



HAL
open science

Physiopathologie respiratoire et cardiovasculaire suite à un trauma spinal cervical chez le rongeur

Pauline Michel-Flutot

► **To cite this version:**

Pauline Michel-Flutot. Physiopathologie respiratoire et cardiovasculaire suite à un trauma spinal cervical chez le rongeur. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ004 . tel-03624328

HAL Id: tel-03624328

<https://theses.hal.science/tel-03624328>

Submitted on 30 Mar 2022

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.

Physiopathologie respiratoire et cardiovasculaire suite à un trauma spinal cervical chez le rongeur

*Respiratory and cardiovascular pathophysiology following a cervical
spinal cord injury in rodent*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie
Graduate School : Santé et médicaments
Réfèrent : Université de Versailles -Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche END-ICAP (Université Paris-Saclay, UVSQ,
Inserm), sous la direction de Stéphane VINIT, Maître de Conférence, HDR

Thèse soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 28 Janvier 2022, par

Pauline MICHEL-FLUTOT

Composition du Jury

François VIALARD Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université Paris-Saclay	Président
Laurence BODINEAU Professeure des Universités, Université Sorbonne	Rapporteur & Examinatrice
Nicolas GUEROUT Maître, HDR, Université de Rouen Normandie	Rapporteur & Examineur
Julien BOUVIER Chargé de recherche, HDR, Université Paris- Saclay	Examineur
Fatiha NOTHIAS Directrice de recherche, Université Sorbonne	Examinatrice
Carole PLANES Professeure des Universités-Praticien hospitalier, Université Sorbonne	Examinatrice
Isabelle VIVODTZEV Chargée de recherche, HDR, Université Sorbonne	Examinatrice
Stéphane VINIT Maître de Conférence, HDR, Université Paris- Saclay	Directeur de thèse

Titre : Physiopathologie respiratoire et cardiovasculaire suite à un trauma spinal cervical chez le rongeur

Mots clés : lésion spinale, fonction respiratoire, fonction cardiovasculaire, rTMS

Résumé : Les traumatismes spinaux cervicaux induisent non seulement une insuffisance respiratoire en raison de la déafférentation des motoneurons innervant le diaphragme, mais aussi des déficits cardiovasculaires dus à la réduction des efférences sympathiques innervant le cœur et le système vasculaire. La mise au point de thérapeutiques visant à améliorer ces fonctions suite à une lésion spinale est donc nécessaire. Une partie de ce travail doctoral a donc consisté à améliorer les connaissances sur la physiopathologie des traumatismes spinaux. Au niveau fonctionnel, nous avons montré qu'en plus d'une paralysie hémidiaphragmatique permanente, une hémisection spinale unilatérale en C2 induit aussi un déficit systolique évalué par échocardiographie et caractérisée par une réduction de la fraction d'éjection du ventricule gauche. Cette lésion partielle conduit de plus à une réponse inflammatoire au niveau des motoneurons phréniques (localisés dans la moelle épinière C3-C6), mais aussi au niveau lésionnel (C1-C3), où la production de pièges extracellulaires a pu être observée par les neutrophiles infiltrants et la microglie activée par cytométrie en flux. La seconde partie de ce travail doctoral s'est concentrée sur l'évaluation de l'efficacité de la stimulation magnétique transcrânienne répétée sur la neuromodulation du réseau respiratoire. Nous avons ainsi montré que délivré de façon aiguë, notre protocole permet d'augmenter l'excitabilité du réseau phrénique. Délivré de façon chronique après trauma spinal, il permet de renforcer l'activité de l'hémidiaphragme intact afin de mieux compenser pour la perte d'activité de l'hémidiaphragme lésé. Malgré une absence d'effet sur l'activité basale de l'hémidiaphragme paralysé, un renforcement des voies croisées phréniques a pu être observé après traitement, laissant entrevoir de nouvelles thérapeutiques potentielles visant à induire une récupération fonctionnelle respiratoire après trauma spinal cervical.

.....

Title : Respiratory and cardiovascular pathophysiology following a cervical spinal cord injury in rodent

Keywords : spinal cord injury, respiratory function, cardiovascular function, rTMS

Abstract : High cervical spinal cord injuries induce a deafferentation of phrenic motoneurons innervating the diaphragm, leading to respiratory insufficiency. They also cause a reduction in the number of sympathetic afferences innervating the heart and vascular system, leading to cardiovascular dysfunction. The development of therapeutics aiming to improve functional outcomes following spinal injury is therefore essential. A part of this doctoral work aimed to improve knowledge about the pathophysiology of cervical spinal cord injury. At functional level, we showed that, in addition to a permanent hemidiaphragm paralysis, a unilateral C2 spinal cord injury also induces a systolic dysfunction evaluated by echography and characterized by a reduction in left ventricular ejection fraction. This incomplete lesion also leads to an inflammatory response in the sublesional phrenic motoneurons area (located in the C3-C6 spinal cord), and in the injured C1-C3 spinal cord where the formation of extracellular traps by infiltrating neutrophils and activated microglia is also observed using flow cytometry. The second part of this doctoral work evaluated the efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation on the neuromodulation of the phrenic system excitability. A chronic application of repetitive transcranial magnetic stimulation protocol following spinal cord injury allow to strengthen the uninjured hemidiaphragm activity that compensate for the loss of the paralyzed hemidiaphragm activity. Despite any effect on the paralyzed hemidiaphragm activity, a strengthening of the crossed phrenic pathways has been observed following chronic repetitive transcranial magnetic stimulation treatment. These encouraging results could lead to a new therapeutic avenue for respiratory neuronal disorders.

