exercise training paradigm on locomotor and respiratory muscle plasticity. Therefore, the aim of this work was to demonstrate the feasibility of using a mouse model to investigate the impact of cervical spinal cord injury hemisection on locomotor/respiratory plasticity and recovery followed 6 weeks of training on forced exercise wheel system. We wanted 1) to evaluate the animal running capacity (at different

post-lesional time points) on forced exercise wheel system, 2) to investigate the effect of SCI on locomotor forelimb (extensor digitorum communis (EDC)), hindlimb (Tibialis anterior (TA) and soleus (SOL)) and respiratory (DIA) morphology muscles and microcirculation following 6 weeks of slow intensity exercise training paradigm. Diaphragmatic electromyography was also recorded at the end of exercise training protocol to determine the recovery of mouse diaphragm activity.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Ethics statement**

All experiments reported in this manuscript were conformed to the policies laid out by the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. These experiments were approved by the Ethics committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and complied with the French and European laws regarding animal experimentation (Apafis #2018011916127707v4). These experiments were performed on adult C57BL/6 male and female mice (8-10 weeks old). The animals were housed in individually ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation A78-322-3, France), with access to food and water *ad libitum* on a 12 h light/dark cycle.

### **Incremental test protocol**

A total of 36 animals were familiarized to the forced exercise wheel system (Lafayette Inst., Lafayette, IN) during 1 week (6 m/min, 10 min each day). After the acclimatization period, all mice performed an incremental test with increments of 2 m/min every 2 min, until exhaustion, defined as the moment when animals were unable to keep up the pace into the wheel or animal stopped running spontaneously. A custom-made polystyrene barrier was developed to motivate the animal to keep running. After a first incremental test (before SCI surgery) the mice were randomly separated in 3 groups: NAIVE(n=12, 6 females and 6 males),

SHAM (n=12, 8 females and 4 males) and SCI (n=12, 5 females and 7 males). Afterwards, each NAIVE, SHAM and SCI group was equally distributed (n=6 to each group) to sedentary or trained subgroups (SED or TR). No difference in incremental test results was observed between sex. A second incremental test was performed 7 days after SCI/SHAM surgery to determine the intensity of the exercise protocol (60% from maximal speed achieved). At the end of the exercise protocol, sedentary and trained mice performed a third incremental to evaluate the running performance at 49 days after the SCI /SHAM surgery (Figure 1A).

### **Chronic C2 hemisection**

Animals were anesthetized with isoflurane (5% in 100% O<sub>2</sub>) in a closed chamber. Anesthesia was maintained throughout the procedure (1.5-2% isoflurane in 100% O<sub>2</sub>) through a nose cone. Animals were placed on a heating pad. After careful shaving of the dorsal part of the animal's neck, the skin and muscles above the first vertebrae were retracted. A C2 laminectomy and a durotomy were performed. The spinal cord was ventrolaterally hemisected caudal to the C2 dorsal roots by using microscissors followed by the use of a microscalpel to ensure the sectioning of all remaining fibers. Sutures were performed to close the wounds and skin. Sham mice underwent the same procedures without the hemisection. The isoflurane vaporizer was then turned off and mice received subcutaneous injections of analgesic (buprenorphine, 375 µg/kg: Buprecare from Axience) and antibiotics (40 mg/kg Trimethoprim and 200 mg/kg Sulfadoxin: Borgal 24%, from Virbac).

### **Exercise training protocol paradigm**

Exercise training was applied during 6 weeks (1 week after surgery) and consisted of running on an exercise wheel system at 60% of the second incremental test (7 days after SCI surgery), 1 hour per day and 5 days a week. Sedentary mice were kept in non-moving wheel for the entire duration of the exercise session.

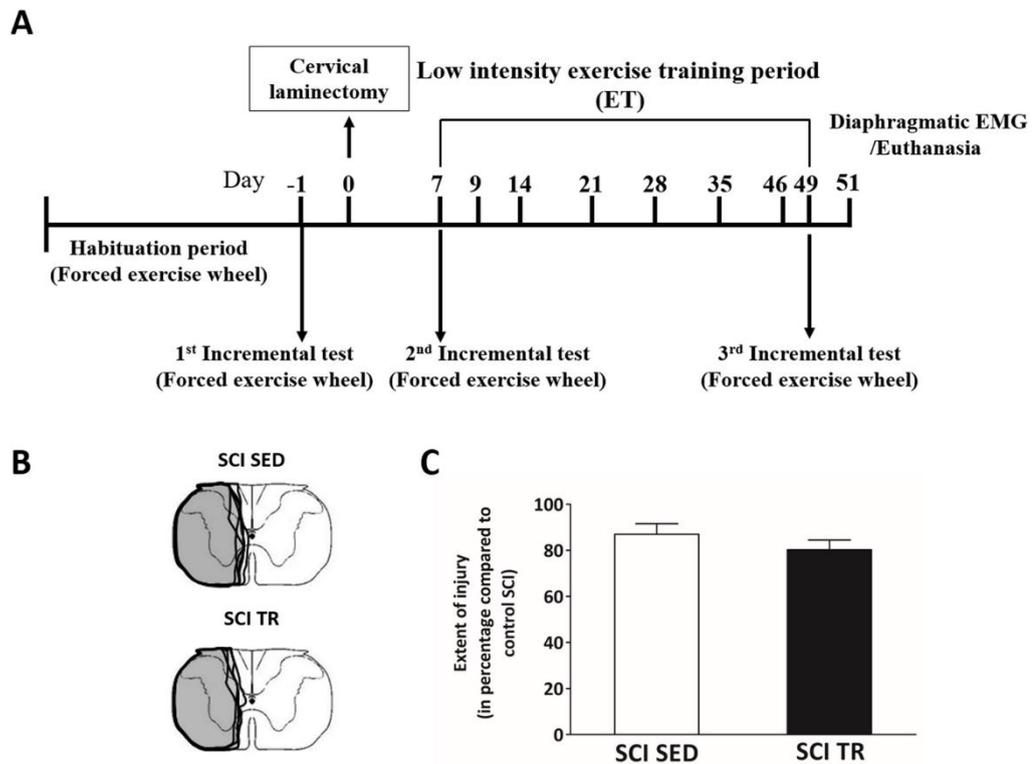


Figure 1

### Electrophysiological recordings

Two days after the third incremental test (49 days after SCI surgery), anesthesia was induced using 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> and maintained throughout the experiment (2.5% in 21% O<sub>2</sub>) through a nose cone. Animals were placed in supine position on a heating pad to maintain a physiological and constant body temperature. A laparotomy was performed to access the diaphragm. Both sides (ipsilateral and contralateral to the spinal cord lesion) of the diaphragm were tested for their activity (electromyography) using a handmade bipolar surface silver electrode on the muscle during spontaneous poikilocapnic normoxic or transient mild asphyxia breathing (by occlusion of the animal nose for 15 s). Electromyographies were amplified (Model 1800; gain, 100; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100 Hz to 10 kHz). The signals were digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 4 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 9 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The bilateral diaphragmatic electromyographies were integrated (50 ms decay). At the end of the experiment, animals were humanly euthanized by intracardiac perfusion of

heparinized 0.9% NaCl (10 mL) for tissue harvesting. The C1-C3 segment of the spinal cord was dissected out and immediately placed overnight in cold 4% paraformaldehyde, then cryoprotected for 48h in 30% sucrose (in 0.9% NaCl) and samples were stored in a freezer at -80°C. Forelimb (EDC) and hindlimb (TA and SOL) muscles from the ipsilateral side, and respiratory muscle (Ipsilateral and Contralateral DIA) were then dissected and immediately flash-frozen in isopentane (2-methylbutane) chilled with liquid nitrogen. After freezing, muscle samples were stored at -80°C for further processing.

### **Immunofluorescence labeling of muscle tissue**

All frozen skeletal muscles were placed in a Leica cryostat and transverse sections of 10 µm were performed. Sections were blocked for 45 min in 10% goat serum diluted in PBS 1X solution and incubated overnight at 4°C in primary antibodies for the following Myosin heavy chain (MyHC) isoforms: MyHCSlow (BA-F8, 1:100 dilution; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), MyHC2A (SC-71, 1:100 dilution; Developmental Studies Hybridoma Bank), and Laminin (Sigma L9393, 1:200 dilution; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Secondary antibodies were then incubated at a 1:2000 dilution, using Alexa Fluor Goat anti-Mouse IgG2b 647 (for MyHCSlow), Goat anti-Mouse IgG1 555 (for MyHC2A) and Goat anti-Rabbit 594 (for Laminin). CD 31 (PECAM-1, 1:100; Thermo Fisher Scientific, Inc., MA) antibody was incubated with Laminin antibody and Alexa Fluor Goat anti-Rat 488 and Goat anti-Rabbit 594 were applied at 1:2000 dilution.

### **Muscle measurements**

Fields within stained cross-sections were captured at 10 × magnification on a laser confocal microscope (Leica TCS SPE) capable of simultaneous imaging of multilabeled fluorescence. Images were captured in a 1024 x 1024 pixel array, with similar acquisition parameters across preparations. The composition of the different types of myofibers (scale bars=200 µm) was measured in approximately 200 muscle fibers from each muscle in each animal and was analyzed using Fiji v1.52p (NIH Image du National Institutes of Health, USA). The same fibers selected for cross-sectional area measurements were also used to determine the proportion of fiber types in each muscle. Based on the staining pattern, all skeletal muscles fibers were classified as type I, type

Ila, type IIX and/or IIb (61). CD31-positive cells and the number of fibers were counted then, density and capillary-to-fiber ratios were calculated using Fiji v1.52p (NIH Image du National Institutes of Health, USA).

### **Histological reconstitution of the extent of C2 injury**

Longitudinal spinal cord sections (30  $\mu$ m thickness) were obtained with a Leica cryostat and the extent of injury was assessed after cresyl violet staining. A light microscope was used to evaluate the extent of the injury and reported on a stereotaxic transverse plane (C2). Each injury was then digitized and analyzed with Fiji v1.52p (NIH Image du National Institutes of Health, USA). The percentage of damaged tissue on the injured side was calculated by reference to a complete hemisection (which is 100% of the hemicord).

### **Data processing and statistical analyses**

The amplitude and duration electromyography signal of minimally 5 double integrated bursts during spontaneous breathing and mild asphyxia was calculated for each animal from the both diaphragm sides with LabChart 9 Pro software (AD Instruments). Student's t test was performed between the different groups for extent of injury evaluation or between the different post-lesioned time groups of the same condition. Paired t-test was used for comparisons 1) of the animal running capacity through incremental test at different time points (before SCI, 7 days after SCI and 49 days after SCI) and 2) of contralateral and ipsilateral diaphragmatic electromyography and 3) of immunofluorescence analysis. Two-way ANOVA (Bonferroni post hoc test) was used considering training and group (NAIVE, SHAM and SCI group) as different ways. All data were presented as mean  $\pm$  SEM and statistics were considered significant when  $p < 0.05$ . SigmaPlot 12.5 software was used for all analyses.

## **RESULTS**

## Maximal physical capacity

The size of the cervical SCI lesion was similar in the lateral part of both groups of injured animals (SCI SED and SCI TR group) (Figure 1B). Quantitatively, no significant difference in the size of injury between SCI SED and SCI TR groups was observed ( $86.99 \pm 4.60\%$  and  $80.23 \pm 4.27\%$ , respectively,  $p = 0.329$ ) (Figure 1C). Running capacity expressed as running time (s) was decreased in SCI groups at 7 days after SCI. After 6 weeks of training on the forced exercise wheels (Figure 2A), running capacity was higher in trained groups (Figure 2B) ( $785.20 \pm 59.21$  s vs  $500.31 \pm 20.00$  s for SCI TR vs SCI SED,  $p < 0.05$ ;  $1119.48 \pm 50.74$  s vs  $857.32 \pm 80.94$  s for NAIVETR vs NAIVESED  $p < 0.05$ ;  $1102.93 \pm 34.99$  s vs  $802.75 \pm 85.49$  s for SHAM TR vs SHAM SED,  $p < 0.05$ ).

## Morphometric analysis of locomotor muscle

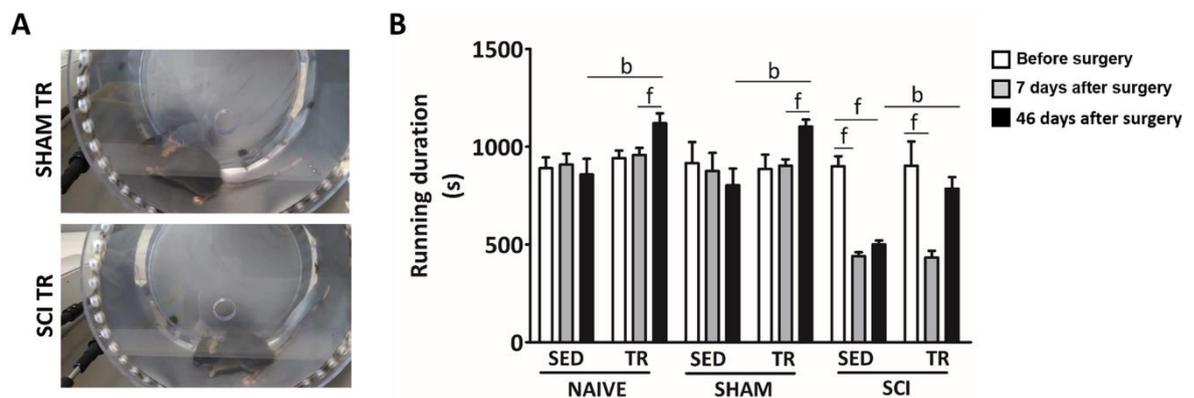


Figure 2

To investigate whether forced exercise wheel training alters the muscle fiber composition in SCI mice, MyHC isoforms (MyHC<sub>slow</sub>= type I, MyHC<sub>2A</sub>= type IIa and non-labeling= IIb/x) were detected by immunofluorescence staining (Figure 3). However, only soleus muscle presented type I staining (Figure 3A). The predominant types of myofibers in the ipsilateral forelimb (EDC) and hindlimb (TA and SOL) muscles of trained and sedentary animals were compared. No significant difference in the relative distribution of myofiber types between SCI TR and SCI SED was found at any all 3 locomotor muscles (Figure 3B-D). However,

a significant decrease in cross-sectional area type IIa myofiber was observed in EDC of NAIVETR group (Figure 4A) ( $625.43 \pm 10.40 \mu\text{m}^2$  vs  $752.87 \pm 49.78 \mu\text{m}^2$ ; NAIVETR vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ) and in SHAM SED group ( $645.19 \pm 24.37 \mu\text{m}^2$  vs  $752.87 \pm 49.78 \mu\text{m}^2$ ; SHAM SED vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ) compared to NAIVESED group. Cross-sectional area of type IIb/x myofiber in the EDC was reduced in NAIVETR (Figure 4B) ( $1127.63 \pm 70.26 \mu\text{m}^2$  vs  $1506.85 \pm 93.62 \mu\text{m}^2$ ; NAIVETR vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ), in SHAM SED ( $1005.97 \pm 37.97 \mu\text{m}^2$  vs  $1506.85 \pm 93.62 \mu\text{m}^2$ ; SHAM SED vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ) and in SCI SED group ( $1178.82 \pm 84.52 \mu\text{m}^2$  vs  $1506.85 \pm 93.62 \mu\text{m}^2$ ; SCI SED vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ) compared to NAIVESED group. No significant difference in cross-sectional area of TA muscle was observed between groups (Figure 4C and D). Interestingly, in SOL muscle, the cross-sectional area in myofibers of SHAM SED group compared to NAIVESED group, presented no significant difference in type I fibers (Figure 4E) ( $1303.93 \pm 46.97 \mu\text{m}^2$  vs  $1613.38 \pm 158.96 \mu\text{m}^2$ ; SHAM SED vs NAIVESED,  $p = 0.143$ ), while in type IIa (Figure 4F) a tendency to reduce ( $743.56 \pm 64.84 \mu\text{m}^2$  vs  $1088.34 \pm 134.40 \mu\text{m}^2$ ; SHAM SED vs NAIVESED,  $p = 0.079$ ) and a significant decrease in type IIb/x (Figure 4G) were observed ( $538.94 \pm 56.44 \mu\text{m}^2$  vs  $902.87 \pm 68.15 \mu\text{m}^2$ ; SHAM SED vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ).

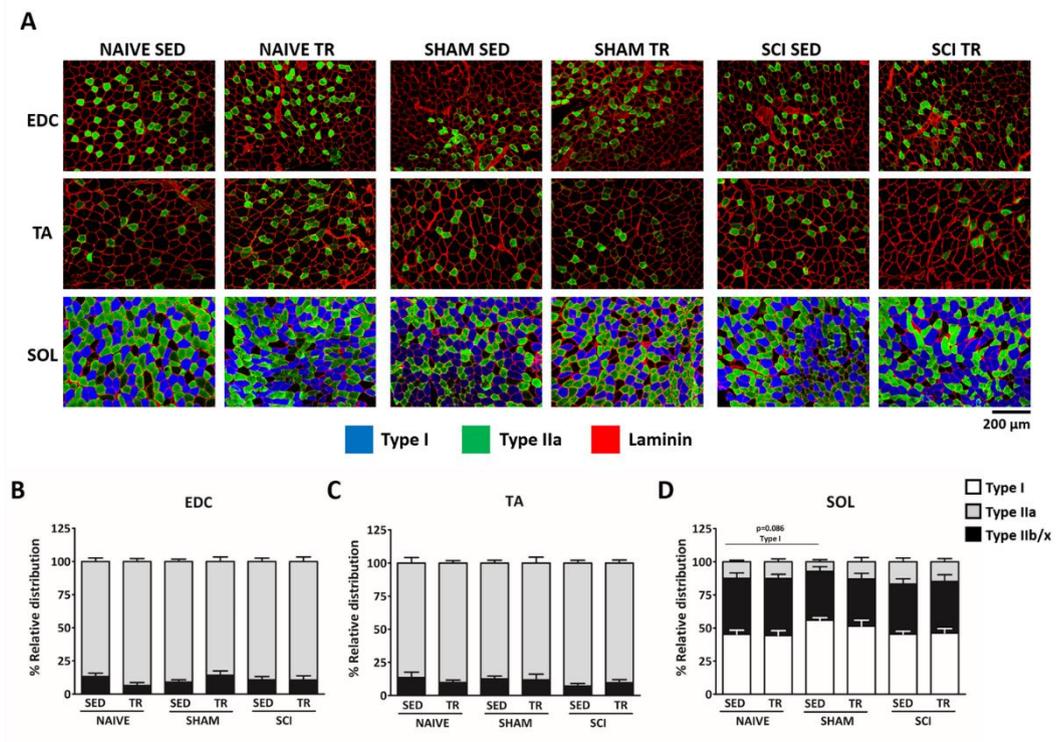


Figure 3

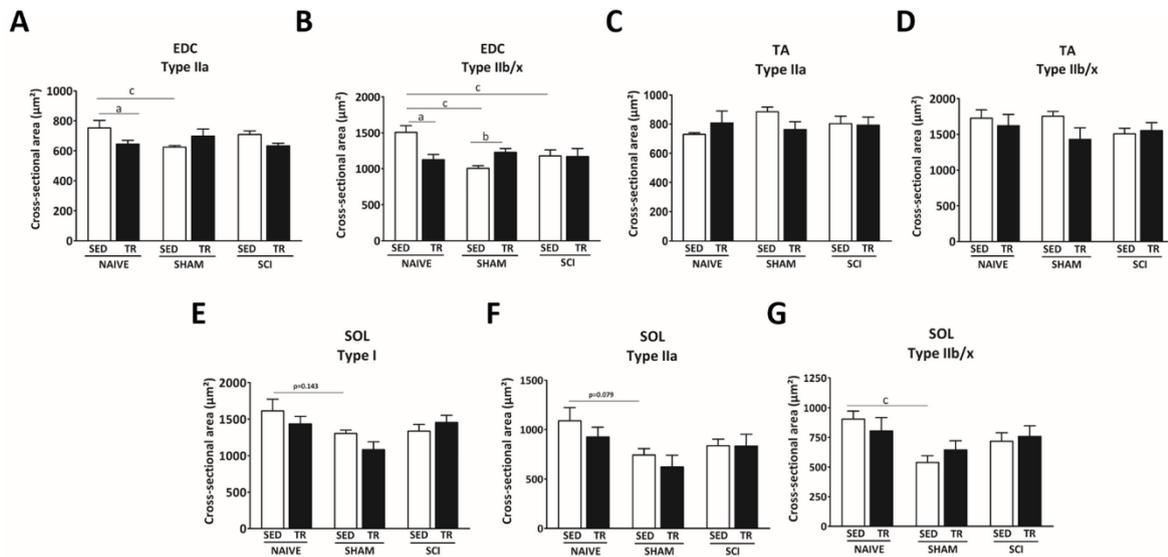


Figure 4

### Vascularization analysis of locomotor muscle.

To assess the capillary response to exercise, endothelial cells were detected in EDC, TA and SOL muscles (Figures 5) by immunofluorescence staining and then capillary density (CD) and capillary-to-fiber ratio (C:F ratio) were analyzed (Figures 6A-F). For the capillary density of forelimb muscle (EDC) no significant difference was observed between groups (Figure 6A), while the capillary-to-fiber ratio (Figure 6B) in SCI TR group was higher than in the SCI SED (C:F  $1.48 \pm 0.27$  vs  $0.47 \pm 0.06$ , SCI TR vs SCI SED,  $p < 0.05$ ) and NAIVETR (C:F  $1.48 \pm 0.27$  vs  $0.70 \pm 0.16$ , SCI TR vs NAIVE,  $p < 0.05$ ) groups. Six weeks of exercise training increased the muscle capillaries of the hindlimb (TA and SOL) in SCI group (Figures 6C-F), capillary density and capillary-to-fiber ratio in the SCI TR group were increased compared to the SCI SED group in TA muscle (Figures 6C and D) (CD  $10602.12 \pm 1575.66 \mu\text{m}^2$  vs  $5362.49 \pm 802.74 \mu\text{m}^2$ ; C:F ratio  $1.71 \pm 0.12$  vs  $1.01 \pm 0.24$ , SCI TR vs SCI SED,  $p < 0.05$ ) and SOL muscle (Figures 6E and F) (CD  $2655.93 \pm 265.20 \mu\text{m}^2$  vs  $1685.34 \pm 196.38 \mu\text{m}^2$ ; C:F ratio  $2.32 \pm 0.33$  vs  $1.33 \pm 0.18$ , SCI TR vs SCI SED,  $p < 0.05$ ). In addition, the capillary density in TA muscle was higher in the SCI TR group than in the NAIVETR group (CD  $10602.12 \pm 1575.66 \mu\text{m}^2$  vs  $5600.13 \pm 576.03 \mu\text{m}^2$ ). The same tendency was observed in the and SOL muscle (CD  $2655.93 \pm 265.20 \mu\text{m}^2$  vs  $1319.29 \pm 152.05 \mu\text{m}^2$ , SCI

TR vs NAIVETR,  $p < 0.05$ ). In the SCI SED group the capillary density of TA muscle was significantly lower than that seen in the NAIVESED group ( $CD\ 5362.49 \pm 802.73\ \mu m^2$  vs  $8530.24 \pm 1821.85$ , SCI SED vs NAIVESED,  $p < 0.05$ ).

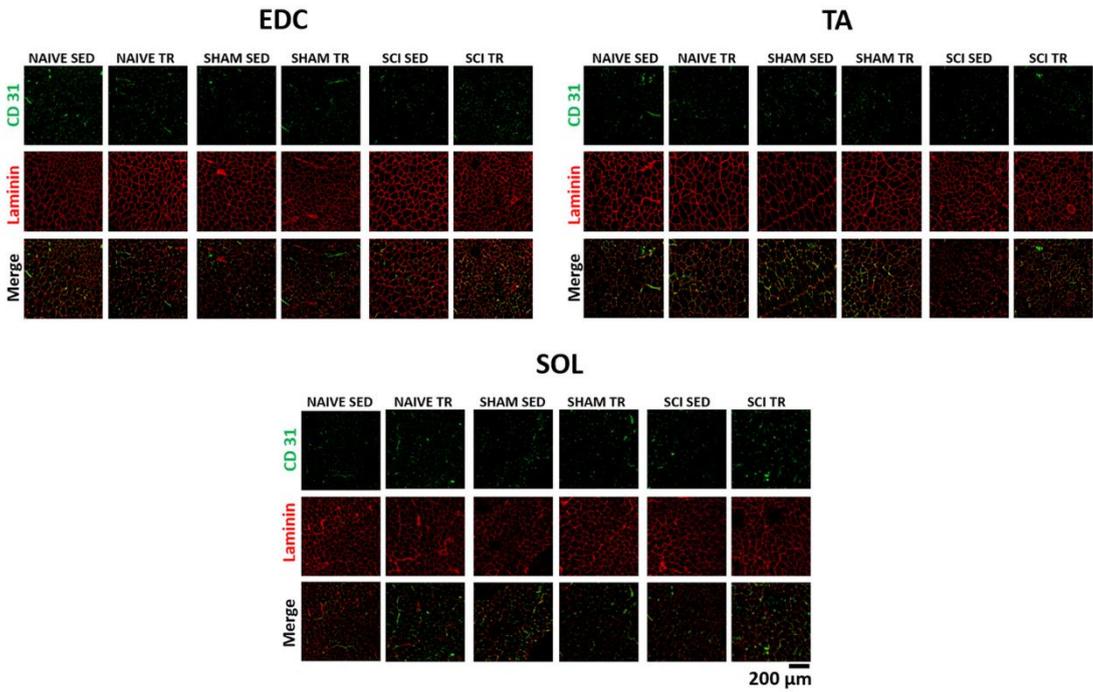
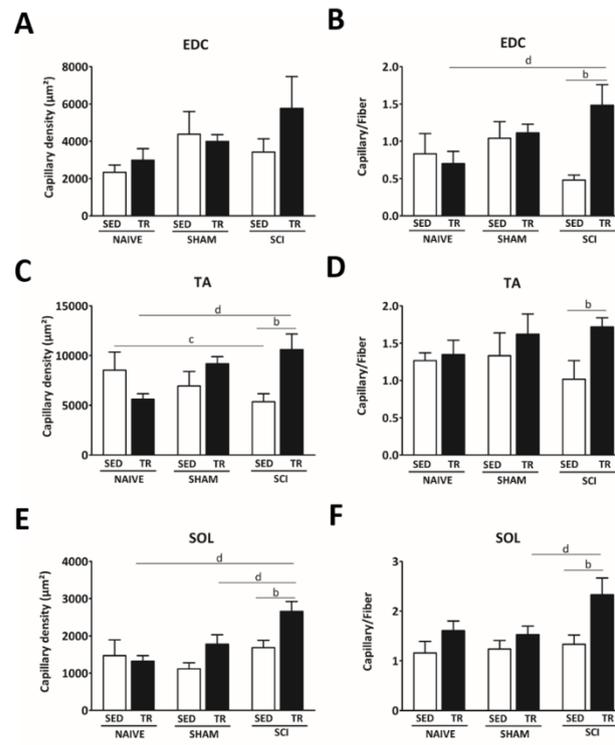


Figure 5



**Figure 6**

**SCI effect on diaphragm activity following exercise training**

Representative traces of raw diaphragmatic electromyography at 51 days following SCI are shown in Figure 7A (uninjured (NAIVE/SHAM, SED and TR) and injured animals in Figure 7B (SCI, contralateral and ipsilateral DIA, SED and TR). A reduced diaphragmatic electromyography activity during spontaneous breathing and mild asphyxia on the ipsilateral side in SCI groups was observed when compared to the contralateral side. Diaphragmatic electromyography during spontaneous breathing and mild asphyxia did not show any difference in amplitude on the contralateral side of injured and uninjured animals groups. Quantitatively, uninjured animals groups showed a similar integrated diaphragm average amplitude (Figure 7C and D) ( $1.19 \pm 0.13$  and  $0.97 \pm 0.11 \mu\text{V.s.s}$ , for NAIVE SED and TR, respectively,  $1.12 \pm 0.15$  and  $0.98 \pm 0.23 \mu\text{V.s.s}$ , for SHAM SED and TR, respectively,  $p < 0.05$ ) compared to the contralateral side of the SCI SED ( $1.59 \pm 0.28 \mu\text{V.s.s}$ ) and SCI TR group ( $1.37 \pm 0.18 \mu\text{V.s.s}$ ). Fifty-one days following SCI, the integrated diaphragm average amplitude during spontaneous breathing and mild asphyxia on the ipsilateral side was reduced compared to the

contralateral one. No significant difference was observed during spontaneous breathing ( $0.38 \pm 0.08 \mu\text{V.s.s}$ , for SCI SED and  $0.61 \pm 0.11 \mu\text{V.s.s}$ , for SCI TR,  $p=0.138$ ) and mild asphyxia ( $0.74 \pm 0.07 \mu\text{V.s.s}$ , for SCI SED and  $0.830 \pm 0.19 \mu\text{V.s.s}$ , for SCI TR,  $p= 0.589$ ). On the ipsilateral side, a significant decrease in the duration of integrated average electromyography during spontaneous breathing (Figure 7E) was observed in SCI SED group when compared to the contralateral side ( $158.06 \pm 4.92 \text{ ms}$  vs  $139.17 \pm 4.37 \text{ ms}$ ,  $p<0.05$ ), while in the SCI TR group no difference was observed between diaphragm sides ( $153.13 \pm 5.07 \text{ ms}$  vs  $145.82 \pm 9.53 \text{ ms}$ ,  $p=0.272$  for contralateral vs ipsilateral). Interestingly, the duration of integrated average electromyography during mild asphyxia (Figure 7F) showed a decreasing tendency in the SCI SED group ( $181.89 \pm 9.55 \text{ ms}$  vs  $155.60 \pm 5.83 \text{ ms}$ , contralateral vs ipsilateral side, respectively,  $p=0.092$ ), while it was significantly reduced in SCI TR group ( $169.75 \pm 6.62 \text{ ms}$  vs  $151.98 \pm 2.84 \text{ ms}$ , contralateral vs ipsilateral side, respectively,  $p=0.043$ ).

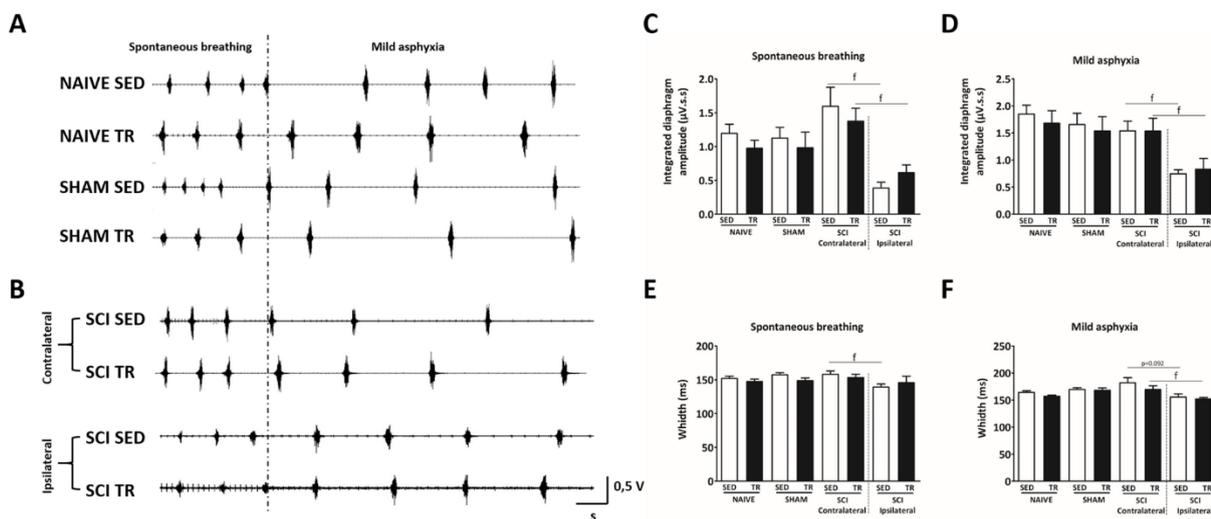


Figure 7

### Morphometric analyses of respiratory muscle

To investigate the effect of our forced exercise wheel training protocol in respiratory muscle recovery followed by SCI, MyHC isoforms (MHC I, IIa and negative label IIb/x) were detected by immunofluorescence stain (Figure 8A). The predominant fiber types of the contralateral and ipsilateral diaphragm muscle were analyzed (Figure 8B-E). In cross-sectional area of type I myofiber (Figure 8B), no significant increase was observed on the ipsilateral side of both SCI groups (SED and TR) compared to their respective contralateral

sides (SCI SED  $634.29 \pm 41.02 \mu\text{m}^2$  vs  $875.59 \pm 96.62 \mu\text{m}^2$ , respectively,  $p=0.126$ ; and SCI TR  $607.57 \pm 38.88 \mu\text{m}^2$  vs  $801.56 \pm 62.77 \mu\text{m}^2$ , respectively,  $p=0.076$ ). In the SCI TR group, the cross-sectional area of type IIa myofiber on the contralateral side (Figure 8C) was decreased when compared to the ipsilateral side ( $524.09 \pm 13.74 \mu\text{m}^2$  vs  $759.74 \pm 33.07 \mu\text{m}^2$ , respectively,  $p<0.05$ ) and SCI SED contralateral side ( $524.09 \pm 13.74 \mu\text{m}^2$  vs  $645.19 \pm 39.89 \mu\text{m}^2$ , SCI TR vs SCI SED group,  $p<0.05$ ). In type IIb/x myofiber cross-sectional area (Figure 8D), no difference was observed between groups or diaphragm sides. Relative distribution (Figure 8E) was altered between the contralateral and the ipsilateral sides in SCI SED group ( $7.25 \pm 1.14 \%$  vs  $16.49 \pm 4.20 \%$ ,  $p<0.05$ ), while no difference was observed in the SCI TR group ( $7.88 \pm 1.13 \%$  vs  $10.17 \pm 1.77 \%$ ,  $p=0.303$ ).

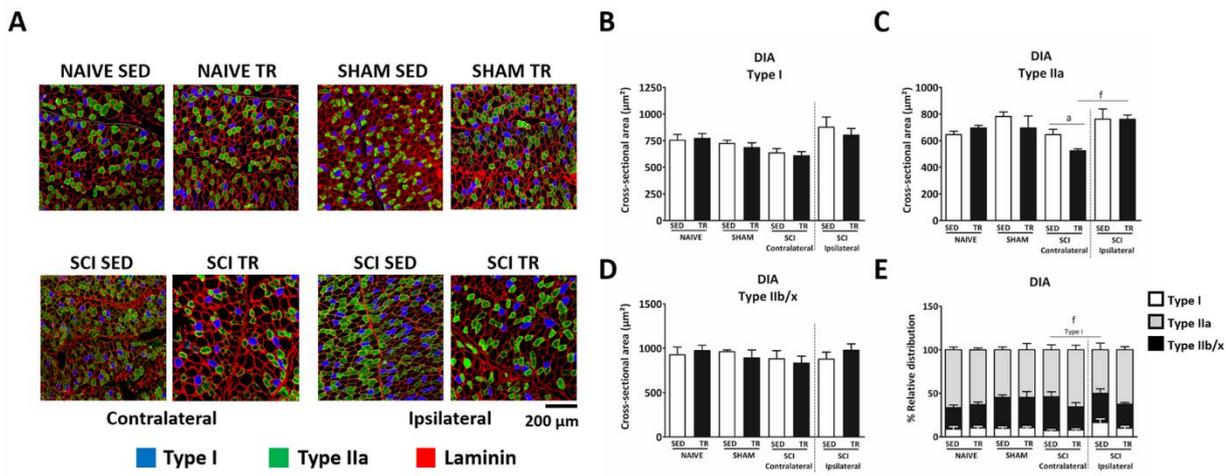


Figure 8

### Vascularization analysis of respiratory muscle.

To assess the capillary response to exercise, endothelial cells were detected in diaphragm muscle (Figures 9A) by immunofluorescence and then capillary density (CD) and capillary-to-fiber ratio (C:F ratio) were analyzed (Figure 9 B-C). Six weeks of exercise training increased effectively the capillary density and capillary-to-fiber ratio (Figures 9B and 9C) on the contralateral side of SCI group (CD  $1586.00 \pm 280.68 \mu\text{m}^2$  vs  $433.87 \pm 65.91 \mu\text{m}^2$ ; C:F  $1.46 \pm 0.21$  vs  $0.82 \pm 0.12$ , SCI TR vs SCI SED, respectively,  $p<0.05$ ). On the other hand, no significant difference in the capillary density was observed between ipsilateral sides of SCI groups (CD

1061.15 ± 235.35 vs 851.63 ± 224.75, SCI TR vs SCI SED, respectively, p=0.534) and capillary-to-fiber ratio (C:F 0.945 ± 0.15 vs 1.29 ± 0.24, SCI TR vs SCI SED, respectively, p=0.606).

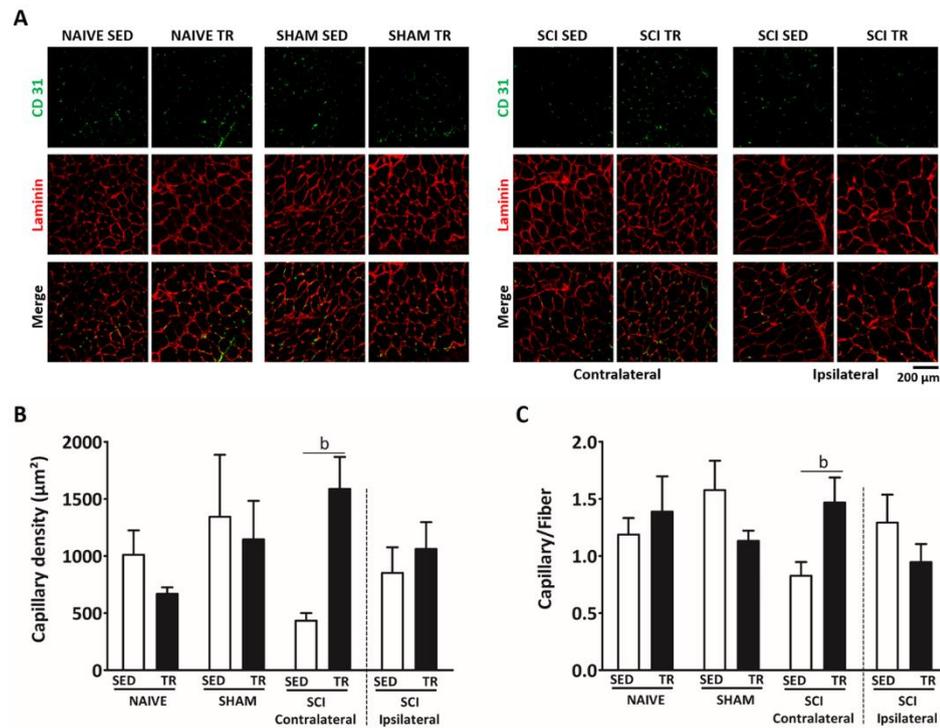


Figure 9

## DISCUSSION

This study reports for the first time the effect of a 6-week low intensity exercise training on locomotor/respiratory muscles and vascular remodeling in a mouse model of C2 cervical spinal cord injury.

### Impact of cervical spinal cord injury on locomotor muscles

Running capacity of the SCI group was significantly reduced 7 days after injury. A 6-week exercise training (49 days post SCI) induced a running capacity recovery similar to the level observed pre-SCI. Cervical SCI commonly affects ipsilateral forelimb and rehabilitative training is usually provided to recover locomotor skills abilities (106, 107). Usually, to assess limb rehabilitation, training efficacy is measured through a qualitative rating scale such as the Basso Mouse scale (BMS), the forelimb locomotor assessment scale (FLAS) or the forelimb locomotor scale (FLS) (108-110). However, these tests are better suited for evaluating

parameters like coordination, paw position, and trunk instability (Basso et al., 1995; Carvalho et al., 2008; Cramer et al., 2002; Jung et al., 2016; Liu et al., 2008; Sandrow-Feinberg et al., 2009; Zhang et al., 2007). Locomotor rehabilitation is one of the most common methods to provide functional recovery after SCI in both pre-clinical settings and animal models (79, 111). This training promotes plasticity in the neuromuscular control, especially in the spinal circuit pattern generator (CPG) (112-114). However, studies using rehabilitative training, which induces repetitive movement for one specific task (e.g. treadmill walking, biking, wheel running, swimming), assess locomotion recovery only by qualitative tests (66, 67, 115), whereas running capacity has not yet been evaluated in mice following chronic SCI. Several studies have used incremental exercise capacity in both animal models and humans as a strategy to evaluate running capacity (81, 116-118). In order to assess the post-traumatic CPG plasticity, we were able to quantify using the incremental test the impact of SCI on the running capacity of our mouse model.

In rodent models, SCI impacts dramatically the muscle morphology within the first weeks following injury (82, 83). One week of training can efficiently improve recovery in the skeletal muscle heavily impacted by SCI (84, 85). Few studies have assessed the effects of long periods of locomotor training on muscle properties in a mouse model of SCI. Battistuzzo et al. have performed a treadmill-training paradigm on thoracic hemisectioned mice, with the speed initially set up at 6 m/min and then, gradually increased to 10–12 m/min over the course of training. This protocol led to a slight increase in fiber cross-sectional area at 10 weeks post-training in SOL muscle (62). In comparison with the training paradigm above, our 6-week low intensity exercise training protocol did not change fiber cross-sectional area in locomotor muscle. The absence of modification in fiber cross-sectional area of skeletal muscle may be due to the exercise intensity or the duration period applied in this work. However, despite the fact that our exercise training protocol was not effective to remodel the fiber cross-sectional area of the limb muscles, an increase in the microcirculation in the SCI TR group was observed. Contrary to skeletal muscles, microvascular supply undergoes remodeling, typically in the form of capillary rarefaction after SCI (65). The capacity to deliver oxygen and fuel to the working muscles is *de facto* impaired and contributes to reduce fatigue resistance (86). Moreover, a capillary rarefaction could contribute to the impairment of insulin sensitivity and glucose intolerance which may be further aggravated by systemic

inflammation (87) and posttraumatic inflammatory response in SCI secondary pathogenesis (88, 89). Prolonged endurance exercise training leads to an increase in skeletal muscle microcirculation (116) and based on observation in rodents, it has been suggested that the rate of microvessels proliferation (angiogenesis) is faster in response to low intensity of aerobic exercise training (98). In our study, only the SCI group showed an increase in microcirculation after 6 weeks of exercise training. Usually, in prolonged endurance exercise in rodents, the intensity of exercise is adjusted to maintain the training intensity (116). However, we did not adjust our protocol training throughout the experiment to prevent any bias in our procedure between the uninjured and injured animals. The absence of increase in microcirculation in our uninjured TR groups could be due to the lack of exercise/training adaptation.