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mes deux rapporteurs de thèse, le Pr. Laurence BODINEAU et le Dr. Nicolas GUEROUT, pour avoir accepté de consacrer du temps à la lecture et l'évaluation de ce travail doctoral.

Je remercie également le Dr. Julien BOUVIER, le Dr. Fatiha NOTHIAS, le Pr. Carole PLANES, le Dr. Isabelle VIVODTZEV et le Pr. François VIALARD pour leur expertise apportée sur ce travail doctoral.

Je remercie le Dr. Luis GARCIA pour m'avoir accueillie au sein de l'unité INSERM 1179, et le Pr. Marcel BONAY pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe.

Mes plus sincères remerciements vont à mon directeur de thèse, le Dr. Stéphane VINIT. Tu as souhaité me recruter en thèse dès ma L3, j'espère que tu ne regrettes toujours pas ce choix. En ce qui me concerne, c'est une des meilleures choses qui me soient arrivées. Merci d'avoir été mon mentor durant toutes ces années, de m'avoir appris tout ce que tu pouvais, de m'avoir fait évoluer sur tous les plans possibles, de m'avoir ouvert au monde de la science en m'emmenant en congrès, et surtout d'avoir réussi (du moins je l'espère) à me faire sortir de ma boîte... Merci aussi pour la grande liberté que tu as su me laisser dans l'évolution de mes projets, et dans l'initiation de nouveaux. On s'est disputé un certain nombre de fois, et tu es la personne qui m'aie probablement fait le plus pleurer ces dernières années, mais globalement la quantité énorme de bons moments qu'on a passé ensemble l'emporte largement, comme les longues soirées, voire nuits de discussion autour d'un verre, de même que les midi, après-midi et soirs passés au BDT. Aussi, comment ne pas évoquer les BBQ chez toi où la viande a été claquée par notre brésilien préféré, et où la pastèque a brûlé vive... Merci aussi de m'avoir fait goûter au génépi, et de m'avoir appris à en préparer, je n'oublierais pas ce protocole ;-). Malheureusement pour toi, tu vas devoir me supporter encore longtemps dans ta vie, étant donné que je te dois un nombre infini de bières...

La deuxième personne que je tiens le plus à remercier est le Dr. Arnaud MANSART. Ces 5-6 dernières années n'auraient pas été les mêmes sans toi dans le coin. Merci d'avoir toujours été présent quand j'en avais besoin, que ce soit pour les manips, les papiers, les conseils, ou pour me soutenir moralement quand j'étais au fond du trou... Et encore désolée pour les fois où tu m'as servi de défouloir... Merci de m'avoir permis d'avancer dans un bon environnement et pour les souvenirs inoubliables qu'on s'est fait en congrès. Merci pour toutes nos conversations sur la vie, sur ta vie, sur la mienne, et pour tous les moments passés ensemble. Tu sais déjà tout le bien que je pense de toi et ce que tu représentes pour moi, je ne m'étalerai donc pas plus ici...

Je remercie l'ingénieure de recherche de mon équipe d'accueil, Thérèse DERAMAUDT, pour son soutien technique au cours de ces dernières années.

Merci à tous les doctorants passés et présents que j'ai côtoyé au laboratoire pour le soutien inter-étudiants apporté et nécessaire durant la thèse... Malika ALI, ta patience et ta persévérance ont vraiment forcé mon respect. Isley DE JESUS, ton calme brésilien (no stress) m'a toujours impressionné et fait envie, j'espère pouvoir refaire bientôt des congrès avec toi. Valentin VANHEE, continue d'avoir autant de bonnes idées, et fais tout pour les mener à bien. Tu es le plus gentil de la terre entière et pour la vie :-). Camille BOURCIER, je ne boirai plus jamais tes mojitos...

Merci au Dr. Simon GLATIGNY, à Elodie LAMY (et Jejo !) mes compagnons de labo et de week-end. Vous m'avez permis d'avoir un peu la tête hors de l'eau alors que je me sentais submergée. On remerciera aussi Harry Potter, The Crew et la GG de nous y avoir aidé. Et toi Chuchu, fais bien attention à Simon...

Laurie EFTHIMIADI, Graziella GRIFFITH et Aude ROBERT, merci pour les fondues, les barbecues, les soirées filles et pour tous les bons moments passés ensemble.

De même, merci aux autres doctorants de l'U1173 et de l'U1179. Laila EMAM, tu es sûrement la personne qui me ressemble le plus parmi les étudiants que j'ai croisés jusqu'à maintenant. Ne lâche rien, tu vas dépoter. Mais ne fais pas comme moi, essaye de prendre du temps pour toi... Hendrick MAMBU MAMBUENI, on se retrouve aux States ;-). Hamadoun TOURE, tu resteras à jamais mon mari du labo. Marion LAGUNE et Gina COSENTINO, courage les filles, c'est presque fini. Flavien BIZOT, garde ta bonne humeur, et continue à ne pas te laisser faire. Adrien MORIN, chaque nouveau poème écrit au tableau est un vrai divertissement. Merci aussi à Bilade CHERQAOUI, Marie BEAUFRERE et Amel AÏT SALI SAÏD de la team KK, votre bonne humeur aussi été un bon soutien.

Je remercie aussi Olivier LE COZ de la plateforme d'histologie, et Aude JOBART et Benoit MAURY de la plateforme d'imagerie, qui ont su répondre présent lors des différents problèmes rencontrés avec les machines, et pour toute l'aide apportée durant mes nombreuses expérimentations.

Merci au personnel de Pelvipharm pour les services rendus. En particulier Charline BRADESI, Sandrine COMPAGNIE et Pravina MUTHAN, vous faites un super job et on peut vraiment compter sur vous ;-).

Merci aussi à toutes les autres personnes qui ont été présentes durant ces quelques années. Adeline GASSER, merci pour ta bonne humeur, tes gâteaux, le schnaps, et toutes tes expressions de l'est qui nous ont bien fait rire. Valérie ROBIN, merci pour tes conseils et d'avoir pu jouer le rôle d'intermédiaire dans pas mal de situations. Gwenaël DAVID et Julien DATTOLA, merci pour votre réactivité et votre disponibilité pour les divers commandes qui ont été passées. Merci aux membres des différentes équipes avec qui j'ai pu interagir ces dernières années : l'équipe 1 de l'U1179, les équipes LARENES, IRIS et EPIM de l'U1173, le LGBC, SKY therapeutics, les sage-femmes et l'équipe GIG.

Je remercie aussi nos collaborateurs, Michael LANE, Kun-Ze LEE, Lana ZHOLUDEVA et Margo RANDELMAN, sans qui mon travail doctoral n'aurait sûrement pas pu être ce qu'il est.

Merci à mes petits stagiaires de master 1, Marion BIARD, Abderrahim OUGUERROUDJ, et Clémence BASIRE, qui m'ont permis d'apprendre la patience, à déléguer et à essayer de faire confiance.

Merci aussi aux personnels du PC sécurité et de Bouygues, en particulier Cyrille, Ludovic et Guillaume, d'avoir assuré notre sécurité durant toutes ces années en empêchant la chaudière de brûler, d'avoir empêché le bâtiment de finir sous l'eau, et aussi pour cette journée d'été où nous avons pu déguster de délicieux breuvages aromatisés.

Je remercie ma famille d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue depuis le début de mes études. Et surtout à mes parents de m'avoir laissé habiter chez eux jusqu'à la fin malgré mon âge avancé. C'est quand même plus agréable d'avoir une vie de famille plutôt que de vivre seul... Je sais que la séparation va être compliquée, mais ce sera pour mieux se retrouver après.

Merci à mes amies doctorantes Jessica MOREL et Marion PILLARD (ça fait longtemps qu'on partage le même bateau ;-), ainsi qu'à mes amies de collège/lycée, Camille, Carine (tu connais ma galère...), Delphine R, Audrey et Delphine M pour votre soutien, même si ça a pu être plus ou moins dur de se voir ces derniers temps...

Enfin, je remercie chaudement le Bistrot du Théâtre d'exister. Les repas, Happy Hour et soirées passées chez vous sont pleins de bons souvenirs, de moments de détente et de rigolade autour de nombreuses et délicieuses boissons. Vive le poulet pané et la brasserie O'Clock.

ABREVIATIONS

2DG : 2-Déoxy-D-Glucose
AIH : hypoxie intermittente aigue
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AMPC : adénosine monophosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ATF : activating transcription factor
ATP : adénosine triphosphate
BDNF : facteur neurotrophique issu du cerveau
BötC : complexe Bötzinger
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine
C/EBP : CAAT box enhancer binding protein
CaMK : molécules sensibles au calcium telles que les Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes
CIH : hypoxie intermittente chronique
CPG : central pattern generators
CPP : crossed phrenic phenomenon
CRE: cAMP recognition element
CREB : cAMP response element-binding protein
CSPG : protéines sulfate protéoglycane
CST : tractus corticospinal
CTB : cholera toxin subunit B
cVRG : groupe respiratoire ventral caudal
DAMPs : motifs moléculaires associés aux dommages
ECG : électrocardiographie
EdU : 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EES : stimulation électrique épidurale
EMG : électromyographie
FSC : moelle épinière fœtale
GAD : glutamate acid carboxylase
HK : hexokinase
Iba1 : ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL : interleukine
KCC2 : canal co-transporteur 2 du chlore et au potassium
LCR : liquide céphalo-rachidien
LKB1: liver kinase B1
LTD : dépression à long terme
LTP : potentialisation à long terme
MBP : myelin basic protein
MFI : intensité de fluorescence moyenne
MiETs : microglia extracellular traps
MMP9 : métalloprotéase matricielle 9
MPO : myéloperoxydase
mTOR: mammalian target of rapamycin
NETs : neutrophil extracellular traps
NGF : facteur de croissance nerveuse
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NOS : oxyde nitrique synthase
NPC : précurseurs neuronaux
Nrf2 : Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2
NT-3 : neurotrophine-3
NTS : tractus solitaire
OPC : précurseurs des oligodendrocytes
pCO₂ : pressions partielles en CO₂