### **Impact of cervical spinal cord injury on respiratory muscle**

We hypothesized that stimulation of fore/hindlimb muscle by exercise rehabilitation might be used as a strategy to enhance the neuroplasticity in order to recover the stepping ability and the respiratory function (41, 62, 76, 90). Treadmill training is known to improve respiratory function in patients with cervical and thoracic SCI. However, the mechanisms involved remain unclear (76). One hypothesis is that direct inputs to the respiratory CPG from the mesencephalic locomotor region may provide an interaction between spinal locomotor and brainstem respiratory CPGs (90). From this standpoint, an increase in hindlimb stimulation could lead to a phrenic motor output (119). This work investigated the modulation in diaphragm activity in SCI model following an exercise training protocol of 6 weeks. Electromyography activity was recorded at the end of the exercise training to determine its effect on the recovery of the SCI mouse. This current study showed for the first time that, even after 51 days, diaphragm recovery following SCI in mice is quite limited. Low intensity exercise training did not induce an effective recovery of the electromyography activity in impaired diaphragm in SCI mouse. On the other hand, the contraction duration observed during spontaneous breathing was reduced in SCI sedentary group, while it was similar in the SCI trained group and uninjured groups. Post-injury plasticity is attributed to the “cross phrenic phenomenon” (CPP), which consists in the activation of silent pathways crossing the spinal cord midline at the C3-C6 segmental level and connects to the ipsilateral deafferented phrenic motoneurons (92, 93). However, it has been suggested that this

spontaneous post-injured plasticity process, named, “spontaneous cross-phrenic phenomenon”, could be different from the initial pathways described as the CPP and should involve axonal sprouting and rerouting, and the formation of new polysynaptic connections to phrenic motoneurons via cervical spinal interneurons (38, 94-96). Nevertheless, the recovery of phrenic motor function remains limited and deficits in breathing persist for months post-injury (55, 96). With regard to the impact of SCI injury on diaphragmatic muscle, we investigated the effect of a putative non-invasive strategy to enhance long-term diaphragmatic plasticity and remodeling following SCI. Long-term study with in rat models of cervical SCI has previously demonstrated that 42 days post-injury diaphragm morphology exhibited a reduction in type IIb/x myofiber, and hypertrophy was no longer evident on type I or IIa myofibers (56). In addition, reduction in contractile force occurs in parallel with altered cross-sectional area of fibers. In our study, cross-sectional area of type I myofiber showed a slight increase in ipsilateral diaphragm in both SED and TR SCI groups. On the other hand, exercise training decreased type IIa myofiber in the contralateral side. Moreover, we investigated for the first time the effect of aerobic exercise on inducing angiogenesis in the respiratory muscle of SCI mice. Therefore, the capillaries in the intact diaphragm of SCI TR group were increased compared to SCI SED group. As previously demonstrated, this increase in capillary density could contribute to the switch in fiber type in the limb muscles (99-101). This suggests that morphology and vascular remodeling of the diaphragm, contributed to avoid imbalance of fiber distribution between diaphragm sides. More experiments are required to investigate if the changes on diaphragm morphology and vascular structures in SCI trained group are correlated with contraction duration analyzed by electromyography.

Based on these data, low intensity exercise training improves the microcirculation of the locomotor muscle. In addition, our protocol showed a favorable role in diaphragm myofibers and vascularization after cervical spinal cord injury hemisection. These results suggest an increase in fatigue resistance and a contribution to the running capacity. On the other hand, we admit that 6 weeks of low exercise intensity are not enough to improve respiratory function. Nevertheless, our data allow us to consider that low intensity exercise training could be a good non-invasive strategy to use in order to sustain locomotor and respiratory muscle plasticity following cervical spinal cord injury.

**Acknowledgements:** This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV, MB), INSERM (MB), Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (MB, SV). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Conflicts of interest:** No conflict of interest

## REFERENCES

1. Thompson C, Mutch J, Parent S, Mac-Thiong J-M. The changing demographics of traumatic spinal cord injury: An 11-year study of 831 patients. *The journal of spinal cord medicine*. 2015;38(2):214-23.
2. Winslow C, Rozovsky J. Effect of spinal cord injury on the respiratory system. *Am J Phys Med Rehabil*. 2003;82(10):803-14.
3. Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J. Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature*. 2011;475(7355):196-200.
4. Keomani E, Deramautd TB, Petitjean M, Bonay M, Lofaso F, Vinit S. A murine model of cervical spinal cord injury to study post-lesional respiratory neuroplasticity. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2014(87):e51235.
5. Lee K-Z, Dougherty BJ, Sandhu MS, Lane MA, Reier PJ, Fuller DD. Phrenic motoneuron discharge patterns following chronic cervical spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2013;249:20-32.
6. Vinit S, Darlot F, Stamegna J-C, Gauthier P, Kastner A. Effect of cervical spinal cord hemisection on the expression of axon growth markers. *Neurosci Lett*. 2009;462(3):276-80.
7. Battistuzzo CR, Rank MM, Flynn JR, Morgan DL, Callister R, Callister RJ, et al. Effects Of treadmill training on hindlimb muscles of spinal cord–injured mice. *Muscle Nerve*. 2017;55(2):232-42.
8. Castro MJ, Apple Jr DF, Hillegass EA, Dudley GA. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle cross-sectional area within the first 6 months of injury. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1999;80(4):373-78.
9. Gill L, Ross H, Lee K, Gonzalez-Rothi E, Dougherty B, Judge A, et al. Rapid diaphragm atrophy following cervical spinal cord hemisection. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014;192:66-73.
10. Cramer R, Weston A, Climstein M, Davis G, Sutton J. Effects of electrical stimulation-induced leg training on skeletal muscle adaptability in spinal cord injury. *Scand J Med Sci Sports*. 2002;12(5):316-22.
11. Lin VW, Bono CM. *Spinal cord medicine: principles & practice*: Demos medical publishing; 2010.
12. Mantilla CB, Sieck GC. Phrenic motor unit recruitment during ventilatory and non-ventilatory behaviors. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;179(1):57-63.
13. Bezdudnaya T, Hormigo KM, Marchenko V, Lane MA. Spontaneous respiratory plasticity following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats. *Exp Neurol*. 2018;305:56-65.
14. Fuller D, Doperalski N, Dougherty B, Sandhu M, Bolser D, Reier P. Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Exp Neurol*. 2008;211(1):97-106.
15. Mantilla CB, Greising SM, Zhan W-Z, Seven YB, Sieck GC. Prolonged C2 spinal hemisection-induced inactivity reduces diaphragm muscle specific force with modest, selective atrophy of type IIx and/or IIb fibers. *J Appl Physiol*. 2013;114(3):380-86.
16. de Paleville DT, McKay W, Aslan S, Folz R, Sayenko D, Ovechkin A. Locomotor step training with body weight support improves respiratory motor function in individuals with chronic spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;189(3):491-97.
17. Hormigo KM, Zholudeva LV, Spruance VM, Marchenko V, Cote M-P, Vinit S, et al. Enhancing neural activity to drive respiratory plasticity following cervical spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2017;287:276-87.
18. Sandrow-Feinberg HR, Izzi J, Shumsky JS, Zhukareva V, Houle JD. Forced exercise as a rehabilitation strategy after unilateral cervical spinal cord contusion injury. *J Neurotrauma*. 2009;26(5):721-31.
19. Loy K, Schmalz A, Hoche T, Jacobi A, Kreutzfeldt M, Merkler D, et al. Enhanced voluntary exercise improves functional recovery following spinal cord injury by impacting the local neuroglial injury response and supporting the rewiring of supraspinal circuits. *J Neurotrauma*. 2018;35(24):2904-15.
20. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari M, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*. 2017;55(8):714-21.
21. Komnenov D, Solarewicz JZ, Afzal F, Nantwi KD, Kuhn DM, Mateika JH. Intermittent hypoxia promotes recovery of respiratory motor function in spinal cord-injured mice depleted of serotonin in the central nervous system. *J Appl Physiol*. 2016;121(2):545-57.
22. Forgione N, Chamankhah M, Fehlings MG. A mouse model of bilateral cervical contusion-compression spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(6):1227-39.
23. Reinhardt D, Stehlik K, Satkunendrarajah K, Kroner AJEN. Bilateral cervical contusion spinal cord injury: A mouse model to evaluate sensorimotor function. 2020:113381.
24. Anderson KD, Gunawan A, Steward O. Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Exp Neurol*. 2005;194(1):161-74.
25. Weishaupt N, Vavrek R, Fouad K. Training following unilateral cervical spinal cord injury in rats affects the contralesional forelimb. *Neurosci Lett*. 2013;539:77-81.
26. Anderson KD, Sharp KG, Hofstadter M, Irvine K-A, Murray M, Steward O. Forelimb locomotor assessment scale (FLAS): novel assessment of forelimb dysfunction after cervical spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2009;220(1):23-33.

27. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.
28. Singh A, Krisa L, Frederick KL, Sandrow-Feinberg H, Balasubramanian S, Stackhouse SK, et al. Forelimb locomotor rating scale for behavioral assessment of recovery after unilateral cervical spinal cord injury in rats. *J Neurosci Methods*. 2014;226:124-31.
29. Harvey LA. Physiotherapy rehabilitation for people with spinal cord injuries. *J Physiother*. 2016;62(1):4-11.
30. Torres-Espín A, Beaudry E, Fenrich K, Fouad K. Rehabilitative training in animal models of spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2018;35(16):1970-85.
31. Wenger N, Moraud EM, Gandar J, Musienko P, Capogrosso M, Baud L, et al. Spatiotemporal neuromodulation therapies engaging muscle synergies improve motor control after spinal cord injury. *Nat Med*. 2016;22(2):138.
32. Martinez M, Delivet-Mongrain H, Rossignol S. Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. *J Neurophysiol*. 2013;109(12):2909-22.
33. Jung S-Y, Seo T-B, Kim D-Y. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2016;12(4):284.
34. Shah PK, Garcia-Alias G, Choe J, Gad P, Gerasimenko Y, Tillakaratne N, et al. Use of quadrupedal step training to re-engage spinal interneuronal networks and improve locomotor function after spinal cord injury. *Brain*. 2013;136(11):3362-77.
35. Sun T, Ye C, Wu J, Zhang Z, Cai Y, Yue F. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2013;8(27):2540.
36. de Jesus I, Herrera NA, Andreo JC, Santos CF, Amaral SL. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins. *Steroids*. 2020:108573.
37. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(8):760-65.
38. Grant S, McMillan K, Newell J, Wood L, Keatley S, Simpson D, et al. Reproducibility of the blood lactate threshold, 4 mmol·l<sup>-1</sup> marker, heart rate and ratings of perceived exertion during incremental treadmill exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2002;87(2):159-66.
39. Mead W. Maximal exercise testing--Bruce protocol. *The Journal of family practice*. 1979;9(3):479-90.
40. Hutchinson KJ, Linderman JK, Basso DM, Jon. Skeletal muscle adaptations following spinal cord contusion injury in rat and the relationship to locomotor function: a time course study. 2001;18(10):1075-89.
41. Huey KA, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR, JM, Medicine NO, JotAAoE. Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. 2001;24(4):517-26.
42. Jayaraman A, Liu M, Ye F, Walter GA, Vandenborne K. Regenerative responses in slow- and fast-twitch muscles following moderate contusion spinal cord injury and locomotor training. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(1):191-200.
43. Stevens JE, Liu M, Bose P, O'Steen WA, Thompson FJ, Anderson DK, et al. Changes in soleus muscle function and fiber morphology with one week of locomotor training in spinal cord contusion injured rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(11):1671-81.
44. Bloor CM, JA. Angiogenesis during exercise and training. 2005;8(3):263-71.
45. Wagenmakers AJ, Strauss JA, Shepherd SO, Keske MA, Cocks M. Increased muscle blood supply and transendothelial nutrient and insulin transport induced by food intake and exercise: effect of obesity and ageing. *The Journal of physiology*. 2016;594(8):2207-22.
46. Sinescu C, Popa F, Grigorean VT, Onose G, Sandu A, Popescu M, et al. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. *J Med Life*. 2010;3(3):254.
47. Li Y, Lucas-Osma AM, Black S, Bandet MV, Stephens MJ, Vavrek R, et al. Pericytes impair capillary blood flow and motor function after chronic spinal cord injury. *Nat Med*. 2017;23(6):733.
48. Olfert IM, Baum O, Hellsten Y, Egginton S. Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*. 2016;310(3):H326-H36.
49. Shevtsova NA, Marchenko V, Bezdudnaya T. Modulation of Respiratory System by Limb Muscle Afferents in Intact and Injured Spinal Cord. *Front Neurosci*. 2019;13.
50. Persegol L, Palisses R, Viala D. Characterization of hindlimb muscle afferents involved in ventilatory effects observed in decerebrate and spinal preparations. *Exp Brain Res*. 1993;92(3):495-501.
51. Goshgarian HG. Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol*. 2003;94(2):795-810.
52. Minor KH, Akison LK, Goshgarian HG, Seeds NW. Spinal cord injury-induced plasticity in the mouse—the crossed phrenic phenomenon. *Exp Neurol*. 2006;200(2):486-95.
53. Vinit S, Boulenguez P, Efthimiadi L, Stamegna J-C, Gauthier P, Kastner A. Axotomized bulbospinal neurons express c-Jun after cervical spinal cord injury. *Neuroreport*. 2005;16(14):1535-39.

54. Vinit S, Kastner A. Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;169(2):115-22.
55. Darlot F, Cayetanot F, Gauthier P, Matarazzo V, Kastner A. Extensive respiratory plasticity after cervical spinal cord injury in rats: axonal sprouting and rerouting of ventrolateral bulbospinal pathways. *Exp Neurol.* 2012;236(1):88-102.
56. Lane MA, Lee K-Z, Fuller DD, Reier PJ. Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;169(2):123-32.
57. Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH, Yan Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2004;287(5):C1342-C48.
58. Egginton S. Physiological factors influencing capillary growth. *Acta physiologica.* 2011;202(3):225-39.
59. Wüst RC, Gibbings SL, Degens H. Fiber capillary supply related to fiber size and oxidative capacity in human and rat skeletal muscle. *Oxygen Transport to Tissue XXX: Springer;* 2009. p. 75-80.

## FIGURE LEGEND

**Figure 1. Experimental design throughout surgery and low intensity exercise training periods and extent of injury following a C2 hemisection.** **A** After 1st incremental test on forced exercise wheel, animals were distributed into six experimental groups (3 sedentary and 3 trained of NAIVE, SHAM and SCI). SHAM and SCI groups underwent cervical laminectomy followed by a 1-week recovery. Next, all groups went through a 6-week aerobic exercise training on forced exercise wheel. **B** Schematic representation of the extent of injury for each animal in SCI SED and SCI TR groups. **C** Graph shows the quantification of the extent of injury in percentage compared to a 100% hemisected spinal cord. The quantification has only been made in the ventral part where the phrenic motoneurons are located. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). There is no difference between the different groups (t-test, p = 0.4127).

**Figure 2. Maximal physical capacity expressed as running time (s).** **A** Representative snapshot of a SHAM (upper) and SCI (below) mouse running in forced exercise wheel. **B** Running capacity on forced exercise wheel at different time points (before SCI; 7 days after surgery and 46 days after surgery). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). Significance: b p<0.05 compared to sedentary, f p<0.05 compared to before surgery or 7 days after surgery.

**Figure 3. Representative images of fiber type composition in locomotor muscles and analysis of fiber type composition.** **A** Extensor digitorum communis (EDC), Tibialis anterior (TA) and Soleus (SOL) cryosections were immunostained to identify Myosin heavy chain (MyHC) isoforms: MyHCSlow (type I in blue), MyHC2A (type IIa in green) co-labeled with an anti-laminin antibody to visualize myofiber boundaries (type IIb/x corresponding to unlabeled fibers). Scale bar=200  $\mu$ m. Relative distribution of MHC I, MHC IIa, and MHC IIb/x in **B** EDC, **C** TA and **D** Soleus SOL. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6).

**Figure 4. Analysis of fiber type composition in locomotor muscles.** MHC I, MHC IIa, and MHC IIb/x fiber composition in cross sectional areas of **A and B** Extensor digitorum communis (EDC), **C and D** Tibialis (TA) anterior and **E-G** Soleus (SOL). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). Significance: a p<0.05 compared to TR group; b p<0.05 compared to SED group; c p<0.05 compared to SHAM or SCI SED group.

**Figure 5. Comparison of CD31 expression and number of fibers in the skeletal muscles.** Cryosections were immunostained to visualize CD31 (green) co-labeled with an anti-Laminin antibody (in red) in Extensor digitorum communis (EDC), Tibialis (TA) anterior and Soleus (SOL). Scale bar=200  $\mu$ m.

**Figure 6. Analysis of endothelial cells in locomotor muscles.** Capillary density in **A** Extensor digitorum communis (EDC), **C** Tibialis (TA) anterior and **E** Soleus (SOL). Ratio between capillary and fiber in **B** EDC, **D** TA and **F** SOL. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). Significance: b p<0.05 compared to SED group; c p<0.05 compared to SHAM or SCI SED group; d p<0.05 compared to NAIVE or SHAM TR group.

**Figure 7. Diaphragm activity at 51 days following a C2 hemisection.** **A** Representative traces of diaphragm raw electromyography for uninjured animals: NAIVE and SHAM groups (SED and TR) and **B** injured (contralateral diaphragm and ipsilateral diaphragm) animals: SCI groups (SED and TR). Graphs show integrated diaphragm amplitude during **C** spontaneous breathing and **D** mild asphyxia. Graphs represent the duration of integrated diaphragm signal during **E** spontaneous breathing and **F** mild asphyxia. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). Significance: f  $p < 0.05$  compared to ipsilateral side.

**Figure 8. Analysis of fiber type composition in the respiratory muscle.** **A** Diaphragmatic muscle cryosections were immunostained to visualize Myosin heavy chain (MyHC) isoforms: MyHC<sub>slow</sub> (type I in blue), MyHC<sub>2A</sub> (type IIa in green) co-labeled with an anti-laminin antibody to visualize myofiber boundaries (type IIb/x corresponding to unlabeled fibers). Scale bar=200  $\mu$ m. **B-D** muscle fiber cross sectional area. **E** Percentage of fiber type relative in diaphragmatic muscle. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). Significance: a  $p < 0.05$  compared to TR group; f  $p < 0.05$  compared to contralateral side.

**Figure 9. Analysis of endothelial cells on respiratory muscle.** **A** Comparison of CD31 expression and number of fibers in the diaphragm muscle. Cryosections were immunostained to visualize CD31 (green) co-labeled with an anti-Laminin antibody (in red) in the diaphragm muscle. Scale bar=200  $\mu$ m. **B** Capillary density and **C** Ratio between capillary and fiber. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 6). Significance: b  $p < 0.05$  compared to SED group.

**-B-**

**Etude de l'intérêt de l'exercice physique dans la récupération fonctionnelle locomotrice et respiratoire chez la souris KO Nrf2 blessée médullaire cervicale**

## **9 GENERALITES**

### **9.1 NRF2 ET LESIONS MEDULLAIRES**

Comme déjà abordé précédemment, une lésion médullaire est un événement qui se compose de phases primaire (aiguë) et secondaire (subaiguë). La lésion primaire est causée par une insulte à la moelle épinière, entraînant la stimulation des réponses inflammatoires et la perturbation de l'apport vasculaire de la moelle épinière pendant la phase secondaire. L'ischémie, l'apoptose, la nécrose, l'inflammation, le stress oxydatif et la formation de cicatrices sont courants. Ensuite, un dysfonctionnement temporaire ou permanent des systèmes moteur, sensoriel et autonome est instauré pendant la phase secondaire.

De nombreuses études expérimentales se sont concentrées sur les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la régulation de l'inflammation après lésion médullaire afin de trouver une stratégie thérapeutique.

Une de ces stratégies serait l'activation du facteur de transcription Nrf2. Considéré comme un grand protecteur de multiples organes, cette protéine est considérée comme neuroprotectrice dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson et lors des lésions médullaires.

### **9.2 Facteur de transcription Nrf2**

Un des principaux acteurs des défenses antioxydantes dans notre organisme est le facteur de transcription appelé Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2 (Nrf2). Il

appartient à la famille de protéines cap'n'collar (CNC) regroupant les protéines Nrf1, Nrf2 et Nrf3 chez les vertébrés (120, 121). Le Nrf2 est une protéine de 606 acides aminés chez l'homme, composée d'un domaine basique de la leucine zipper (bZIP) en C-terminal et de 7 domaines *Nrf2-ECH homology* (*Neh*). Neh1 contient le domaine bZIP et permet la dimérisation de Nrf2 avec une protéine de la famille de musculoaponeurotic fibrosarcoma (MAF). En condition basale, non stressée, le Nrf2 est réprimé par liaison à la protéine homodimérique Kelch-like érythroïde dérivée des cellules avec la protéine 1 associée à l'homologie CNC (Keap1) dans le cytosol. Dans un état quiescent, le domaine Neh2 interagit avec le Keap1. Cette interaction fonctionne comme un adaptateur pour la dégradation de Nrf2 via Cul3 / Rbx1 en favorisant l'ubiquitination et la dégradation ultérieure de Nrf2 par le protéasome (122). Le domaine Neh6 conduit à la dégradation de Nrf2 dans les conditions de stress cellulaire en se liant au domaine de liaison de la beta-transducin repeats-containing proteins ( $\beta$ -TrCP). Les domaines Neh 3, 4, 5 permettent la transactivation de Nrf2 par fixation sur les séquences promotrices de ses gènes cibles, conduisant à la transcription de plus de 200 gènes cytoprotecteurs en réponse au stress oxydatif (121). Enfin, le dernier domaine, Neh7, interagit avec le domaine de liaison à l'ADN au récepteur X rétinolique  $\alpha$  (RXR  $\alpha$ ) pour inhiber l'activation de Nrf2. En réponse à un stimulus oxydatif ou électrophile, les résidus de cystéine sur Keap1 sont modifiés. Ce mécanisme joue un rôle important car il participe à de nombreuses fonctions homéostatiques comme par exemple la régulation de l'inflammation, du métabolisme redox et des protéases (123).

En outre, le Nrf2 régule la réponse inflammatoire cellulaire. En effet, il est capable d'inhiber la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires de NF-kB. Cette interaction a été observée chez la souris Nrf2 KO. Lorsque les poumons de ces souris ont été stimulés au lipopolysaccharides (LPS), un inducteur d'inflammation, une augmentation de la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et IL-6) issues des cellules polynucléaires comme les neutrophiles et les macrophages (cellules du système immunitaire inné) a été observée (124).

### 9.3 Nrf2 en réponse à l'exercice aigu

Comme pour l'inflammation, l'exercice physique est un activateur non pharmacologique du facteur de transcription Nrf2 (Figure 20). Il a été démontré qu'une activation régulière par l'exercice diminue le stress oxydatif en augmentant les défenses antioxydantes composées d'enzymes telles que la Cat, la superoxyde dismutase (SOD) et la GPx, et des antioxydants non enzymatiques, y compris le glutathion (122, 125). Des études *in vitro* utilisant des cellules musculaires squelettiques C2C12 démontrent que Nrf2 est activé par les ROS et que cette activation est supprimée lorsque des antioxydants, tels que la N-acétylcystéine, sont appliqués sur des cultures cellulaires (126). Des études sur un modèle *in vivo* ont démontré qu'une seule séance d'exercice intensif chez la souris de type sauvage augmente l'expression du gène Nrf2 ainsi que la quantité de la protéine Nrf2 dans le muscle squelettique et des enzymes de phase II dépendant de ce facteur de transcription (127, 128). Il est proposé que cet effet aigu de l'exercice sur l'activation de Nrf2 se traduit par une augmentation de l'expression génique comme l'hème oxygenase-1 (HO-1) et NAD (P)

H quinone déshydrogénase 1 (NQO1) qui sera plus activée chez les jeunes que chez les personnes plus âgées (129, 130). De plus, des diminutions du Nrf2 cytosolique et nucléaire ainsi que de la capacité de liaison Nrf2 / ARE liées à l'âge ont été précédemment montrées chez la souris dans le myocarde, tandis que chez le rat, l'atténuation du contenu protéique dans le foie s'accompagne de l'expression du gène antioxydant dépendant de Nrf2 en réponse à exercice (131, 132).

Outre l'observation d'un effet de l'âge dans l'expression de Nrf2, d'autres données proposent que la forme physique puisse jouer un rôle majeur dans le maintien de la réponse Nrf2 aiguë avec le vieillissement. Ainsi, une étude a démontré une augmentation significative de l'expression génique d'ARNm de Nrf2 2h post-exercice chez des femmes d'âge moyen actives, physiquement soumises à une séance d'exercice modéré de 30 min sur tapis roulant. En revanche, les femmes sédentaires n'ont montré aucune modification de l'expression génique de Nrf2 ou des cibles en réponse à l'exercice [48].

#### **9.4 Nrf2 en réponse à l'exercice chronique**

L'activation régulière de Nrf2 est connue pour conduire à des réponses cumulatives de l'expression de l'ARNm (133). L'effet de l'entraînement physique régulier sur la réponse Nrf2 a été étudié de manière plus approfondie que l'exercice intensif. Plusieurs études réalisées avec des modèles animaux ont montré que quelle que soit la durée (4 à 24 semaines) ou l'intensité d'entraînement (modérée ou haute intensité), l'activation de la signalisation Nrf2 est présente sur plusieurs tissus comprenant les muscles squelettiques, les reins, le cerveau, le foie, les testicules, la

prostate, et le myocarde (131, 134-137). Les données de ces études chez les animaux démontrent que l'exercice chronique régule le contenu des protéines Nrf2 et l'activité

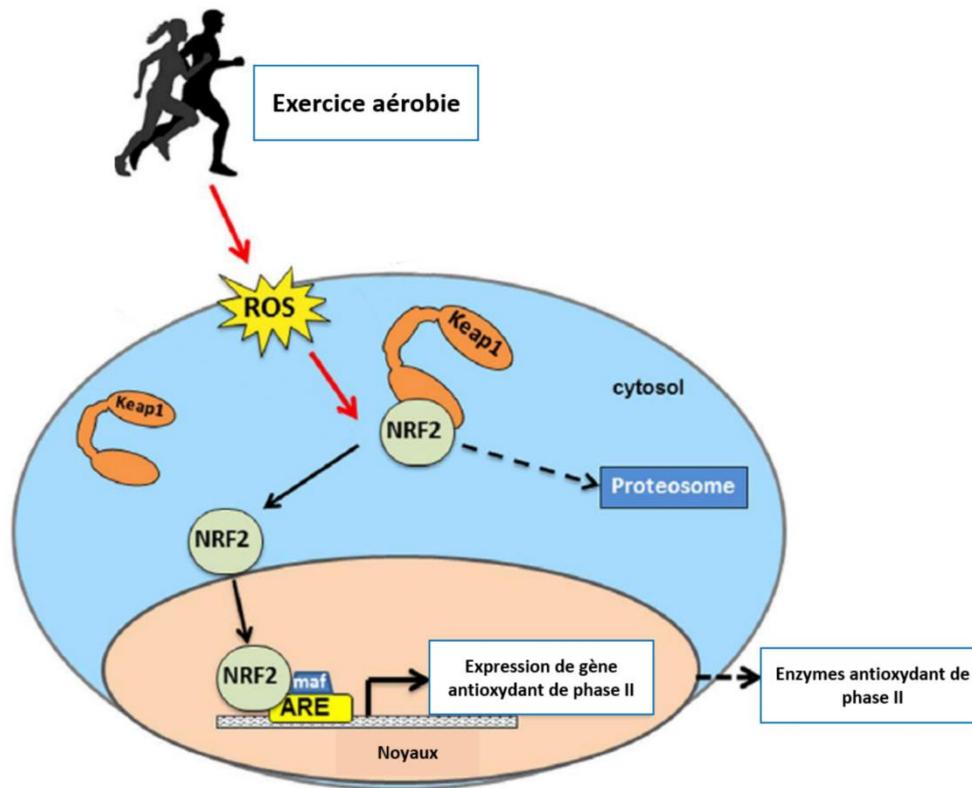


Figure 20: Activation de la voie de signalisation de Nrf2 par exercice aérobie d'après Done et Traustadóttir (41)

des enzymes de phase II. Chez l'homme, les études plus approfondies sur la signalisation Nrf2 induite par exercice restent encore rares car des méthodes plus invasives sont nécessaires. Cependant, une étude transversale comparant les quantités de protéines Nrf2 et Keap1 dans une seule biopsie musculaire chez des personnes âgées sédentaires et actives a montré que les personnes physiquement actives disposaient de plus de protéines Nrf2 et un rapport Nrf2 / Keap1 plus élevé (138), suggérant que l'exercice régulier peut atténuer les changements liés à l'âge, comme cité précédemment.

## 9.5 Système antioxydant dans la physiopathologie de lésion médullaires

Le facteur de transcription Nrf2 est considéré comme un grand protecteur de multiples organes et joue un rôle très important dans plusieurs maladies du système nerveux central. Par exemple, il a été montré que l'utilisation d'un activateur pharmacologique de Nrf2, le sulforaphane (SFN), induit une réduction de l'œdème cérébral après un traumatisme crânien (139). Un autre activateur, comme la tert-butylhydroquinone, qui induit l'expression de plusieurs gènes médiés par Nrf2, s'est également révélé neuroprotecteur contre l'ischémie cérébrale (140).

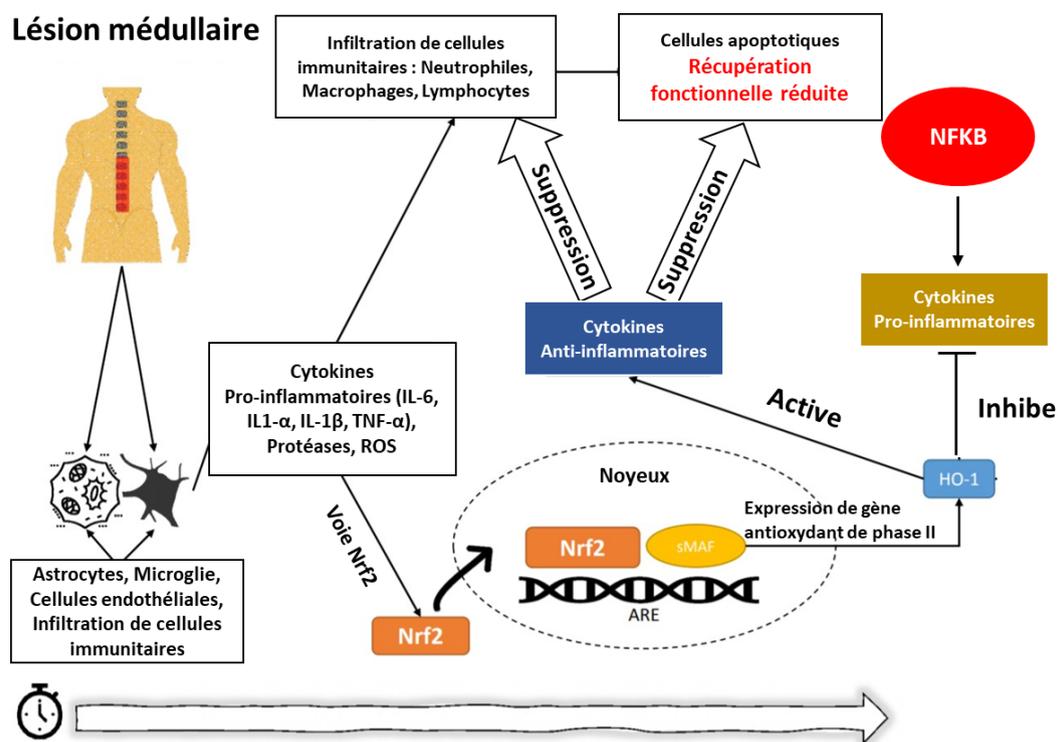


Figure 21 : Rôle de Nrf2 dans la modulation de la lésion médullaire d'après Pomeshchik et collaborateurs (142).

Le Nrf2 agit donc comme un régulateur maître de nombreux gènes protecteurs. Il peut servir de cible thérapeutique dans les conditions neurodégénératives impliquant un stress oxydatif et inflammation, y compris les lésions médullaires. Dans des modèles

*in vivo* de lésion de la moelle épinière par compression thoracique, les souris Nrf2 KO présentent des déficits neurologiques, une expression de gènes pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6) plus importante que les souris sauvages, ainsi qu'une diminution dans l'expression des gènes antioxydants NQO1 et HO-1(Figure 21) (141, 142).

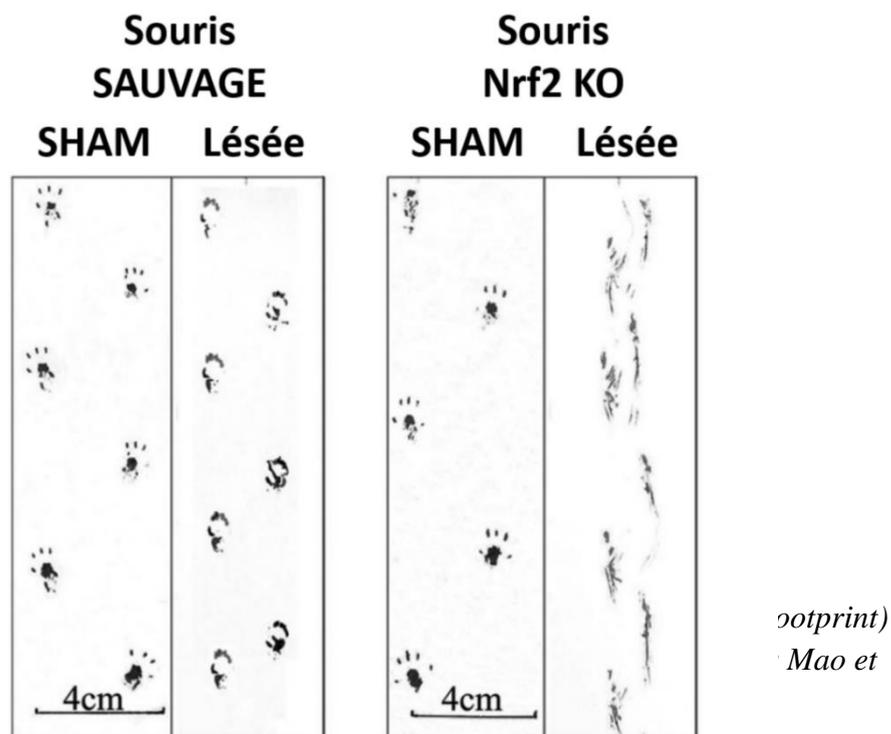
## 9.6 Nrf2 et lésion médullaire chez des modèles animaux

Récemment publiée, une revue de la littérature a montré que des études utilisant des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices de Nrf2 sont employées comme stratégie pour améliorer l'inflammation après une lésion médullaire (143). Dans une étude sur un modèle de contusion médullaire chez le rat, l'activation de la voie de signalisation Nrf2/ARE par probucol a contribué à inhiber l'inflammation et l'apoptose neuronale (144).

Plusieurs études sur des modèles animaux ont rapporté le rôle des voies de signalisation Nrf2 de la lésion médullaire dans la récupération fonctionnelle locomotrice. Dans ce contexte, des données montrent que les souris Nrf2 KO sont plus sensibles à l'inflammation induite par lésion médullaire. Mao *et coll.* (141) ont étudié les effets de Nrf2 après contusion médullaire chez des souris de type sauvage et Nrf2 KO. A partir d'un test comportemental d'empreintes (foot print), les auteurs ont observé un dysfonctionnement moteur sévère des membres postérieurs chez les souris Nrf2 KO à 4 semaines après lésion (Figure 22). Les auteurs ont détecté comme la principale cause de gravité des troubles neurologiques, les niveaux accrus d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  chez les souris Nrf2 KO. Cependant la récupération fonctionnelle motrice semble s'améliorer suite à un traitement par activateur pharmacologique de Nrf2 (144).

Une autre étude a indiqué que le sulforaphane a amélioré la fonction locomotrice, les lésions inflammatoires et l'œdème de la moelle épinière causé par lésion chez les souris Nrf2 KO et de type sauvage (145). Ces résultats renforcent la pertinence de l'implication de Nrf2 dans la récupération après lésion dans la moelle épinière.

Ces données montrent que la contusion médullaire dans les modèles murins est fréquemment utilisée pour investiguer les effets d'une stratégie thérapeutique (par des



activateurs pharmacologiques). En revanche, l'implication de Nrf2 dans des modèles d'hémisection médullaire au niveau cervical n'a pas encore été investiguée. L'exercice physique connu comme activateur non pharmacologique de Nrf2 a été très peu exploré pour son rôle dans l'inflammation et la récupération fonctionnelle post-lésion médullaire haute. Notre modèle préclinique d'hémisection spinale cervicale au niveau

métamérique C2, qui se distingue par une déafférentation des motoneurones phréniques, donne la possibilité d'avoir une meilleure compréhension de l'effet d'un entraînement physique aérobie modéré dans la récupération fonctionnelle motrice et respiratoire sur des modèles dans lequel la protéine Nrf2 a été abolie.

## **10 OBJECTIF DE L'ETUDE**

L'objectif de cette étude préliminaire est de montrer l'implication de la voie Nrf2 dans la mise en place de la récupération fonctionnelle motrice et respiratoire suite à un protocole d'exercice physique de 6 semaines. Pour cela, j'ai utilisé des souris C57BL/6 de la lignée Nrf2 KO. Le même programme d'exercice physique modéré de 6 semaines a été utilisé. ,

Après la fin du protocole d'entraînement physique de 6 semaines, l'activité électromyographique du diaphragme a été enregistrée à 51 jours..

# 11 MATÉRIEL ET METHODES

## 11.1 Modèle préclinique de souris hémi-lésée médullaire Nrf2 KO

La sélection de la souche de souris knockout (Nrf2 - / -) C57BL / 6J Nrf2, fournie par Riken BRC, a été réalisée à l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (licence n° Apafis #2018011916127707v4). Les protocoles ont été approuvés par le Comité d'Éthique Animale CEEA47 PELVIPHARM de l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines et le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Des compagnons de portée hétérozygotes Nrf2 (Nrf2 +/-) ont été utilisés comme groupe témoin.

## 11.2 Génotypage de souris Nrf2 KO

Pour déterminer le génotype des souris, le Kit Phire tissue Direct PCR master mix (Thermo Fischer) a été utilisé. L'ADN d'un petit morceau de l'oreille a été prélevé afin de déterminer le génotype de l'animal. Les acides nucléiques extraits ont été soumis à une transcription inverse suivie de réaction en chaîne de la polymérase (RT PCR) avec primers (NRF2-5', lacZ, Nraf2-AS). Electrophorèse en gel a été réalisé afin de confirmer l'invalidation du gène Nrf2 KO par lacZ.

## 11.3 Protocole d'exercice incrémental

Au total, 9 animaux ont été familiarisés avec le système de roues d'exercice forcé (Lafayette Inst., Lafayette, IN) pendant 1 semaine (6 m/min, 10 min par jour). Après la période d'acclimatation, toutes les souris ont effectué un test d'exercice incrémental adapté au système de roue d'exercice forcé (voir Jesus *et coll* (80). Pour ce faire, des

incréments de 2 m/min toutes les 2 m/min, jusqu'à épuisement, défini comme le moment où les animaux étaient incapables de maintenir le rythme dans la roue ou l'animal a cessé de courir spontanément. Une barrière en polystyrène sur mesure a été mise au point pour motiver l'animal à continuer à courir. Après un premier test d'exercice progressif (avant la chirurgie de lésion médullaire) les souris ont été aléatoirement séparées. Par la suite, les animaux du groupe Nrf2 KO a été réparti à des sous-groupes sédentaires ou entraînés (SED ou TR). Aucune différence dans les résultats des tests incrémental n'a été observée entre les sexes. Un deuxième test d'exercice incrémental a été effectué 7 jours après la chirurgie pour déterminer l'intensité du protocole d'exercice (60% de la vitesse maximale atteinte). À la fin du protocole d'exercice de 6 semaines, des souris sédentaires et entraînées ont effectué un troisième test incrémental pour évaluer leur capacité de course à 49 jours après la chirurgie SCI (Figure 23).

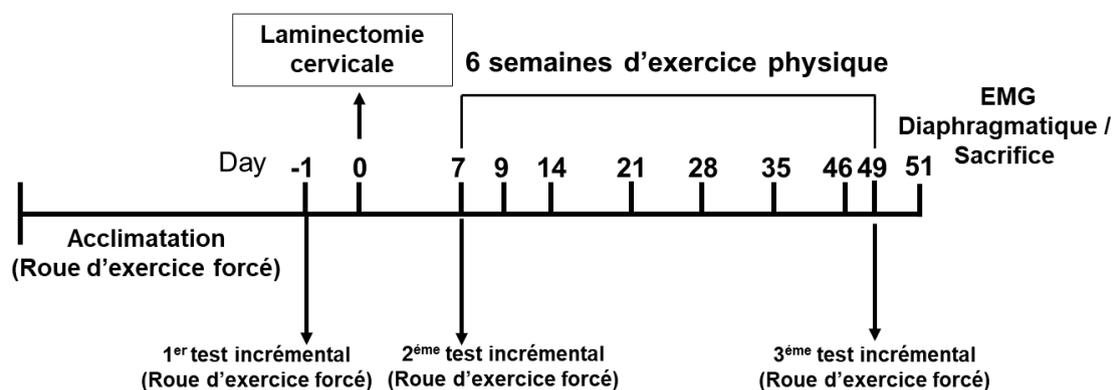


Figure 23 : Schéma expérimental de l'étude

## 11.4 Hémisection chronique C2

La lésion spinale cervicale est obtenue en effectuant une hémisection spinale au niveau du deuxième segment métamérique (C2) qui interrompt de manière unilatérale les projections respiratoires bulbospinales avec pour conséquence une abolition de l'activité phrénique et diaphragmatique du côté lésé. Le côté controlatéral sain permet la survie de l'animal. La fonction locomotrice est également interrompue pendant quelques jours. Au bout d'une semaine, l'animal retrouve une certaine mobilité. Pour développer le modèle préclinique d'hémisection médullaire, l'animal est anesthésié à l'isoflurane (Vetlurane 2.5% dans 100% O<sub>2</sub>) puis placé en decubitus ventral sur une plaque chauffante afin de maintenir sa température à environ 37,5 °C. Une fois la partie dorsale rasée et désinfectée (bétadine puis alcool 70°x3), une incision dorsale rostro-caudale de la peau est pratiquée, suivie d'une incision de muscles acromiotrapezius, rhomboïdes et spinaux entourant la vertèbre cervicale C2. Une laminectomie dorsale au niveau de la vertèbre C2 est pratiquée, puis la dure-mère est disséquée afin d'atteindre la moelle épinière. Une section spinale latérale sous la racine C2 est pratiquée à l'aide d'un microscalpel. Les muscles et la peau sont ensuite recousus, puis l'animal reçoit une injection sous-cutanée d'antibiotique (Borgal 30 mg/kg) et d'antidouleur (Buprecare 0.03 mg/kg) puis est placé dans une cage de réveil. Les animaux sont sous surveillance constante ont accès à l'eau et à la nourriture standard ad libitum. Aucune détresse respiratoire postopératoire n'est observée car un seul côté de l'animal est paralysé, le côté épargné permet la survie. Une paralysie transitoire des pattes avant et arrière du côté lésé est observée. L'animal retrouve une certaine mobilité après environ une semaine.