PEM : potentiels évoqués moteurs
pFL : noyau parafacial latéral
pFv : noyau parafacial ventral
PGI : phosphoglucose isomerase
PiCo : complexe post-inspiratoire
PIP₂ : phosphatidylinositol (4,5) trisphosphate
PIP₃ : phosphatidylinositol (3,4,5) bisphosphate
PKA : adénosine monophosphate cyclique
pLTF : facilitation à long terme phrénique
pO₂ : pressions partielles en O₂
preBötC : complexe preBötzinger
PTEN : phosphatase and tensin homolog
PVN : noyau paraventriculaire
ROS : espèces dérivées de l'oxygène
RTN : noyau rétrotrapézoïde
rTSMS : stimulation magnétique trans-spinale répétée
RVLM : médulla ventrolatérale rostrale
RVMM : médulla ventromédiale rostrale
rVRG : groupe respiratoire ventral rostral
SC : stimulation conditionnante
sCPP : crossed phrenic phenomenon spontané
ST : stimulation test
TBS : stimulation thêta burst
TMS : stimulation magnétique transcrânienne
TNF α : facteur de nécrose tumoral α
Trk : récepteurs tyrosine kinases
VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire
WFA : wisteria floribunda agglutinin

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
ABREVIATIONS.....	6
TABLE DES MATIERES	10
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	16
INTRODUCTION GENERALE	19
PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	20
1. Plasticité générale dans le système nerveux central	20
1.1. Plasticité à court terme	20
1.2. Plasticité à long terme.....	22
1.2.1. Bases de la plasticité à long terme	23
1.2.2. Potentialisation et dépression à long terme	25
1.3. Remodelage des réseaux sains.....	26
1.3.1.1. Pendant la période post-natale.....	26
1.1.1.1. Chez l'animal adulte	28
2. Réorganisation des voies nerveuses après trauma spinal	31
2.1. Remodelage tissulaire et facteurs impliqués dans la plasticité post-lésionnelle	31
2.1.1. Processus délétères aigus au niveau de la zone lésionnelle	31
2.1.2. Formation de la cicatrice gliale.....	34
2.1.3. Facteurs favorisant la régénération et la repousse	39
2.1.4. Facteurs inhibiteurs de la plasticité.....	40
2.1.4.1. Chondroïtines sulfatées protéoglycanes (CSPG).....	40
2.1.4.2. Autres molécules extracellulaires inhibitrices.....	42
2.1.5. Facteurs intrinsèques	43
2.2. Réorganisation des circuits nerveux après lésion des voies corticospinales	45
2.2.1. Processus de bourgeonnement et de croissance axonale	45
2.2.2. Réorganisation des circuits nerveux après lésion des voies corticospinales	47
2.2.3. Réorganisation des circuits au niveau des centres corticaux.....	51
PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LES SYSTEMES NEURORESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE	53
1. Lésion en C2 au niveau du système neurorespiratoire	53
1.1. Réseau respiratoire chez l'animal sain	53
1.1.1. Physiologie respiratoire : anatomie fonctionnelle	53
1.1.2. Cycle respiratoire chez les mammifères.....	54
1.1.3. Génération du rythme respiratoire	57

1.1.4.	Modulation du rythme respiratoire	59
1.1.5.	Transmission du rythme respiratoire aux motoneurones phréniques médullaires..	60
1.2.	Physiopathologie respiratoire suite à un trauma spinal cervical	61
1.2.1.	Modèle préclinique de trauma spinal cervical en C2	62
1.2.1.1.	Impact ventilatoire d'une lésion spinale cervicale en C2.....	63
1.2.1.2.	Plasticité après lésion spinale cervicale : le « CPP ».....	63
1.2.2.	Effets moléculaires et cellulaires.....	69
1.2.2.1.	Dans le tronc cérébral	69
1.2.2.2.	Dans la corne ventrale de la moelle épinière C3-C6	70
2.	Impact d'un trauma cervical au niveau cardiovasculaire.....	72
2.1.	Système cardiovasculaire chez l'animal sain.....	72
2.1.1.	Anatomie cardiaque et vasculaire.....	72
2.1.2.	Systèmes nerveux autonome chez l'animal sain.....	74
2.1.2.1.	Le système sympathique.....	74
2.1.2.2.	Le système parasympathique.....	76
2.2.	Physiopathologie cardiovasculaire après trauma spinal	77
2.2.1.	Chez l'Homme	77
2.2.1.1.	Effets cardiovasculaires aigus.....	78
2.2.1.2.	Effets cardiovasculaires chroniques	79
2.2.2.	Chez les modèles précliniques	80
2.2.2.1.	Effets cardiovasculaires aigus.....	80
2.2.2.2.	Effets cardiovasculaires subaigus et chroniques.....	82
THERAPEUTIQUES VISANT A AMELIORER LES FONCTIONS RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE		
APRES TRAUMA SPINAL.....		
1.	Stratégies thérapeutiques connues	85
1.1.	Défi respiratoire : protocoles d'hypoxie intermittente.....	85
1.1.1.	Réponse à une hypoxie intermittente.....	86
1.1.2.	Chez les modèles précliniques de trauma spinal cervical	88
1.1.3.	Chez l'Homme après trauma spinal cervical	89
1.2.	Stimulation électrique épidurale.....	89
1.3.	Modification de l'environnement extracellulaire	91
1.4.	Greffes de nerfs.....	92
1.5.	Grefe de cellules.....	94
1.6.	Réhabilitation par l'exercice.....	96
2.	Stratégies thérapeutiques potentielles étudiées	98
2.3.	Stimulation magnétique transcrânienne (TMS)	98