## 11.5 Protocole d'entraînement physique sur roue d'exercice forcé

L'entraînement physique a été appliqué pendant 6 semaines (1 semaine après chirurgie) et consistait à courir sur un système de roue d'exercice à 60% du deuxième test incrémental (7 jours après la chirurgie de d'hémisection médullaire C2), 1 heure par jour et 5 jours par semaine. L'intensité de l'entraînement à l'exercice a été adaptée du protocole décrit précédemment par Ferreira *et coll.* (81). Les souris sédentaires ont été maintenues dans la roue non-déplacement pendant toute la durée de la session d'exercice.

## 11.6 Enregistrements électrophysiologiques

Deux jours après le troisième test incrémental (49 jours après la chirurgie d'hémisection médullaire C2), l'anesthésie a été induite utilisant l'isoflurane de 5% dans 100% O<sub>2</sub> et maintenue tout au long de l'expérience (2.5% dans 21% O<sub>2</sub>) par un cône de nez. Comme l'a déjà décrit Vinit *et coll.* (146), l'animal a été placé à une plaque chauffante pour maintenir une température physiologique et constante du corps. Une laparotomie a été effectuée pour accéder au diaphragme. Les deux côtés (ipsilateral et controlatéral à la lésion de la moelle épinière) du diaphragme ont été testés pour leur activité (électromyographie) à l'aide d'une électrode d'argent de surface bipolaire faite à la main sur le muscle pendant la respiration normaxique poïkilocapnique ou transitoire d'asphyxie légère (par occlusion du nez animal pendant 15 s) (146). Les électromyographies ont été amplifiées (Modèle 1800; gain, 100; A-M Systems, Everett, WA, USA) et bande pass-filtré (100 Hz à 10 kHz). Les signaux ont été numérisés avec un dispositif d'acquisition de données Powerlab à 8 canaux (taux

d'acquisition : 4 k/s; AD Instruments, Dunedin, Nouvelle-Zélande) connecté à un ordinateur et analysé à l'aide du logiciel LabChart 9 Pro (AD Instruments, Dunedin, Nouvelle-Zélande). Les électromyographies diaphragmatiques bilatérales ont été intégrées (50 ms de décomposition). À la fin de l'expérience, les animaux ont été humanement euthanasiés par le CO<sub>2</sub>, puis la perfusion intracardiaque de 0,9 % de NaCl héparinisé (10 mL) a été réalisée pour la récolte des tissus. Le segment C1-C3 de la moelle épinière a été disséqué et immédiatement placé pendant la nuit dans du paraformaldéhyde froid de 4 %, puis cryoproté pendant 48h dans 30% de saccharose (dans 0,9% de NaCl) et des échantillons ont été stockés dans un congélateur à -80°C.

## RESULTATS PRELIMINAIRES

Ces résultats préliminaires montrent que la capacité de course exprimée en secondes (s) (Figure 24) a été diminuée dans tous les groupes avec lésion médullaire à 7 jours après lésion. De plus, dans les groupes lésés médullaires sédentaires, nous avons montré une tendance à une récupération minimale de ces capacités de course 51 jours après lésion dans les groupes sauvages et Nrf2 KO. Cependant, après 6 semaines d'entraînement, la capacité de course était plus élevée dans les groupes entraînés y compris dans le groupe entraîné Nrf2 KO. Cela indique que l'abolition de Nrf2 n'influence pas la récupération locomotrice après exercice physique aérobie.

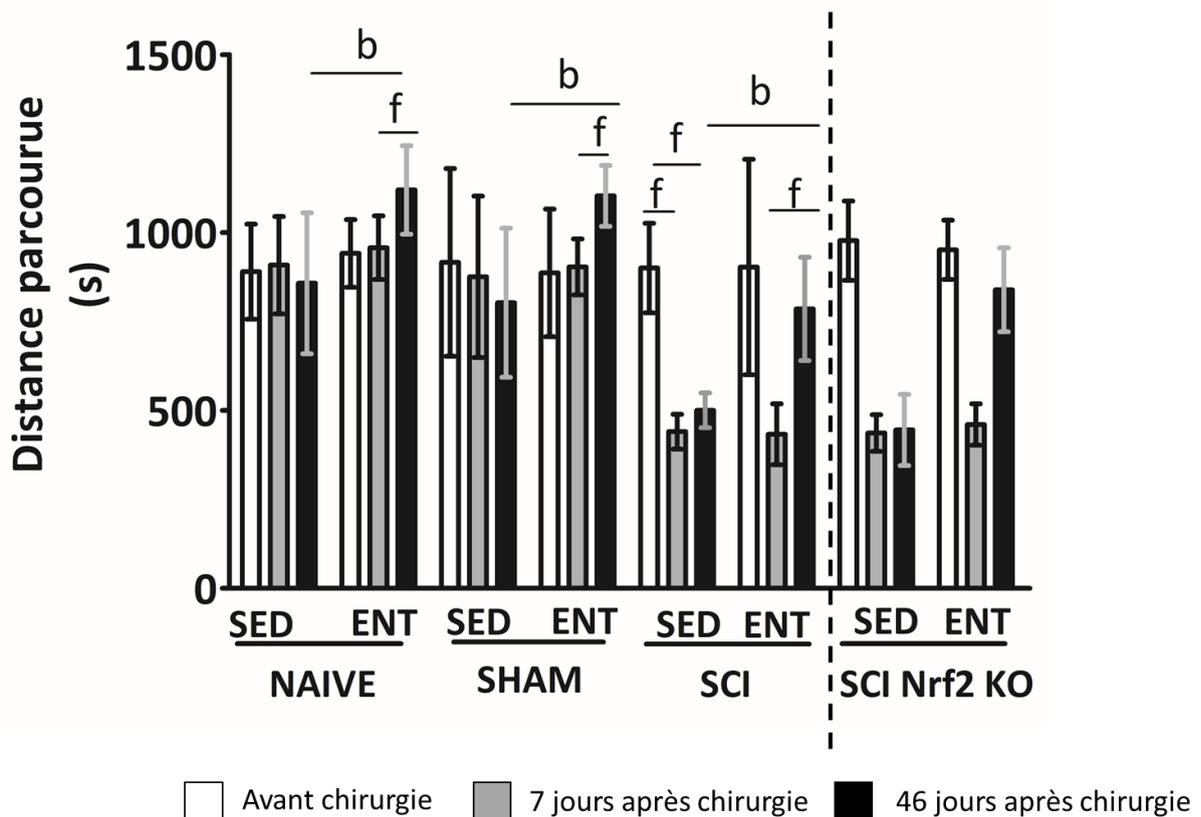
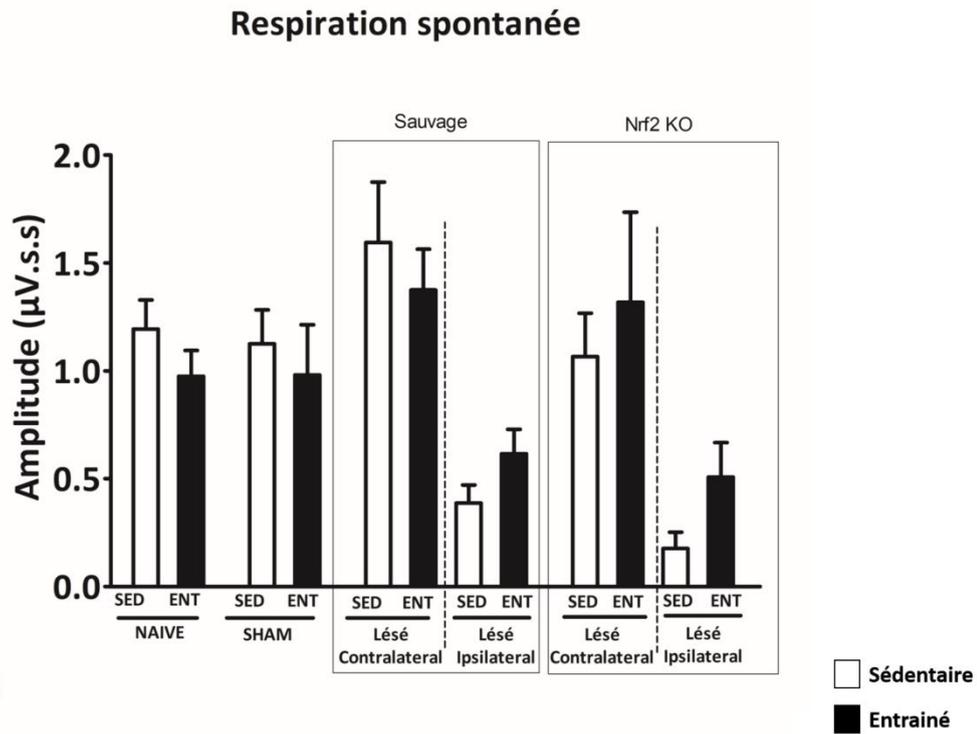


Figure 234 : Analyse de la distance parcourue sur la roue d'exercice forcée au long de 51 jour post-lésionelle pour le groupe Naïf SED n=6), Naïf Ent (n=6), SHAM SED (n=6), SHAM ENT (n=6), Lésé SED sauvage (n=6), Lésé ENT sauvage (n=6), Lésé SED Nrf2 KO (n=5) et Lésé SED Nrf2 KO (n=4)

## **Analyse de l'activité électromyographique diaphragmatique 51 jours après lésion chez la souris blessée médullaire Nrf2 KO**

Ce résultat préliminaire indique que la récupération de l'activité électromyographique diaphragmatique en respiration spontanée post-lésion médullaire reste encore plus limitée chez la souris Nrf2 KO sédentaires en comparaison avec les souris sauvages (Figure 25). Cela nous donne un indice que Nrf2 joue un possible rôle dans la récupération respiratoire suite à une hémisection médullaire haute. En contrepartie, dans le groupe Nrf2 KO soumis à 6 semaines d'exercice physique modérée, nous observons une tendance à une meilleure récupération fonctionnelle respiratoire. Ce résultat préliminaire nous montre que malgré l'ablation de Nrf2, l'exercice aérobic pourrait contribuer par d'autres voies à la récupération fonctionnelle respiratoire. Par rapport à l'activité électromyographique diaphragmatique en asphyxie (Figure 26), les données préliminaires actuelles ne montrent aucun changement entre les génotypes sauvages et Nrf2 KO sédentaire ou entraîné.

A



B

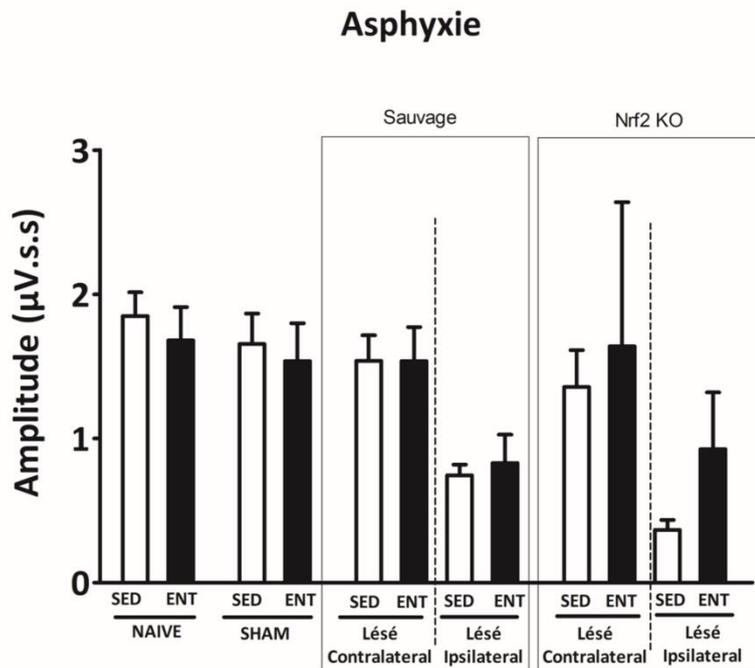


Figure 25 : (A) et en asphyxie (B) 51 jours post-lésion médullaire pour le groupe Naïf SED ( $n=6$ ), Naïf Ent ( $n=6$ ), SHAM SED ( $n=6$ ), SHAM ENT ( $n=6$ ), Lésé SED sauvage ( $n=6$ ), Lésé ( $n=6$ ), Lésé ENT sauvage ( $n=6$ ), Lésé SED Nrf2 KO ( $n=5$ ) et Lésé SED Nrf2 KO ( $n=4$ )

## 12 DISCUSSION

L'ensemble de ces données permet de considérer que l'entraînement physique de faible intensité pourrait être une bonne stratégie non invasive afin de maintenir la plasticité des muscles locomoteurs et respiratoires après une lésion de la moelle épinière cervicale. D'autre part, je reconnais que 6 semaines de d'entraînement physique n'améliorent pas l'activité électromyographique du diaphragme affecté et n'aboutissent pas à la récupération fonctionnelle respiratoire. En outre, nous sommes un des rares laboratoires dans le monde à développer ce modèle de lésion médullaire cervicale chez la souris. L'hypothèse de l'implication de la voie Nrf2 dans la récupération fonctionnelle respiratoire et locomotrice nous a conduit à tester notre protocole chez la souris Nrf2 KO. Considéré comme un grand protecteur de multiples organes, le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle très important dans plusieurs maladies du système nerveux central. Des données disponibles dans la littérature montrent que le Nrf2 participe à la récupération motrice dans des modèles de contusion chez le rat blessé médullaire. En revanche, l'effet de Nrf2 dans des modèles d'hémisection au niveau cervical n'avait pas encore été investigué. Les résultats préliminaires de cette étude montrent une tendance à une récupération minimale de la capacité des courses même à 51 jours après lésion dans les groupes sauvages et Nrf2 KO sédentaires. Cependant, après 6 semaines d'entraînement sur les roues d'exercice forcée, la capacité de course était plus élevée dans les groupes entraînés y compris dans le groupe entraîné Nrf2 KO. Cela indique que l'abolition de Nrf2 n'influence pas dans l'amélioration de la capacité de course à long-terme. Cependant, la récupération de

l'activité électromyographique diaphragmatique chez la souris Nrf2 KO sédentaire se montre limitée en comparaison avec les souris sauvages sédentaires. Cela suggère que Nrf2 joue un possible rôle dans la récupération respiratoire suite à une hémisection médullaire haute. En contrepartie, dans le groupe Nrf2 KO soumis à 6 semaines d'exercice physique modérée, nous observons une tendance à une meilleure récupération fonctionnelle respiratoire. Ce résultat préliminaire nous montre que malgré l'ablation de Nrf2, l'exercice aérobic pourrait contribuer par d'autres voies à la récupération fonctionnelle respiratoire

## 13 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La perspective à court terme est de tester d'autres souris Nrf2 KO pour confirmer si cette protéine joue dans la récupération de l'activité électromyographique, ainsi que pour évaluer la plasticité des muscles locomoteurs et respiratoires après une lésion de la moelle épinière cervicale des souris.

Comme perspectives à plus long terme, et compte tenu de la faisabilité chez la souris, nous envisageons d'évaluer l'effet de l'exercice sur l'inflammation et la récupération fonctionnelle des motoneurons phréniques déafférentés de souris KO pour Nrf2. De plus, l'association de l'exercice chronique à d'autres traitements comme la stimulation magnétique transcranienne répétitive (rTMS) et l'hypoxie intermittente est envisagée pour tester son effet sur la récupération fonctionnelle respiratoire et locomotrice dans notre modèle préclinique d'hémisection cervicale haute.

**C-**

**Etude de différents protocoles d'exercice physique aigu  
sur l'inflammation tissulaire et la bactéricidie de  
macrophage alvéolaires**

## **14 GENERALITES**

### **14.1 Exercice physique et système immunitaire**

L'adoption d'un régime d'exercice est souvent une stratégie précoce pour inverser ou prévenir la progression des maladies. Ces effets bénéfiques qui découlent de l'exercice sont le résultat de sa capacité à stimuler l'environnement interne et à induire des modifications généralisées et intégrées du métabolisme, du tonus cardiovasculaire et de la fonction pulmonaire. Cependant, un exercice excessif qui épuise la réserve adaptative du corps, ou la capacité à répondre positivement à un stimulus d'entraînement, peut être dommageable. Bien que cette réserve adaptative soit relativement élevée chez les jeunes adultes en bonne santé, certaines conditions telles que la fatigue, les états pathologiques, un entraînement intensif aigu ou chronique et le manque de récupération adéquate après l'exercice peuvent compromettre la réserve adaptative et prédisposer les individus à un dysfonctionnement des organes induit par l'exercice et blessure (147). Ainsi, des études ont démontré qu'il est très important de prendre en compte la charge (durée, intensité et fréquence) pour avoir des bénéfices. Plusieurs données suggèrent que l'exercice physique exhaustif affaiblirait le système immunitaire (7).

### **14.2 Mécanisme de l'inflammation**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, est un médiateur clé de l'inflammation qui régule de grands réseaux de gènes codant pour les récepteurs des cytokines et des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans le déclenchement de l'inflammation

induite par les cytokines (148). Dans des conditions normales, NF- $\kappa$ B existe dans le cytoplasme sous la forme d'un hétérotrimère qui comprend les sous-unités p50, p65 et la sous-unité inhibitrice appelée Inhibitor of nuclear factor kappa B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (Figure 26). Après activation par certains stimuli inflammatoires, les sous-unités p50 et p65 se transloquent dans le noyau puis se lient à la région des promoteurs de divers gènes. Cette translocation va activer et induire la transcription de plus de 400 gènes impliqués dans l'inflammation et d'autres maladies chroniques (149).

L'inflammation est un médiateur important du stress oxydatif. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou réactives de l'azote (RNS) sont des molécules oxydantes à double tranchant. Les ROS / RNS peuvent fonctionner comme des effecteurs inflammatoires importants en soutenant la clairance des agents pathogènes par le système immunitaire et la réparation des tissus musculaires endommagés. Ils

peuvent également amplifier l'inflammation chronique (par exemple, pendant l'obésité) et induire des lésions tissulaires (150).

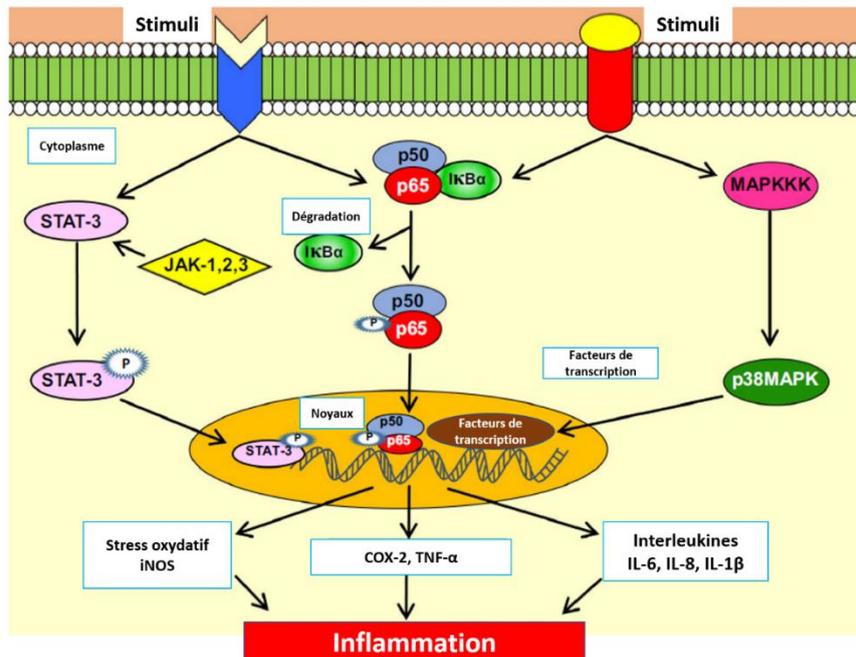


Figure 26: Voie moléculaire de l'inflammation d'après Kunnumakkara et collaborateurs (22)

### 14.3 Inflammation à l'exercice

L'exercice physique stimule de nombreux changements cellulaires et moléculaires dans les tissus permettant de favoriser les réponses anti-inflammatoires, antioxydantes et d'augmenter l'immunosurveillance qui sera discutée ci-dessous. Par exemple, la libération de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 (cytokines pro-inflammatoires) par le muscle en exercice, induit l'augmentation des niveaux d'IL-1RA (récepteur antagoniste) plasmatique au cours de la phase de récupération de l'exercice. L'IL-1RA inhibe ainsi de manière compétitive la signalisation de l'IL-1 $\beta$  qui, à son tour, diminue l'expression du récepteur 4 de type Toll (TLR4).

L'exercice active les voies de production de ROS, comme la chaîne de transport d'électrons qui, dans une certaine mesure, maintient l'homéostasie en activant des voies de signalisation de base spécifiques à la réponse adaptative.

Cependant, lors de la pratique de l'exercice physique, la demande énergétique du système musculaire peut augmenter la consommation d'oxygène jusqu'à 50 fois par rapport au repos (151). Cet apport d'oxygène supplémentaire induit l'augmentation des enzymes comme la xanthine oxydase, le nicotinamide, l'adénine dinucléotide, la phosphate oxydase (NADPH oxydase) et la phospholipase A2 qui seront les actrices principales de cette production de ROS (152). Ainsi, en réponse à l'augmentation des ROS lors de l'entraînement physique, surtout lorsqu'il n'est pas pratiqué de manière intensive, le système enzymatique antioxydant endogène est activé, ce qui régule des enzymes telles que le glutathion peroxidase (GPx), le glutathion réductase (GR) et la catalase (Cat). Ainsi le muscle squelettique devient le principal producteur de ROS pendant l'exercice. Cette production aura lieu dans des cellules mitochondriales et certaines cellules du système immunitaire, tels que les macrophages, monocytes, neutrophiles et éosinophiles (153, 154). En outre, l'augmentation de la température corporelle et la diminution du pH dans le sang en raison de la présence du lactate accélère la production de ROS (151). De plus, il est proposé que l'augmentation de la méthémoglobine dérivant des fibres musculaires endommagées pourrait interagir avec la méthémoglobine et les peroxydes pendant la génération de ROS (154).

#### **14.4 Immunosurveillance et exercice physique :Théorie de la courbe J**

L'immunosurveillance est une autre réponse qui participe à l'adaptation induite par exercice physique. En 1994 Nieman a proposé une théorie qui est utilisée aujourd'hui dans ce domaine, et s'appelle « Théorie de la courbe J » (Figure 27). Son hypothèse suggère que la pratique de l'exercice physique de charge modérée protégera un individu contre les infections des voies respiratoires hautes, tandis qu'un exercice intense augmentera le nombre d'épisodes de ce type d'infection (6). En contrepartie, le mécanisme immunologique à l'origine de la sensibilité aux infections des voies respiratoires supérieures après un exercice physique intense n'est pas encore décrit (7).

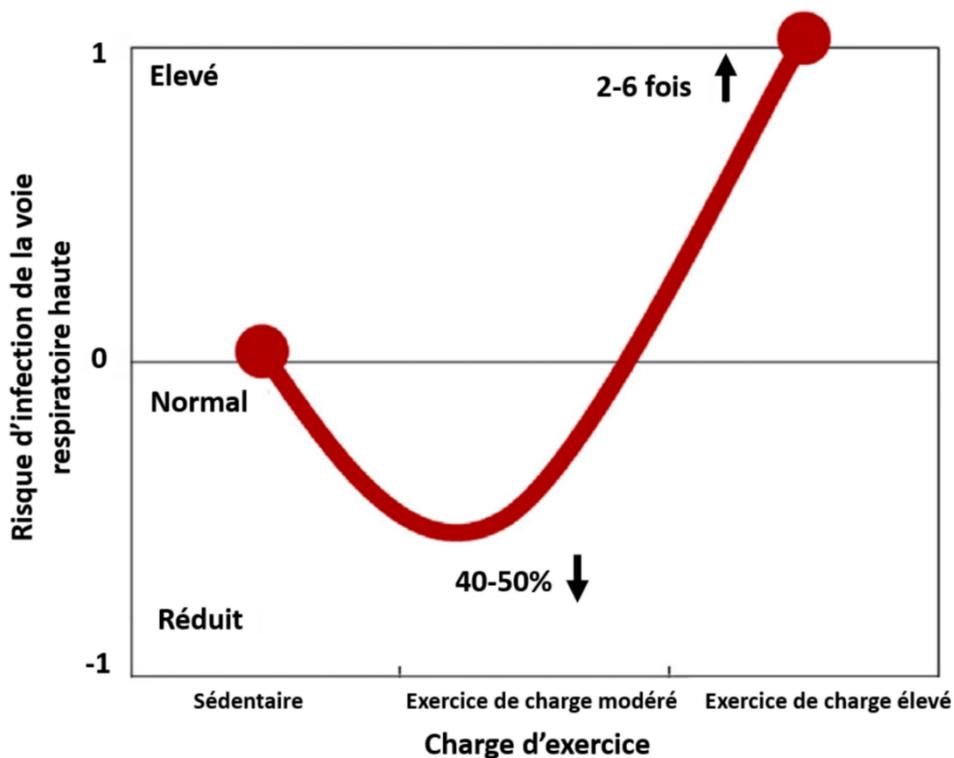


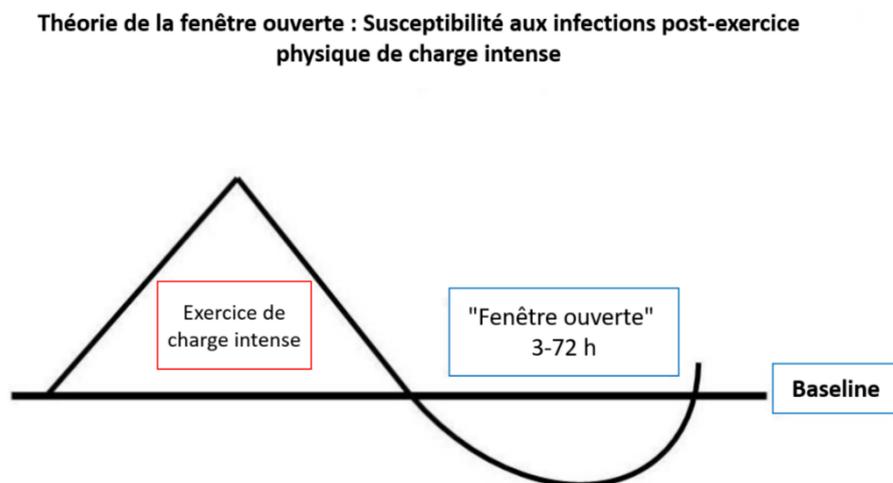
Figure 27: Théorie de la susceptibilité aux infections respiratoires hautes induites par exercice physique de charge élevée (Théorie de la curve J) d'après Nieman et Wentz (7)

## **14.5 Réponse immunitaire après une séance d'exercice physique de charge modérée**

Des données disponibles dans la littérature montrent que l'exercice physique est un stress capable de moduler la réponse immunitaire et ainsi renforcer le lien entre exercice et système immunitaire. Dans les modèles animaux et chez l'homme les exercices aérobies modérée ou vigoureux de moins de 60 minutes, l'activité antipathogène des macrophages tissulaires se produit en parallèle avec une recirculation des immunoglobulines. Des cytokines anti-inflammatoires, des neutrophiles, des cellules natural killer (NK), des cellules T cytotoxiques et de cellules B immature, jouent toutes un rôle essentiel dans l'activité de défense immunitaire et la santé métabolique (155-157). Les séances d'exercices aigus mobilisent préférentiellement les cellules NK et les lymphocytes T qui présentent une cytotoxicité élevée et un potentiel de migration tissulaire. Les hormones de stress, qui peuvent supprimer la fonction des cellules immunitaires, et les cytokines pro-inflammatoires, indicatives d'une activité métabolique intense, n'atteignent pas des niveaux élevés pendant une courte durée, lors des exercices modérés (158). Au fil du temps, ces augmentations transitoires, peuvent améliorer l'immunosurveillance et réduire l'inflammation, et même dans les cas cliniques pour les personnes obèses et malades (159, 160). En général, l'exercice physique répété à une charge non élevée est désormais considérée comme un adjuvant important du système immunitaire pour stimuler l'échange continu de leucocytes entre la circulation et les tissus (155).

## 14.6 Réponse immunitaire après une séance d'exercice physique de charge élevée

Les réponses immunitaires à un exercice avec des charges de travail élevées sont liées à la dysfonction immunitaire, à l'inflammation, au stress oxydatif et aux dommages musculaires (161-163). Un paradigme classique en immunologie de l'exercice est qu'une « fenêtre ouverte » de l'immunodépression peut se produire lors de la récupération d'une charge élevée d'exercice physique (Figure 28).



*Figure 28 : Théorie de la susceptibilité aux infections respiratoire post-exercice physique de charge intense "Fenêtre ouverte" d'après Hackeney (153)*

La fonction des cellules NK, des neutrophiles, des cellules T et B, la production d'IgA salivaires, la réponse d'hypersensibilité de type retardé cutané, l'expression du complexe d'histocompatibilité II majeur dans les macrophages et d'autres biomarqueurs de la fonction immunitaire sont modifiés pendant plusieurs heures par jours au cours de la récupération après un exercice d'endurance prolongé et intensif (164). À la suite

de cette immunodépression, les agents microbiens, en particulier les virus, peuvent envahir l'hôte ou être réactivés à partir d'un état latent, conduisant à une infection et à la maladie. Si l'exercice est répété une autre fois cela pourrait conduire à un plus grand degré d'immunodépression et potentiellement une fenêtre d'opportunité plus longue pour l'infection (162).

D'après les données qui montrent les différentes réponses immunitaires, par exemple, entre un exercice de marche (considéré une charge modérée) de 30 à 45 minutes et une course de marathon de 42,2 km (une charge intense) les réponses immunitaire post-exercice seront différentes (Figure 29) (7).

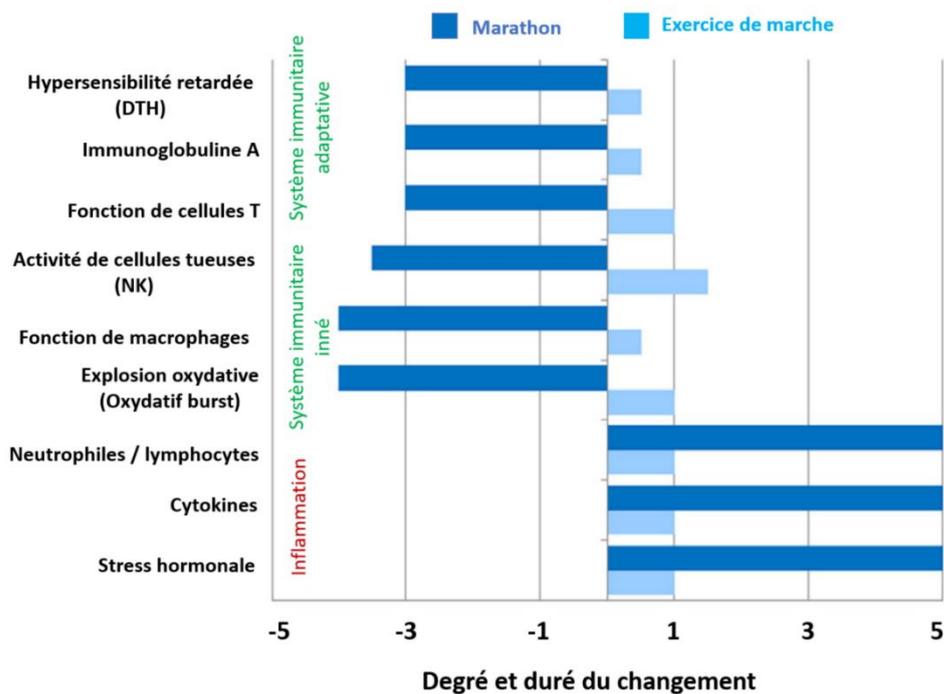


Figure 29: Le contraste entre la réponse immunitaire post-exercice au marathon et à l'exercice de marche de 30 à 45 minutes d'après Nieman and Wentz (7)

## **14.7 Incidences des infections respiratoires hautes post-exercice exhaustif**

Depuis 1980 beaucoup d'études sont apparues sur le lien potentiel entre un exercice prolongé et intensif et l'augmentation du risque de maladie (165-167). En effet, les données des études épidémiologiques indiquent que chez les marathoniens, l'ultra marathoniens ou des personnes soumises à des entraînements très intensif présentaient un risque accru d'infections des voies respiratoires. En 1983 Peters et Bateman ont mené une enquête sur 141 ultra marathoniens et 124 contrôles d'une tranche d'âge entre 18 et 65 ans. Les chercheurs ont constaté que l'incidence d'infection des voies respiratoires hautes chez les ultra marathoniens était de 33% contre 15% dans le groupe contrôle (168). Plus récemment, Gleeson et ses collaborateurs ont suivi pendant 4 mois 75 étudiants universitaires entraînés en exercice physique d'endurance. Leurs résultats ont démontré que les épisodes d'infection des voies respiratoires hautes pendant les 4 mois de suivi ont été plus récurrents chez les athlètes avec une haute charge d'entraînement *vs* chez les athlètes avec une faible charge d'entraînement (169).

Malgré les données sur les incidences de convalescence par infection respiratoire chez les personnes qui pratiquent des charges d'exercice très élevées, les mécanismes d'immunosuppression sont complexes, multifactoriels et comprennent des facteurs neuroendocrinologiques et métaboliques qui affectent les facteurs innés et métaboliques. En contrepartie, avec des modèles animaux, des recherches plus approfondies sur ce sujet sont de plus en plus révélatrices. Des études avec ce type de

modèle, permettent d'investiguer les mécanismes de l'immunodépression. Par exemple, récemment une étude réalisée chez le rat a démontré qu'un programme d'entraînement de charge intense de 5 semaines, mais pas un entraînement plus court, induit des altérations de la fonctionnalité du système immunitaire inné systémique dans le sang (170). Une autre étude, cette fois avec une supplémentation d'anti oxydant, l'Hespéridine, a amélioré la cytotoxicité des cellules NK et atténué la sécrétion de cytokines par les macrophages stimulés, prévenu la leucocytose induite par l'épuisement et augmenté la proportion de cellules T auxiliaires dans le thymus, le sang et la rate (171).

## 15 OBJECTIFS DE L'ETUDE

De nombreuses études ont montré que la pratique de l'exercice physique lorsqu'il est réalisé de manière trop intense, comporte autant de risques pour la santé que la sédentarité absolue.

Ainsi, le but de ce travail de thèse est d'étudier l'intérêt de l'exercice physique avec deux objectifs :

- Investiguer l'impact de l'exercice exhaustif sur les réponses inflammatoires dans le sang et les muscles chez la souris saine.
- Etudier l'impact dans les défenses antiinfectieuses respiratoires.

Pour cela, le tapis roulant à différentes charges et degrés de pente a été utilisé comme outil pour l'exercice physique, L'expression génique de cytokines inflammatoires de différents tissus a été réalisée. De plus, la bactéricidie des macrophages alvéolaires face à une infection par *S. aureus ex vivo* a été évaluée.

## **15.1 MATERIELS ET METHODES**

### **15.2 Modèle des souris soumises à l'exercice aigu répété**

Des souris C57BL / 6J (mâles ou femelles) ont été obtenues auprès de Janvier Labs, France. Les animaux ont été hébergés dans des cages collectives (5 chacune) de la garderie (animalerie 2CARE, accréditation B78-423-1, France), avec accès à la nourriture et à l'eau ad libitum avec un cycle lumière / obscurité de 12h. Le comité pour l'utilisation éthique des animaux (installations 2CARE) et l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines ont approuvé ces expériences (protocole approuvé # 2018022817398715).

### **15.3 Protocole d'exercice incrémental**

Vingt souris ont été familiarisées avec le tapis roulant pendant 3 jours sur un tapis roulant (6 m / min, 10 min chaque jour). Après la période d'acclimatation, les souris ont été séparées de façon aléatoire et puis réparties en groupes d'exercice (Exercice) ou sans exercice (non Exercice). Toutes les souris du groupe exercice ont effectué 2 jours d'exercice de charge intense par un protocole incrémental de course dans un période de 24 heures entre chaque séance. Ce protocole d'exercice consistait en faire des incréments de 3 m / min toutes les 3 min, pente de 0° jusqu'à l'épuisement, défini comme le moment où les animaux n'ont pas pu suivre le rythme du tapis roulant, l'animal ayant cessé de courir spontanément. En plus, pour cette procédure, nous n'avons pas utilisé du choc électrique, seul une légère touche de la queue pour inciter les souris à courir pendant toute la séance d'exercice. Deux heures après avoir effectué la dernière séance du protocole d'exercice physique sur le tapis roulant, les souris ont

été sacrifiées par CO<sub>2</sub> suivi d'une exsanguination. La description de ce protocole est illustrée dans la Figure 30 ci-dessous.

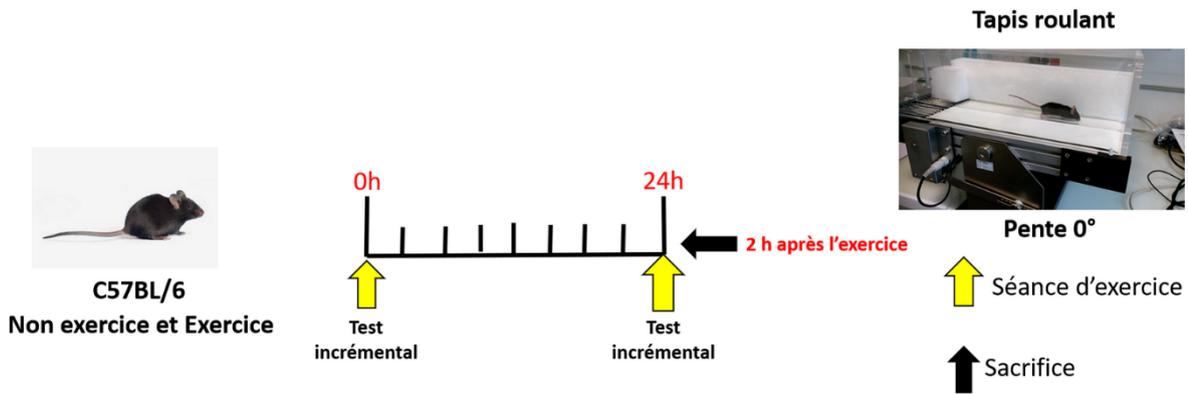


Figure 30: Schéma expérimental du protocole d'exercice de charge intense de courte durée

#### 15.4 Protocole d'exercice de longue durée en pente négative -10°

Vingt-quatre souris ont été réparties en deux groupes (n = 12 chacun) : un groupe sans exercice (Non Exercice), un groupe d'exercice (Exercice). Le protocole d'exercice prolongé consistait en deux jours consécutifs sur un tapis roulant motorisé à 15 m / min, pente de -10 °, pendant 2 heures, avec un intervalle de 24 heures entre chaque séance. Dans l'ordre, chaque séance consistait en 10 minutes d'échauffement à 7m / min puis la vitesse était augmentée sur 2 m / min toutes les 5 min jusqu'à atteindre 15 m / min. Pour permettre l'animal d'effectuer les deux heures d'exercice physique, la vitesse a été diminuée de 1 m / min lorsque les souris ont touché l'extrémité du tapis roulant 10 fois sur 1 min, si la vitesse était diminuée en dessous de 9 m / min, l'animal serait exclu de l'étude. L'exercice sur tapis roulant sans choc a été effectué, seul un

léger toucher de la queue a été utilisé pour inciter les souris à courir pendant toute la séance d'exercice. Bien après avoir effectué la dernière séance du protocole d'exercice physique sur le tapis roulant, les souris ont été sacrifiées par CO<sub>2</sub> suivi d'une exsanguination. La description de ce protocole est illustrée dans la Figure 31 ci-dessous.

### 15.5 Protocole d'exercice de longue durée en pente de -5°

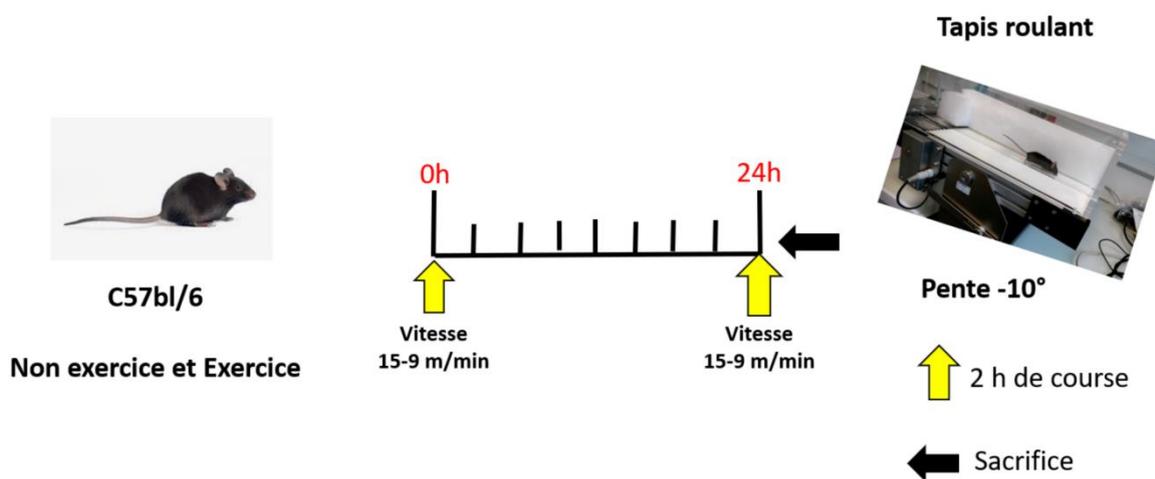


Figure 31: Schéma expérimental du protocole d'exercice de longue durée en pente de -10°

Seize souris ont été réparties de façon aléatoire en groupes d'exercice naïf ou sans exercice dans lesquelles ont reçu (n = 8 chacun). Toutes les souris du groupe exercice ont effectué un exercice modéré de longue durée (maximum 2 heures) dans un période de 24 heures entre chaque séance. Pour la première séance d'exercice dans une pente de -5°, le protocole d'exercice de charge modérée de longue durée consistait en régler les vitesses à 10 m / min pendant 15 min, suivi de 15 m / min et 20 m / min pendant 15 min, puis 24 m / min jusqu'à 2 heures ou épuisement. Pour le deuxième jour, 24 heures après la première séance, le même protocole a été réalisé. Nous avons utilisé un protocole d'exercice sur tapis roulant sans choc électrique, seul un léger toucher de la

queue a été utilisé pour inciter les souris à courir pendant toute la séance d'exercice. Trente minutes après avoir effectué la dernière séance du protocole d'exercice physique sur le tapis roulant, les souris ont été sacrifiées par CO<sub>2</sub> suivi d'une exsanguination. La description de ce protocole est illustrée dans la Figure 32 ci-dessous.

## 15.6 Culture ex vivo des macrophages alvéolaires souris

Un lavage broncho-alvéolaire (LBA) au PBS stérile a permis la récupération des macrophages alvéolaires. Les cellules ont été mis en culture dans du milieu RPMI Glutamax supplémenté de 10% de sérum de veau foetal inactive, de tampon Hepes (10 mM), de Pyruvate de sodium (1 mM) dans un incubateur humidifié maintenu à 5 % de

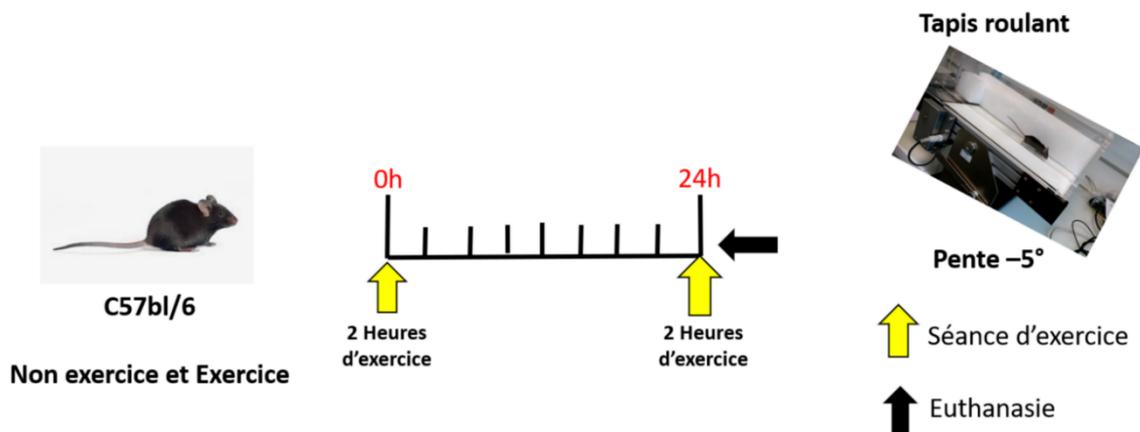


Figure 32: Schéma expérimental du protocole d'exercice de longue durée en pente de -5°

CO<sub>2</sub> et à 37 °C. Le jour suivant, les cellules non-adhérentes ont été retirées tandis que les macrophages pulmonaires adhérant ont été infectés par la bactérie *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) à une MOI (multiplicity of infection) de 10 (172). Après une heure dans l'incubateur à 37 °C, les cellules ont été lavées deux fois au PBS stérile pour

éliminer les bactéries extracellulaires. Du milieu frais contenant de la gentamycine (25µg / ml) a été ajoutée pour éliminer les bactéries extracellulaires résiduelles. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules ont été lavées deux fois au PBS stérile et lysées par de l'eau distillée glacée. Les Bactéries intracellulaires ont été étalées sur des boîtes de géloses Trypticase soja en effectuant des dilutions en séries au 5<sup>ème</sup>. Le comptage des unités formant des colonies (CFU) a été réalisé après 16 heures d'incubation à 37 °C (Figure 33).

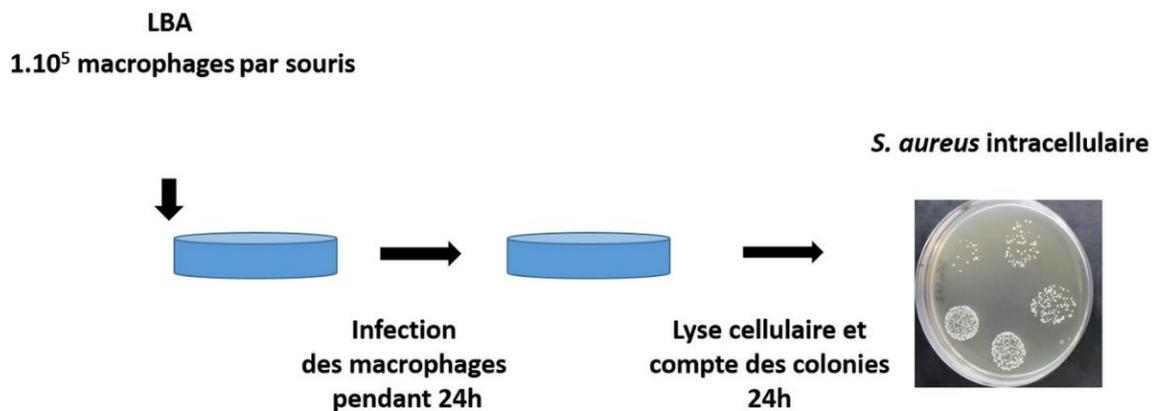


Figure 33 : Illustration du protocole d'étude de la survie des macrophages alvéolaires

## 15.7 Purification de l'ARN et analyse de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel

L'ARN total a été extrait grâce au Trizol conformément au protocole du fabricant (Thermo Fisher). La concentration totale d'ARN ainsi que sa pureté (Absorbance 260/280) ont été déterminées avec le spectrophotomètre GE NanoVue (GE Healthcare). 1 µg d'ARN total a été utilisé pour une transcription inverse afin de produire de l'ADNc en utilisant le kit de synthèse d'ADNc *Maxima First cDNA*

*synthesis* (Thermo Fischer) selon les instructions du fabricant. L'ADNc a été analysé par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) en présence du iTaq SYBr green qPCR mix dans le thermocycleur CFX96 (Bio-Rad). Les amorces oligo-nucléotidiques spécifiques de gènes IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , iNOS et 18S ont été conçus à l'aide de Primer-BLAST (site Web NCB) et produits par Eurogentec. Les niveaux d'expression de gènes ont été calculés en tant que rapport à l'expression du gène de référence ribossomal 18S. Les données ont été analysées sur le Bio-Rad CFX manager 3.1 en utilisant la méthode  $\Delta\Delta Ct$ .

<b>Gène cible</b>	<b>Séquences des amorces sens (5'-3')</b>	<b>Séquences des amorces antisens (5'-3')</b>
mouse IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	CCAGTTTGGTAGCATCCATC
mouse TNF- $\alpha$	TGTCTACTCCCAGGTTCTCTT	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC
mouse IL-1 $\beta$	GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT	ATCTTTTTGGGGTCCGTCAACT
mouse 18S rRNA	CTGAGAAACGGCTACCACATC	CGCTCCCAAGATCCAACCT

*Tableau 7 : Tableau des amorces utilisées lors des analyses par qPCRs*

## 16 RESULTATS

### 16.1 Résultats du protocole d'exercice incrémental

#### 16.1.1 Résultats des performances

Pour ce premier résultat, nous avons voulu savoir si ce protocole d'exercice de charge intense pourrait être suffisamment exhaustif, et ainsi, diminuer la performance des souris. Pour ce faire, nous avons comparé les performances du 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> jour d'exercice. Les résultats indiquent que ce premier protocole a été suffisamment intense et stressant. En effet, nous observons une diminution de la performance au deuxième jour pour tous les groupes (Figure 34A et B).

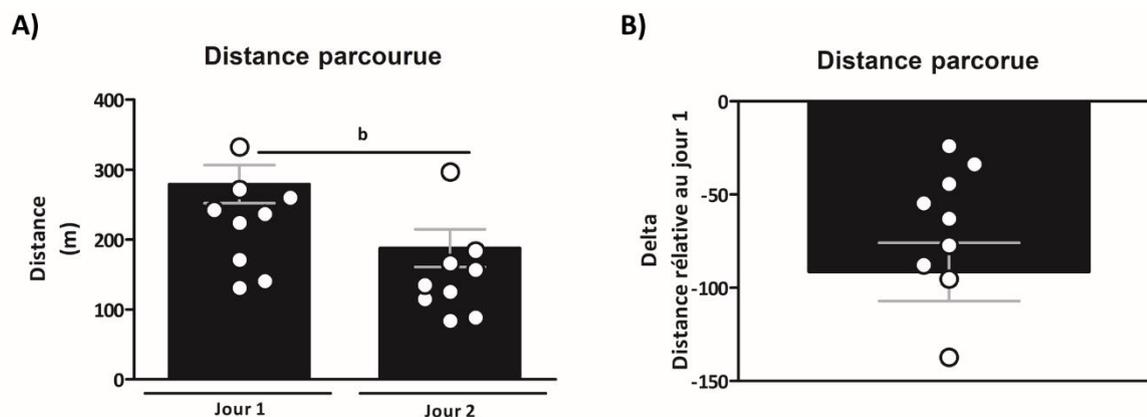


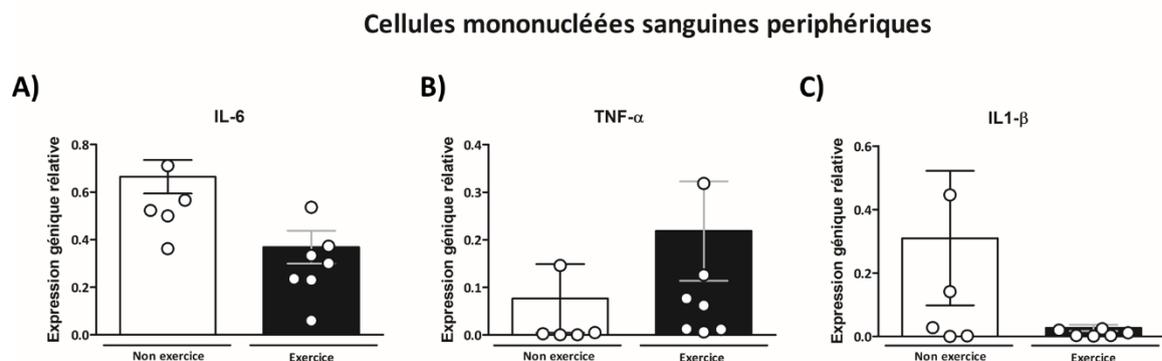
Figure 34: Effet des deux jours d'exercice de charge intense de courte durée dans la capacité de course des souris. A) Distance parcourue exprimée en mètre (m). B) Delta de la distance relative au jour 1 en m. b  $p < 0.05$  effet du jour. Paired t-test.

#### 16.1.2 Analyse de l'expression génique de cytokines pro inflammatoires

Deux heures après la deuxième séance d'exercice, les animaux ont été euthanasiés et le sang collecté, puis les muscles des pattes arrière (muscle Soléaire, Tibial antérieur)

(muscle Soléaire, Tibial antérieur) (muscle Soléaire, Tibial antérieur) (muscle Soléaire, Tibial antérieur) et la moelle épinière disséqués pour la réalisation des analyses d'expression génique de cytokines pro inflammatoires par qPCR. Pour ce premier résultat, après avoir collecté le sang des souris, nous avons réalisé un isolement de cellules mononuclées sanguines (PBMC) avant de réaliser l'analyse de cytokines inflammatoires par qPCR (Figure 35). Cependant, nous n'avons pas observé une altération du profil de cytokines dans les PBMC après avoir soumis les souris à un protocole d'exercice intense.

Ensuite, pour le muscle Tibial antérieur et Soléaire (Figure 36), ce protocole d'exercice de charge intense n'a pas aussi modifié le profil de cytokines pro inflammatoires souris. Le même profil a été trouvé dans les cytokines proinflammatoires de la moelle épinière (Figure 37).



*Figure 35: Effet des deux jours d'exercice de charge intense de courte durée dans l'expression génique de cytokines proinflammatoires des cellules mononuclées sanguines périphérique (PBMCs) analysé par PCR quantitative. Les PBMCs ont été lissés et l'ARN total extrait. Les ARNm de A) IL-6. B) TNF- $\alpha$  et C) IL1- $\beta$  ont été quantifiés par RT-PCR.*

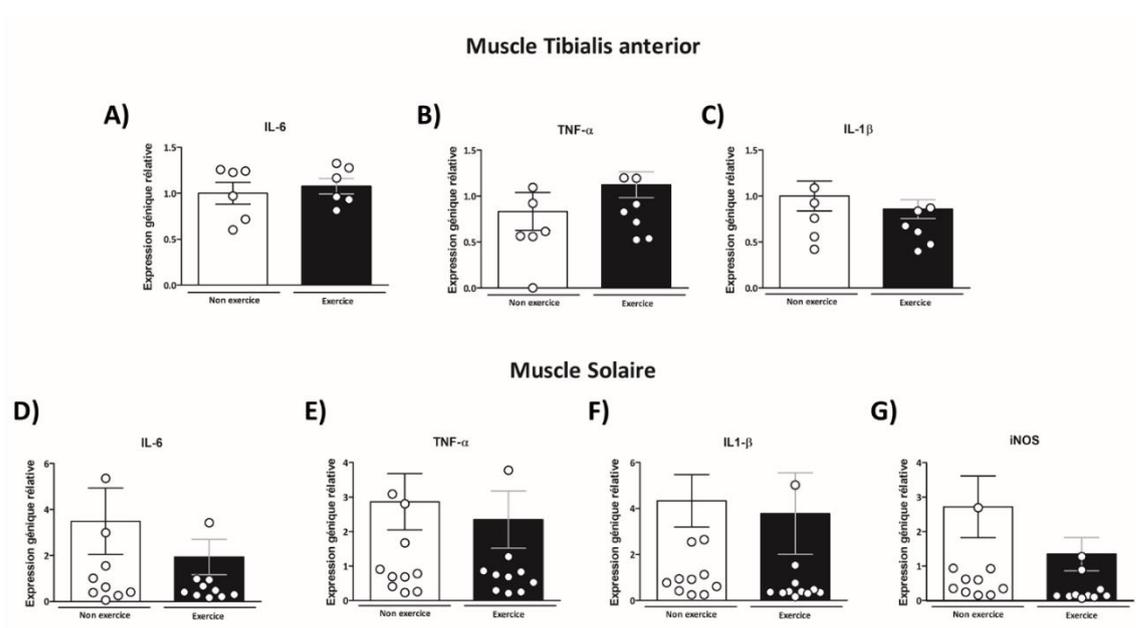


Figure 36: Effet des deux jours d'exercice de charge intense de courte durée dans l'expression génique de cytokines proinflammatoires du muscle squelettique. Les muscle Tibiales antérieur (A-C) et Soléaire (D-F) ont été lissés et l'ARN total extrait. Les ARNm d'A et D) IL-6, B et E) TNF- $\alpha$  et C et F) IL1- $\beta$  ont été quantifiés par RT-PCR.

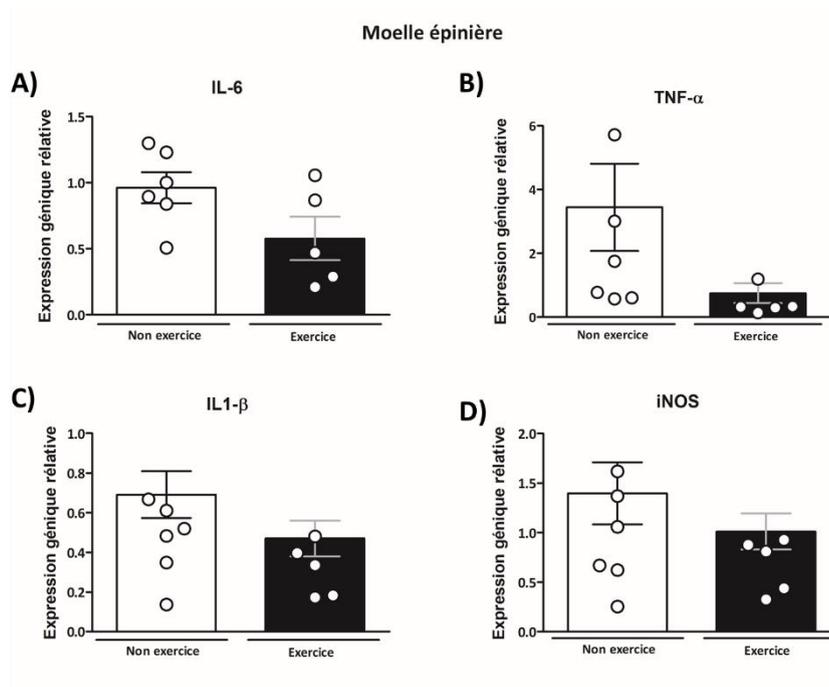


Figure 37: Effet des deux jours d'exercice de charge intense de courte durée dans l'expression génique de cytokines proinflammatoires de la moelle épinière. La moelle épinière a été lissée et l'ARN total extrait. Les ARNm d'A) IL-6, B) TNF- $\alpha$  et C) IL1- $\beta$  ont été quantifiés par RT-PCR.

### 16.1.3 Analyse de la bactéricidie des macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires ont été prélevés lors du sacrifice à deux heures post exercice. Ensuite ils ont été purifiés et incubés avec la bactérie pendant 24 heures. L'intérêt de cette analyse était d'investiguer si les deux séances d'exercice de charge intense de courte durée pourraient modifier la réponse de ces macrophages face à une infection bactérienne (Figure 38). Nous n'avons pas observé de modification de la survie des bactéries dans les macrophages alvéolaires des animaux soumis à ce protocole d'exercice physique.

L'ensemble des résultats pour ce protocole d'exercice de charge intense de courte durée n'est pas suffisant pour changer l'expression génique de cytokines proinflammatoires au niveau systémique et tissulaire.

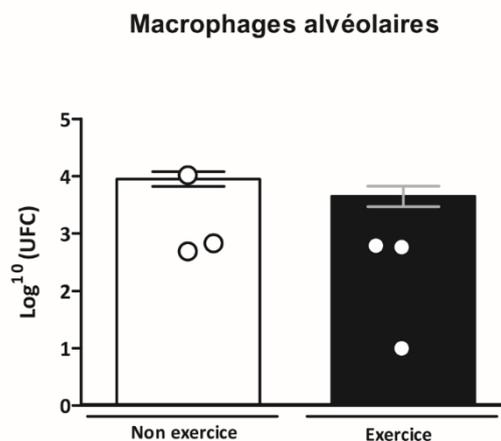


Figure 38 : Effet des deux jours d'exercice de charge intense de courte durée sur la fonction bactéricide des macrophages alvéolaires de souris ex vivo. . Les macrophages alvéolaires ont été extraits des poumons (2 souris par n) et infectés par *S. aureus* à la MOI de 10. La survie intracellulaire de *S. aureus* a été déterminée dans des macrophages alvéolaires 16 h après l'infection par dénombrement UFC (n=6 par groupe). b  $p < 0.05$  effet du traitement c  $p < 0.05$  effet de l'exercice. Two-way ANOVA avec post test de Bonferroni.

## 16.2 Résultats du protocole d'exercice de charge modéré de longue durée en pente négative (-10°)

### 16.2.1 Résultats des performances

Les résultats indiquent que ce protocole a été assez suffisamment intense et stressant, vu qu'il a eu une diminution de la performance au deuxième jour pour tous les groupes (Figure 39A et B).

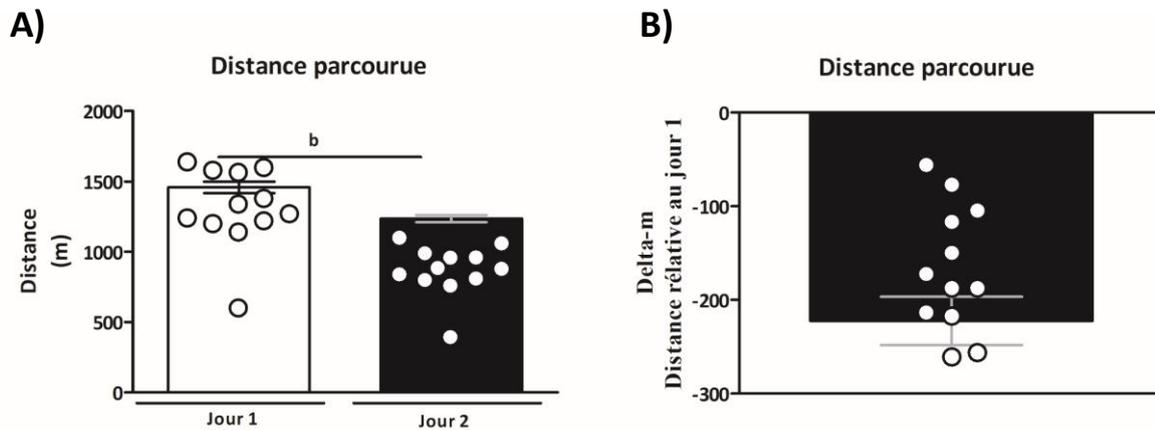


Figure 39: Effet des deux jours d'exercice de charge modérée de longue durée dans la capacité de course des souris. A) Distance parcourue exprimée en mètre (m). B) Delta de la distance relative au jour 1 en m. b  $p < 0.05$  effet du jour. Paired t-test.

### 16.2.2 Analyse de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires

Après la fin de la deuxième séance d'exercice, les muscles Tibial antérieur, Soléaire et le Long extenseur des orteils ont été collectés pour la réalisation des analyses d'expression génique de cytokines pro inflammatoires par RT-qPCR (Figure 40). Cependant, ce protocole n'a pas modifié le profil de cytokines proinflammatoires des souris.

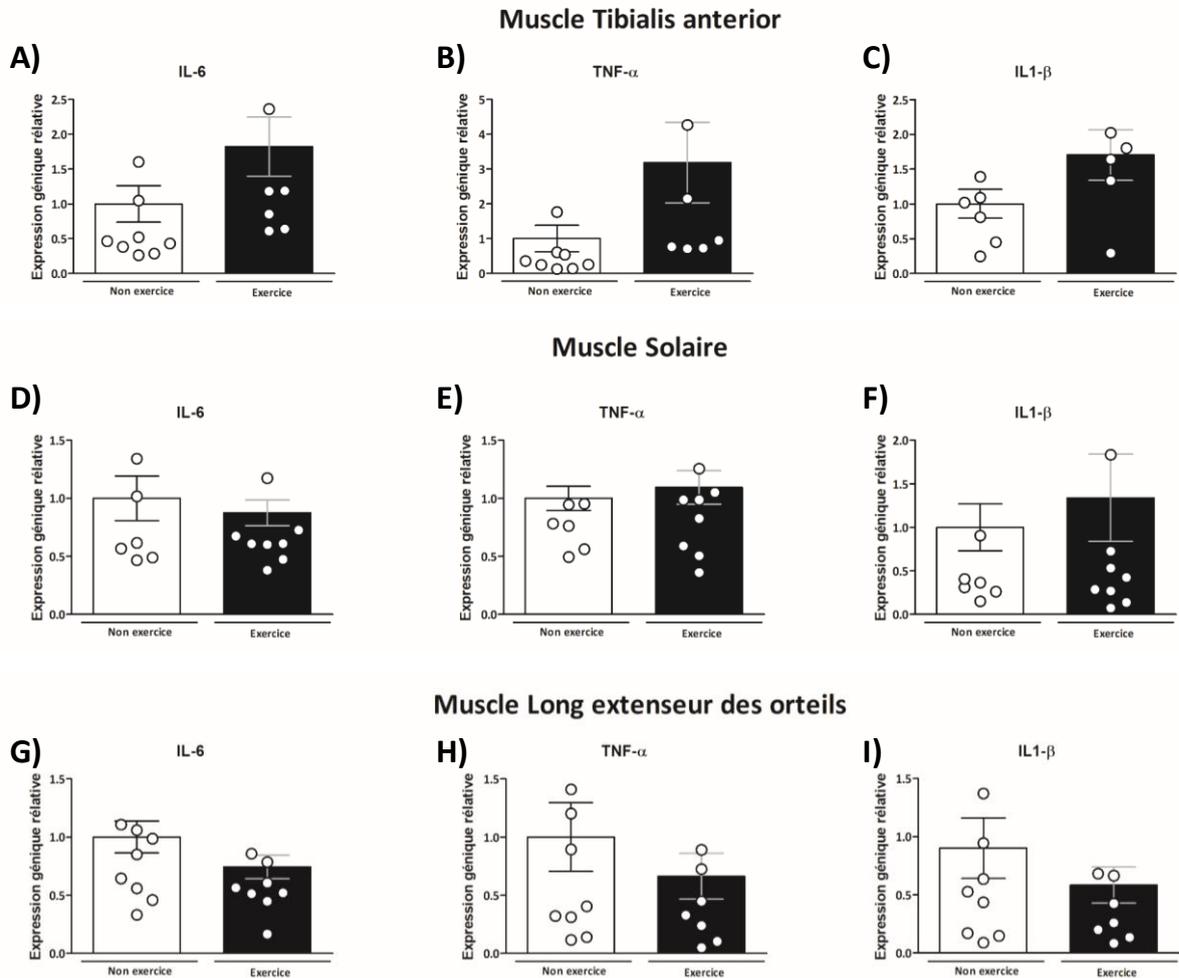


Figure 40: Effet des deux jours d'exercice de charge modérée de longue durée dans l'expression génique de cytokines proinflammatoires de muscle squelettique. Le muscle Tibialis antérieur (A-C), Soléaire (D-F) et Long extenseur des orteils (G-I) a été lissé et l'ARN total extrait. Les ARNm d'A, D et G) IL-6, B, E, et H) TNF- $\alpha$  et C, F et I) IL-1- $\beta$  ont été quantifiés par RT-PCR.

Ensuite, nous avons testé une autre méthode (ELISA) pour investiguer le contenu protéique d'IL-6 dans le muscle post-exercice. Cependant, nous n'avons pas observé d'altération du profil de cette cytokine pro-inflammatoire dans le muscle Soléaire et le Long extenseur des orteils (Figure 41).

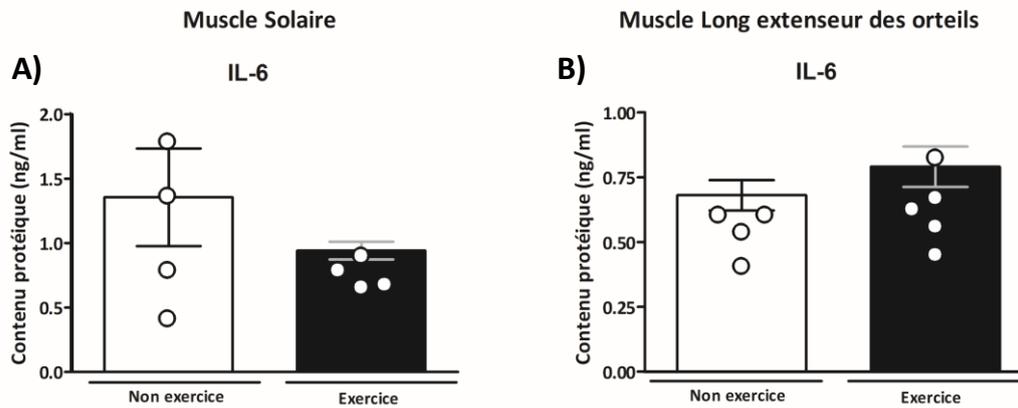


Figure 41: Effet des deux jours d'exercice de charge modérée de longue durée dans le contenu protéique d'IL-6 dans le muscle squelettique. Le muscle Soléaire (A) et le Long extenseur des orteils (B) a été lissés et quantifiés par ELISA.

## 16.3 Résultats du protocole d'exercice de charge modéré de longue durée en pente négative (-5°)

### 16.3.1 Résultats des performances

Les résultats indiquent que ce protocole a été assez suffisamment intense et stressant, vu qu'il y a eu une diminution de la performance au deuxième jour pour tous les groupes (Figure 42A et B).

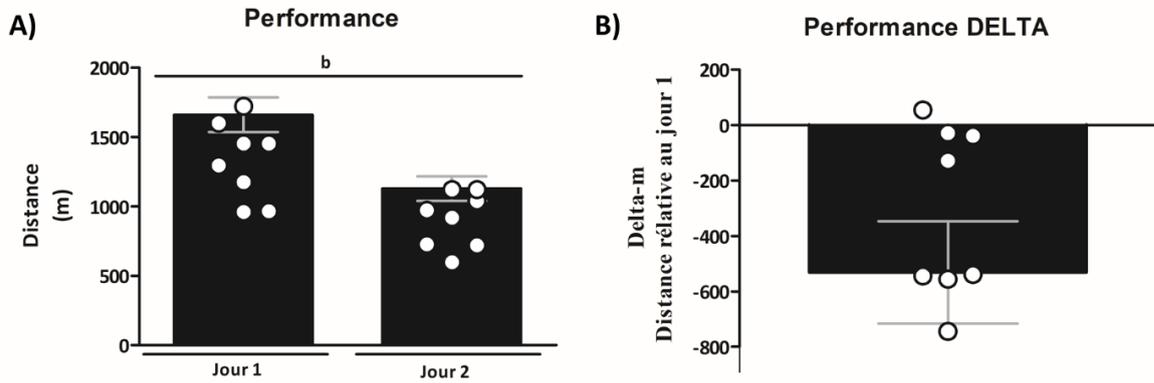


Figure 42: Effet des deux jours d'exercice de charge modérée de longue durée dans la capacité de course des souris. A) Distance parcourue exprimée en mètre (m). B) Delta de la distance relative au jour 1 en m. *b*  $p < 0.05$  effet du jour. Paired t-test.

### 16.3.2 Analyse de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires

Pour l'analyse de l'expression génique de cytokines inflammatoires par qPCR, nous avons choisi le muscle gastrocnémien (Figure 44). Les données préliminaires montrent une tendance à l'augmentation de l'expression d'IL-6 (Figure 43A) et d'iNOS (Figure 44C) chez les souris soumises au protocole d'exercice.

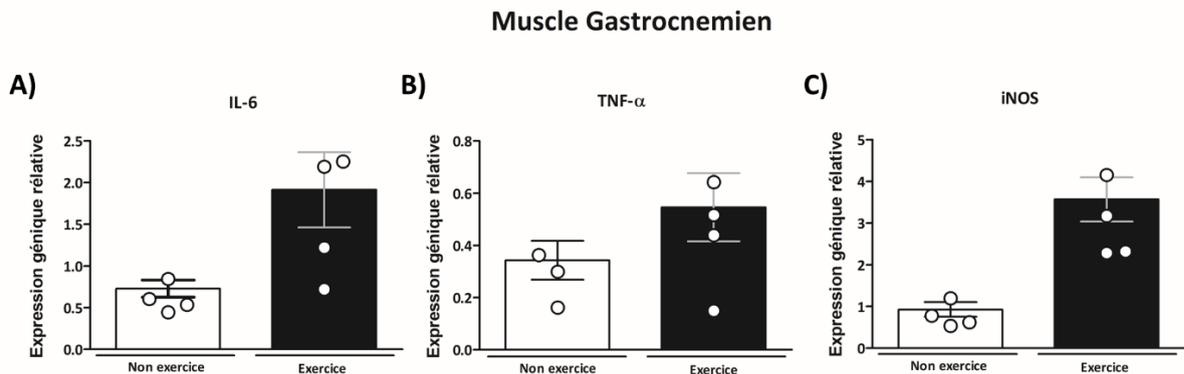


Figure 43: Effet des deux jours d'exercice de charge modérée de longue durée dans l'expression génique de cytokines proinflammatoires du muscle gastrocnémien. Les ARNm d'A) IL-6, B) TNF- $\alpha$  et C) iNOS ont été quantifiés par RT-PCR.

### 16.3.3 Analyse de bactéricide des macrophages alvéolaires des souris soumises à l'exercice de charge intense de courte durée

Pour ce résultat, nous n'avons observé qu'une tendance à l'augmentation de la survie de bactéries dans le groupe d'animal soumis à ce protocole d'exercice de charge modérée de longue durée (Figure 44).

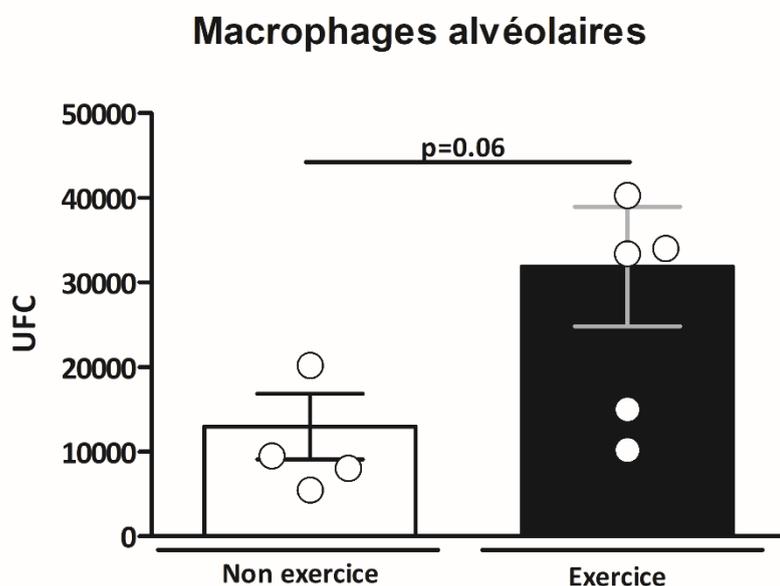


Figure 44 : Effet des deux jours d'exercice de charge intense de courte durée sur la fonction bactéricide des macrophages alvéolaires de souris *ex vivo*. Les macrophages alvéolaires ont été extraits des poumons (1 souris par n) et infectés par *S. aureus* à la MOI de 10. La survie intracellulaire de *S. aureus* a été déterminée dans des macrophages alvéolaires 16 h après l'infection par dénombrement UFC (n=4-5 par groupe). T-test

## 17 DISCUSSION

Dans cette partie de l'étude, j'ai voulu évaluer les effets stressants de deux séances d'exercice physique d'une charge intense de courte durée (30 minutes) ou d'une charge modérée de longue durée (2 heures) dans la réponse inflammatoire musculaire. J'ai également testé les effets de ce type d'exercice sur la bactéricidie des macrophages alvéolaires infectés *ex vivo* par *Staphylococcus Aureus*.

Pour le premier protocole, un exercice incrémental classifié comme un exercice intense de courte durée a été réalisé. Pour ce faire, des souris C57BL/6 ont été soumises à deux séances d'exercice avec un intervalle de 24 heures. Cependant, il est important de souligner que pour tous les protocoles d'exercice, la stratégie de motivation utilisant le choc électrique n'a été pas adopté comme le font beaucoup d'études (164, 165). En effet, cette méthode peut produire une réponse émotionnelle, telle que l'anxiété et peut être nocive et causer des blessures à l'animal et entraîner des changements métaboliques non liés à l'exercice (166, 167). Les résultats de performances obtenus après deux jours d'exercice montrent que ce protocole a été suffisant pour engendrer une diminution de la capacité de course au deuxième jour. Ensuite, des analyses de l'expression génique de cytokines inflammatoires dans le sang et les tissus (moelle épinière, muscles squelettiques) ont été réalisées. Comme résultats préliminaires, à cette intensité d'exercice, l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires n'a été pas altérée au niveau systémique et tissulaire. Aucune modification de la bactéricidie des macrophages alvéolaires infectés par *S.aureus* n'a également été observée. Suite de ces résultats, j'ai mis au point un autre protocole d'exercice exagéré

pour induire une inflammation au niveau du muscle. Pour cela, un protocole d'exercice de 2 jours de charge modérée de longue durée avec une pente négative de  $-10^\circ$  a été établi. Les résultats de performance ont montré une diminution de la capacité de course au deuxième jour. Cependant, l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires analysée par RT-PCR quantitative n'a été pas modifiée. Cela a été pareil pour le contenu protéique d'IL6 dans le tissu musculaire analysé par ELISA. Ainsi, ces résultats indiquent que même avec un protocole d'exercice plus long et une évidente fatigue physique après deux jours d'exercice de charge intense, le délai pour avoir une inflammation au niveau musculaire restait encore différent. Malgré cela, en utilisant le même principe du protocole d'exercice précédent, la pente du tapis roulant a été modifié vers  $-5^\circ$  pour un nouveau protocole. Cela a permis d'augmenter la performance des animaux au cours de 2 heures de course pour chaque séance. Les résultats ont montré qu'au niveau du stress physique, ce protocole d'exercice a été efficace pour réduire considérablement la capacité de course des animaux. Fait intéressant, pour cette fois, il a été observé une tendance à l'augmentation de la survie de *S. aureus* dans les macrophages alvéolaires du groupe soumis à ce protocole d'exercice. Ces données suggèrent que l'exercice physique pratiqué de façon exagérée, de charge modérée de longue durée, peut effectivement jouer un rôle dans la capacité bactéricide des macrophages alvéolaires de souris. De plus, une tendance à l'augmentation de l'expression génique de la cytokine IL-6 et de l'enzyme iNOS dans le muscle gastrocnémien des souris soumises à la course a été également observée. Ces données suggèrent que la durée, mais pas la charge de la séance de l'exercice, pourrait engendrer

un stress plus important dans le muscle et causer une diminution de la bactéricidie des macrophages alvéolaires à deux jours d'exercice consécutifs.

Des données de la littérature indiquent que les réponses immunitaires à un exercice avec des charges de travail élevées, sont associées à une dysfonction immunitaire, à l'inflammation, au stress oxydatif et aux dommages musculaires (161-163). Les effets de l'exercice physique sur l'immunité ont largement été étudiés chez le sujet sportif. Lors d'une séance d'exercice physique de charge intense ou prolongée, la circulation des cellules immunitaires, comme les lymphocytes, augmente très rapidement et cela contribue à une inflammation et un stress oxydant systémique et musculaire. Plusieurs études ont démontré que la pratique sportive exagérée peut affaiblir les réponses immunitaires face aux infections, notamment respiratoires, mais peu de données sont disponibles sur les liens physiologiques entre exercice et immunité. La bactérie *S. aureus* est une bactérie Gram + qui peut causer des infections asymptomatiques bien que des infections virulentes peuvent toucher la peau, l'endocarde et les voies respiratoires (173). Dans la majorité des cas, cette bactérie peut devenir résistante aux antibiotiques. De plus, des nombreuses études ont corrélié la convalescence causée par cette bactérie à l'immunodépression post-exercice (174, 175). Les mécanismes qui sous-tendent cette réponse ont été très peu étudiés. Cependant, très récemment, une étude de notre laboratoire montre que l'effet du SFN dans ce mécanisme est de bloquer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  en inhibant les voies de signalisation p38 et JNK ce qui réduit l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les macrophages infectés et diminue la survie de

*S.aureus* (176). Pour cette étude, les résultats observés indiquent que l'exercice exagéré, dans la durée mais pas dans l'intensité, a altéré les défenses des macrophages alvéolaires face à l'infection à *S. aureus*. Dans la littérature, une étude a mesuré *in vivo* l'effet d'une infection virale sur la survie des souris soumis à un protocole exercice exagéré. Ce travail a étudié la survie des animaux inoculés avec le virus H1N1 après avoir effectué 3 jours d'exercice physique de charge modérée de longue durée. Les auteurs ont observé que la mortalité du groupe exercice était significativement plus élevée que celle du groupe contrôle (177). Les mécanismes mis en jeu n'ont été pas explorés. Ainsi, pour cette partie de mon étude, les résultats préliminaires sont encourageants et poursuivre les investigations pour caractériser les effets de l'exercice de charge exagérée sur la capacité bactéricide des macrophages alvéolaires devient un projet pertinent.

Les lésions musculaires squelettiques résultant d'un exercice exagéré sont principalement induites par des blessures par étirement mécanique. Des résultats d'exercice aussi dommageables des lésions directes du sarcomère ainsi que des lésions de la membrane plasmique entraînant la libération d'enzymes musculaires, telles que la créatine kinase (CK), dans le plasma (178, 179). En outre, les lésions musculaires squelettiques induisent une réponse inflammatoire à la nécrose musculaire qui se traduit par l'activation et la migration des cellules immunitaires. Bien que cette réponse soit importante pour la régénération musculaire après un exercice normal, un exercice excessif induit une réponse inflammatoire systémique plus importante avec la libération d'une variété de cytokines et de chimiokines qui peuvent induire des effets

multi-organes (180). Dans le contexte de la réponse inflammatoire systémique et tissulaire, tous les protocoles d'exercice employés dans cette étude n'ont été pas suffisamment stressants. Dans la littérature, IL-6, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  jouent des fonctions spécifiques dans les mécanismes d'inflammation post-exercice. Par exemple, l'IL-6 est généralement considéré comme une cytokine stimulée par l'inflammation. Son rôle principal dans ce cas est de stimuler le cortisol qui à son tour va entraîner la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 et IL-1ra et inhiber l'expression de TNF- $\alpha$  (181-183). Le TNF- $\alpha$  joue un important rôle pour l'activation de l'hyperalgésie causée par l'exercice extrême. Il va induire la production d'IL-1 $\beta$  via la sécrétion de prostaglandines. Ainsi, l'étude du ratio entre IL-10 et TNF- $\alpha$  est proposée pour vérifier l'état inflammatoire post-exercice (184). Une étude a démontré que l'expression des cytokines IL-10 et TNF- $\alpha$  sont augmentées bien après la période post-exercice (185). Dans notre étude préliminaire, même en absence d'analyse de cytokines anti-inflammatoires, il n'a été pas observé d'altération de l'expression d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  entre souris soumise à l'exercice et les témoins. Pourtant, il serait intéressant d'analyser également les cytokines anti-inflammatoires pour pouvoir définir plus précisément dans quel état inflammatoire se trouvent nos souris.

Un autre point important qui doit être abordé pour la compréhension de ces résultats, est le délai d'apparition de cette réponse inflammatoire induite par exercice exagéré. Il est bien documenté qu'une seule séance d'exercice est capable d'induire des phénomènes tels que les lésions musculaires et l'inflammation en rapport avec une leucocytose post-exercice (186) (Malm, 2001). De plus, lorsque l'exercice exagéré est

pratiqué de manière courante, cette inflammation peut éventuellement conduire à des lésions multi-organes (178). D'autres questions sur le rôle des différents types d'exercice, la charge ou l'intensité de l'exercice, le manque de périodes de récupération dans l'inflammation transitoire et le lien potentiel entre les lésions tissulaires restent encore sans réponse. Dans notre étude, basée sur l'hypothèse de la « fenêtre ouverte », les protocoles ont été conçus avec l'hypothèse que deux séances d'exercice physique dans un intervalle de 24 heures seraient suffisantes pour déclencher des réponses inflammatoires. Cette hypothèse n'a été pas confirmée. En contrepartie, une très récente étude établissant un modèle d'exercices répétitifs d'endurance pendant 7 jours de course sur tapis roulant chez le rat, et étudiant les dommages causés sur plusieurs organes, renforcent cette discussion des résultats. Liao, P. *et coll.* (2020) ont trouvé que morphologiquement, 7 jours d'exercice répétitif provoquent une destruction structurelle des tissus et une infiltration de cellules inflammatoires dans les muscles squelettiques et de nombreux organes viscéraux. De plus, ils ont trouvé des modifications quantitatives des leucocytes, des érythrocytes et des plaquettes, ainsi que des modifications de la concentration des facteurs inflammatoires sanguins (187).