2.3.1.	Utilisation comme outil de diagnostic de l'intégrité des voies nerveuses	99
2.3.1.1.	Stimulation unique	100
2.3.1.2.	Stimulations pairées	102
2.3.2.	Stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS)	103
2.3.2.1.	La rTMS dans le traitement de traumatismes du système nerveux	104
2.3.2.2.	Evaluation des effets de la rTMS chez les modèles précliniques	106
2.3.2.3.	Processus physiologiques et moléculaires impliqués	109
2.4.	Le 2-Déoxy-D-Glucose	112
2.4.1.	Voies impliquées	112
2.4.2.	Utilisation du 2-DG dans les modèles cellulaires et précliniques.....	113
2.4.3.	Utilisation du 2-DG en clinique.....	116
2.4.4.	Potentiels effets néfastes du 2-DG.....	117
	OBJECTIFS DE RECHERCHE	119
	RESULTATS.....	121
	Liste des publications présentées dans les résultats	122
1.	Physiopathologie chez le rat après trauma spinal cervical et application de thérapies innovantes	123
1.1.	Evaluation non-invasive de l'activité des muscles respiratoires chez le rat sain	123
1.2.	Effet d'une hémisection spinale en C2 sur les fonctions respiratoire et cardiovasculaire chez le rat à 7 jours post-lésion.....	130
1.3.	Résultats complémentaires : Etude de la neuroinflammation au niveau des motoneurones phréniques après trauma spinal cervical.....	157
1.3.1.	Vérification de l'étendue des lésions en C2	158
1.3.2.	Recrutement et activation de cellules immunitaires	158
1.3.3.	Expression de molécules inflammatoires dans les motoneurones phréniques.....	160
1.3.4.	Expression du facteur de transcription Nrf2 dans les motoneurones phréniques .	161
1.3.5.	Expression de l'AMPK phosphorylée dans les motoneurones phréniques.....	163
1.3.6.	Discussion	166
2.	Effet neuromodulateur de la stimulation transcrânienne répétée chez le rat après trauma spinal cervical	168
2.1.	Modulation de l'excitabilité du réseau phrénique par l'application d'un protocole aigu de stimulation magnétique transcrânienne répétée chez le rat sain	168
2.2.	Effets d'un protocole chronique de rTMS à haute fréquence sur la récupération fonctionnelle diaphragmatique après trauma spinal cervical.....	180
2.3.	Projet annexe dans un modèle de lésion du système nerveux périphérique : Evaluation des potentiels évoqués moteurs par stimulation magnétique trans-spinal après lésion du nerf tibial chez le rat	220

3.	Modulation de la glycolyse dans la neuroplasticité respiratoire et cardiovasculaire en réponse à un traumatisme cervical de la moelle épinière chez le rat	244
3.1.	Vérification de l'étendue des lésions en C2 et des variables physiologiques	244
3.2.	Effets ventilatoires.....	245
3.3.	Effets sur l'activité musculaire diaphragmatique.....	247
3.4.	Effets sur la pression artérielle.....	248
3.5.	Effets de l'hémisection spinale cervicale en C2 et du traitement au 2DG sur l'expression des CSPG dans la moelle épinière C3-C6.....	249
3.6.	Discussion	252
4.	Physiopathologie suite à une hémisection en C2 chez la souris	253
4.1.	Suivi de l'activité diaphragmatique chez la souris après hémisection spinale en C2	253
4.2.	Résultats préliminaires : Evaluation de la production de pièges extracellulaires par les cellules microgliales et les neutrophiles après hémisection en C2 chez la souris	264
4.2.1.	Introduction sur les pièges extracellulaires.....	264
4.2.2.	But de l'étude	265
4.2.3.	Identification des populations cellulaires d'intérêt.....	266
4.2.4.	Evaluation de la présence de NETs et de MiETs dans la moelle épinière C1-C3 après hémisection en C2	267
4.2.4.1.	Quantification des neutrophiles et des cellules microgliales au site de la lésion (C1-C3)	268
4.2.4.2.	Evolution de l'expression individuelle des marqueurs des pièges extracellulaires par mesure l'intensité de fluorescence moyenne (MFI)	269
4.2.4.3.	Evaluation du co-marquage des marqueurs des pièges extracellulaires chez les neutrophiles et les cellules microgliales dans la moelle épinière C1-C3.....	271
4.2.5.	Discussion	273
4.3.	Projet annexe : Effet d'un entraînement en aérobie forcé sur les muscles locomoteurs et respiratoire après hémisection spinale en C2 chez la souris	277
	DISCUSSION	293
1.	Effets physiopathologiques d'une lésion spinale cervicale incomplète.....	294
1.1.	Effets sur l'activité respiratoire	294
1.2.	Effets sur la fonction cardiovasculaire	295
1.3.	Effets inflammatoires	297
2.	Effets de thérapeutiques visant à induire de la plasticité respiratoire suite à une lésion spinale incomplète chez le rat	299
2.1.	Effet de l'application d'un protocole de rTMS à haute fréquence sur l'excitabilité du réseau neurorespiratoire	299
2.2.	Utilisation de la stimulation magnétique trans-spinale comme outil d'évaluation de la fonction nerveuse dans un modèle de trauma du système nerveux périphérique.....	302