Compte tenu des avancées récentes à propos de l'effet inflammatoire et immunodépresseur de l'exercice physique exagéré, comparables aux résultats observés dans ce travail de thèse, s'ouvre une intéressante fenêtre d'opportunité à ce sujet. Une étude de caractérisation des mécanismes de la capacité bactéricide des macrophages alvéolaires et ses liens avec la réponse inflammatoire induits par l'exercice physique exagéré est envisagée dans le laboratoire.

## 18 CONCLUSION ET PERSPECTIVE

En conclusion de ce travail en cours, l'inflammation post-exercice exagéré n'était pas présente avec les protocoles réalisés. Les résultats préliminaires suggèrent que cette réponse peut être plus complexe et d'autres études cinétiques sont nécessaires. Les résultats préliminaires obtenus pour la bactéricide des macrophages alvéolaires suggèrent un effet délétère de l'exercice aigu de charge intense. Ainsi, d'autres expériences sont nécessaires. En effet, d'autres stratégies seraient envisageables, comme par exemple, tester l'effet d'un activateur du Nrf2 comme le sulforaphane (SFN). Cette stratégie pharmacologique pourrait être utile pour atténuer un éventuel effet sur la capacité bactéricide des macrophages alvéolaires induit par des charges intenses d'exercice. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer le lien entre la réponse inflammatoire systémique et les propriétés fonctionnelles des macrophages alvéolaires.

La perspective à court terme pour cette étude est de réaliser une autre campagne d'exercice aigu de charge intense chez la souris sauvage C57BL/6 avec un traitement pharmacologique de SFN en gavage. Ainsi, des expériences par PCR quantitative seront réalisées prochainement pour déterminer le profil de cytokines anti et pro-inflammatoires au niveau tissulaire et systémique et en immunofluorescence pour analyser l'infiltration de cellules immunitaires dans le muscle squelettique lors de protocole d'exercice aigu de charge intense.

La perspective à long terme, est de réaliser une étude cinétique pour augmenter la compréhension sur les infections des voies respiratoires hautes qui sont très fréquentes chez les personnes qui se soumettent régulièrement à des efforts exagérés par exercice physique.

## 19 CONCLUSION GENERALE

Une lésion de la moelle épinière entraîne des déficits neuromoteurs permanents qui modifient la vie en raison de la capacité de récupération limitée du système nerveux central. Lorsque la blessure est située au niveau cervical, les fonctions sensori-motrices en dessous du site de la lésion sont perdues et l'insuffisance respiratoire permanente est induite. Pour l'étude de cette pathologie, le rat est le modèle plus utilisé. Néanmoins, la faible disponibilité des spécimens génétiquement modifiés chez le rat limite son utilisation. Récemment, le modèle de lésion médullaire cervicale a été étudié chez la souris pour évaluer la récupération post-traumatique locomotrice spontanée et la récupération des muscles respiratoires. Les études moléculaires sont importantes pour améliorer les connaissances sur les mécanismes impliqués dans la lésion médullaire cervicale. Ainsi, les modèles développés chez la souris, avec un grand nombre disponible de souches génétiquement modifiées, peuvent être utilisés pour déchiffrer les interactions moléculaires et cellulaires.

La première partie de mon travail de thèse a consisté à démontrer la faisabilité de l'utilisation d'un modèle souris d'hémisection cervicale de la moelle épinière pour étudier l'impact de l'entraînement physique sur la plasticité des muscles locomoteurs/respiratoires. Les résultats obtenus montrent que le test incrémental est applicable pour évaluer la capacité de course chez la souris avec des lésions cervicales de la moelle épinière. L'entraînement aérobie améliore la microcirculation des muscles locomoteurs. Notre protocole a également joué un rôle favorable dans la modification du type de myofibres de diaphragme et le développement de la microcirculation

diaphragmatique après hémisection cervicale de moelle épinière. L'intensité employée dans notre protocole d'exercice physique de 6 semaines n'a pas été suffisante pour induire une amélioration de la fonction respiratoire après hémisection cervicale de moelle épinière. Néanmoins, ces données permettent de considérer que l'entraînement aérobique pourrait être une bonne stratégie non invasive à utiliser afin de maintenir la plasticité locomotrice et respiratoire musculaire suite à une lésion médullaire cervicale. Les résultats préliminaires de cette étude montrent une tendance à une récupération minimale de la capacité de course même à 51 jours après lésion dans les groupes sauvages et Nrf2 KO sédentaires. Après 6 semaines d'entraînement, la capacité de course était plus élevée dans les groupes entraînés, y compris dans le groupe entraîné Nrf2 KO. Cela indique que l'abolition de Nrf2 n'influence pas dans l'amélioration de la capacité de course à long-terme. Cependant, la récupération de l'activité électromyographique diaphragmatique chez la souris Nrf2 KO sédentaire reste limitée en comparaison des souris sauvages sédentaires.

La deuxième partie de mon travail de thèse concerne l'étude de différents types d'exercice de haute intensité sur l'inflammation systémique et l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires de souris saines.

Plusieurs études ont démontré qu'il est important de prendre en compte la charge (durée, intensité et fréquence) de l'exercice pour obtenir des effets bénéfiques sur l'inflammation par exemple. En effet, des données montrent que l'exercice physique exhaustif présenterait des effets délétères en affaiblissant le système immunitaire. L'immunosurveillance participe à l'adaptation induite par exercice physique. Une

hypothèse suggère que la pratique de l'exercice physique de charge modérée protège un individu contre les infections des voies respiratoires hautes, tandis qu'un exercice intense augmentera le nombre d'épisodes infectieux. Les résultats préliminaires de notre étude suggèrent que l'exercice de haute intensité n'entraîne pas d'inflammation chez la souris. Cependant, la réponse à ce type d'exercice pourrait être plus complexe et d'autres études cinétiques sont nécessaires. Les résultats préliminaires obtenus pour la bactéricide des macrophages alvéolaires suggèrent un effet délétère de l'exercice aigu de charge intense. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer le lien entre la réponse inflammatoire systémique et les propriétés fonctionnelles des macrophages alvéolaires.

Les résultats obtenus pendant ces 3 ans de thèse renforcent l'importance de l'utilisation de l'exercice physique comme outil pour investiguer les mécanismes impliqués dans des situations physiologiques et pathologiques. Ainsi, les résultats obtenus pour l'étude des effets de l'exercice dans un modèle d'hémisection cervicale de la moelle épinière chez la souris pourraient contribuer à améliorer les connaissances sur la physiopathologie des lésions médullaires et ouvrir de nouvelles perspectives de stratégies thérapeutiques. Les travaux sur les souris Nrf2 KO et sur l'effet immuno-modulateur de l'exercice physique restent à compléter.

## 20 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Zimmer MB, Nantwi K, Goshgarian HG. Effect of spinal cord injury on the respiratory system: basic research and current clinical treatment options. Taylor & Francis; 2007.
2. Winslow C, Rozovsky J. Effect of spinal cord injury on the respiratory system. *American journal of physical medicine & rehabilitation*. 2003;82(10):803-14.
3. DiMarco AF. Restoration of respiratory muscle function following spinal cord injury: review of electrical and magnetic stimulation techniques. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2005;147(2-3):273-87.
4. Harkema SJJTN. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. 2001;7(5):455-68.
5. Hsieh F, Giszter SF, editors. Robot-driven spinal epidural stimulation compared with conventional stimulation in adult spinalized rats. 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society; 2011: IEEE.
6. Nieman DC. Exercise, infection, and immunity. *International journal of sports medicine*. 1994;15(S 3):S131-S41.
7. Nieman DC, Wentz LM. The compelling link between physical activity and the body's defense system. *Journal of sport and health science*. 2019;8(3):201-17.
8. Bican O, Minagar A, Pruitt AA. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurologic clinics*. 2013;31(1):1-18.
9. Watson. *The Mouse Nervous System*: Elsevier; 2012.
10. Diaz E, Morales H. *Spinal Cord Anatomy and Clinical Syndromes*. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*. 2016;37(5):360-71.
11. Johnson RT, Joy JE, Altevogt BM, Liverman CT. *Spinal cord injury: progress, promise, and priorities*: National Academies Press; 2005.
12. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229-48.
13. James SL, Theadom A, Ellenbogen RG, Bannick MS, Montjoy-Venning W, Lucchesi LR, et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. 2019;18(1):56-87.
14. Hamid R, Averbeck MA, Chiang H, Garcia A, Al Mousa RT, Oh S-J, et al. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury. *World journal of urology*. 2018;36(10):1517-27.
15. Wilson JR, Cadotte DW, Fehlings MG. Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury: a systematic review. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2012;17(Suppl1):11-26.
16. Hachem LD, Ahuja CS, Fehlings MG. Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. *The journal of spinal cord medicine*. 2017;40(6):665-75.
17. Middleton J, Dayton A, Walsh J, Rutkowski S, Leong G, Duong S. Life expectancy after spinal cord injury: a 50-year study. *Spinal Cord*. 2012;50(11):803-11.
18. Shavelle RM, Paculdo DR, Tran LM, Strauss DJ, Brooks JC, DeVivo MJ. Mobility, continence, and life expectancy in persons with ASIA impairment scale grade D spinal cord injuries. *American journal of physical medicine & rehabilitation*. 2015;94(3):180-91.
19. Kang Y, Ding H, Zhou H, Wei Z, Liu L, Pan D, et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. 2018;6(1):1-9.
20. Spungen AM, Adkins RH, Stewart CA, Wang J, Pierson RN, Jr., Waters RL, et al. Factors influencing body composition in persons with spinal cord injury: a cross-sectional study. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2003;95(6):2398-407.
21. Mortazavi MM, Verma K, Harmon OA, Griessenauer CJ, Adeeb N, Theodore N, et al. The microanatomy of spinal cord injury: a review. *Clinical anatomy*. 2015;28(1):27-36.
22. Stein DM, Sheth KN. Management of acute spinal cord injury. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2015;21(1):159-87.

23. Tian DS, Liu JL, Xie MJ, Zhan Y, Qu WS, Yu ZY, et al. Tamoxifen attenuates inflammatory-mediated damage and improves functional outcome after spinal cord injury in rats. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(6):1658-67.
24. Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. Mary Ann Liebert, Inc.; 2004.
25. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*. 2006;129(12):3249-69.
26. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Experimental neurology*. 1998;151(1):77-88.
27. Grayson MH, Van der Vieren M, Sterbinsky SA, Michael Gallatin W, Hoffman PA, Staunton DE, et al. alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(11):2187-91.
28. Mabon PJ, Weaver LC, Dekaban GA. Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin alphaD: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp Neurol*. 2000;166(1):52-64.
29. Rust R, Kaiser J. Insights into the Dual Role of Inflammation after Spinal Cord Injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017;37(18):4658-60.
30. Popovich PG, Horner PJ, Mullin BB, Stokes BT. A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury. *Exp Neurol*. 1996;142(2):258-75.
31. Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2003;41(7):369-78.
32. Hackett AR, Lee JKFIN. Understanding the NG2 glial scar after spinal cord injury. 2016;7:199.
33. Lane MA. Spinal respiratory motoneurons and interneurons. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011;179(1):3-13.
34. Jefferson SC, Tester NJ, Rose M, Blum AE, Howland BG, Bolser DC, et al. Cough following low thoracic hemisection in the cat. *Experimental neurology*. 2010;222(1):165-70.
35. Grélot L, Milano S, Portillo F, Miller AD. Respiratory interneurons of the lower cervical (C4-C5) cord: membrane potential changes during fictive coughing, vomiting, and swallowing in the decerebrate cat. *Pflügers Archiv*. 1993;425(3-4):313-20.
36. Baydur A, Sassoon CS. Respiratory dysfunction in spinal cord disorders. *Spinal Cord Medicine: Principles and Practice*. 2010;2:215-29.
37. Bezdudnaya T, Hormigo KM, Marchenko V, Lane MA. Spontaneous respiratory plasticity following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats. *Experimental neurology*. 2018;305:56-65.
38. Vinit S, Kastner A. Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2009;169(2):115-22.
39. Jackson AB, Grooms TE. Incidence of respiratory complications following spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1994;75(3):270-5.
40. Winslow C, Bode RK, Felton D, Chen D, Meyer Jr PR. Impact of respiratory complications on length of stay and hospital costs in acute cervical spine injury. *Chest*. 2002;121(5):1548-54.
41. Hormigo KM, Zholudeva LV, Spruance VM, Marchenko V, Cote M-P, Vinit S, et al. Enhancing neural activity to drive respiratory plasticity following cervical spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2017;287:276-87.
42. Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(8):628-43.
43. Mantilla CB, Sieck GC. Neuromuscular adaptations to respiratory muscle inactivity. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2009;169(2):133-40.
44. Goshgarian HG. The crossed phrenic phenomenon and recovery of function following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2009;169(2):85-93.
45. Giszter SF. Spinal primitives and intra-spinal micro-stimulation (ISMS) based prostheses: a neurobiological perspective on the "known unknowns" in ISMS and future prospects. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:72.

46. Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(4):263-73.
47. Loy K, Bareyre FM. Rehabilitation following spinal cord injury: how animal models can help our understanding of exercise-induced neuroplasticity. *Neural regeneration research*. 2019;14(3):405.
48. Ferguson AR, Huie JR, Crown ED, Baumbauer KM, Hook MA, Garraway SM, et al. Maladaptive spinal plasticity opposes spinal learning and recovery in spinal cord injury. *Frontiers in physiology*. 2012;3:399.
49. Thompson C, Mutch J, Parent S, Mac-Thiong J-M. The changing demographics of traumatic spinal cord injury: An 11-year study of 831 patients. *The journal of spinal cord medicine*. 2015;38(2):214-23.
50. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari M, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*. 2017;55(8):714-21.
51. Komnenov D, Solarewicz JZ, Afzal F, Nantwi KD, Kuhn DM, Mateika JH. Intermittent hypoxia promotes recovery of respiratory motor function in spinal cord-injured mice depleted of serotonin in the central nervous system. *Journal of applied physiology*. 2016;121(2):545-57.
52. Forgiione N, Chamankhah M, Fehlings MG. A mouse model of bilateral cervical contusion-compression spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2017;34(6):1227-39.
53. Mantilla CB, Greising SM, Stowe JM, Zhan W-Z, Sieck GCJEn. TrkB kinase activity is critical for recovery of respiratory function after cervical spinal cord hemisection. 2014;261:190-5.
54. Satkunendrarajah K, Karadimas SK, Laliberte AM, Montandon G, Fehlings MGJN. Cervical excitatory neurons sustain breathing after spinal cord injury. 2018;562(7277):419-22.
55. Fuller D, Doperalski N, Dougherty B, Sandhu M, Bolser D, Reier P. Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Experimental neurology*. 2008;211(1):97-106.
56. Mantilla CB, Greising SM, Zhan W-Z, Seven YB, Sieck GC. Prolonged C2 spinal hemisection-induced inactivity reduces diaphragm muscle specific force with modest, selective atrophy of type IIx and/or IIb fibers. *Journal of applied physiology*. 2013;114(3):380-6.
57. Vinit S, Darlot F, Stamegna J-C, Gauthier P, Kastner A. Effect of cervical spinal cord hemisection on the expression of axon growth markers. *Neuroscience letters*. 2009;462(3):276-80.
58. Michel-Flutot P, Mansart A, Deramaudt TB, De Jesus I, Lee KZ, Bonay M, et al. Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2020:103568.
59. Lin VW, Bono CM. *Spinal cord medicine: principles & practice*: Demos medical publishing; 2010.
60. Mantilla CB, Sieck GC. Phrenic motor unit recruitment during ventilatory and non-ventilatory behaviors. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011;179(1):57-63.
61. Gill L, Ross H, Lee K, Gonzalez-Rothi E, Dougherty B, Judge A, et al. Rapid diaphragm atrophy following cervical spinal cord hemisection. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2014;192:66-73.
62. Battistuzzo CR, Rank MM, Flynn JR, Morgan DL, Callister R, Callister RJ, et al. Effects Of treadmill training on hindlimb muscles of spinal cord-injured mice. *Muscle & nerve*. 2017;55(2):232-42.
63. Castro MJ, Apple Jr DF, Hillegass EA, Dudley GA. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle cross-sectional area within the first 6 months of injury. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1999;80(4):373-8.
64. Gorgey AS, Witt O, O'Brien L, Cardozo C, Chen Q, Lesnefsky EJ, et al. Mitochondrial health and muscle plasticity after spinal cord injury. 2019;119(2):315-31.
65. Cramer R, Weston A, Climstein M, Davis G, Sutton J. Effects of electrical stimulation-induced leg training on skeletal muscle adaptability in spinal cord injury. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2002;12(5):316-22.
66. Jung S-Y, Seo T-B, Kim D-Y. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2016;12(4):284.
67. Sun T, Ye C, Wu J, Zhang Z, Cai Y, Yue F. Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2013;8(27):2540.
68. Flynn JR, Dunn LR, Galea MP, Callister R, Callister RJ, Rank MM. Exercise training after spinal cord injury selectively alters synaptic properties in neurons in adult mouse spinal cord. *Journal of Neurotrauma*. 2013;30(10):891-6.

69. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
70. Lovely RG, Gregor R, Roy R, Edgerton VRJEn. Effects of training on the recovery of full-weight-bearing stepping in the adult spinal cat. 1986;92(2):421-35.
71. Lovely R, Gregor R, Roy R, Edgerton VJBr. Weight-bearing hindlimb stepping in treadmill-exercised adult spinal cats. 1990;514(2):206-18.
72. Martinez M, Delivet-Mongrain H, Rossignol SJJon. Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. 2013;109(12):2909-22.
73. Kakulas BJSc. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. 2004;42(10):549-63.
74. Côté M-P, Murray M, Lemay MAJJon. Rehabilitation strategies after spinal cord injury: inquiry into the mechanisms of success and failure. 2017;34(10):1841-57.
75. Evans N, Wingo B, Sasso E, Hicks A, Gorgey AS, Harness E. Exercise recommendations and considerations for persons with spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2015;96(9):1749-50.
76. de Paleville DT, McKay W, Aslan S, Folz R, Sayenko D, Ovechkin A. Locomotor step training with body weight support improves respiratory motor function in individuals with chronic spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2013;189(3):491-7.
77. Sandrow-Feinberg HR, Izzj J, Shumsky JS, Zhukareva V, Houle JD. Forced exercise as a rehabilitation strategy after unilateral cervical spinal cord contusion injury. *Journal of neurotrauma*. 2009;26(5):721-31.
78. Gorgey AS, Graham ZA, Chen Q, Rivers J, Adler RA, Lesnefsky EJ, et al. Sixteen weeks of testosterone with or without evoked resistance training on protein expression, fiber hypertrophy and mitochondrial health after spinal cord injury. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2020;128(6):1487-96.
79. Loy K, Schmalz A, Hoche T, Jacobi A, Kreutzfeldt M, Merkler D, et al. Enhanced voluntary exercise improves functional recovery following spinal cord injury by impacting the local neuroglial injury response and supporting the rewiring of supraspinal circuits. *Journal of neurotrauma*. 2018;35(24):2904-15.
80. Jesus I, Herrera NA, Andreo JC, Santos CF, Amaral SL. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins. *Steroids*. 2020;156:108573.
81. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007;34(8):760-5.
82. Hutchinson KJ, Linderman JK, Basso DMJJon. Skeletal muscle adaptations following spinal cord contusion injury in rat and the relationship to locomotor function: a time course study. 2001;18(10):1075-89.
83. Huey KA, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VRJM, Medicine NOJotAAoE. Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. 2001;24(4):517-26.
84. Jayaraman A, Liu M, Ye F, Walter GA, Vandenborne K. Regenerative responses in slow-and fast-twitch muscles following moderate contusion spinal cord injury and locomotor training. *European journal of applied physiology*. 2013;113(1):191-200.
85. Stevens JE, Liu M, Bose P, O'Steen WA, Thompson FJ, Anderson DK, et al. Changes in soleus muscle function and fiber morphology with one week of locomotor training in spinal cord contusion injured rats. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(11):1671-81.
86. Bloor CMJA. Angiogenesis during exercise and training. 2005;8(3):263-71.
87. Wagenmakers AJ, Strauss JA, Shepherd SO, Keske MA, Cocks M. Increased muscle blood supply and transendothelial nutrient and insulin transport induced by food intake and exercise: effect of obesity and ageing. *The Journal of physiology*. 2016;594(8):2207-22.
88. Sinescu C, Popa F, Grigorean VT, Onose G, Sandu A, Popescu M, et al. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. *Journal of medicine and life*. 2010;3(3):254.
89. Li Y, Lucas-Osma AM, Black S, Bandet MV, Stephens MJ, Vavrek R, et al. Pericytes impair capillary blood flow and motor function after chronic spinal cord injury. *Nature medicine*. 2017;23(6):733.

90. Shevtsova NA, Marchenko V, Bezdudnaya T. Modulation of Respiratory System by Limb Muscle Afferents in Intact and Injured Spinal Cord. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13.
91. Michel-Flutot P, Mansart A, Deramaudt TB, Jesus I, Lee KZ, Bonay M, et al. Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2020;284:103568.
92. Goshgarian HG. Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *Journal of applied physiology*. 2003;94(2):795-810.
93. Minor KH, Akison LK, Goshgarian HG, Seeds NW. Spinal cord injury-induced plasticity in the mouse—the crossed phrenic phenomenon. *Experimental neurology*. 2006;200(2):486-95.
94. Vinit S, Boulenguez P, Efthimiadi L, Stamegna J-C, Gauthier P, Kastner A. Axotomized bulbospinal neurons express c-Jun after cervical spinal cord injury. *Neuroreport*. 2005;16(14):1535-9.
95. Darlot F, Cayetanot F, Gauthier P, Matarazzo V, Kastner A. Extensive respiratory plasticity after cervical spinal cord injury in rats: axonal sprouting and rerouting of ventrolateral bulbospinal pathways. *Experimental neurology*. 2012;236(1):88-102.
96. Lane MA, Lee K-Z, Fuller DD, Reier PJ. Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2009;169(2):123-32.
97. Kissane RW, Egginton SJCOiP. Exercise-mediated angiogenesis. 2019;10:193-201.
98. Olfert IM, Baum O, Hellsten Y, Egginton S. Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*. 2016;310(3):H326-H36.
99. Waters RE, Rotevatn S, Li P, Annex BH, Yan Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;287(5):C1342-C8.
100. Egginton S. Physiological factors influencing capillary growth. *Acta physiologica*. 2011;202(3):225-39.
101. Wüst RC, Gibbings SL, Degens H. Fiber capillary supply related to fiber size and oxidative capacity in human and rat skeletal muscle. *Oxygen Transport to Tissue XXX: Springer*; 2009. p. 75-80.
102. Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J. Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature*. 2011;475(7355):196-200.
103. Keomani E, Deramaudt TB, Petitjean M, Bonay M, Lofaso F, Vinit S. A murine model of cervical spinal cord injury to study post-lesional respiratory neuroplasticity. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2014(87):e51235.
104. Lee K-Z, Dougherty BJ, Sandhu MS, Lane MA, Reier PJ, Fuller DD. Phrenic motoneuron discharge patterns following chronic cervical spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2013;249:20-32.
105. Reinhardt D, Stehlik K, Satkunendrarajah K, Kroner AJEN. Bilateral cervical contusion spinal cord injury: A mouse model to evaluate sensorimotor function. 2020:113381.
106. Anderson KD, Gunawan A, Steward O. Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Experimental neurology*. 2005;194(1):161-74.
107. Weishaupt N, Vavrek R, Fouad K. Training following unilateral cervical spinal cord injury in rats affects the contralesional forelimb. *Neuroscience letters*. 2013;539:77-81.
108. Anderson KD, Sharp KG, Hofstadter M, Irvine K-A, Murray M, Steward O. Forelimb locomotor assessment scale (FLAS): novel assessment of forelimb dysfunction after cervical spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2009;220(1):23-33.
109. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.
110. Singh A, Krisa L, Frederick KL, Sandrow-Feinberg H, Balasubramanian S, Stackhouse SK, et al. Forelimb locomotor rating scale for behavioral assessment of recovery after unilateral cervical spinal cord injury in rats. *Journal of neuroscience methods*. 2014;226:124-31.
111. Harvey LA. Physiotherapy rehabilitation for people with spinal cord injuries. *Journal of physiotherapy*. 2016;62(1):4-11.

112. Torres-Espín A, Beaudry E, Fenrich K, Fouad K. Rehabilitative training in animal models of spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2018;35(16):1970-85.
113. Wenger N, Moraud EM, Gandar J, Musienko P, Capogrosso M, Baud L, et al. Spatiotemporal neuromodulation therapies engaging muscle synergies improve motor control after spinal cord injury. *Nature medicine*. 2016;22(2):138.
114. Martinez M, Delivet-Mongrain H, Rossignol S. Treadmill training promotes spinal changes leading to locomotor recovery after partial spinal cord injury in cats. *Journal of neurophysiology*. 2013;109(12):2909-22.
115. Shah PK, Garcia-Alias G, Choe J, Gad P, Gerasimenko Y, Tillakaratne N, et al. Use of quadrupedal step training to re-engage spinal interneuronal networks and improve locomotor function after spinal cord injury. *Brain*. 2013;136(11):3362-77.
116. de Jesus I, Herrera NA, Andreo JC, Santos CF, Amaral SL. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins. *Steroids*. 2020:108573.
117. Grant S, McMillan K, Newell J, Wood L, Keatley S, Simpson D, et al. Reproducibility of the blood lactate threshold, 4 mmol·l<sup>-1</sup> marker, heart rate and ratings of perceived exertion during incremental treadmill exercise in humans. *European journal of applied physiology*. 2002;87(2):159-66.
118. Mead W. Maximal exercise testing--Bruce protocol. *The Journal of family practice*. 1979;9(3):479-90.
119. Persegol L, Palisses R, Viala D. Characterization of hindlimb muscle afferents involved in ventilatory effects observed in decerebrate and spinal preparations. *Experimental brain research*. 1993;92(3):495-501.
120. Baird L, Dinkova-Kostova ATJAot. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. 2011;85(4):241-72.
121. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;88:108-46.
122. Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al. Antioxidant and adaptative response mediated by Nrf2 during physical exercise. *Antioxidants*. 2019;8(6):196.
123. Pajares M, Jiménez-Moreno N, Dias IHK, Debelec B, Vucetic M, Fladmark KE, et al. Redox control of protein degradation. *Redox biology*. 2015;6:409-20.
124. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature communications*. 2016;7:11624.
125. Wei M, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SN. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *Annals of internal medicine*. 2000;132(8):605-11.
126. Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda JJPO. Cytoprotective role of Nrf2 in electrical pulse stimulated C2C12 myotube. 2015;10(12):e0144835.
127. Merry TL, Ristow MJTJop. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. 2016;594(18):5195-207.
128. Wang P, Li CG, Qi Z, Cui D, Ding S. Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. *Experimental physiology*. 2016;101(3):410-20.
129. Done AJ, Traustadóttir TJRb. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. 2016;10:191-9.
130. Done AJ, Newell MJ, Traustadóttir TJFrr. Effect of exercise intensity on Nrf2 signalling in young men. 2017;51(6):646-55.
131. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. 2012;7(9):e45697.

132. Shenvi SV, Smith E, Hagen TMJAc. Identification of age-specific Nrf2 binding to a novel antioxidant response element locus in the Glc promoter: a compensatory means for the loss of glutathione synthetic capacity in the aging rat liver? 2012;11(2):297-304.
133. Perry CG, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LLITJop. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. 2010;588(23):4795-810.
134. Kumar R, Negi P, Singh B, Ilavazhagan G, Bhargava K, Sethy NKJJoE. Cordyceps sinensis promotes exercise endurance capacity of rats by activating skeletal muscle metabolic regulators. 2011;136(1):260-6.
135. Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, Gounder SS, Davidson CJ, Boeheme C, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. 2012;52(2):366-76.
136. Aguiar AS, Duzzioni M, Remor AP, Tristao FSM, Matheus FC, Raisman-Vozari R, et al. Moderate-intensity physical exercise protects against experimental 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism through Nrf2-antioxidant response element pathway. 2016;41(1-2):64-72.
137. George L, Lokhandwala MF, Asghar MJAJop-RP. Exercise activates redox-sensitive transcription factors and restores renal D1 receptor function in old rats. 2009;297(5):F1174-F80.
138. Safdar A, deBeer J, Tarnopolsky MAJFRB, Medicine. Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old. 2010;49(10):1487-93.
139. Zhao J, Moore AN, Clifton GL, Dash PKJJonr. Sulforaphane enhances aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury. 2005;82(4):499-506.
140. Shih AY, Li P, Murphy THJJoN. A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. 2005;25(44):10321-35.
141. Mao L, Wang H-D, Wang X-L, Tian L, Xu J-YJJoT, Surgery AC. Disruption of Nrf2 exacerbated the damage after spinal cord injury in mice. 2012;72(1):189-98.
142. Pomeschchik Y, Kidin I, Savchenko E, Rolova T, Yamamoto M, Levenon A-L, et al. Does Nrf2 gene transfer facilitate recovery after contusion spinal cord injury? : Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2014.
143. Samarghandian S, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Khan H, Forouzanfar F, Aramjoo H, et al. A pivotal role of the nrf2 signaling pathway in spinal cord injury: A prospective therapeutics study. 2020;19(3):207-19.
144. Zhou Z, Liu C, Chen S, Zhao H, Zhou K, Wang W, et al. Activation of the Nrf2/ARE signaling pathway by probucol contributes to inhibiting inflammation and neuronal apoptosis after spinal cord injury. 2017;8(32):52078.
145. Mao L, Wang H, Wang X, Liao H, Zhao XJJoSR. Transcription factor Nrf2 protects the spinal cord from inflammation produced by spinal cord injury. 2011;170(1):e105-e15.
146. Vinit S, Gauthier P, Stamegna J-C, Kastner AJJon. High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. 2006;23(7):1137-46.
147. Marques A, Santos T, Martins J, Matos MGD, Valeiro MGJEjoss. The association between physical activity and chronic diseases in European adults. 2018;18(1):140-9.
148. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. Nutrition. 1996;12(4):274-7.
149. Kunnumakkara AB, Sailo BL, Banik K, Harsha C, Prasad S, Gupta SC, et al. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? Journal of translational medicine. 2018;16(1):14.
150. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current biology. 2014;24(10):R453-R62.
151. Blomstrand E, Rådegran G, Saltin B. Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. The Journal of Physiology. 1997;501(Pt 2):455.
152. Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. Asian journal of sports medicine. 2015;6(1).
153. Piao YJ, Seo YH, Hong F, Kim JH, Kim Y-J, Kang MH, et al. Nox 2 stimulates muscle differentiation via NF- $\kappa$ B/iNOS pathway. Free Radical Biology and Medicine. 2005;38(8):989-1001.

154. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 2008;88(4):1243-76.
155. Adams GR, Zaldivar FP, Nance DM, Kodesh E, Radom-Aizik S, Cooper DM. Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(4):658-66.
156. Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the regulation of immune functions. *Progress in molecular biology and translational science*. 135: Elsevier; 2015. p. 355-80.
157. Turner JE, Spielmann G, Wadley AJ, Aldred S, Simpson RJ, Campbell JP. Exercise-induced B cell mobilisation: preliminary evidence for an influx of immature cells into the bloodstream. *Physiology & behavior*. 2016;164:376-82.
158. Nieman DC, Henson DA, Austin MD, Brown VA. Immune response to a 30-minute walk. *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37(1):57-62.
159. Ferrandi PJ, Fico BG, Whitehurst M, Zourdos MC, Bao F, Dodge KM, et al. Acute high-intensity interval exercise induces comparable levels of circulating cell-free DNA and Interleukin-6 in obese and normal-weight individuals. *Life sciences*. 2018;202:161-6.
160. Viana JL, Kosmadakis GC, Watson EL, Bevington A, Feehally J, Bishop NC, et al. Evidence for anti-inflammatory effects of exercise in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(9):2121-30.
161. Mackinnon LT. Changes in some cellular immune parameters following exercise training. *Medicine and science in sports and exercise*. 1986;18(5):596-7.
162. Peake JM, Neubauer O, Walsh NP, Simpson RJ. Recovery of the immune system after exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2017;122(5):1077-87.
163. Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *Journal of applied physiology*. 1997.
164. Campbell JP, Turner JE. Debunking the myth of exercise-induced immune suppression: redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. *Frontiers in immunology*. 2018;9:648.
165. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop N, et al. Position statement part one: immune function and exercise. 2011.
166. Hotamisligil GSJL. Foundations of immunometabolism and implications for metabolic health and disease. 2017;47(3):406-20.
167. HEATH G, FORD E, CRAVEN T, MACERA C, JACKSON K, PATE RJM, et al. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. 1991;23(2):152-7.
168. Peters EJSAMJ. Ultramarathon running and upper respiratory tract infections-an epidemiological survey. 1983;64(16):582-4.
169. Gleeson M, Bishop N, Oliveira M, Tauler PJSjom, sports si. Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production. 2013;23(4):451-7.
170. Estruel-Amades S, Camps-Bossacoma M, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Castell MJSR. Alterations in the innate immune system due to exhausting exercise in intensively trained rats. 2020;10(1):1-12.
171. Ruiz-Iglesias P, Estruel-Amades S, Camps-Bossacoma M, Massot-Cladera M, Franch À, Pérez-Cano FJ, et al. Influence of Hesperidin on Systemic Immunity of Rats Following an Intensive Training and Exhausting Exercise. 2020;12(5):1291.
172. Ali M, Bonay M, Vanhee V, Vinit S, Deramaudt TBJPo. Comparative effectiveness of 4 natural and chemical activators of Nrf2 on inflammation, oxidative stress, macrophage polarization, and bactericidal activity in an in vitro macrophage infection model. 2020;15(6):e0234484.
173. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VGJComr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. 2015;28(3):603-61.
174. Kirkland EB, Adams BBJotAAoD. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and athletes. 2008;59(3):494-502.
175. Maurice Bilung L, Tahar AS, Kira R, Mohd Rozali AA, Apun KJJoe, health p. High occurrence of Staphylococcus aureus isolated from fitness equipment from selected gymnasiums. 2018;2018.

176. Deramaudt TB, Ali M, Vinit S, Bonay MJJomm. Sulforaphane reduces intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages through inhibition of JNK and p38 MAPK-induced inflammation. 2020;45(6):1927-41.
177. Murphy EA, Davis JM, Carmichael MD, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP. Exercise stress increases susceptibility to influenza infection. *Brain Behav Immun*. 2008;22(8):1152-5.
178. Behringer M, Montag J, Franz A, McCourt ML, Mester J, Nosaka KJMH. Exhaustive exercise—A near death experience for skeletal muscle cells? 2014;83(6):758-65.
179. Owens DJ, Twist C, Copley JN, Howatson G, Close GLJEJoSS. Exercise-induced muscle damage: What is it, what causes it and what are the nutritional solutions? 2019;19(1):71-85.
180. Yang W, Hu PJoot. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. 2018;13:25-32.
181. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BKJJoP-E, *Metabolism*. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. 2003;285(2):E433-E7.
182. Pedersen BK, Fischer CPJCOiCN, Care M. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. 2007;10(3):265-71.
183. Pedersen B. IL-6 signalling in exercise and disease. Portland Press Ltd.; 2007.
184. Cunha F, Poole S, Lorenzetti B, Ferreira SJBjop. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. 1992;107(3):660.
185. Neto JCR, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita AS, Batista ML, et al. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. 2009;106(5):697.
186. Malm CJSM. Exercise immunology. 2004;34(9):555-66.
187. Liao P, He Q, Zhou X, Ma K, Wen J, Chen H, et al. Repetitive Bouts of Exhaustive Exercise Induces a Systemic Inflammatory Response and Multi-Organ Damage in Rats. 2020;11:685.

## **21 TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES**

# **Effets prometteurs de l'exercice physique sur le système cardiovasculaire, métabolique et immunitaire pendant l'épidémie de COVID-19**

## **Effets prometteurs de l'exercice physique sur le système cardiovasculaire, métabolique et immunitaire pendant l'épidémie de COVID-19**

Publication : Journal of Human Hypertension, 2020, p. 1-3.

Avec 4 milliards de personnes en confinement dans le monde, l'épidémie de COVID-19 peut entraîner une sédentarité excessive, en particulier dans la population de sujets vulnérables et handicapés. Le but de ce manuscrit était d'aborder les effets bénéfiques cardiovasculaires et immunitaires des interventions d'exercice dans les maladies chroniques, notamment le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle.



## Promising effects of exercise on the cardiovascular, metabolic and immune system during COVID-19 period

Isley Jesus<sup>1</sup> · Valentin Vanhee<sup>1</sup> · Therese B. Deramautd<sup>1</sup> · Marcel Bonay<sup>1,2</sup>

Received: 2 June 2020 / Revised: 25 August 2020 / Accepted: 9 September 2020  
© The Author(s) 2020. This article is published with open access

With 4 billion people in lockdown in the world, COVID-19 outbreak may result in excessive sedentary time, especially in the population of vulnerable and disabled subjects. In many chronic disorders and diseases including type 2 diabetes mellitus and hypertension, cardiovascular and immune beneficial effects of exercise interventions should be reminded.

Direct metabolic and endocrine link between type 2 diabetes mellitus (T2DM), hypertension, and coronavirus SARS-CoV-2 disease (COVID-19) was recently reported [1]. It is also important to note that with 4 billion people in lockdown in the world, COVID-19 outbreak may result in excessive sedentary time, especially in the population of vulnerable and disabled subjects. Indeed, this population is very dependent on the caregivers in charge of their rehabilitation, since the trip to the patients' homes may be made more difficult during the outbreak. In many chronic disorders and diseases including T2DM and hypertension, cardiovascular, metabolic and immune, beneficial effects of exercise interventions have been reported [2, 3]. The intensity, volume, and mode of exercise may exert different activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, of the autonomous nervous system and of the resulting immunoregulatory hormones that influence immune response. Exercise interventions may affect susceptibility to infection, as they were shown to modify monocytes and lymphocytes distribution, phenotype and cytokine production.

As observed in many other chronic disorders and diseases including atherosclerosis and cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, obesity, and insulin resistance, T2DM is characterized by systemic inflammation and oxidative stress [4]. Animal models have shown

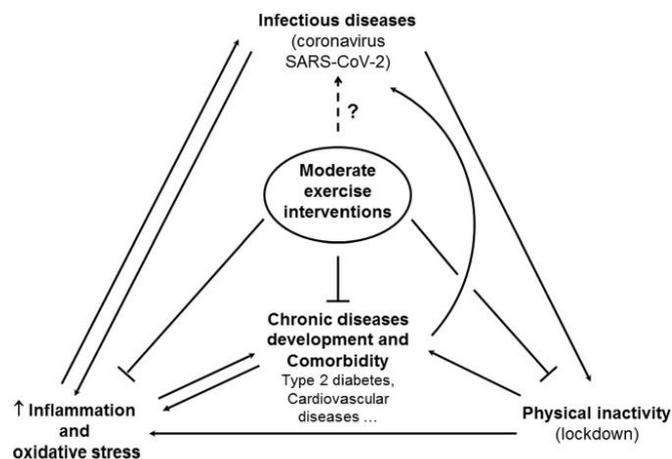
that inflammatory cytokines expressed in adipose tissue were involved in obesity-linked insulin resistance. Recently, macrophages were defined as key cells of innate immunity able to regulate metabolic homeostasis and inflammation [5]. They express different anti or pro-inflammatory phenotypes modulating inflammation in metabolic tissues involved in glycemic homeostasis like adipose tissue, liver, pancreas and skeletal muscle. Recently, growing evidences suggest the role of immune system in hypertension and the contribution of immune cells, cytokines, and innate and adaptive immunity in experimental models of hypertension [6]. Angiotensin II, a key hormone of the renin-angiotensin system, is involved in the link between metabolic and immune response in hypertension through the activation of immune cells [7]. Although inflammation plays a central role in the development of T2DM or atherosclerosis and hypertension, anti-inflammatory molecules are not recommended in current therapeutic strategies. Potential candidates targeting tissue-specific inflammation, and minimizing the risks of systemic complications and/or comorbidities, are lacking.

Moderate exercise is known to exert beneficial health effects in patients with chronic disorders and diseases [2, 3]. A Randomized Controlled Trial was conducted to test whether an intensive lifestyle intervention (including 5–6 weekly aerobic training sessions with 30–60 min duration, of which 2 to 3 sessions were combined with resistance training) results in equivalent glycemic control compared with standard care in participants with T2DM [8]. In this 1-year follow-up study, 73.5% of patient in lifestyle group and 26.4% in the standard care group presented a reduction in glucose-lowering drugs. Moreover, 56.3% of the participants in the lifestyle group have discontinued glucose lowering medication, suggesting that exercise may be an efficient treatment.

✉ Marcel Bonay  
marcel.bonay@aphp.fr

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM END-ICAP, 78000 Versailles, France

<sup>2</sup> Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Boulogne, France



**Fig. 1** Schematic diagram representing known and hypothetical links between moderate exercise interventions and infectious diseases including COVID-19, inflammation, oxidative stress, and chronic diseases. Inflammation and oxidative stress are increased by viral infection, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, and physical inactivity enacted by lockdown. Increased inflammation and oxidative stress may contribute to the susceptibility of both chronic

disease like type 2 diabetes mellitus and infectious diseases. Inflammation may be the link between chronic diseases development and comorbidity and increased susceptibility to coronavirus. Moderate exercise interventions stimulate anti-inflammatory and antioxidant response, and prevent many chronic diseases development and comorbidity.

Interleukin-6 produced by skeletal muscle during exercise might improve glucose and lipid metabolism and exert direct anti-inflammatory effects by an inhibition of tumor necrosis factor alpha and by stimulating interleukin-1 receptor antagonist in patients with cardiometabolic diseases [9]. In animal models, exercise was assessed to counteract deleterious cardiovascular effects of anti-inflammatory molecules like dexamethasone (i.e., capillary density decrease in skeletal muscles and arterial blood pressure increase). Jesus et al. [10] showed that 8 weeks aerobic exercise training in rats prevented dexamethasone-induced hypertension and microvascular rarefaction by increasing antioxidant enzymes and improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins.

Acute and chronic effects of exercise on immune response have been extensively studied in athletes [2]. When done in excess, heavy exercise is associated with increased risk of illness, attributed to immune dysfunction. Increased inflammatory biomarkers and increased risk of upper respiratory tract infections were observed after acute bouts of intense and prolonged exercise in athletes. During the post-race period, the increased susceptibility was correlated to suppressed salivary immunoglobulin A output, decreased natural killer cell activity and reduced T- and B-cell function. At the opposite, moderate acute and chronic exercise-induced immune changes have been involved in the beneficial effects of physical activity to prevent cancer

and cardiovascular diseases development [2, 3, 9]. Immune cells in anti-inflammatory responses are linked to mitochondrial fatty acid oxidation [11]. Recently, improvement of fatty acid oxidation-dependent respiration was reported in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers with a sedentary lifestyle during low-intensity exercise [12]. Further studies are needed to assess the potential anti-inflammatory effects of low-intensity exercise in patients with cardiometabolic diseases. Concerning global health beneficial effects of low volume leisure-time physical activity, a large observational study showed that 15 min/day for 6 days a week of low-volume activity reduced all-cause mortality by 14%, cancer mortality by 10%, and mortality from cardiovascular disease by 20%, compared to individuals in the inactive group [13].

In animal models of viral respiratory infection, chronic exercise reduced illness severity, viral load and resulted in greater anti-inflammatory effects than acute exercise during influenza infection. Interestingly, epidemiologic data suggest that moderate exercise decreases mortality and incidence rate for influenza infection [14, 15]. Viral respiratory infections, including coronaviruses, induce severe inflammation, which is partially triggered by reactive oxygen species production and dysfunction of the host's antioxidant defense [16]. Interestingly, exercise interventions may stimulate antioxidant response, particularly via the Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transcription factor

that have been involved in antimicrobial defense and cardiovascular risk in metabolic diseases [17, 18].

In this context, chronic moderate and adapted exercise may be doubly beneficial in T2DM and cardiovascular diseases for preventing inflammation and viral respiratory infection, including coronavirus infection (Fig. 1). High incidence rates of overweight and obese patients are observed in COVID-19 intensive care units and many data suggest that pre-existing comorbidities including hypertension, diabetes, and cardiovascular disease increase severity and mortality rate of COVID-19. Whether exercise training programs, as secondary preventive interventions after healing, would confer immune protection to patients with cardiovascular and metabolic disease compared to sedentary controls, would deserve further investigations. The location of the exercise training programs, indoors or outdoors, should also be assessed.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

### References

- Bomstein SR, Dalan R, Hopkins D, Mingrone G, Boehm BO. Endocrine and metabolic link to coronavirus infection. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16:297–8.
- Nieman DC, Wentz LM. The compelling link between physical activity and the body's defense system. *J Sport Health Sci.* 2019; 8:201–17.
- Sharman JE, Smart NA, Coombes JS, Stowasser M. Exercise and sport science australia position stand update on exercise and hypertension. *J Hum Hypertens.* 2019;33:837–43.
- Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Boczkowski J, Bonay M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol Med.* 2011;17:363–71.
- Orliaguet L, Dalmas E, Drareni K, Venteclaf N, Alzaid F. Mechanisms of macrophage polarization in insulin signaling and sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:62.
- Rodriguez-Turbe B, Pons H, Johnson RJ. Role of the immune system in hypertension. *Physiol Rev.* 2017;97:1127–64.
- Piqueras L, Sanz MJ. Angiotensin II and leukocyte trafficking: new insights for an old vascular mediator. Role of redox-signaling pathways. *Free Radic Biol Med.* 2020;157:38–54.
- Johansen MY, MacDonald CS, Hansen KB, Karstoft K, Christensen R, Pedersen M, et al. Effect of an intensive lifestyle intervention on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2017;318:637–46.
- Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest.* 2017;47:600–11.
- Jesus I, Herrera NA, Andreo JC, Santos CF, Amaral SL. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins. *Steroids.* 2020;156:108573.
- Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2015;42:406–17.
- Liepinsh E, Makarova E, Plakane L, Konrade I, Liepins K, Videja M, et al. Low-intensity exercise stimulates bioenergetics and increases fat oxidation in mitochondria of blood mononuclear cells from sedentary adults. *Physiol Rep.* 2020;8:e14489.
- Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, et al. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet.* 2011;378:1244–53.
- Wu S, Ma C, Yang Z, Yang P, Chu Y, Zhang H, et al. Hygiene behaviors associated with influenza-like illness among adults in Beijing, China: a large, population-based survey. *PLoS ONE.* 2016;11:e0148448.
- Wong CM, Lai HK, Ou CQ, Ho SY, Chan KP, Thach TQ, et al. Is exercise protective against influenza-associated mortality? *PLoS ONE.* 2008;3:e21108.
- Khomich OA, Kochetkov SN, Bartosch B, Ivanov AV. Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses.* 2018;10:392.
- Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al. Antioxidant and adaptative response mediated by Nrf2 during physical exercise. *Antioxid (Basel).* 2019;8:196.
- Bonay M, Deramaut TB. Nrf2: new insight in cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1897.

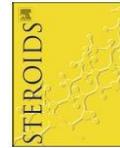
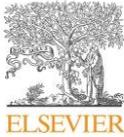
**L'entraînement contrecarre la raréfaction  
microvasculaire induite par la dexaméthasone en  
améliorant l'équilibre entre les protéines apoptotiques  
et angiogéniques chez le rat**

## **L'entraînement contrecarre la raréfaction microvasculaire induite par la dexaméthasone en améliorant l'équilibre entre les protéines apoptotiques et angiogéniques chez le rat**

Publication : Steroids, 2020, vol. 156, p. 108573.

Ce travail a permis d'étudier les mécanismes induits par l'entraînement physique qui peuvent contribuer à atténuer la raréfaction microvasculaire et l'hypertension induite par dexaméthasone, un glucocorticoïde non stéroïdien. Des rats Wistar ont subi un protocole d'entraînement ou ont été maintenus sédentaires pendant 8 semaines. La dexaméthasone a été administrée au cours des 14 jours suivants et hémodynamique les paramètres ont été enregistrés à la fin. La densité capillaire et rapport capillaire / fibre ont été obtenus dans le muscle soléaire. En outre, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), l'endothélial vasculaire récepteur du facteur de croissance-2 (VEGFR-2), synthase de l'oxyde nitrique endothélial (eNOS), lymphome à cellules B 2 (Bcl-2), Bcl-2- comme la protéine 4 (Bax), les niveaux de protéine clivée p-BAX et caspase-3 ont été analysés.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le traitement chronique ce glucocorticoïde a augmenté de manière significative la pression artérielle, ce résultat a été associée à une réduction du rapport de la vascularisation du muscle squelettique. La réduction de la densité des vaisseaux était accompagnée à une diminution de l'expression protéique de VEGF, du VEGFR-2, du Bcl-2, du rapport entre les protéines Bcl-2 / Bax et p-Bax / Bax, ainsi qu'avec une augmentation de la production protéique de la caspase-3 clivée. Pourtant, l'ensemble de ces résultats ont démontré que le protocole de préconditionnement physique a empêché la perte de microvaisseaux en atténuant tous les changements de protéines induit par DEX. En outre, les protéines angiogéniques et apoptotiques étaient significativement corrélées avec la densité de capillaires, qui, dans son tour, a été associée à la pression artérielle. Par conséquent, nous pouvons souligner que le preconditionnement physique à partir de l'entraînement physique est une bonne stratégie pour atténuer la raréfaction microvasculaire induite par dexaméthasone dans le muscle soléaire et cette réponse implique un meilleur équilibre entre les protéines apoptotiques et angiogéniques, ce qui peut contribuer à l'atténuation de l'hypertension.



## Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins

Isley Jesus<sup>b,1</sup>, Naiara A. Herrera<sup>b</sup>, Jesus C. Andreo<sup>c</sup>, Carlos F. Santos<sup>c</sup>, Sandra L. Amaral<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physical Education – São Paulo State University (UNESP), Science Faculty, Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01 – Vargem Limpa, Bauru, SP, Brazil

<sup>b</sup> Joint Graduate Program in Physiological Sciences, PIPGCF UFSCar/UNESP, Rodovia Washington Luiz, km 235 Monjolinho, 676, São Carlos, SP, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Alameda Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Bauru, SP 17012-901, Brazil



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Angiogenesis  
 Apoptosis  
 Blood pressure  
 Exercise training  
 Steroid hormone  
 Skeletal muscle

### ABSTRACT

This work investigated the mechanisms induced by exercise training that may contribute to attenuate dexamethasone (DEX)-induced microvascular rarefaction and hypertension. Wistar rats underwent training protocol or were kept sedentary for 8 weeks. Dexamethasone was administered during the following 14-days and hemodynamic parameters were recorded at the end. Capillary density (CD) and capillary-to-fiber ratio (C:F ratio) were obtained in soleus muscle (SOL). Also, vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-like protein 4 (Bax), p-BAX and caspase-3 cleaved protein levels were analyzed. DEX treatment significantly increased blood pressure (+14%), which was associated with reduced C:F ratio (-41.0%) and CD (-43.1%). Reduction of vessel density was associated with decreased VEGF (-15.6%), VEGFR-2 (-14.6%), Bcl-2 (-18.4%), Bcl-2/Bax ratio (-29.0%) and p-Bax/Bax (-25.4%), and also with increased caspase-3 cleaved protein level (25%). Training, on the other hand, prevented microvessels loss by mitigating all proteins changes induced by DEX. In addition, angiogenic and apoptotic proteins were significantly correlated with CD, which, in turn, was associated with blood pressure. Therefore, we may point out that exercise training is a good strategy to attenuate DEX-induced microvascular rarefaction in soleus muscle and this response involves a better balance between apoptotic and angiogenic proteins, which may contribute for the attenuation of hypertension.

### 1. Introduction

Dexamethasone (DEX) is widely used in clinical medicine due to its anti-inflammatory and antiallergic properties, but its chronic use may cause hypertension (H), which may be associated with cardiac autonomic unbalance, baroreflex alterations and skeletal muscle microvessel loss [1–3]. There is a strong evidence that DEX prefers to act on muscles containing mainly type IIb fast-twitch fibers comparing with type I slow-twitch fibers [4] mainly because type IIb has more glucocorticoid receptors than type I [5]. Because of this preference, our group and others [6–11] have shown that DEX promotes muscle atrophy mainly in tibialis anterior (TA), plantaris and extensor digitorum longus (EDL) muscles (fast-twitch fibers), but not in soleus muscle (slow-twitch). Recently, we have shown that DEX induces microvessels loss in TA [12] and in soleus (SOL) muscles [1], however, the mechanisms involved in DEX-induced microvascular rarefaction in

oxidative muscles (soleus) are still unclear.

The maintenance of vessels density is dependent on a tight balance between antiapoptotic proteins, like B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bcl-x2) and apoptotic proteins, like Bcl-2 interacting domain death agonist (Bid), Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak), Bcl-2-associated death promoter (Bad), Bcl-2-like protein 4 (Bax) and a novel Bcl-2 homology 3 (BH3) containing protein (Bim). It has been shown that Bcl-2 and Bcl-x2 proteins protect the mitochondria by avoiding cytochrome c release, whereas, Bid, Bak, Bad, Bax and Bim are capable to increase mitochondria permeability and release cytochrome c, which activates the caspases cascade and culminates in apoptosis [13–16]. On the other hand, vascular endothelial growth factor (VEGF) is known to be a key-regulator protein of the physiological angiogenesis [17,18] and, in addition, it has been suggested to be a survival factor because it helps to maintain the balance between antiapoptotic and apoptotic proteins [19].

\* Corresponding author at: Department of Physical Education, Science Faculty, UNESP – São Paulo State University, Bauru, SP, Brazil.  
 E-mail address: [amaral.cardoso@unesp.br](mailto:amaral.cardoso@unesp.br) (S.L. Amaral).

<sup>1</sup> Permanent address: Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, INSERM U1179, UFR SSSV, Montigny-le-Bretonneux, France.

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108573>

Received 30 September 2019; Received in revised form 17 December 2019; Accepted 27 December 2019

Available online 02 January 2020

0039-128X/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Recently we demonstrated that DEX determines loss of microvessels in tibialis anterior muscle, which possess about 95% fast-twitch (types IIA and IIB) fibres and only 4% to 5% slow-twitch (type I) fibers, due to a VEGF decrease and an antiapoptotic and apoptotic factors unbalance [12], however, the mechanism involved in DEX-induced microvascular rarefaction in soleus, which is a slow-twitch (type I) muscle, is not totally understood. Specially, the role of VEGF receptors, nitric oxide enzyme and caspase-3 cleaved, known to be the executioner of apoptosis, have not been evaluated.

Exercise training (T) has been considered as a non-pharmacological treatment of hypertension [20] and its role may be associated with reorganization of vascular disorders, like arterioles wall-to-lumen changes and angiogenesis [1,21–23]. Training effects in preventing microvascular rarefaction and/or stimulating angiogenesis have been demonstrated in spontaneously hypertensive rats (SHR) [21,23–26] and in rats treated with DEX [1,12]. This training-induced effect has been associated with VEGF increase and a better balance between apoptotic/antiapoptotic proteins [1,12,23,25]. However, little is known about molecular signaling involved in T-induced prevention of microvessel loss in soleus muscle after chronic DEX treatment.

Therefore, the aim of this work was to investigate the mechanisms induced by T that can contribute to attenuate DEX-induced microvascular rarefaction in SOL muscle and hypertension. The hypothesis was that T would increase VEGF and its receptor and induce a better balance between anti-apoptotic and apoptotic proteins, thus contributing to maintain microcirculation in SOL skeletal muscle, which could help to attenuate hypertension.

## 2. Experimental

### 2.1. Animals and pharmacological treatment

Forty male Wistar rats (250–300 g) were obtained from the Center for Research and Production Facilities of UNESP (Botucatu, SP, Brazil) and housed in collective cages (5 each) at the Animal Facility Maintenance from the Faculty of Science, UNESP, Bauru, SP, Brazil. All rats received water and food (Biobase, Águas Frias, SC, Brazil) *ad libitum* and were maintained in dark-light cycle (12 h-12 h) with controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C). All methods used were approved by the Committee for Ethical use of Animals (CEUA) at the São Paulo State University (UNESP; approved protocol #1452/2014). In order to design a preventive experimental protocol, DEX or saline were administered during 14 days following 8 weeks of an exercise program. Half of the group received DEX treatment (50 µg/kg, *s.c.*) and the other half (control animals) received saline (same volume as DEX) and during the same 14 days.

### 2.2. Maximal physical capacity

All rats were adapted for 10 days on a treadmill (5–15 m/min, 5 min each day) and exposed to a maximal physical capacity test (Tmax), following a published protocol [27]. In summary, all rats performed a test on a treadmill with increments of 5 m/min every 3 min, 0% grade until the animal stopped running spontaneously. After 4 weeks, another Tmax was applied in order to adjust the velocity of the treadmill to maintain the training intensity throughout the exercise protocol. After 8 weeks of training (end of the protocol), all animals performed another maximal test, just to evaluate the effect of training on maximal capacity. All sedentary animals performed a Tmax at the same time as trained groups. Maximal test was not performed after DEX treatment because our group has already demonstrated that DEX does not affect maximal capacity of the rats on a treadmill or on a vertical ladder [8,9,11].

### 2.3. Groups

After Tmax, rats were distributed into 4 experimental groups: 1/ sedentary control (SC): sedentary during 8 weeks that received saline injections during the following 14 days; 2/sedentary DEX (SD): sedentary during 8 weeks that received DEX injections during the following 14 days; 3/trained control (TC): 8 weeks of aerobic exercise training that received daily saline injections during the following 14 days; and 4/trained DEX (TD): 8 weeks of aerobic exercise training that received daily DEX injections during the following 14 days. All trained animals maintained their training routine during saline or DEX treatment. Body weight (BW) was measured weekly during training protocol and on a daily basis during DEX treatment period.

### 2.4. Exercise training protocol

Exercise training program was applied during 8 weeks and consisted of running on a treadmill at 60% of maximum physical capacity reached at the Tmax, 0% grade, as already published [27]. Sedentary rats were kept sedentary during all protocol and adapted to the treadmill every 15 days.

### 2.5. Morphometric measurements

After the hemodynamic measurements, all rats were euthanized by an overload of anesthesia (ketamine 160 mg/kg and xylazine 20 mg/kg, Ceva Sante Animale, Paulínea, SP, Brazil). Soleus (SOL) muscle of the rat's right leg was removed, cleaned and immediately surrounded by neutral talc, covered with Tissue Tech (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and dipped into nitrogen liquid. After freezing, muscle samples were stored in a freezer at  $-80$  °C for further processing. Adrenal glands were also removed and weighed to evaluate DEX treatment efficacy.

All frozen material was placed in a cryostat ( $-20$  °C) (Leica® type CM 1850 Nussloch, Germany) and transverse cuts of 5–10 µm were performed. Thereafter, all slices were stained with hematoxylin-eosin (HE) and observed using a light microscope. Analyses of capillary density (CD) and capillary-to-fibers ratio (C:F ratio) were performed as previously published [1]. All analyses were made from four sections for each animal, using 6–8 microscope fields measuring 137,280 µm<sup>2</sup> each, chosen from different areas of the transverse sections. To quantitate vessels, all images were digitized using a DP Controller program (Olympus micro DP70/DP30 BW ver. 02.01 2.0; Tokyo, Japan) with Olympus BX50 microscope and an objective of 20x or 40x. To determine C:F ratio, the average of four to six pictures were analyzed off-line by Image.pro Plus 6.2 program. CD was determined as the number of capillaries identified/mm<sup>2</sup>, while C:F ratio was obtained by the ratio between capillaries and fiber numbers.

### 2.6. Western blotting procedures

Soleus muscle of the rat's left leg was homogenized in RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) containing 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM EDTA, cocktail phosphatase inhibitor (0.1%, Sigma Aldrich) and 1% Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The homogenized sample was centrifuged for 10 min at 4 °C with 10,000 rpm. The supernatant was transferred to microcentrifuge tubes and stored in a freezer at  $-20$  °C. Protein concentrations were verified by Bradford method (Bio-Rad KIT, Protein Assay Standard II, Hercules, CA, USA) with albumin as standard. The absorbance values were analyzed by a micro plate reader (BMG Labtech, Spectro Star Nano, Ortenberg, Germany). Analysis of the proteins was performed using western blot procedure as published [8]. Polyacrylamide gel system was used to electrophoretically separate the proteins by size, as previously published. In summary, 50 µg of protein were separated in a 12% polyacrylamide gel with buffer (190 mM

glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS pH 8.3) for 50 min, at 200 V. These gels were transferred to a nitrocellulose membrane in a buffer (190 mM glycine, 25 mM Tris, 20% methanol, pH 8.3), during 2 h at 120 V. Membranes were stained with Ponceau for verification of the protein bands and washed in Tris-buffered saline (TBS-T, 50 mM Tris and 750 mM NaCl; pH 5.8, with 1% of Tween 20). Membranes were incubated with blocking solution (albumin bovine, BSA, 3% in TBS-T) for 2 min. The SNAP i.d.\* 2.0 Protein Detection system (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) was used to incubate the membranes during 10 min with diluted primary antibody: Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) (Rabbit monoclonal, 1:1,000 in 3% BSA, Cell Signaling Tech, MA, USA), VEGF (Mouse monoclonal, 1:1,000 in 3% BSA, BD Pharmingen, CA, USA), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Mouse monoclonal, 1:1,000 in 3% BSA, BD Pharmingen, CA, USA), Bcl-2 (Rabbit polyclonal, 1:500 in 3% BSA, Cell Signaling Tech, MA, USA), Bax (Rabbit polyclonal, 1:500 in 3% BSA, Cell Signaling Tech, MA, USA), p-Bax (Rabbit polyclonal, 1:1,000 in 3% BSA, Byorbyt, Cambridge, UK), caspase-3 cleaved (Rabbit polyclonal, 1:1,000 in 3% BSA, Cell Signaling Tech, MA, USA) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (anti-GAPDH, 1:1,000 in 3% BSA, R & D Systems, MN, USA). Then, they were washed 3x10 min with TBS-T, incubated for 10 min with the respective secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, accordingly, in 1% BSA). In a sequence, antibody was detected through a chemiluminescence reaction (Super Signal Pico, Pierce, IL, USA) and the blots were visualized on X-ray film. The bands were analyzed by a computer program (Scion Image, Corporation, Beta 4.02, Houston, TX, USA).

## 2.7. Hemodynamic measurements

On the last day of DEX treatment, rats were anesthetized with ketamine 80 mg/kg and xylazine 7 mg/kg (Ceva Sante Animale, Paulínea, SP, Brazil) and a polyethylene catheter was inserted into the carotid artery for arterial pressure (AP) recording. After 24 h, AP and heart rate (HR) were recorded during 30 min using a pressure transducer (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, USA) connected to the catheter that sent the signal to an amplifier (Quad Bridge Amp, AD Instruments, NSW, Australia) and then to an acquisition board (PowerLab 4/35, AD Instruments, NSW, Australia). During the recording period, animals were kept in individual cages in a quiet room. Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP) and mean arterial pressure (MAP) were recorded.

## 2.8. Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Two way analysis of variance (ANOVA) was used, considering training as one factor and treatment as the other factor. Student's *t* test was used for comparisons between two groups (maximal physical capacity). When interactions were found, Tukey post-hoc was adopted. Pearson correlation test was used to associate protein level and CD and also for CD and MAP. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Body weight

At the beginning of the protocol, all rats presented similar body weight (BW) ( $265.0 \pm 21.1$ ;  $252.6 \pm 30.1$ ;  $255.6 \pm 22.1$ ;  $256.3 \pm 11.9$  g, for SC, SD, TC, TD, respectively). The increment of BW throughout 8 weeks of training was similar between groups and, at the end of this period, BW was higher than before ( $441.4 \pm 50.7$ ;  $401.0 \pm 45.1$ ;  $403.6 \pm 47.5$  and  $374.3 \pm 27.0$  g for SC, SD, TC and TD, respectively). However, after 14 days of DEX treatment, BW of SD group was 12% lower than SC and TD was 13% lower than TC ( $p < 0.05$ ). Adrenal gland weight of treated rats was 38% lower than

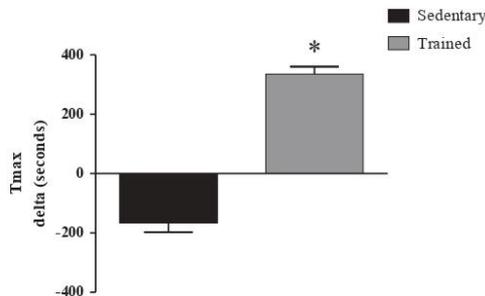


Fig. 1. Maximal physical capacity expressed as running time (s) on a treadmill in sedentary ( $n = 20$ ) and trained ( $n = 20$ ) groups. Significance: + vs sedentary,  $p < 0.05$ .

control rats, confirming DEX efficacy.

### 3.2. Maximal physical capacity

Training was effective to increase 49.3% the physical capacity of rats, while sedentary animals presented a small decrease ( $-23.8\%$ ). As shown in Fig. 1, the effect of training, evaluated as delta of seconds on a treadmill (final T<sub>max</sub> vs initial T<sub>max</sub>), was higher in trained animals compared with sedentary ( $p < 0.05$ ). We have previously shown that DEX treatment does not affect maximal physical capacity of the rats [8,9,11].

### 3.3. Morphometric analysis

Quantitative analyses of transversal sections of SOL muscle are illustrated in Fig. 2. As shown, chronic treatment with DEX significantly reduced C:F ratio (Fig. 2A) and CD (Fig. 2B) in SD group ( $-41.0\%$  vs  $-43.1\%$ , for SD vs SC,  $p < 0.05$ ). Training was able to significantly increase C:F ratio and CD (43.2% and 45.0%, for C:F ratio and CD, respectively, compared with SC,  $p < 0.05$ ) and also to prevent reduction in C:F ratio and CD (72.7% and 81.0%, for C:F ratio and CD respectively, comparing TD vs SD  $p < 0.05$ ).

### 3.4. Western blotting analysis

In order to investigate the effects of 14 days of DEX treatment after 8 weeks of training on proteins involved in VEGF signaling and apoptosis, a quantitative densitometry was performed: VEGFR-2, VEGF, eNOS, Bcl-2, Bax, Bcl-2/Bax, p-Bax/Bax and caspase-3 cleaved protein levels in SOL muscle. Fig. 3 shows that DEX treatment significantly decreased VEGFR-2 ( $-14.6\%$ , Fig. 3A), VEGF ( $-15.6\%$ , Fig. 3B), Bcl-2 ( $-18.4\%$ , Fig. 3D), Bcl-2/Bax ratio ( $-29.0\%$ , Fig. 3F) and p-Bax/Bax ( $-25.4\%$ , Fig. 3G) compared with SC ( $p < 0.05$ ). However, eNOS (Fig. 3C) and Bax (Fig. 3E) protein levels were not significantly changed by DEX treatment ( $p > 0.05$ ). On the other hand, caspase-3 cleaved protein level (Fig. 3H) was significantly increased in SD group (25.0%,  $p < 0.05$ ) compared with SC. However, training was able to significantly increase VEGFR-2 (14.7%), VEGF (15.3%), Bcl-2 (21.6%), Bcl-2/Bax ratio (26.1%) as well as p-Bax/Bax (23.7%) and prevented the increase in caspase-3 cleaved (16.0%) when TD was compared with SD ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. Hemodynamics parameters

As demonstrated in Table 1, chronic treatment with DEX significantly increased SAP, DAP and MAP in SD, compared with SC group. On the other hand, 8 weeks of training was effective in attenuating the

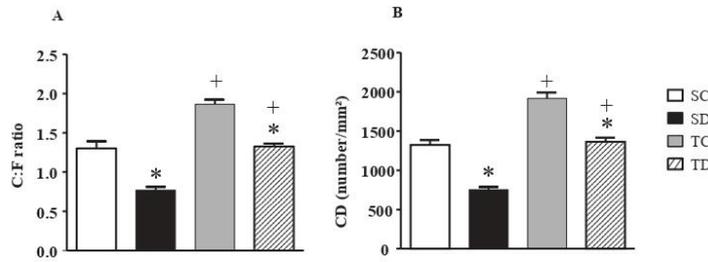


Fig. 2. Capillary-to-fiber ratio (A) and capillary density (B) in all analyzed groups: sedentary control (SC) (n = 7), sedentary treated with DEX (SD) (n = 9), trained control (TC) (n = 9) and trained and treated with DEX (TD) (n = 8). Significance: \* vs control and + vs sedentary, p < 0.05.

increase of SAP, when TD was compared with SD. Also, TD group presented lower DAP and MAP when compared with SD. Despite this attenuation, SAP values were not normalized when compared with trained control animals, as shown in Table 1. Values of HR were not affected neither by DEX nor exercise training (p = 0.06, SC vs SD).

In order to associate proteins related to apoptosis and angiogenesis with microvessel density, Pearson correlations were performed and demonstrated in Fig. 4. As shown, both Bcl-2/Bax and p-Bax/Bax were positively associated with capillary density (r = 0.406 and 0.441, respectively, P < 0.05), whereas caspase-3 cleaved was negatively associated with CD (r = 0.444, P < 0.01). Additionally, VEGF and VEGFR-2 were positively associated with CD (r = 0.487 and 0.500, respectively, P < 0.01) and finally, capillary density was also associated with MAP (r = 0.475, p < 0.01).

4. Discussion

The major result of the present study is that physical pre-conditioning counteracts with DEX-induced imbalance of apoptotic and angiogenic proteins in soleus muscle, which contributes to maintain

Table 1

Hemodynamic parameters in all groups analyzed.

	SAP	DAP	MAP	HR
SC	123.8 ± 2.5	107.3 ± 2.3	112.8 ± 2.0	371.6 ± 10.8
SD	140.0 ± 2.5*	121.6 ± 2.7*	127.7 ± 2.4*	386.0 ± 8.7
TC	122.8 ± 3.0	103.0 ± 5.7	109.6 ± 4.7	373.2 ± 12.6
TD	131.9 ± 2.3*+	106.4 ± 3.4+	114.9 ± 2.8+	383.6 ± 10.8

Systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). Significance: \* vs control and + vs sedentary, p < 0.05.

microcirculation and this response may help to mitigate hypertension.

In the present study, we investigated some of the mechanisms induced by DEX that could alter skeletal muscle microcirculation and if previous exercise training would be an important strategy to attenuate this response. Indeed, we hypothesized that changes in microcirculation, induced by training, would help to ameliorate DEX-induced hypertension. It is already known that DEX reduces capillary density and increase blood pressure [1,28] and, in fact, it has been clinically used in

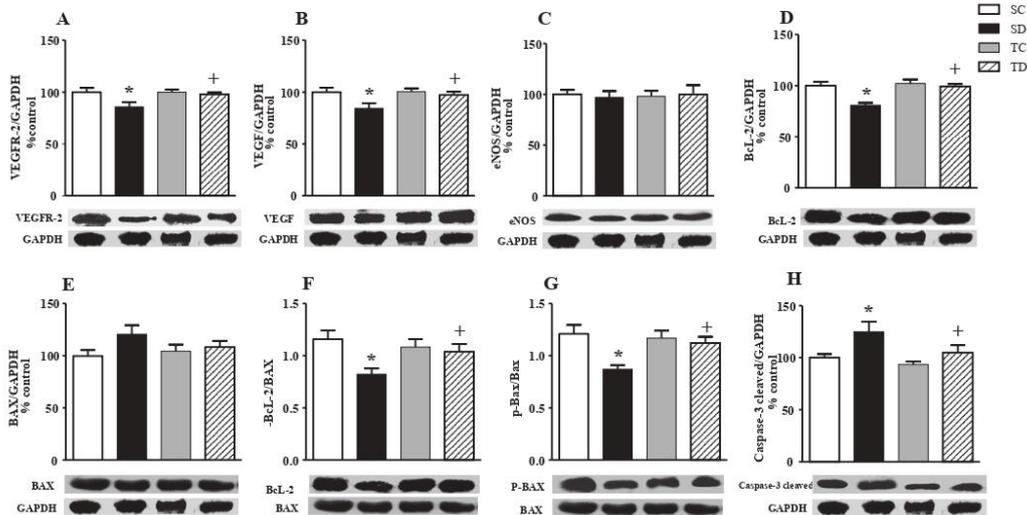


Fig. 3. Representative gel and quantitative densitometry of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2, A) (n = 8–9), vascular endothelial growth factor (VEGF, B), endothelial nitric oxide synthase (eNOS, C) (n = 8–9), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2, D) (n = 10), Bcl-2-like protein 4 (Bax, E) (n = 10), Bcl-2/Bax ratio (F) (n = 10), p-Bax/Bax (G) (n = 10) and caspase-3 cleaved (H) (n = 10) in SOL muscle. Fifty µg of protein were loaded. Sedentary control (SC), sedentary treated with DEX (SD), trained control (TC) and trained treated with DEX (TD). Values are expressed as % of control. Significance: \* vs control and + vs sedentary, p < 0.05.

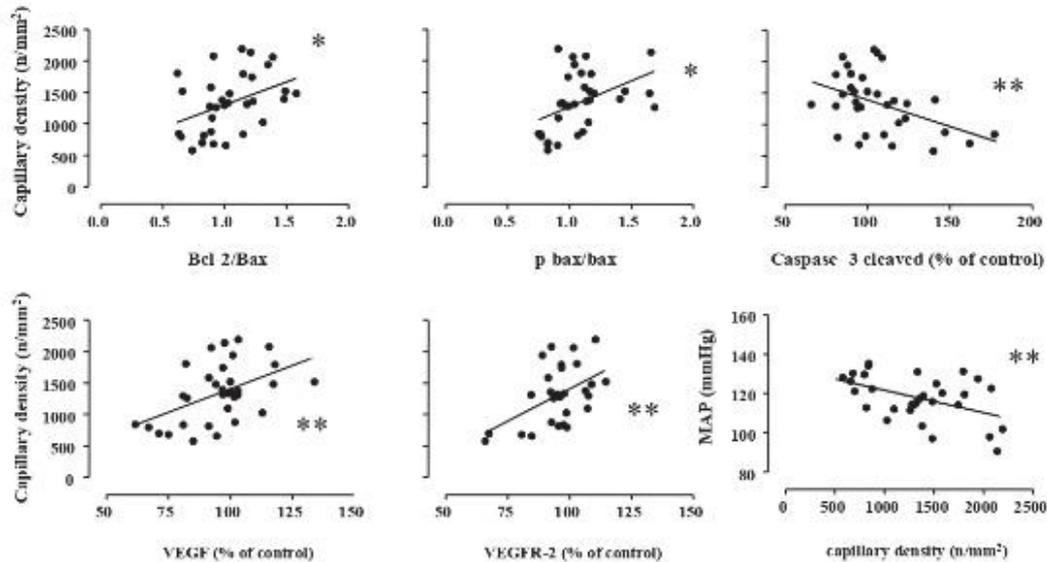


Fig. 4. Pearson correlation between: Bcl-2/Bax and CD ( $r = 0.406$ ); p-Bax/Bax and CD ( $r = 0.4414$ ); caspase-3 cleaved and CD ( $r = 0.444$ ); VEGF and CD ( $r = 0.487$ ); VEGFR-2 receptor and CD ( $r = 0.500$ ), as well as CD and MAP ( $r = 0.475$ ) in all groups analyzed: sedentary control (SC), sedentary treated with DEX (SD), trained control (TC) and trained and treated with DEX (TD). Significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

therapies for the management of pathological angiogenesis, like tumors, atherosclerosis, and eye diseases (corneal neovascularization) [29]. Although important in pathological situations, reduction of vessel density is an unwanted side effect of DEX regular treatment and the mechanisms responsible for this finding are not completely understood. It is widely recognized that maintenance of muscle function, size, resistance and strength is necessary for quality of life and the role that skeletal muscle microcirculation plays in muscle health is growing. Reductions of skeletal muscle capillary density below normal values may compromise oxygen uptake, nutrients distribution and metabolites elimination and, therefore all muscle health is compromised, consequently the quality of life.

Besides most of the studies are performed *in vitro* or *in vivo*, dexamethasone may reduce vessel density by altering some components of the intrinsic or extrinsic apoptosis pathways or both [1,14,30]. Normally, there is a tight balance between anti-apoptotic factors and caspases (the executors of apoptosis). It has been shown that VEGF induces Bcl-2 expression via the VEGFR2, PI3K/Akt signaling pathway and Bcl-2 has the ability to inhibit the activation of other proapoptotic protein like Bax. Accordingly, the results of the present study showed that chronic treatment with DEX promoted an imbalance among anti-apoptotic and apoptotic proteins, as shown by decreases in VEGF, VEGFR2, Bcl-2, Bcl-2/Bax. It was observed that, although Bax, an apoptotic protein, was not significantly altered after DEX-treatment ( $p > 0.05$ ), Bcl-2 protein level, an anti-apoptotic protein, decreased after DEX treatment; therefore, Bcl-2/Bax ratio was significantly reduced in sedentary treated rats when compared with sedentary non treated rats. It has been shown that increases of Bax induce release of cytochrome C from the mitochondrial outer membrane, which facilitates the oligomerization of apaf-1 and caspase-9 in the apoptosome, thus resulting in activation of caspase-9 [16]. Caspase-9 cleaves and activates some effectors such as caspase 3 and 7, resulting in proteolysis and cell death [16]. We evaluated caspase-3 mainly because it has been shown that it has a pivotal role on microvascular rarefaction.

On the other hand, VEGF plays an important role in exercise-

induced angiogenesis [21,23,31]. This present study did not show any further increase in VEGF of control animals after exercise training, which was not a surprise, since it has been demonstrated that VEGF is important to trigger angiogenesis, but once capillary density is enough, the level of VEGF protein comes back to normal [25]. This result is in agreement with previous publications. It has been demonstrated that VEGF is important in the initial phase of exercise adaptation, but, when significant angiogenesis has occurred due to training, the need and importance of this mechanism become significantly reduced [32]. However, it is important to note that exercise training in DEX-treated rats completely blocked the decrease of VEGF protein level and its receptor. Since VEGF has been considered a survival factor (as already mentioned in this discussion), we believe that the protection of VEGF protein level, induced by exercise training, had an important role in preventing microvascular rarefaction in DEX-treated and trained rats. The association between angiogenic proteins and capillaries was demonstrated by the positive Pearson correlation between these proteins and capillary density.

Finally, it is well-known that aerobic exercise training is efficient to control arterial pressure in hypertensive individuals [21,23,33], but the mechanisms underlying the blood pressure-lowering effect in rats treated with DEX are not completely understood. There is some evidence related to endothelial abnormalities and superoxide production [34–37]. Recently, our group has suggested that 8 weeks of previous exercise training attenuated DEX-induced hypertension and the mechanisms may involve a better autonomic balance to the heart associated with improvements in skeletal muscle microcirculation (prevented microvascular rarefaction) [1]. This present work confirmed this benefit of exercise training in attenuating hypertension and microvascular rarefaction. Even though arterial pressure is mainly maintained by alterations in arterioles structure, such as wall-to-lumen ratio and vessel wall [21,24,38,39], which was not observed after DEX treatment [1], prevention of microvascular rarefaction found in this present study may be another possible mechanism that could be contributing to mitigate arterial pressure after DEX treatment. This

information is relevant since microvascular rarefaction is present in several patients with hypertension [40,41]. In addition, some miRNA related to capillary microvascular rarefaction, such as mi-126, mi-16 and mi-21 have been considered as target for pharmacological and non-pharmacological hypertension treatment, such as exercise training [42,43]. Also, it has been suggested that the elevated % of apoptotic cell death in microvessel endothelium could be a possible mechanism for structural microvascular rarefaction and glucocorticoid-induced hypertension [28]. In the present work, we showed a significant correlation between CD and arterial pressure, in agreement with a previous study in SHR [24], indicating an association between these two variables and therefore suggesting that capillaries may have, at least, some role in helping to control arterial pressure.

In conclusion, the results of the present study may suggest that previous exercise training would be a good strategy to keep a better balance between apoptotic and angiogenic proteins, which contributes for the maintenance of the skeletal muscle microcirculation and health and, therefore, may be valuable for the attenuation of DEX-induced hypertension.

#### Acknowledgments

This study was supported by São Paulo Research Foundation, FAPESP, Brazil (# 2014/23229-6 grant to SLA). IJ was a recipient of a scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES, Brazil. NAH was a recipient of a scholarship from São Paulo Research Foundation, FAPESP, Brazil (# 2014/18177-7) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES, Brazil. We gratefully acknowledge Dr. André Luis Shinohara, from the Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, for providing the use of the equipment to perform part of the analysis presented in this study, and also the graduate student Mizaél Pereira for all his help on the morphometric analysis.