2.3. Effet d'un traitement au 2-Déoxy-D-Glucose sur les fonctions respiratoire et cardiovasculaire.....	304
2.4. Effet de protocoles d'exercice sur l'activité respiratoire	306
REFERENCES	309

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Modulation de l'efficacité des synapses chimiques à court terme	21
Figure 2 : Les synapses axo-axonales peuvent inhiber ou faciliter la libération des neurotransmetteurs	22
Figure 3 : la sensibilisation à long terme repose sur la facilitation synaptique et la formation de nouvelles connexions synaptiques	25
Figure 4 : Plasticité structurale, poids versus connectivité	29
Figure 5 : Schéma des zones neurogéniques chez l'adulte dans le cerveau et la moelle épinière	31
Figure 6 : Corrélation entre les cinétiques d'expression des cytokines proinflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires	34
Figure 7 : Composition cellulaire et extracellulaire de la cicatrice post-trauma spinal	35
Figure 8 : Temporalité de la formation de la cicatrice	38
Figure 9 : Schéma montrant la structure des lecticans	41
Figure 10 : Organisation du cône de croissance axonal et du bulbe terminal dystrophique	47
Figure 11 : Représentation schématique des projections du tractus corticospinal (CST) après lésion unilatérale de la moelle épinière	48
Figure 12 : Bourgeonnement des fibres du CST sur les neurones propriospinaux	50
Figure 13 : Restauration de la fonction locomotrice évaluée par le BBB score après contusion thoracique chez le rat	51
Figure 14 : Réorganisation de la carte corticale motrice après amputation du bras chez le macaque	52
Figure 15 : Anatomie du système respiratoire	54
Figure 16 : Représentation schématique des étapes du cycle respiratoire	56
Figure 17 : Schéma des régions respiratoires du tronc cérébral	57
Figure 18 : Schéma représentant la théorie des « Bursts et burstlets »	59
Figure 19 : Voies descendantes respiratoires innervant les motoneurones phréniques	61
Figure 20 : Modèle d'hémisection spinale en C2 chez le rongeur	62
Figure 21 : Schéma illustrant le mode de déclenchement du « CPP »	64
Figure 22 : Modifications morphologiques sous-tendant le « CPP » au niveau des noyaux phréniques	67
Figure 23 : Anatomie schématique cardiaque et vasculaire	73
Figure 24 : Schéma illustrant le contrôle sympathique et parasympathique du système cardiovasculaire	76
Figure 25 : Tracés représentatifs du déclin phrénique post-hypoxie	86
Figure 26 : pLTF induite par AIH sévère ou modérée	87
Figure 27 : Effet de la chondroïtinase ABC l'activité diaphragmatique	92
Figure 28 : Activité spontanée d'une unité d'un nerf périphérique greffé dans la moelle épinière C2	93
Figure 29 : Restauration du système respiratoire après trauma spinal par transplantation cellulaire	95
Figure 30 : Exercice forcé versus exercice volontaire après trauma spinal	96
Figure 31 : Stimulation magnétique transcrânienne	98
Figure 32 : Représentation schématique d'une stimulation magnétique transcrânienne (TMS) avec enregistrement de PEM	99
Figure 33 : Représentation des modulations intracorticales induites par stimulations paires de TMS	103
Figure 34 : Exemple de protocoles de rTMS et de stimulation thêta burst	104
Figure 35 : Réduction de la glycolyse par le 2-Déoxy-D-Glucose (2-DG)	112
Figure 36 Quantification de l'étendue des lésions spinales en C2	158

Figure 37 : Surface occupée par les cellules CD11b ou CD68 positives dans la moelle épinière C3-C6	159
Figure 38 : Expression de iNOS et NADPH-oxydase dans les motoneurones phréniques déafférentés	160
Figure 39 : Expression de Nrf2 dans les motoneurones phréniques déafférentés	162
Figure 40 : Expression de l'intensité du marquage p-AMPK dans les motoneurones phréniques	165
Figure 41 : Schéma récapitulatif de l'effet d'une axotomie suite à une lésion spinale sur la modulation de l'AMPK phosphorylée.	167
Figure 42 : Quantification de l'étendue des lésions spinales en C2	245
Figure 43 : Effets ventilatoires de l'hémisection en C2 et du traitement au 2-DG	246
Figure 44 : Effets de l'hémisection spinale en C2 et du traitement au 2-DG sur l'activité respiratoire	247
Figure 45 : Effet de l'hémisection en C2 et du traitement au 2-DG sur la pression artérielle moyenne.	249
Figure 46 : Effets de l'hémisection en C2 et du traitement au 2-DG sur l'expression des CSPG dans la moelle épinière C3-C6.	251
Figure 47 : Stratégie de gating utilisée pour la sélection des neutrophiles et des cellules microgliales	267
Figure 48 : nombre et fréquence de neutrophiles vivants présents dans la moelle épinière C1-C3	268
Figure 49 : nombre et fréquence de cellules microgliales vivantes présentes dans la moelle épinière C1-C3	269
Figure 50 : Mesure de la MFI pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans la moelle épinière C1-C3 chez les neutrophiles	270
Figure 51 : Mesure de la MFI pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans la moelle épinière C1-C3 chez les cellules microgliales.	271
Figure 52 : Co-marquage pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans les neutrophiles individuels	272
Figure 53 : Co-marquage pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans les cellules microgliales individuelles	273

INTRODUCTION GENERALE

Les traumatismes spinaux consistent en une atteinte physique de la moelle épinière. Au niveau mondial, on recense entre 250 000 et 500 000 nouveaux cas par an selon l'OMS (OMS., 2013), avec une incidence comprise entre 8,2 et 19,4 pour un million d'habitants en France (Jazayeri et al., 2015). Toujours selon l'OMS, les hommes sont au moins deux fois plus à risque que les femmes (OMS., 2013), et ces traumatismes sont le plus souvent la conséquence d'accidents motorisés, de chutes, de violences ou bien liés à la pratique d'un sport et peuvent conduire à une parésie ou une paralysie musculaire. Lorsque ces lésions atteignent la région cervicale (ce qui est le plus courant), celles-ci entraînent des déficits moteurs et sensoriels, ainsi qu'une perturbation des systèmes nerveux autonomes qui contrôlent entre autres, la fonction respiratoire, les fonctions cardiovasculaires, la thermorégulation ou encore les fonctions sexuelles (Hou and Rabchevsky, 2014).

Cependant, aucun traitement n'existe à ce jour pour induire la récupération fonctionnelle complète des fonctions perdues suite à ces traumatismes. En effet, une lésion cervicale incomplète permet une récupération partielle spontanée des fonctions respiratoires et somatiques en raison de la mise en place d'évènements neuroplastiques. Cette récupération reste cependant très limitée au niveau des voies spinales épargnées (Ghali, 2017).

Ainsi, la recherche et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer la récupération des fonctions respiratoires et cardiovasculaires chez les patients atteints de lésions cervicales hautes sont indispensables afin d'améliorer leurs conditions de vie, principalement en supprimant l'assistance respiratoire nécessaire à leur survie, ainsi qu'en limitant leurs déficits cardiovasculaires.

Dans ce contexte, ce travail doctoral a consisté d'une part en l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie respiratoire et cardiovasculaire sur un modèle préclinique d'hémisection spinale en cervical 2 chez le rat et la souris, modèle utilisé dans mon laboratoire d'accueil. D'autre part, le développement de thérapeutiques visant à induire une récupération fonctionnelle respiratoire et cardiovasculaire chez nos modèles précliniques a aussi été étudié.

PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1. Plasticité générale dans le système nerveux central

Le terme de plasticité désigne la capacité du système nerveux à s'adapter et à induire des modifications structurelles, cellulaires et moléculaires à court ou à long terme en cas de besoin. Ce concept est à mettre en parallèle avec celui de modulation qui résulte en des modifications transitoires du système. Ainsi, les connexions synaptiques peuvent adapter leur fonction et leur structure en réponse à une expérience, telle que des changements environnementaux, des privations sensorielles, ou encore en cas de trauma ou de pathologie. Ainsi, l'efficacité d'une synapse chimique connectant deux neurones peut être modulée à plus ou moins long terme, soit au travers d'un renforcement, soit d'un affaiblissement de la force de transmission synaptique, par l'action de facteurs intrinsèques ou extrinsèques. Ces modifications peuvent se faire au niveau présynaptique par une modulation du nombre de neurotransmetteurs libérés par les vésicules, au niveau postsynaptique par une modification de la réponse à ces neurotransmetteurs, ou encore au niveau morphologique par la formation, la destruction, la croissance ou la rétractation de dendrites ou de synapses. Par ailleurs, la genèse de nouvelles cellules neuronales représente aussi une forme de plasticité dans le sens où le remplacement de cellules mortes ou en apoptose permet de maintenir une activité fonctionnelle stable dans certaines régions du système nerveux.