#### References

- N.A. Herrera, I. Jesus, A.L. Shinohara, T.J. Dionísio, C.F. Santos, S.L. Amaral, Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation, *J. Hypertens.* (2016).
- P.B. Constantino, T.J. Dionísio, F. Duchatsch, N.A. Herrera, J.O. Duarte, C.F. Santos, C.C. Crestani, S.L. Amaral, Exercise attenuates dexamethasone-induced hypertension through an improvement of baroreflex activity independently of the renin-angiotensin system, *Steroids* 128 (2017) 147–154.
- F. Duchatsch, P.B. Constantino, N.A. Herrera, M.F. Fabricio, L.P. Tardelli, A.M. Martuscelli, T.J. Dionísio, C.F. Santos, S.L. Amaral, Short-term exposure to dexamethasone promotes autonomic imbalance to the heart before hypertension, *J. Am. Soc. Hypertens.* (2018).
- M.T. Falduto, S.M. Czerwinski, R.C. Hickson, Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers, *J. Appl. Physiol.* 69 (3) (1985) 1058–1062 1990.
- N. Shimizu, N. Yoshikawa, N. Ito, T. Maruyama, Y. Suzuki, S. Takeda, J. Nakae, Y. Tagata, S. Nishitani, K. Takehana, M. Sano, K. Fukuda, M. Suematsu, C. Morimoto, H. Tanaka, Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle, *Cell Metab.* 13 (2) (2011) 170–182.
- M. Barel, O.A. Perez, V.A. Giozzet, A. Rafacho, J.R. Bosqueiro, S.L. do Amaral, Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment, *Eur. J. Appl. Physiol.* 108 (5) (2010) 999–1007.
- H. Nicastro, N.E. Zanchi, C.R. da Luz, W.M. de Moraes, P. Ramona, M.A. de Siqueira Filho, D.F. Chaves, A. Medeiros, P.C. Brum, D. Dardevet, A.H. Lancha, et al., Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats, *Nutrition* 28 (4) (2012) 465–471.
- A.G. Macedo, A.L. Krug, N.A. Herrera, A.S. Zago, J.W. Rush, S.L. Amaral, Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 357–364.
- T.J. Dionísio, J.C. Louzada, B.A. Viscelli, E.J. Dionísio, A.M. Martuscelli, M. Barel, O.A. Perez, J.R. Bosqueiro, D.T. Brozski, C.F. Santos, S.L. Amaral, Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance, *Horm. Metab. Res.* 46 (7) (2014) 484–489.
- A.G. Macedo, A.L. Krug, L.M. Souza, A.M. Martuscelli, P.B. Constantino, A.S. Zago, J.W. Rush, C.F. Santos, S.L. Amaral, Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone, *Steroids* 107 (2016) 30–36.
- A.L. Krug, A.G. Macedo, A.S. Zago, J.W. Rush, C.F. Santos, S.L. Amaral, High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy, *Muscle Nerve* (2015).
- N.A. Herrera, I. Jesus, E.J. Dionísio, T.J. Dionísio, C.F. Santos, S.L. Amaral, Exercise training prevents dexamethasone-induced rarefaction, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 70 (3) (2017) 194–201.
- B.J. Padanilam, Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284 (4) (2003) F608–F627.
- M.C. Marchetti, B. Di Marco, G. Cifone, G. Migliorati, C. Riccardi, Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation, *Blood* 101 (2) (2003) 585–593.
- L. Prenek, F. Boldizar, R. Kugyelka, E. Ugor, G. Berta, P. Nemeth, T. Berki, The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bel-2 family proteins in developing T cells, *Apoptosis* 22 (2) (2017) 239–253.
- A.B. Sanz, B. Santamaria, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, A. Ortiz, Mechanisms of renal apoptosis in health and disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (9) (2008) 1634–1642.
- N. Ferrara, H.P. Gerber, J. Lecouter, The biology of VEGF and its receptors, *Nat. Med.* 9 (6) (2003) 669–676.
- H. Roy, S. Bhardwaj, S. Yla-Herttuala, Biology of vascular endothelial growth factors, *FEBS Lett.* 580 (12) (2006) 2879–2887.
- H.P. Gerber, V. Dixit, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bel-2 and A1 in vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 273 (21) (1998) 13313–13316.
- G. Mancía, R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redon, A. Zanchetti, M. Bohm, T. Christiaens, R. Gifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galdieri, D.E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S.E. Kjeldsen, S. Laurent, A.J. Manolis, P.M. Nilsson, L.M. Ruilope, R.E. Schmieder, P.A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, F. Zannad, 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC), *J. Hypertens.* 31 (7) (2013) 1281–1357.
- S.L. Amaral, L.C. Michelini, Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44 (9) (2011) 814–826.
- R. Coimbra, L.S. Sanchez, J.M. Potenza, L.V. Rossoni, S.L. Amaral, L.C. Michelini, Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 52 (3) (2008) 514–521.
- T. Fernandes, F.C. Magalhães, F.R. Roque, M.I. Phillips, E.M. Oliveira, Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126, *Hypertension* 59 (2) (2012) 513–520.
- S.L. Amaral, T.M. Zorn, L.C. Michelini, Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.* 18 (11) (2000) 1563–1572.
- S.L. Amaral, L.S. Sanchez, A.J. Chang, L.V. Rossoni, L.C. Michelini, Time course of training-induced microcirculatory changes and of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41 (5) (2008) 424–431.
- B. Hoier, Y. Hellsten, Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF, *Microcirculation* 21 (4) (2014) 301–314.
- G.J. Silva, P.C. Brum, C.E. Negrao, E.M. Krieger, Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* 30 (3 Pt 2) (1997) 714–719.
- C.J. Vogt, G.W. Schmid-Schonbein, Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat, *Microcirculation* 8 (2) (2001) 129–139.
- P. Mirabelli, B.B. Peebo, M. Xeroudaki, M. Koulikovska, N. Lagali, Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model, *Exp. Eye Res.* 125 (2014) 118–127.
- T. Braun, W. Meng, H. Shang, S. Li, D.M. Sloboda, L. Ehrlich, K. Lange, H. Xu, W. Henrich, J.W. Dudenhausen, A. Plagemann, J.P. Newnham, J.R. Challis, Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep, *Reprod. Sci.* 22 (1) (2015) 47–59.
- S. Amaral, N. P. Silveira, T. Zorn, L. Michelini, Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats, 2001.
- R.S. Richardson, H. Wagner, S.R. Mudaliar, E. Saucedo, R. Henry, P.D. Wagner, Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (2) (2000) H772–H778.
- M.C. Laterza, L.D. de Matos, I.C. Trombetta, A.M. Braga, F. Roveda, M.J. Alves, E.M. Krieger, C.E. Negrao, M.U. Rondon, Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients, *Hypertension* 49 (6) (2007) 1298–1306.
- C.K. Mondo, W.S. Yang, N. Zhang, T.G. Huang, Anti-oxidant effects of atorvastatin in dexamethasone-induced hypertension in the rat, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33 (11) (2006) 1029–1034.
- S.L. Ong, J.A. Whitworth, How do glucocorticoids cause hypertension: role of nitric oxide deficiency, oxidative stress, and eicosanoids, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 40 (2) (2011) 393–407 ix.
- R.D. Roghair, F.J. Miller Jr., T.D. Scholz, F.S. Lamb, J.L. Segar, Coronary constriction to angiotensin II is enhanced by endothelial superoxide production in sheep programmed by dexamethasone, *Pediatr. Res.* 63 (4) (2008) 370–374.
- S.C. Schafer, T. Wallerath, E.I. Closs, C. Schmidt, P.M. Schwarz, U. Forstermann, H.A. Lehr, Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (1) (2005)

- H436–H444.
- [38] R.M. Melo, E. Martinho Jr., L.C. Michelini, Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles, *Hypertension* 42 (4) (2003) 851–857.
- [39] M.J. Mulvany, Small artery remodeling and significance in the development of hypertension, *News Physiol. Sci.* 17 (2002) 105–109.
- [40] M. Gueugneau, C. Coudy-Gandilhon, B. Meunier, L. Combaret, D. Taillandier, C. Polge, D. Attaix, F. Roche, L. Feasson, J.C. Barthelemy, D. Bechet, Lower skeletal muscle capillarization in hypertensive elderly men, *Exp. Gerontol.* 76 (2016) 80–88.
- [41] A. Triantafyllou, P. Anyfanti, A. Pyrpasopoulou, G. Triantafyllou, S. Aslanidis, S. Douma, Capillary rarefaction as an index for the microvascular assessment of hypertensive patients, *Curr. Hypertens. Rep.* 17 (5) (2015) 33.
- [42] L. Shi, J. Liao, B. Liu, F. Zeng, L. Zhang, Mechanisms and therapeutic potential of microRNAs in hypertension, *Drug Discov. Today* 20 (10) (2015) 1188–1204.
- [43] V.J. Neves, T. Fernandes, F.R. Roque, U.P. Soci, S.F. Melo, E.M. de Oliveira, Exercise training in hypertension: role of microRNAs, *World J. Cardiol.* 6 (8) (2014) 713–727.

## **22 ANNEXE**

### **22.1 Activités complémentaires**

#### **Formations :**

- Formation réglementaire de base en chirurgie chez le rongeur de laboratoire (22h), SOCIETE VETSALIUS
- Formation expérimentation animale éthique et bien-être, formation de concepteurs de projets scientifiques utilisant des animaux (57h), SORBONNE UNIVERSITE;
- Du doctorant au Maître de Conférences (Université Paris-Sud – 12 h)
- Bases de la Rédaction de la thèse (Université Paris-Sud - 12 h)
- Statistiques, Analyse de données (Université Paris-Sud - 18 h)
- Détection et Gestion de la Fatigue en Entraînement Sportif (Université Paris-Sud – 12 h)
- Ethique de la Recherche' (Université Paris-Sud – 12)
- Recherche documentaire et gestion informatisée des références bibliographiques (Université Paris-Sud – 12 h)

#### **Conférences :**

- Moderate training on forced exercise wheel following C2 SCI: Locomotor and respiratory effects in mice. Conference: International Research Spinal Trust, London, UK septembre 2019 (présentation poster).
- Mise au point d'un modèle d'entraînement physique chez la souris blessée médullaire. 3ème Congrès de la SPBI, Montpellier juin 2019 (présentation orale)

## 22.2 Publication

## Highlights

### **Highlights**

- No spontaneous recovery of diaphragm activity observed in eupneic C2 injured mice
- Mild asphyxia increases diaphragm activity (injured side) after 7d post-injury (P.I.)
- Diaphragmatic EMG shows an increase in inter-burst signal from 1d P.I. to 7d P.I.
- This inter-burst signal resumes when the crossed phrenic phenomenon is activated

**Abstract**

High spinal cord injuries (SCI) lead to permanent respiratory insufficiency, and the search for new therapeutics to restore this function is essential. To date, the most documented preclinical model for high SCI is the rat cervical C2 hemisection. However, molecular studies with this SCI model are limited due to the poor availability of genetically modified specimens. The aim of this work was to evaluate the pathophysiology of respiratory activity following a cervical C2 injury at different times post-injury in a C57BL/6 mouse model. No significant spontaneous recovery of diaphragmatic activity was observed up to 30 days post-injury in eupneic condition. However, during a respiratory challenge, i.e. mild asphyxia, a partial restoration of the injured diaphragm was observed at 7 days post-injury, corresponding to the crossed phrenic phenomenon. Interestingly, the diaphragmatic recording between 2 respiratory bursts on the injured side showed an amplitude increase between 1 to 7 days post-injury, reflecting a change in phrenic motoneuronal excitability. This increase in inter-burst excitability returned to pre-injured values when the crossed phrenic phenomenon started to be effective at 7 days post-injury. Taken together, these results demonstrate the ability of the mouse respiratory system to express long-lasting plasticity following a C2 cervical hemisection and genetically modified animals can be used to study the pathophysiological effects on these plasticity phenomena.

**Title: Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury**

**Authors and Affiliations:**

Pauline Michel-Flutot<sup>1</sup>, Arnaud Mansart<sup>2</sup>, Therese B. Deramaudt<sup>1</sup>, Isley De Jesus<sup>1</sup>, Kun-Ze Lee<sup>3</sup>, Marcel Bonay<sup>1,#</sup>, Stéphane Vinit<sup>1,#,\*</sup>.

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000 Versailles, France

<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et Inflammation (2I), 78000 Versailles, France

<sup>3</sup> Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan

# These authors have contributed equally to the study

\* Corresponding author:

Stéphane Vinit, PhD, HDR

Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000 Versailles, France

E-mail: [stephane.vinit@uvsq.fr](mailto:stephane.vinit@uvsq.fr)

Phone: +33170429427

## **Abstract**

High spinal cord injuries (SCI) lead to permanent respiratory insufficiency, and the search for new therapeutics to restore this function is essential. To date, the most documented preclinical model for high SCI is the rat cervical C2 hemisection. However, molecular studies with this SCI model are limited due to the poor availability of genetically modified specimens. The aim of this work was to evaluate the pathophysiology of respiratory activity following a cervical C2 injury at different times post-injury in a C57BL/6 mouse model. No significant spontaneous recovery of diaphragmatic activity was observed up to 30 days post-injury in eupneic condition. However, during a respiratory challenge, i.e. mild asphyxia, a partial restoration of the injured diaphragm was observed at 7 days post-injury, corresponding to the crossed phrenic phenomenon. Interestingly, the diaphragmatic recording between 2 respiratory bursts on the injured side showed an amplitude increase between 1 to 7 days post-injury, reflecting a change in phrenic motoneuronal excitability. This increase in inter-burst excitability returned to pre-injured values when the crossed phrenic phenomenon started to be effective at 7 days post-injury. Taken together, these results demonstrate the ability of the mouse respiratory system to express long-lasting plasticity following a C2 cervical hemisection and genetically modified animals can be used to study the pathophysiological effects on these plasticity phenomena.

## **Keywords**

Mice; C2 spinal cord injury; Diaphragm EMG; Phrenic motoneuron

## **1. INTRODUCTION**

High cervical spinal cord injuries (SCI) lead to neuromotor deficits, including respiratory insufficiency (Winslow and Rozovsky, 2003). For patients living with these deficits, mechanical ventilation is necessary for survival, and only a few of them may be weaned off ventilatory assistance. The development of new treatments aiming to ameliorate the living conditions of these patients is critical. A good preclinical model of respiratory insufficiency is *de facto* required to discover innovative efficient therapeutics that could be translated into clinics.

To date, the most studied pre-clinical model for evaluating putative therapeutics aimed to enhance respiratory function consists in doing a spinal cord injury at the cervical segment C2 in the rat. This model is the most documented in the field, especially the C2 hemisection (C2HS) model (Alilain et al., 2011; Golder et al., 2001; Goshgarian, 2003; Keomani et al., 2014; Lane et al., 2009; Lee et al., 2014; Nantwi et al., 1999; Porter, 1895; Vinit et al., 2006) or the C2 compression model (Nicaise et al., 2012; Wen et al., 2019; Wu M., 2019).

This highly reproducible model has demonstrated its usefulness in the study of several molecular pathways such as the respiratory motor plasticity by following daily acute intermittent hypoxia, which is mediated by modification in Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) expression (Lovett-Barr et al., 2012) or mTor/PTEN interaction (Gutierrez et al., 2013). Furthermore, the comprehension of a particular neuro-anatomical reorganization named the “crossed phrenic phenomenon” (CPP) (Goshgarian, 2003) following a cervical C2 injury still remains under investigation.

The descending respiratory pathways originate from the rostral ventral respiratory group located in the rostro-ventral medulla (Feldman et al., 2013). It connects bilaterally and monosynaptically to the phrenic motoneurons pool located between C3-C6 spinal segments of the spinal cord in several species, such as human (Gandevia and Rothwell, 1987), cat

(Feldman et al., 1985; Lipski et al., 1986), rat (Alexandrov et al., 2007) and more recently mouse (Vandeweerd et al., 2018). It also connects indirectly phrenic motoneurons via phrenic interneurons (Lane, 2011; Lane et al., 2008; Satkunendrarajah et al., 2018). The phrenic motoneurons project their axons through the phrenic nerves that innervate bilaterally the diaphragm, the main inspiratory muscle.

A unilateral C2HS induces a disruption of the bulbospinal tract from one side of the brainstem to the phrenic motoneurons innervating the diaphragm, leading to hemi-diaphragm paralysis. The contralateral side of the C2 hemi-injury remains intact, allowing the survival and recovery of the animal. In this model, a limited spontaneous recovery of the diaphragm activity can be observed over time post-injury. This recovery is sustained by the CPP, which consists in the activation of normally silent pathways crossing the spinal cord midline at the C3-C6 segmental level and connect to the ipsilateral deafferented phrenic motoneurons (Fuller et al., 2008; Vinit and Kastner, 2009). Strengthening the CPP pathways and providing new intraspinal connections to the deafferented motoneurons could be the substrate for developing new therapeutics in order to further improve the respiratory function following high SCI.

The rat model currently prevails for studying the effects of high cervical SCI because of its similarity to the human respiratory organization (Kastner and Gauthier, 2008). However, investigating the mechanistic approaches is limited in this model due to the poor availability of genetically modified specimens. Interestingly, the mouse model, with an extensive number of genetically modified strains can be used to decipher the molecular and cellular interactions. Mice are widely used in the study of the respiratory network (Cui et al., 2016; Wu et al., 2017; Zanella et al., 2014; Zholudeva et al., 2017) or several respiratory pathologies such as Pompe disease (ElMallah et al., 2015) or Duchenne muscular dystrophy inducing diaphragm weakness (Burns et al., 2019). However, few studies used the mouse model of cervical injury to study

post-traumatic spontaneous recovery and molecular pathophysiology (Mantilla et al., 2014; Minor et al., 2006; Nicaise et al., 2012; Satkunendrarajah et al., 2018). This emerging model needs further in depth investigation to better understand the spontaneous respiratory plasticity following cervical partial injury since the data pertaining to this mouse model are scarce (Streeter et al., 2019). In this study, we propose to evaluate the effect of a cervical spinal cord injury in C57BL/6 mouse strain on the diaphragm activity (eupnea and mild asphyxia) at different time points (up to one month post-injury). A better understanding of the functional effects resulting from such spinal injury could lead to a robust and reliable model for developing efficient therapeutics aimed to improve respiratory function.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Ethics statement**

All experiments reported in this manuscript were conformed to policies laid out by the National Institutes of Health (USA) in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. These experiments were performed on adult C57BL/6 male and female mice (8-12 weeks old, Janvier, France). The animals were housed in individually ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation A78-322-3, France), with access to food and water ad libitum on a 12 h light/dark cycle. These experiments were approved by the Ethics committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and complied with the French and European laws regarding animal experimentation (Apafis #8787-2017013115226134v4).

### **2.2. Chronic C2 hemisection**

Animals were anesthetized with isoflurane (5% in 100% O<sub>2</sub>) in a closed chamber. Anesthesia was maintained throughout the procedure (1.5-2% isoflurane in 100% O<sub>2</sub>) through a nose cone. Animals were placed on a heating pad and the skin and muscles above the first vertebrae were retracted. A C2 laminectomy and a durotomy were performed. The spinal cord was ventro-laterally hemisected just caudal to the C2 dorsal roots by using micro-scissors followed by the use of a micro-scalpel to ensure the sectioning of all remaining fibers. The wounds and the skin were sutured closed. Sham mice underwent the same procedures without hemisection. The Isoflurane vaporizer was then turned off and mice received subcutaneous injections of analgesic (buprenorphine, 375 µg/kg: Buprecare from Axience) and antibiotics (40 mg/kg Trimethoprim and 200 mg/kg Sulfadoxin: Borgal 24%, from Virbac).

### **2.3. Electrophysiological recordings**

A total of 72 animals were used for electrophysiological recordings. They were randomly and evenly (50% males, 50% females) divided into 12 different groups: 1h post-injury (P.I.) (n = 6) and 1h Sham (n = 6), 1d P.I. (n = 6) and 1d Sham (n = 6), 3d P.I. (n = 6) and 3d Sham (n = 6), 7d P.I. (n = 6) and 7d Sham (n = 6), 15d P.I. (n = 6) and 15d Sham (n = 6), 30d P.I. (n = 6) and 30d Sham (n = 6). At corresponding times post-injury, anesthesia was induced using 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> and maintained throughout the experiment (2.5% in 21% O<sub>2</sub> balanced) through a nose cone. Animals were placed on a heating pad to maintain a physiological and constant body temperature. A laparotomy was performed to access the diaphragm. Both sides (ipsilateral and contralateral to the spinal cord lesion) of the diaphragm were tested for their activity (electromyogram, EMG) using a handmade bipolar surface silver electrode on the mid-costal part of the muscle during spontaneous poikilocapnic normoxic or transient mild asphyxia breathing (by occlusion of the animal nose for 15 s). EMGs were amplified (Model

1800; gain, 100; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100 Hz to 10 kHz). The signals were digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 4 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 7 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The bilateral diaphragmatic EMGs were integrated (50 ms decay). At the end of the experiment, animals were euthanized by intracardiac perfusion of heparinized 0.9% NaCl (10 mL) for tissue harvesting.

#### **2.4. Histological reconstitution of the extent of C2 injury**

The C1-C3 segment of the spinal cord was dissected out and immediately placed overnight in cold 4% paraformaldehyde, then cryoprotected for 48h in 30% sucrose (in 0.9% NaCl) and frozen. Longitudinal sections (30  $\mu$ m thickness) were obtained with a Leica cryostat and the extent of injury was assessed after cresyl violet staining. Slides were then scanned with an Aperio AT2 scanner (Leica, France) and a high resolution picture of each slide was taken to evaluate the extent of the injury and reported on a stereotaxic transverse plane (C2). Each injury was then digitized and analyzed with Image J software (NIH). The percentage of damaged tissue on the injured side was calculated by reference to a complete hemisection (which is 100% of the hemicord).

#### **2.5. Data processing and statistical analyses**

The amplitude (normalized to corresponding sham group in arbitrary units, AU) of minimally 5 double integrated diaphragm EMG inspiratory bursts during normoxia and mild asphyxia was calculated for each animal from the injured and the intact sides with LabChart 7 Pro software (AD Instruments). For inter-inspiratory bursts basal signal analysis during normoxia,

the amplitude of minimal 5 basal diaphragmatic EMG signals were calculated, and the power spectral density (PSD) analysis was realized with LabChart 7, using a specific spectral setting (FFT size: 8K; Data window: Hamming; window overlap: 50%). At least, 5 windows of 35 ms were calculated for each side of each animal at all time points. For Sham animals, both left and right hemidiaphragm values were pooled together. Data were then gathered by boots of 100Hz for each animal and the mean for each group was calculated.

One-way ANOVA was performed between the different groups for the extent of injury evaluation or between the different post-lesioned time groups of the same condition. For diaphragmatic EMG, EMG inter-burst amplitude and PSD analysis, comparisons between intact and injured sides, and between eupnea and asphyxia were done by Student paired t-test. Comparisons between sham and injured animals were done by t-test. For PSD analysis, comparisons between frequency ranges and between times post-injury were done by a 2-way ANOVA (Tukey post hoc test).

All the data were presented as mean  $\pm$  SEM and statistics were considered significant when  $p < 0.05$ . SigmaPlot 12.5 software was used for all analyses.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Physiological effect**

The body weight of animals within each group did not show any significant variation over time following sham surgery or C2 SCI and was not statistically different between injured animals (initial weight =  $22.8 \pm 0.6$  g vs 1d P.I. =  $21.9 \pm 0.6$  g; 3d P.I. =  $19.9 \pm 0.7$  g; 7d P.I. =  $21.5 \pm 0.7$  g; 15d P.I. =  $22.7 \pm 1.4$  g; 30d P.I. =  $23.3 \pm 1.3$  g, One Way ANOVA,  $p=0.054$ ) and sham animals (initial weight =  $22.8 \pm 0.5$  g vs injured animals initial weight,  $p=0.834$ ; 1d Sham =  $21.1 \pm 0.6$  g vs 1d P.I.,  $p=0.372$ ; 3d Sham =  $21.8 \pm 0.9$  g vs 3d P.I.,  $p=0.092$ ; 7d Sham  $22.2 \pm 0.8$  g vs 7d P.I.,

p=0.513; 15d Sham =  $22.3 \pm 1.5$  g vs 3d P.I., p=0.872; 30d Sham =  $25.3 \pm 1.9$  g vs 3d P.I., p=0.413) at corresponding time post-surgery (Table 1).

### 3.2. Effect on diaphragm activity during eupnea

No significant difference in injury size between all groups (1h P.I. =  $91.4 \pm 2.7$  %; 1d P.I. =  $90.6 \pm 5.1$  %; 3d P.I. =  $86.1 \pm 4.4$  %; 7d P.I. =  $85.5 \pm 4.6$  %; 15d P.I. =  $94.3 \pm 1.4$  %; 30d P.I. =  $94.4 \pm 0.6$  %; p = 0.248) was observed (Figure 1A, 1B and 1C). Diaphragmatic EMGs showed a significant decrease in diaphragm activity 1h after C2 injury ( $0.01 \pm 0.01$  A.U. vs Sham normalized to 1.00, p<0.001). This abolition persisted until 30d P.I. (1d P.I. =  $0.04 \pm 0.03$  A.U. ; 3d P.I. =  $0.03 \pm 0.02$  A.U. ; 7d P.I. =  $0.22 \pm 0.14$  A.U. ; 15d P.I. =  $0.19 \pm 0.09$  A.U. ; 30d P.I. =  $0.30 \pm 0.08$  A.U.; vs Sham normalized to 1.00; p<0.001) on the injured side. At the intact side, diaphragm EMGs showed a significant increase at 1h P.I. ( $2.50 \pm 0.38$  A.U., p<0.001), 3d P.I. ( $1.48 \pm 0.15$  A.U. , p=0.006), 7d P.I. ( $1.62 \pm 0.18$  A.U. , p=0.002), 15d P.I. ( $2.76 \pm 0.39$  A.U. , p=0.001), 30d P.I. ( $1.93 \pm 0.16$  A.U. , p=0.002) but not at 1d P.I. ( $1.37 \pm 0.47$  A.U. , p=0.289) compared to the corresponding sham groups (normalized to 1.00 A.U.) (Figure 2A and 2B).

### 3.3. Diaphragm activity response to respiratory challenge

During mild asphyxia, all sham groups presented a significant increase in integrated diaphragm EMG amplitude compared to eupnea for all time points: 1h P.I. (p<0.001), 1d P.I. p=0.003), 3d P.I. (p=0.012), 7d P.I. (p=0.002), 15d P.I. (p<0.001) and 30d P.I. (p<0.001). For injured animals, the intact side did not show any significant variation in both conditions (p>0.05). At the injured side, a significant increase was observed at 7d P.I. (p=0.031), 15d P.I. (p=0.002) and 30d P.I. (p=0.011). No differences at 1h P.I., 1d P.I. and 3d P.I. (p>0.05) were observed (Table 2; Figure 3A to 3F).

### 3.4. Activity between respiratory bursts

Electrical recordings between EMG bursts and heart beats was analyzed (Figure 4A). A progressive increase in amplitude of the inter-burst activities at the injured side was observed over time, starting from 1d P.I. (injured side: 1d P.I. =  $2.77 \pm 0.99$  A.U. vs Sham normalized to 1  $p=0.028$ ) and reaching a peak at 3d P.I. (injured side: 3d P.I. =  $3.92 \pm 0.97$  A.U. vs 1h P.I. =  $0.69 \pm 0.12$  A.U.,  $p=0.002$ ; 3d P.I. vs Sham normalized to 1,  $p=0.002$ ; and 3d P.I. vs 1d P.I. =  $2.77 \pm 0.99$  A.U.,  $p=0.048$ ). Then, the amplitude gradually decreased to pre-injury values at 7d P.I. (injured side:  $2.49 \pm 0.30$  A.U. vs 3d P.I.  $p=0.041$ ; vs Sham normalized to 1  $p<0.001$ ), 15d P.I. (injured side:  $1.47 \pm 0.28$  A.U. vs 3d P.I.,  $p=0.002$ ; vs Sham normalized to 1  $p=0.008$ ) and 30d P.I. (injured side:  $1.10 \pm 0.09$  A.U. vs 3d P.I.,  $p=0.002$ ; vs Sham normalized to 1  $p=0.248$ ). The intact side did not show any significant variation in inter-burst amplitude over time (intact side: 1h P.I. =  $0.82 \pm 0.15$  A.U.; 3d P.I. =  $1.17 \pm 0.22$  A.U.; 7d P.I. =  $1.40 \pm 0.27$  A.U.; 15d P.I. =  $1.09 \pm 0.07$  A.U.; 30d P.I. =  $1.10 \pm 0.07$  A.U.; vs Sham normalized to 1  $p>0.05$ ), except at 1d P.I. ( $0.82 \pm 0.15$  A.U. vs Sham normalized to 1  $p=0.044$ ). Interestingly, at 3d P.I. the difference between the intact and the injured side was significant (intact side vs injured side,  $p=0.042$ ) and persisted until 7d P.I. (intact side vs injured side,  $p=0.029$ ) (Figure 4B).

### 3.5. Power spectral density analysis

The PSD analysis of inter-burst recordings revealed an increase in low-end frequencies (from 100 to 1000Hz) at the injured side, similar to those observed during motor unit contraction (Supplemental data 1). For several range of frequencies, the number of events were significantly higher (1d P.I.: 200-300 Hz; 300-400 Hz; 400-500 Hz; 500-600 Hz; 600-700; vs 1hP.I.: 200-300 Hz,  $p=0.01$ ; 300-400 Hz,  $p<0.001$ ; 400-500 Hz,  $p=0.008$ ; 500-600 Hz,  $p=0.008$ ;

600-700 Hz  $p=0.002$ ; Supplementary Table; Figure 5A-B). This increase was maintained at 3d P.I. for lower frequencies (3d P.I.: 200-300 Hz; 400-500 Hz; 500-600 Hz; 700-800 Hz; vs 1h P.I.,  $p\leq 0.049$ ; and vs 1d P.I.,  $p>0.05$ ; Supplementary Table; Figure 5C). At 7d P.I., most of the frequencies returned to pre-injury ones (1d P.I. vs 7d P.I.: 300-400 Hz,  $p<0.001$ ; 600-700 Hz,  $p=0.018$ ; 3d P.I. vs 7d P.I.: 400-500 Hz,  $p<0.001$ ; 500-600 Hz,  $p=0.004$ ; Supplementary Table; Figure 5D). For 15d P.I. and 30d P.I., the profiles obtained were similar to 1h P.I. and sham values (Supplementary Table and supplemental data 2). Interestingly, the observed profile correlated with the one obtained with the inter-burst signal amplitude analysis, with an increase observed between 1h P.I. and 3d P.I. A significant increase was also observed at 1d P.I. for the intact side compared to the other time points (1d P.I.: 100-200 Hz; 200-300 Hz; 300-400 Hz; vs 1h P.I.: 100-200 Hz,  $p=0.004$ ; 200-300 Hz,  $p=0.002$ ; 300-400 Hz,  $p<0.001$ ; 1d P.I. vs 3d P.I.: 100-200 Hz,  $p=0.005$ ; 200-300 Hz,  $p<0.001$ ; 300-400 Hz,  $p<0.001$ ; 1d P.I. vs 7d P.I.: 100-200 Hz,  $p=0.004$ ; 200-300 Hz,  $p<0.001$ ; 300-400 Hz,  $p<0.001$ ; Supplementary Table; Figure 5A-D). Significant differences were also observed between intact and injured sides for some frequencies at 3d P.I. (intact side: 500-600 Hz; 600-700 Hz; 700-800 Hz; 800-900 Hz; 900-1000 Hz; 1000-1100 Hz; vs injured side: 500-600 Hz; 600-700 Hz; 700-800 Hz; 800-900 Hz; 900-1000 Hz; 1000-1100 Hz,  $p<0.04$ ; Supplementary Table; Figure 5C), as well as at 7d P.I. (intact side: 300-400 Hz; 500-600 Hz; 600-700 Hz; vs injured side: 300-400 Hz,  $p=0.018$ ; 500-600 Hz,  $p=0.039$ ; 600-700 Hz,  $p=0.048$ ; Supplementary Table; Figure 5D).

#### **4. DISCUSSION**

The present study depicts for the first time the pathophysiology of the diaphragm muscle activity over time (up to one month P.I.) following a C2 cervical spinal cord injury in a mouse model.

The diaphragmatic activity of injured and sham mice was studied by surface EMG recordings in eupneic and mild asphyxic conditions in anesthetized animals. Under eupneic condition, the diaphragm activity did not show significant spontaneous recovery over time on the injured side. A non-significant increase in the integrated diaphragm EMG amplitude is observed from 7d P.I. to 30 d P.I., which could correspond to the occurrence of the spontaneous crossed phrenic phenomenon (Minor et al., 2006). In mice, following a C2HS injury, previous reports demonstrated the total annihilation of diaphragm activity up to 72h P.I. on the injured side (Minor et al., 2006). Interestingly, high cervical contusion injury at C4-C5 also induces a permanent diaphragm deficit which lasts up to 6 weeks P.I. (Nicaise et al., 2012). These present results are similar to those obtained in a rat model of C2HS (Goshgarian, 1981; Vinit et al., 2006). However, several publications have observed a robust spontaneous recovery of diaphragm activity in awake (Bezdudnaya et al., 2018; Sandhu et al., 2009) and even in anesthetized (Nantwi et al., 1999) rats. The discrepancy in these data is not unexpected since anesthetics, such as isoflurane used in this study, are known to induce a depression in the respiratory function (Teppema and Baby, 2011) and modulate respiratory motoneurons and pre-motoneurons excitability (Stuth et al., 2008). However, these results showed that, even after a longer time point following injury, the mouse model may be a good model to study and test different therapeutics aimed to ameliorate the absence of respiratory function induced by cervical spinal injury.

As expected, during mild asphyxia, sham animals present a significant increase in diaphragm activity compared to eupneic condition at all time points post-sham surgery, which correlate with data seen in the literature (O'Halloran et al., 2002). The necessary increase in central respiratory drive during asphyxia, leads to a recruitment of additional diaphragmatic fibers and leads to an increase in diaphragm contraction. On the intact side of C2HS mice, the

animals did not show any increase in diaphragm activity during asphyxia compared to eupneic conditions. This lack of increase could be due to a ceiling effect from the intact side, suggesting that the maximum drive on the uninjured hemidiaphragm during eupnea is at its optimal to counterbalance the absence of activity on the injured hemidiaphragm to maintain physiological values (Lee and Hsu, 2017). One strategy observed in C2HS animal models is the increase in respiratory frequency when animals are evaluated in awake eupneic condition (Dougherty et al., 2018), whereas in this case, no differences are observed in term of frequency (data not shown) since the animals are deeply anesthetized.

At the injured side, a mild asphyxia induces a significant diaphragmatic activity increase compared to eupnea at 7d, 15d and 30d P.I. This ability to further enhance the central spinal drive from the phrenic motoneurons to the diaphragm on the injured side can be sustained by the crossed phrenic pathways. These physical connections from the spared side of the spinal cord cross the midline at cervical level (C3-C6) and connect to the deafferented phrenic motoneurons. In certain conditions, these silent pathways can be spontaneously activated and lead to the activity resurgence on the injured side of the diaphragm (Goshgarian, 2003; Minor et al., 2006; Moreno et al., 1992). This phenomenon, called the “crossed phrenic phenomenon”, has been described for the first time in 1895 by Porter on dogs and rabbits (Porter, 1895). By definition, this phenomenon induces an increase in the paralyzed hemidiaphragm and phrenic nerve activities following a spinal hemisection (above the level of phrenic motoneurons pools at cervical C2) with an additional contralateral phrenic nerve transection which strengthens the crossed pathways (Fuller et al., 2008; Lee et al., 2014; Vinit et al., 2006). Other conditions could increase the central respiratory drive and reveal the crossed phrenic phenomenon following C2HS, such as intermittent hypoxia (Golder and Mitchell, 2005), chronic intermittent hypoxia (Fuller et al., 2003) or asphyxia (Golder et al.,

2003; O'Hara and Goshgarian, 1991). Here, these silent pathways are activated under mild asphyxic condition and lead to a partial activation of the paralyzed hemidiaphragm, similar to what has been previously observed in a rat model of C2HS (Golder et al., 2003; O'Hara and Goshgarian, 1991). In addition, the crossed pathways can be spontaneously activated over time post-C2 injury (Bezudnaya et al., 2018; Fuller et al., 2008; Huang and Goshgarian, 2009). The inter-burst signal between breaths and heart beats, named "noise signal", was analyzed. Interestingly, a difference in basal noise value was observed with an amplitude increase at 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I. and 15d P.I. with a maximum peak at 3d P.I. on the injured side. The intact side also showed a transient increase at 1d P.I. On the injured side, the decrease in signal amplitude observed between 3d P.I. and 15d P.I. could be due to the crossed phrenic pathway activation which starts to be observed at 7d P.I. Indeed, these previous silent pathways innervate deafferented phrenic motoneurons and can reactivate their bursting activity. The inter-burst signal on the injured side, corresponding to an increase in random deafferented unique spontaneous phrenic motoneuron activity, gradually increases until the CPP strengthen its connections and re-innervate the deafferented phrenic motoneurons in order to resynchronize them and "stabilize" their own activity (Minor et al., 2006). Interestingly, phrenic motoneurons also receive inhibitory expiratory projections from the Böttinger-complex expiratory neurons (Tian et al., 1998). Therefore, C2HS also interrupts this inhibitory bulbospinal pathway and could lead to a phrenic motoneuron disinhibition and then, induce spontaneous diaphragm EMG firing during the expiration phase. When the CPP (both inspiratory and expiratory pathways) occurs, the phrenic motoneurons are again inhibited by the Böttinger-complex expiratory neurons and the inter-burst signal returns to pre-injured values. Another explanation could be a desynchronization of the phrenic motoneurons due to the injury (absence of bulbospinal rhythmic respiratory activity) between the different

subtypes of phrenic motoneurons, i.e. early (early-I) and late (Late-I) inspiratory cells resulting in an increase of the inter-burst signal (Lee et al., 2013). Again, a resynchronization of every sub-types of phrenic motoneurons could be due to the occurrence of the CPP pathways. In addition, the power spectral density (PSD) of the inter-burst signal was analyzed in order to determine the physiological aspect of this signal. Indeed, power spectral analysis can be effectively used for fine analysis of muscle or nerve activities (ElMallah et al., 2016; Freund, 1983; Lindstrom and Magnusson, 1977). The range of frequencies observed in our inter-burst signal corresponds to those observed in diaphragmatic EMG PSD (see Supplemental data 1) and is similar to the one observed in rat diaphragmatic EMG (Seven et al., 2013). Taken altogether, our results demonstrate that the composition of this inter-burst signal at 3 d P.I. is similar to the composition of diaphragmatic EMG burst, i.e. corresponding to random phrenic motoneuron discharge. The spontaneous recovery from the CPP pathways re-synchronize the phrenic motoneurons together and leads to a modest functional recovery. Another explanation could be the venue of a maladaptive behavior following central spinal injury. In fact, spasticity, which is a random contraction of skeletal muscle, is often observed following spinal injury in human (Kawamura et al., 1989; Sköld et al., 1999) and in rats (Bennett et al., 1999; Bennett et al., 2004; Li et al., 2004) and leads to serious motor dysfunction. Several mechanisms contribute to spasticity in rat following SCI, including a down-regulation of potassium-chloride cotransporter at the motoneurons membrane (Boulenguez et al., 2010) and a spontaneous activation of motoneuronal 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors following injury (Murray et al., 2011). The spastic activity in our mice would occur faster compared to human and rat (Bennett et al., 1999). Nevertheless, this inter-burst activity disappears when rhythmic diaphragm EMG resolved at 7d P.I. One cannot rule out the massive inflammatory processes which can occur following cervical injury. Systemic inflammation can undermine subsequent

respiratory plasticity and can impact the respiratory recovery following spinal injury (Hocker and Huxtable, 2019; Windelborn and Mitchell, 2012). More experiments will be needed in order to determine whether our diaphragm EMG recordings are spasms or a desynchronization of the phrenic motoneuronal activity.

## **5. CONCLUSION**

Following C2HS, the diaphragmatic EMG did not reveal any significant spontaneous restoration of the respiratory function up to 30d P.I. in mice. However, the respiratory challenge (i.e. mild asphyxia) revealed the CPP at 7d P.I., demonstrating the tremendous plasticity of the bulbospinal descending respiratory pathways following high SCI. Interestingly, a change in the inter-burst signal of diaphragmatic EMG is observed between 1d P.I. and 7d P.I., which can be reversed by the emergence of the CPP. These findings show the ability of the mouse to be a robust model of respiratory impairment following C2HS, opening new perspectives for the development of innovative therapeutics to reverse respiratory insufficiency.

**Acknowledgements:** This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV, MB), the Fondation de France (SV), the Fondation Médisite (SV), INSERM (MB, SV, AM), Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (MB, SV, AM) and Ministry of Science and Technology 109-2636-B-110-001 (KZL). The supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Conflicts of interest:** No conflict of interest

## REFERENCES

- Alexandrov, V.G., Ivanova, T.G., Alexandrova, N.P., 2007. Prefrontal control of respiration. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 5, 17-23.
- Alilain, W.J., Horn, K.P., Hu, H., Dick, T.E., Silver, J., 2011. Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* 475, 196-200.
- Bennett, D.J., Gorassini, M., Fouad, K., Sanelli, L., Han, Y., Cheng, J., 1999. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 16, 69-84.
- Bennett, D.J., Sanelli, L., Cooke, C.L., Harvey, P.J., Gorassini, M.A., 2004. Spastic long-lasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J Neurophysiol* 91, 2247-2258.
- Bezudnaya, T., Hormigo, K.M., Marchenko, V., Lane, M.A., 2018. Spontaneous respiratory plasticity following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats. *Experimental neurology* 305, 56-65.
- Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., Marsala, M., Vinay, L., 2010. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16, 302-307.
- Burns, D.P., Drummond, S.E., Bolger, D., Coiscaud, A., Murphy, K.H., Edge, D., O'Halloran, K.D., 2019. N-acetylcysteine Decreases Fibrosis and Increases Force-Generating Capacity of mdx Diaphragm. *Antioxidants (Basel)* 8, E581.
- Cui, Y., Kam, K., Sherman, D., Janczewski, W.A., Zheng, Y., Feldman, J.L., 2016. Defining preBötzinger Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits In Vivo. *Neuron* 91, 602-614.
- Dougherty, B.J., Terada, J., Springborn, S.R., Vinit, S., MacFarlane, P.M., Mitchell, G.S., 2018. Daily acute intermittent hypoxia improves breathing function with acute and chronic spinal injury via distinct mechanisms. *Respiratory physiology & neurobiology* 256, 50-57.
- ElMallah, M.K., Pagliardini, S., Turner, S.M., Cerreta, A.J., Falk, D.J., Byrne, B.J., Greer, J.J., Fuller, D.D., 2015. Stimulation of Respiratory Motor Output and Ventilation in a Murine Model of Pompe Disease by Ampakines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53, 326-335.
- ElMallah, M.K., Stanley, D.A., Lee, K.-Z., Turner, S.M.F., Streeter, K.A., Baekey, D.M., Fuller, D.D., 2016. Power spectral analysis of hypoglossal nerve activity during intermittent hypoxia-induced long-term facilitation in mice. *J Neurophysiol* 115, 1372-1380.
- Feldman, J.L., Del Negro, C.A., Gray, P.A., 2013. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annual review of physiology* 75, 423-452.
- Feldman, J.L., Loewy, A.D., Speck, D.F., 1985. Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5, 1993-2000.
- Freund, H.J., 1983. Motor unit and muscle activity in voluntary motor control. *Physiol Rev* 63, 387-436.
- Fuller, D.D., Doperalski, N.J., Dougherty, B.J., Sandhu, M.S., Bolser, D.C., Reier, P.J., 2008. Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Experimental neurology* 211, 97-106.
- Fuller, D.D., Johnson, S.M., Olson, E.B., Jr., Mitchell, G.S., 2003. Synaptic pathways to phrenic motoneurons are enhanced by chronic intermittent hypoxia after cervical spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 2993-3000.
- Gandevia, S.C., Rothwell, J.C., 1987. Activation of the human diaphragm from the motor cortex. *J Physiol* 384, 109-118.
- Golder, F.J., Fuller, D.D., Davenport, P.W., Johnson, R.D., Reier, P.J., Bolser, D.C., 2003. Respiratory motor recovery after unilateral spinal cord injury: eliminating crossed phrenic activity decreases tidal volume and increases contralateral respiratory motor output. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 2494-2501.
- Golder, F.J., Mitchell, G.S., 2005. Spinal synaptic enhancement with acute intermittent hypoxia improves respiratory function after chronic cervical spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 2925-2932.

Golder, F.J., Reier, P.J., Bolser, D.C., 2001. Altered respiratory motor drive after spinal cord injury: Supraspinal and bilateral effects of a unilateral lesion. *Journal of Neuroscience* 21, 8680-8689.

Goshgarian, H.G., 1981. The role of cervical afferent nerve fiber inhibition of the crossed phrenic phenomenon. *Experimental neurology* 72, 211-225.

Goshgarian, H.G., 2003. Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *Journal of Applied Physiology* 94, 795-810.

Gutierrez, D.V., Clark, M., Nwanna, O., Alilain, W.J., 2013. Intermittent hypoxia training after C2 hemisection modifies the expression of PTEN and mTOR. *Experimental neurology* 248, 45-52.

Hocker, A.D., Huxtable, A.G., 2019. Viral Mimetic-Induced Inflammation Abolishes Q-Pathway, but Not S-Pathway, Respiratory Motor Plasticity in Adult Rats. *Front Physiol* 10, 1039-1039.

Huang, Y., Goshgarian, H.G., 2009. Identification of the neural pathway underlying spontaneous crossed phrenic activity in neonatal rats. *Neuroscience* 163, 1109-1118.

Kastner, A., Gauthier, P., 2008. Are rodents an appropriate pre-clinical model for treating spinal cord injury? Examples from the respiratory system. *Experimental neurology* 213, 249-256.

Kawamura, J., Ise, M., Tagami, M., 1989. The clinical features of spasms in patients with a cervical cord injury. *Paraplegia* 27, 222-226.

Keomani, E., Deramaudt, T.B., Petitjean, M., Bonay, M., Lofaso, F., Vinit, S., 2014. A murine model of cervical spinal cord injury to study post-lesional respiratory neuroplasticity. *J Vis Exp*.

Lane, M.A., 2011. Spinal respiratory motoneurons and interneurons. *Respiratory physiology & neurobiology* 179, 3-13.

Lane, M.A., Lee, K.-Z., Fuller, D.D., Reier, P.J., 2009. Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 169, 123-132.

Lane, M.A., White, T.E., Coutts, M.A., Jones, A.L., Sandhu, M.S., Bloom, D.C., Bolser, D.C., Yates, B.J., Fuller, D.D., Reier, P.J., 2008. Cervical prephrenic interneurons in the normal and lesioned spinal cord of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology* 511, 692-709.

Lee, K.-Z., Dougherty, B.J., Sandhu, M.S., Lane, M.A., Reier, P.J., Fuller, D.D., 2013. Phrenic motoneuron discharge patterns following chronic cervical spinal cord injury. *Experimental neurology* 249, 20-32.

Lee, K.Z., Hsu, S.H., 2017. Compensatory Function of the Diaphragm after High Cervical Hemisection in the Rat. *J Neurotrauma* 34, 2634-2644.

Lee, K.Z., Huang, Y.J., Tsai, I.L., 2014. Respiratory motor outputs following unilateral midcervical spinal cord injury in the adult rat. *J Appl Physiol* (1985) 116, 395-405.

Li, Y., Gorassini, M.A., Bennett, D.J., 2004. Role of persistent sodium and calcium currents in motoneuron firing and spasticity in chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 91, 767-783.

Lindstrom, L.H., Magnusson, R.I., 1977. Interpretation of myoelectric power spectra: A model and its applications. *Proceedings of the IEEE* 65, 653-662.

Lipski, J., Bektas, A., Porter, R., 1986. Short latency inputs to phrenic motoneurons from the sensorimotor cortex in the cat. *Exp Brain Res* 61, 280-290.

Lovett-Barr, M.R., Satriotomo, I., Muir, G.D., Wilkerson, J.E., Hoffman, M.S., Vinit, S., Mitchell, G.S., 2012. Repetitive intermittent hypoxia induces respiratory and somatic motor recovery after chronic cervical spinal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 3591-3600.

Mantilla, C.B., Greising, S.M., Stowe, J.M., Zhan, W.-Z., Sieck, G.C., 2014. TrkB kinase activity is critical for recovery of respiratory function after cervical spinal cord hemisection. *Experimental neurology* 261, 190-195.

Minor, K.H., Akison, L.K., Goshgarian, H.G., Seeds, N.W., 2006. Spinal cord injury-induced plasticity in the mouse--the crossed phrenic phenomenon. *Experimental neurology* 200, 486-495.

Moreno, D.E., Yu, X.J., Goshgarian, H.G., 1992. Identification of the axon pathways which mediate functional recovery of a paralyzed hemidiaphragm following spinal cord hemisection in the adult rat. *Experimental neurology* 116, 219-228.

Murray, K.C., Stephens, M.J., Ballou, E.W., Heckman, C.J., Bennett, D.J., 2011. Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor activity. *J Neurophysiol* 105, 731-748.

Nantwi, K.D., El-Bohy, A.A., Schrimsher, G.W., Reier, P.J., Goshgarian, H.G., 1999. Spontaneous Functional Recovery in a Paralyzed Hemidiaphragm Following Upper Cervical Spinal Cord Injury in Adult Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 13, 225-234.

Nicaise, C., Putatunda, R., Hala, T.J., Regan, K.A., Frank, D.M., Brion, J.-P., Leroy, K., Pochet, R., Wright, M.C., Lepore, A.C., 2012. Degeneration of phrenic motor neurons induces long-term diaphragm deficits following mid-cervical spinal contusion in mice. *Journal of neurotrauma* 29, 2748-2760.

O'Halloran, K.D., McGuire, M., O'Hare, T., Bradford, A., 2002. Chronic intermittent asphyxia impairs rat upper airway muscle responses to acute hypoxia and asphyxia. *Chest* 122, 269-275.

O'Hara, T.E., Jr., Goshgarian, H.G., 1991. Quantitative assessment of phrenic nerve functional recovery mediated by the crossed phrenic reflex at various time intervals after spinal cord injury. *Experimental neurology* 111, 244-250.

Porter, W.T., 1895. The Path of the Respiratory Impulse from the Bulb to the Phrenic Nuclei. *J Physiol* 17, 455-485.

Sandhu, M.S., Dougherty, B.J., Lane, M.A., Bolser, D.C., Kirkwood, P.A., Reier, P.J., Fuller, D.D., 2009. Respiratory recovery following high cervical hemisection. *Respiratory physiology & neurobiology* 169, 94-101.

Satkunendrarajah, K., Karadimas, S.K., Laliberte, A.M., Montandon, G., Fehlings, M.G., 2018. Cervical excitatory neurons sustain breathing after spinal cord injury. *Nature* 562, 419-422.

Seven, Y.B., Mantilla, C.B., Zhan, W.-Z., Sieck, G.C., 2013. Non-stationarity and power spectral shifts in EMG activity reflect motor unit recruitment in rat diaphragm muscle. *Respiratory physiology & neurobiology* 185, 400-409.

Sköld, C., Levi, R., Seiger, A., 1999. Spasticity after traumatic spinal cord injury: nature, severity, and location. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 80, 1548-1557.

Streeter, K.A., Sunshine, M.D., Brant, J.O., Sandoval, A.G.W., Maden, M., Fuller, D.D., 2019. Molecular and histologic outcomes following spinal cord injury in spiny mice, *Acomys cahirinus*. *J Comp Neurol*, 10.1002/cne.24836.

Stuth, E.A., Stucke, A.G., Brandes, I.F., Zuperku, E.J., 2008. Anesthetic effects on synaptic transmission and gain control in respiratory control. *Respiratory physiology & neurobiology* 164, 151-159.

Teppema, L.J., Baby, S., 2011. Anesthetics and control of breathing. *Respiratory physiology & neurobiology* 177, 80-92.

Tian, G.F., Peever, J.H., Duffin, J., 1998. Bötzing- complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. *Experimental brain research* 122, 149-156.

Vandeweerdt, J.-M., Hontoir, F., De Knoop, A., De Swert, K., Nicaise, C., 2018. Retrograde Neuroanatomical Tracing of Phrenic Motor Neurons in Mice. *J Vis Exp*, 56758.

Vinit, S., Gauthier, P., Stamegna, J.C., Kastner, A., 2006. High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *Journal of neurotrauma* 23, 1137-1146.

Vinit, S., Kastner, A., 2009. Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 169, 115-122.

Wen, M.-H., Wu, M.-J., Vinit, S., Lee, K.-Z., 2019. Modulation of Serotonin and Adenosine 2A Receptors on Intermittent Hypoxia-Induced Respiratory Recovery following Mid-Cervical Contusion in the Rat. *Journal of neurotrauma* 36, 2991-3004.

Windelborn, J.A., Mitchell, G.S., 2012. Glial activation in the spinal ventral horn caudal to cervical injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 180, 61-68.

Winslow, C., Rozovsky, J., 2003. Effect of spinal cord injury on the respiratory system. *Am J Phys Med Rehabil* 82, 803-814.

Wu, J., Capelli, P., Bouvier, J., Goulding, M., Arber, S., Fortin, G., 2017. A V0 core neuronal circuit for inspiration. *Nature communications* 8, 544-544.

Wu M., V.S., Chen C., Lee K.Z., 2019. 5-HT7 receptor inhibition enhances respiratory recovery following daily acute intermittent hypoxia in rats with chronic mid-cervical spinal cord contusion. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, In press.

Zanella, S., Doi, A., Garcia, A.J., 3rd, Elsen, F., Kirsch, S., Wei, A.D., Ramirez, J.-M., 2014. When norepinephrine becomes a driver of breathing irregularities: how intermittent hypoxia fundamentally

alters the modulatory response of the respiratory network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 36-50.

Zholudeva, L.V., Karliner, J.S., Dougherty, K.J., Lane, M.A., 2017. Anatomical Recruitment of Spinal V2a Interneurons into Phrenic Motor Circuitry after High Cervical Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 34, 3058-3065.

## **TABLES**

**Table 1.** Animals weight evolution post-surgery

**Table 2.** Diaphragmatic EMG evaluation in eupneic vs mild asphyxia conditions in isoflurane-anesthetized mice.

## **FIGURES**

### **Figure 1. Extent of injury following a C2 hemisection**

A. Representative extend of injury for each animal at 1h post-injury (P.I.), 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I.. B. Extent of injury quantification in percentage compared to control spinal cord injury (SCI) 100%. The quantification has been made only in the ventral part where the phrenic motoneurons are located. There is no difference between the different groups (One-way ANOVA,  $p = 0.248$ ). C. Representative spinal cord cross sections for each group at 1h P.I., 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I.. Scale bar: 800 $\mu$ m.

### **Figure 2. Diaphragm activity following a C2 hemisection**

A. Representative traces of raw diaphragm EMG at 1h post-injury (P.I.), 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I.. B. Integrated diaphragm amplitude normalized to corresponding sham animal for 1h post-injury (P.I.), 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I. groups. a  $p < 0.05$  compared to corresponding Sham; b  $p < 0.05$  compared to 1h intact side group; #  $p < 0.05$  compared to 1d, 3d and 7d intact side groups; \*  $p < 0.05$  intact side compared to injured side.

### **Figure 3. Diaphragm activity at 7d P.I. and during respiratory challenge**

Integrated diaphragm amplitude for 1h P.I. (A), 1d P.I. (B), 3d P.I. (C), 7d P.I. (D), 15d P.I. (E) and 30d P.I. (F) groups (Sham and injured animals) in eupnea and during mild asphyxia. \*  $p < 0.05$  mild asphyxia compared to eupnea (Paired t-test).

**Figure 4. Inter-burst diaphragm recordings during EMG**

A. Representative traces of raw inter-inspiratory bursts signals from diaphragm EMG at 1h post-injury (P.I.), 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I.. B. Amplitude of inter-burst diaphragm EMG signal normalized to corresponding sham animal for 1h P.I., 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I. groups. #  $p < 0.05$  compared to corresponding Sham; \*  $p < 0.05$  compared to intact side; a  $p < 0.05$  compared to 3d P.I. injured side.

**Figure 5. Power spectral density (PSD) of EMG recording between two inspiratory bursts following C2 hemisection**

PSD between two inspiratory bursts for intact and injured sides at 1h (A), 1d (B), 3d and 7d (D) post-injury (P.I.). Data were gathered by boot of 100Hz and computed by using a 35 ms window. #  $p < 0.05$  compared to 1h, 7d, and 15d and 30d P.I. (data not shown); \*  $p < 0.05$  compared to 1h, and 15d and 30d P.I. (data not shown); †  $p < 0.05$  compared to 1h and 30d P.I. (data not shown); ‡  $p < 0.05$  compared to 1h, 3d, 7d, and 15d and 30d P.I. (data not shown); a  $p < 0.05$  compared to corresponding injured side.

## **SUPPLEMENTARY DATA**

### **Supplemental data 1. Power spectral density (PSD) of diaphragmatic EMG**

PSD of inspiratory burst for Sham animal. Data were gathered by boot of 100Hz and computed from an entire respiratory burst.

### **Supplemental data 2. Power spectral density (PSD) of EMG recording between two inspiratory bursts following sham surgery.**

PSD between two inspiratory bursts for intact and injured sides at 1h, 1d, 3d and 7d after sham surgery (all groups were pooled together). Data were gathered by boot of 100Hz and computed by using a 35 ms window.

**Supplementary Table.** Power spectral density (PSD) of EMG recording between two inspiratory bursts following C2 hemisection in isoflurane-anesthetized mice.

Figure 1

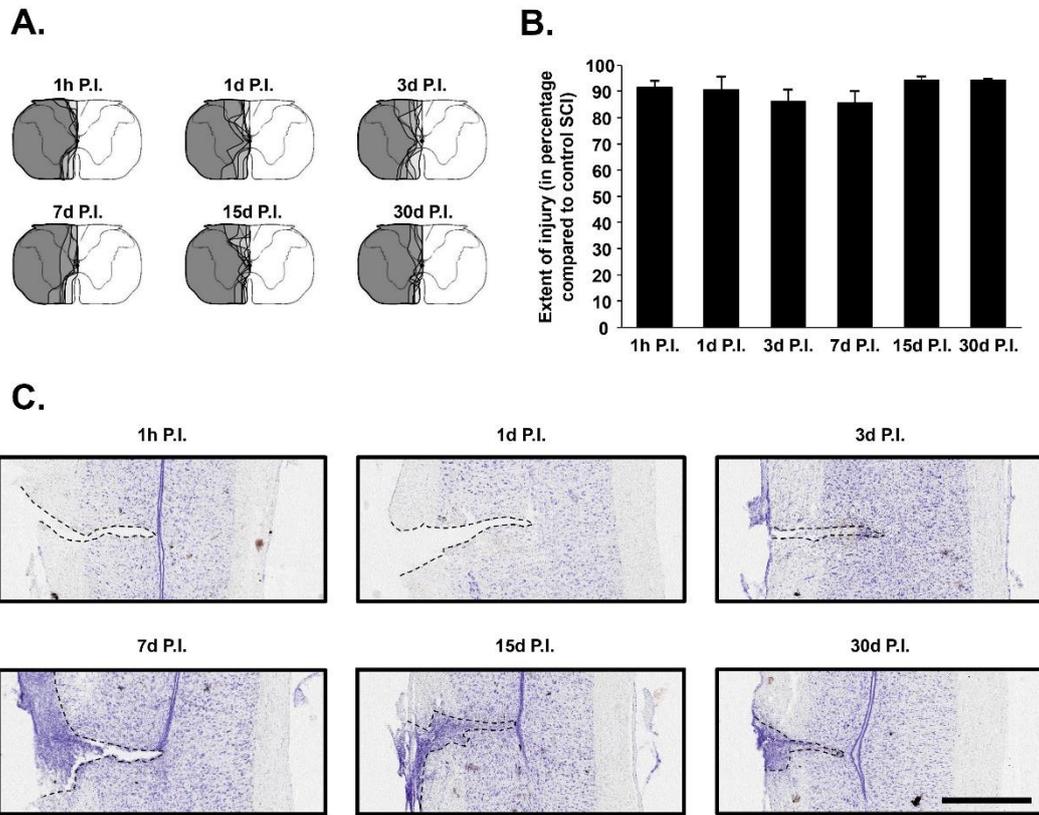


Figure 2

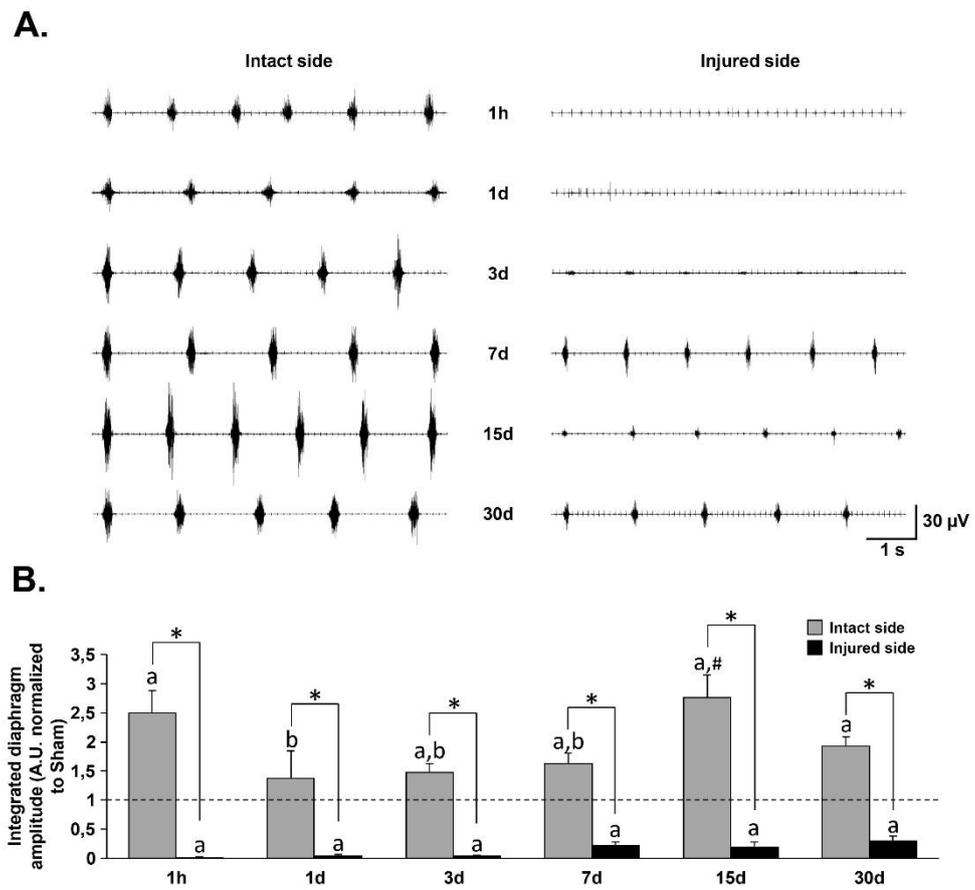


Figure 3

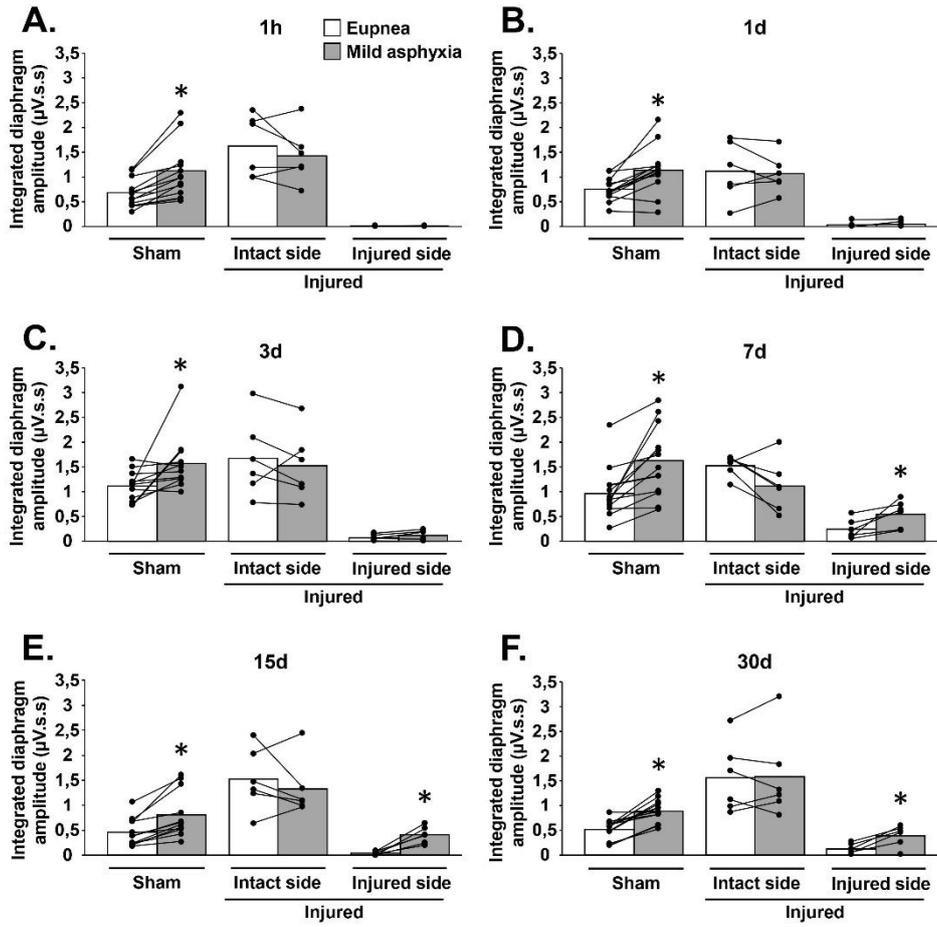
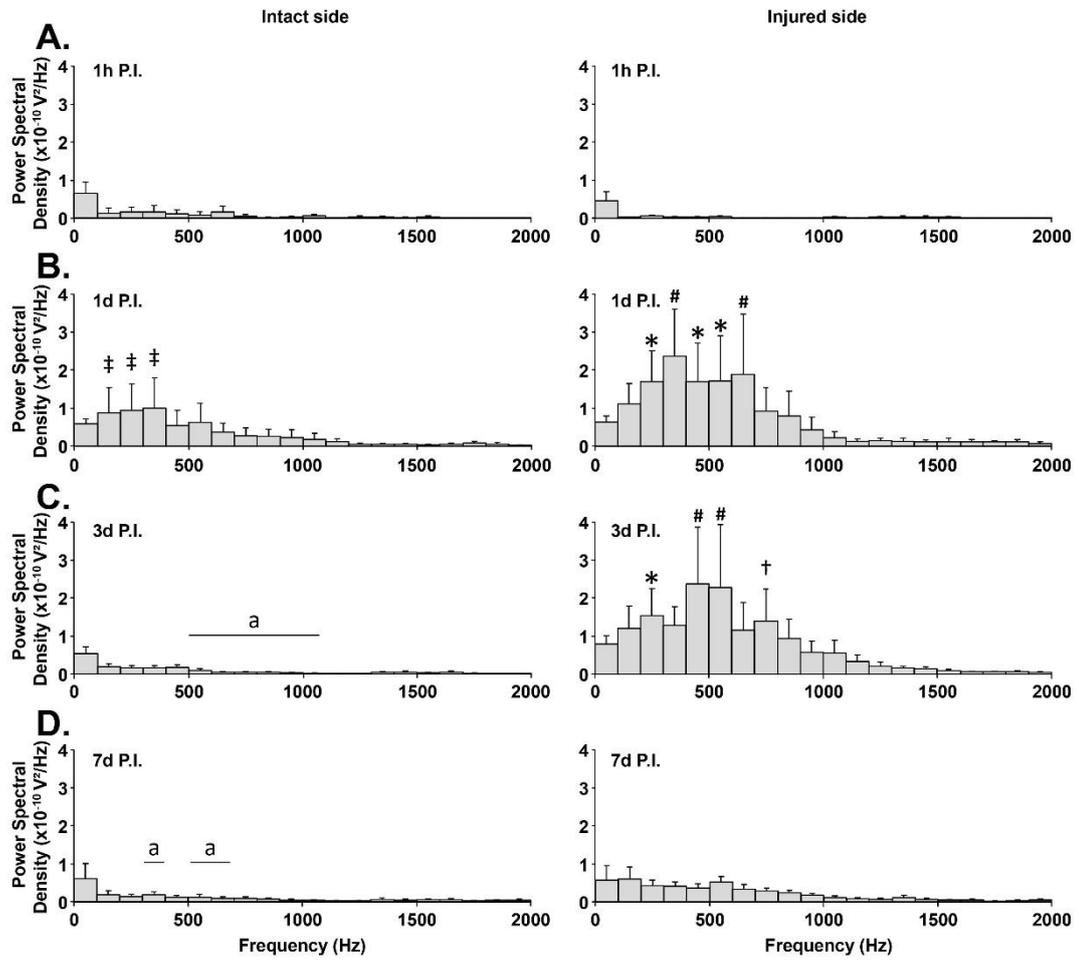
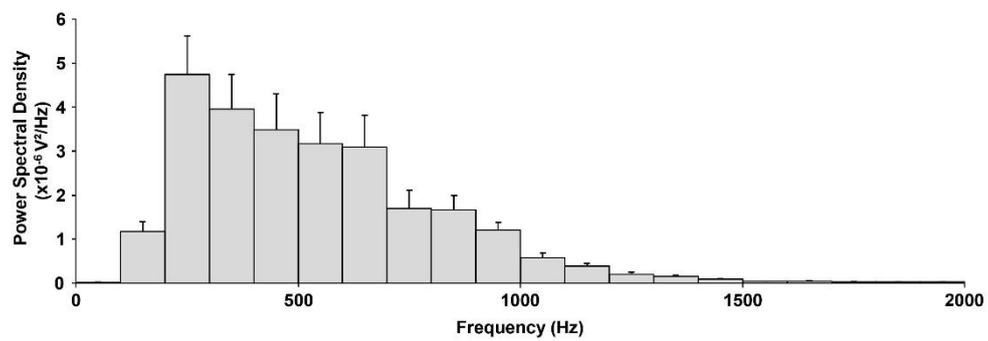
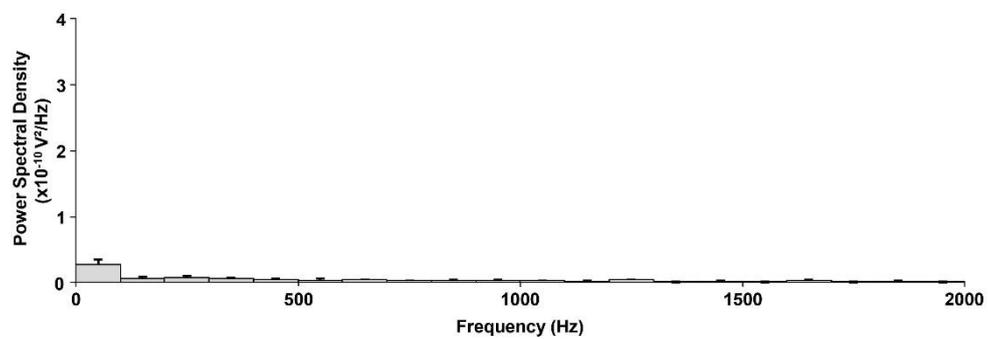




Figure 5







# 22.3 Posters



## Moderate training on forced exercise wheel following C2 SCI: Locomotor and respiratory effects in mice

Isley de Jesus<sup>1</sup>, Stéphane Vinit<sup>1</sup>, Thérèse B Deramaut<sup>1</sup>, Pauline Michel-Flutot<sup>1</sup>, Alexia Paucard<sup>1</sup>, Marcel Bonay<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, INSERM U1179, UFR SSSV, Montigny-Le Bretonneux, France  
<sup>2</sup> Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles; Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Boulogne, France  
 isley.de.jesus@uvsq.fr



### Introduction

**Cervical spinal cord injury (SCI)**

Permanent life-altering motor and respiratory deficits

Exercise training how strategy to improve the recovery of stepping

Animal models: The rat model of partial cervical spinal hemisection at the second cervical vertebrae (C2) segment is commonly used to study the effects of spinal injury on motor and respiratory functions.

Clinical studies:

Few studies have used the mouse model of cervical partial injury

- Recover partial locomotor ability 1 week following cervical hemisection
- Diaphragmatic activity remains impaired on the injured side

We hypothesize that moderate exercise training may provide recovery of respiratory and motor functions following chronic C2 injury

### Materials and Methods

Two-month-old C57BL/6J mice (n = 20) were distributed into 2 different groups: Sedentary (SED with naive, sham and C2 SCI) and 6 weeks trained mice (TR with naive, sham and C2 SCI)

**Progressive maximal tests (Tmax)**  
Forced exercise wheel system

**Diaphragmatic EMG**

**Cervical spinal hemisection surgery (SCI)**

Reactor: Motor cortex of C2 will consist of the sulcal and 2

**Protocol Design**

Forced exercise wheel system

- 6 weeks of exercise training:
  - 50-60% running capacity
  - 5d in recovery day
  - 5 days a week

**Statistical analysis**

The Results are presented as mean ± SEM. Two-way ANOVA and Bonferroni were used when necessary (p < 0.05) and student's t test was used to compare the different times of Tmax into each group

### Results

**Figure 1. Six weeks of moderate training on forced exercise wheel significantly increased the running capacity on C2 SCI group**

Hunting capacity of the animal through progressive maximal tests (1 min at different time points (1 min): before SCI; 1 max2; 7 days post-SCI; 1 max3; end of the 6 weeks of forced exercise training). Success is first showed that in Tmax3, TR C2 SCI was significantly different from SED C2 SCI (P=0.01). Significance: vs sedentary, P<0.05.

**Figure 2. No difference in diaphragmatic activity was observed after 6 weeks of moderate exercise between all groups during spontaneous breathing and mild asphyxia breathing.**

Diaphragmatic EMG activity was recorded in both intact and injured sides during spontaneous breathing.

### Figure 3. Fiber-type (immunofluorescence) to determine the cross-sectional area (CSA) on diaphragmatic muscle

Diaphragmatic EMG activity was recorded in both intact and injured sides during mild asphyxia breathing.

**Figure 4. Immunofluorescence of chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) on injury region (C1-C3)**

Diaphragmatic tissue sections were harvested and cut on a cryostat at 10 µm thickness. Sections were then processed to immunohistochemically detect type I (blue) and III (green) myofibers as well as cell borders (red). Bars: 25 µm.

**Figure 5. Quantification of proteins involved in neural plasticity on phrenic motor neuron region (C4-C6)**

Spinal cord tissue sections were harvested and cut on a cryostat at 20 µm thickness. Sections were then processed to immunohistochemically detect chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG).

Spinal cord (controversary analysis of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Growth-Associated Protein-43 (GAP43) and C AMP Response Element binding protein (CREB)).

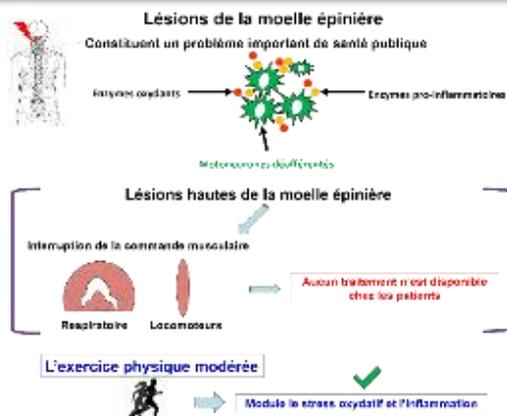
### Conclusion

Our results showed that this moderate exercise training paradigm had no effect on hemiplegic diaphragm recovery. However, preliminary results show one favorable effect in molecular mechanisms involving recovery of respiratory and motor functions following chronic C2 injury.

### References

1. Lopez Ramirez M. Identification of a novel respiratory motor unit in the mouse and its role in breathing and locomotion. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2014;192:105-12.
2. Lopez Ramirez M, Vinit S, Deramaut T, et al. Exercise training on the mouse model of cervical spinal cord injury: effects on respiratory and locomotor functions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2015;195:1-12.
3. Vinit S, Deramaut T, Lopez Ramirez M, et al. Effects of exercise training on the mouse model of cervical spinal cord injury: effects on respiratory and locomotor functions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2015;195:1-12.
4. Lopez Ramirez M, Vinit S, Deramaut T, et al. Exercise training on the mouse model of cervical spinal cord injury: effects on respiratory and locomotor functions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2015;195:1-12.
5. Vinit S, Deramaut T, Lopez Ramirez M, et al. Exercise training on the mouse model of cervical spinal cord injury: effects on respiratory and locomotor functions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2015;195:1-12.
6. Vinit S, Deramaut T, Lopez Ramirez M, et al. Exercise training on the mouse model of cervical spinal cord injury: effects on respiratory and locomotor functions. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2015;195:1-12.

## Introduction



## Objectif

Mise au point de la méthode d'évaluation motrice sur un modèle préclinique d'hémisection spinale cervicale haute.

## Matériels et méthodes

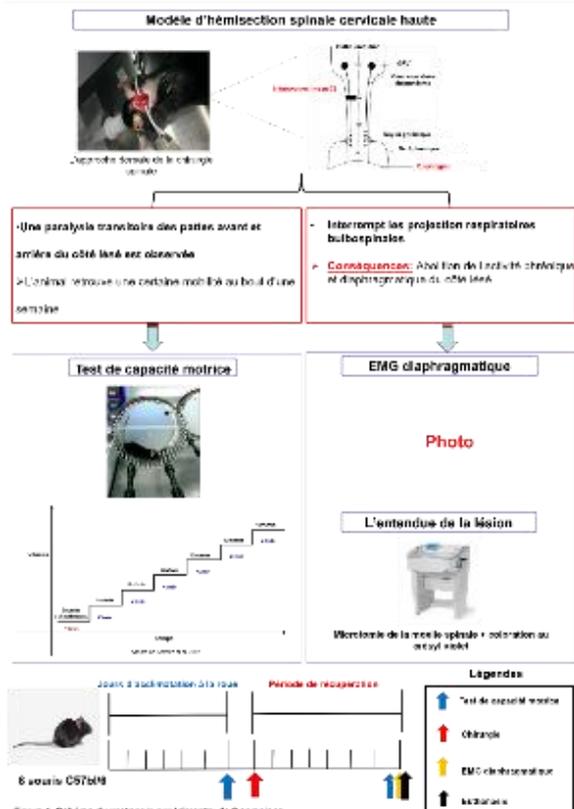


Figure 1. Schéma des procédures expérimentales de l'étude.

## Resultats

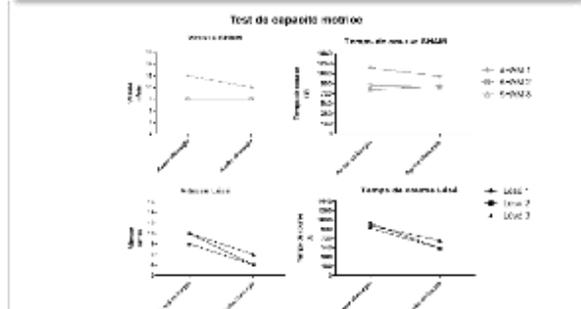


Figure 2. Les valeurs individuelles de la capacité maximale de course sur la roue d'exercice forcée pour les SIAM (n=3) et les Lesée (n=3) avant et 7 jours après chirurgie.

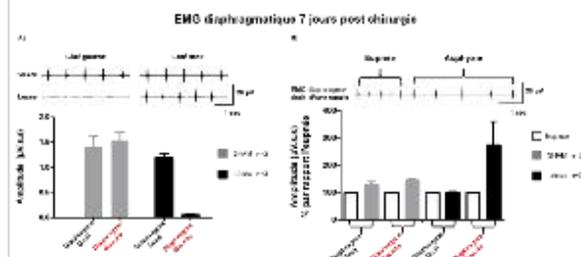


Figure 3. A) Développement électromyographique de l'activité diaphragmatique 7 jours post-chirurgie d'hémisection spinale cervicale haute du côté gauche et du côté droit pour le groupe SIAM (n=3) et le groupe Lesée (n=3). B) Développement électromyographique de l'activité diaphragmatique 7 jours post-chirurgie d'hémisection spinale cervicale en après du côté gauche et du côté droit pour le groupe SIAM (n=3) et le groupe Lesée (n=3).

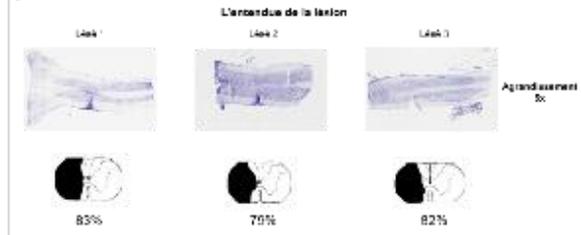
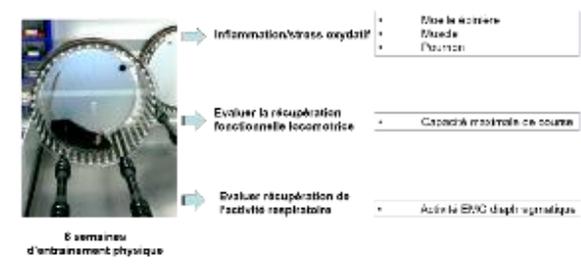


Figure 4. Représentation histologique des coupes (30µm). L'agencement et l'extension au cristal violet des lésions ont été évalués des souris lésées.

## Perspectives



## 22.4 CV

Isley DE JESUS  
Birth date: October 13<sup>th</sup> 1987  
13 rue Julien Perin, 92160 ANTONY  
E-mail : isley.de-jesus@uvsq.fr  
Cell phone : +33778567972  
[https://www.researchgate.net/profile/Isley\\_De\\_Jesus](https://www.researchgate.net/profile/Isley_De_Jesus)

### EDUCATION

<i>November 2017</i> <i>December 2020</i>	<b>PhD in Exercise physiology</b> , ED 566 SCIENCES DU SPORT, DE LA MOTRICITÉ ET DU MOUVEMENT HUMAIN « Respiratory and locomotor neuromodulation following spinal cord injury by non-invasive exercise therapeutics » Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, FRANCE Advisor: Pr Marcel BONAY <u>3 years fellowship from graduate school</u>
2014-2016	<b>Master degree in Exercise physiology</b> Federal University of São Carlos, BRAZIL
2009-2012	<b>Undergraduate degree in Physical education</b> Camilo Castelo Branco University, BRAZIL

### CERTIFICATES

<i>June 2018</i>	Surgery certification (rodent) « Formation réglementaire de base en chirurgie chez le rongeur de laboratoire » (Vetsalius, ICM, Paris)
<i>Mars 2018</i>	Level A in animal experimentation « Formation spécifique destinée aux personnes concevant ou réalisant des procédures expérimentales sur modèle rongeur » (Sorbonne University, Paris)
<i>Mars 2016</i>	Professional French courses-245h (FACEM, Paris)

### RESEARCH PROJECTS AND AWARD

<i>Since</i> <i>April 2018</i>	<b>Project designer</b> « Inflammatory and immune response following endurance or high intensity exercise in mouse » (Aparis #2018022817398715) UVSQ, UFR SSSV, UMR1179, Montigny-le-Bretonneux, Advisor: Pr Marcel BONAY
<i>Since</i> <i>Mars 2018</i>	<b>Project designer</b> « Respiratory and locomotor neuromodulation following spinal cord injury by exercise therapy » (Aparis # 2018011916127707) UVSQ, UFR SSSV, UMR1179, Montigny-le-Bretonneux, Advisor: Pr Marcel BONAY
2014-2016	<b>Master degree internship</b> « Role of aerobic physical training in the skeletal muscle pro and antiangiogenic balance following dexamethasone chronic treatment in Wistar rats » Federal University of São Carlos, Experimental exercise physiology laboratory (LEFEx), BRAZIL <ul style="list-style-type: none"><li><b>Award of International Society of Hypertension (3<sup>rd</sup> place)</b> «XXIII Congress of the Brazilian Society of Hypertension(SBH)</li></ul>

STUDENT SUPERVISION	
---------------------	--

<i>November 2019</i>	Imène LAMECHE, Undergraduate 3 <sup>rd</sup> year student, UVSQ (Voluntary internship)
<i>April-June 2019</i>	Marion BIARD, Master 1 student, UVSQ, Internship « Effect of rTMS on respiratory function following cervical spinal cord injury »
<i>June 2018</i>	Anne-Claire LAGROUX, Undergraduate 3 <sup>rd</sup> year student, UVSQ (Voluntary internship)

SKILLS	
--------	--

<b>Languages</b>	English (Level B1), French (Level C2), Portuguese (native language)
<b>Computing</b>	Graph pad, Fiji (ImageJ), LabChart 8 (electrophysiology), Image Lab, Bio-Rad CFX, Image Studio, SMASH (MATLAB), SigmaPlot (statistics)
<b>Behavior assessment</b>	Running behaviors on treadmill and motorized wheel system (mouse and rats)
<b>Physiology</b>	Surgery and microsurgery in rat and mouse (cervical spinal cord injury in mouse, intrapleural injection, tracheotomy, artery), electrophysiological recordings (diaphragm electromyography, diaphragmatic motor evoked potentials), systemic arterial pressure (carotid) recording, repeated transcranial magnetic stimulation (rTMS), intracardiac perfusion, injections ( <i>i.p.</i> , <i>i.m.</i> , <i>s.c.</i> et <i>gavage</i> )
<b>Molecular biology</b>	Western Blot, ELISA, rt-PCR, q-PCR, Histology, Immunohistochemistry/Immunofluorescence
<b>Others</b>	Cryosection, Confocal microscopy, Epifluorescence microscopy, Light microscopy

PEER-REVIEWED PUBLICATIONS	
----------------------------	--

Published or accepted:

1. Michel-Flutot P, Mansart A, Deramaudt TB, **De Jesus I**, Lee K-Z, Bonay M, et al. Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2020:103568
2. **Jesus, I.**, Vanhee, V., Deramaudt, T. B., & Bonay, M. Promising effects of exercise on the cardiovascular, metabolic and immune system during COVID-19 period. *Journal of Human Hypertension*.2020. 1-3.
3. **Jesus, I.**, Herrera, N. A., Andreo, J. C., Santos, C. F., & Amaral, S. L. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins. *Steroids*. 2020 156; 108573.
4. Herrera, N. A., **Jesus, I.**, Dionisio, E. J., Dionisio, T. J., Santos, C. F., & Amaral, S. L. Exercise training prevents dexamethasone-induced rarefaction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 Sep;70(3):194-201.
5. Herrera, N. A., **Jesus, I.**, Shinohara, A. L., Dionisio T. J., Santos, C. F., & Amaral, S. L. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. *J Hypertens*. 2016 Oct;34(10):1967-76.

Submitted:

1. **Jesus, I.**, Michel-Flutot, P., Deramaudt, T. B., Paucard, A., Vanhee, V., Vinit, S. and Bonay, M. Effects of low intensity exercise on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury. Submitted to Scientific reports.

## SCIENTIFIC COMMUNICATIONS

Oral presentation:

1. **Jesus, I.**, Deramaut, T. B., Vinit, S., Michel-Flutot, P., Ali, M., Paucard, A., Bonay, M. Development of a physical training model in spinal cord injured mice.

**(Congress of the Society of Integrative Physiology and Biology, June 2019, Montpellier, France).**

2. **Jesus I.**, Herrera, N. A., Constantino, P. B., Duchatsch, F., Amaral, S. L. Physical preconditioning prevents changes in the balance between angiogenic and apoptotic factors caused by dexamethasone.

**(XXIII Congress of the Brazilian Society of Hypertension (SBH), Rio de Janeiro, Brazil, August 2015).**

Poster published:

1. **Jesus, I.**, Vinit S., Deramaut, T. B., Michel-Flutot, P., Paucard, A., Bonay, M. Moderate training on forced exercise wheel following C2 SCI: Locomotor and respiratory effects in mice.

**(International Spinal Research Trust: 21st Annual Network Meeting, September 2019, London, UK).**

2. Michel-Flutot, P., Deramaut, T. B., Biard, M., **Jesus I.**, Bonay, M., Vinit, S. Chronic high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation treatment following C2 SCI: respiratory and molecular effects.

**(International Spinal Research Trust: 21st Annual Network Meeting, September 2019, London, UK).**

3. **Jesus, I.**, Herrera, N. A., Constantino, P. B., Duchatsch, F., Amaral, S. L. Physical preconditioning prevents VEGF reduces in treated rats with dexamethasone.

**(67° Annual Meeting of the Brazilian Society for the Progress of Science (SBPC), São Carlos, Brazil, July 2015).**

Poster unpublished:

1. Herrera, N. A., Constantino, P. B., **Jesus, I.**, Duchatsch, F., Amaral, S. L. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improve sympathetic activity for the vessels and prevent alterations in the microcirculation of skeletal muscles. **(Honorable mention).**

**(XXIV Congress of the Brazilian Society of Hypertension (SBH), July 2016, São Paulo, Brazil).**

2. Herrera, N. A., Constantino, P. B., **Jesus, I.**, Duchatsch, F., Amaral, S. L. Aerobic exercise training improves autonomic balance to the heart attenuates dexamethasone-induced hypertension.

**3<sup>rd</sup> Congress on Steroid Research. Chicago, USA, November 2015.**

## HOBBIES

Drawing, Photography, Running, Swimming, Travels