1.1. Plasticité à court terme

Il existe plusieurs types de plasticité à court terme qui peuvent durer de moins d'une seconde à plusieurs jours. La facilitation synaptique consiste en une augmentation de la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique en réponse à une activité neuronale accrue (Capogna, 1998). En effet, la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique fait suite à une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, qui est ensuite repompé hors de la cellule pour mettre fin au signal et ainsi retrouver une concentration intracellulaire physiologique. Or, lors de stimulations rapides et rapprochées (stimulations téaniques) de courte durée, la clairance du calcium intracellulaire ne se fait pas assez rapidement et il y a présence de calcium résiduel dans la terminaison axonale. En conséquence, la concentration intracellulaire en Ca^{2+} lors de la stimulation suivante est augmentée, ainsi que la libération de neurotransmetteurs par exocytose. Ce phénomène pourrait être dû en partie à l'occupation des sites de fixation du calcium sur la synaptotagmine (molécule déclenchant la libération des neurotransmetteurs) qui n'est pas maximale à l'état basal, et est donc augmenté lors de stimulations téaniques (Schneppenburger and Neher, 2000; Fernández-Chacón et al., 2001). De plus, cette facilitation synaptique peut être maintenue durant plusieurs minutes après la

fin de la stimulation tétanique (potentialisation post-tétanique) en raison de l'activation de Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) suite à l'augmentation accrue de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ (Figure 1A). Les CaM kinases pourraient en effet être impliquées dans l'encrage des vésicules à la membrane présynaptique. La dépression synaptique est, à l'inverse, une réduction du nombre de neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique après stimulation du neurone. Elle est généralement due à une déplétion du pool de neurotransmetteurs disponibles suite à une longue série de stimulations rapprochées (Figure 1B) (Kandel et al., 2013).

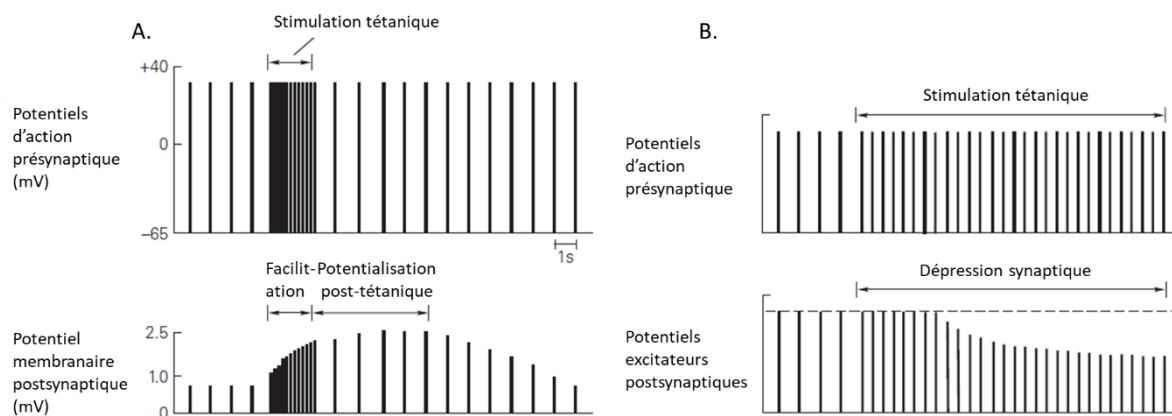


Figure 1 : Modulation de l'efficacité des synapses chimiques à court terme

Une stimulation tétanique à haute fréquence sur une courte durée induit une augmentation de la libération des neurotransmetteurs, et donc à une facilitation synaptique (A). Une stimulation tétanique récurrente va conduire à une déplétion du pool de vésicules contenant les neurotransmetteurs et mener à une dépression synaptique (B). Adapté de *Kandel et al. (2013)*.

Des connexions axo-axonales sur les terminaisons synaptiques des neurones peuvent aussi contrôler l'activité de ces derniers. En effet, ces connexions axo-axonales permettent d'augmenter ou de réduire l'influx calcique, et donc d'induire une facilitation ou une inhibition de la libération des neurotransmetteurs à la terminaison synaptique d'un neurone. On parle ici de facilitation présynaptique et d'inhibition présynaptique respectivement. L'inhibition présynaptique reposerait en partie sur l'activation des récepteurs ionotropiques GABAergiques de type A. Ces récepteurs canaux laissent entrer le Cl⁻, induisant une diminution du potentiel de membrane, et donc de l'amplitude du potentiel d'action dans la terminaison synaptique, résultant en un influx calcique réduit. Il en découle une moindre libération de neurotransmetteurs (Kandel et al., 2013) (Figure 2A). La facilitation présynaptique reposerait quant à elle sur l'activation de la Protéine Kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (PKA) suivant la fixation de la sérotonine sur son récepteur couplé à la protéine G. Ses sous-unités catalytiques vont induire la fermeture des canaux K⁺ dans la terminaison

axonale (Mintz and Korn, 1991; Squire and Kandel 1999). Le potassium sortirait alors en quantité moindre dans la terminaison synaptique, prolongeant ainsi la dépolarisation membranaire induite par le potentiel d'action. Cela mène alors à une augmentation de l'influx calcique, et par conséquent, à une augmentation de la libération de neurotransmetteurs (Figure 2B).

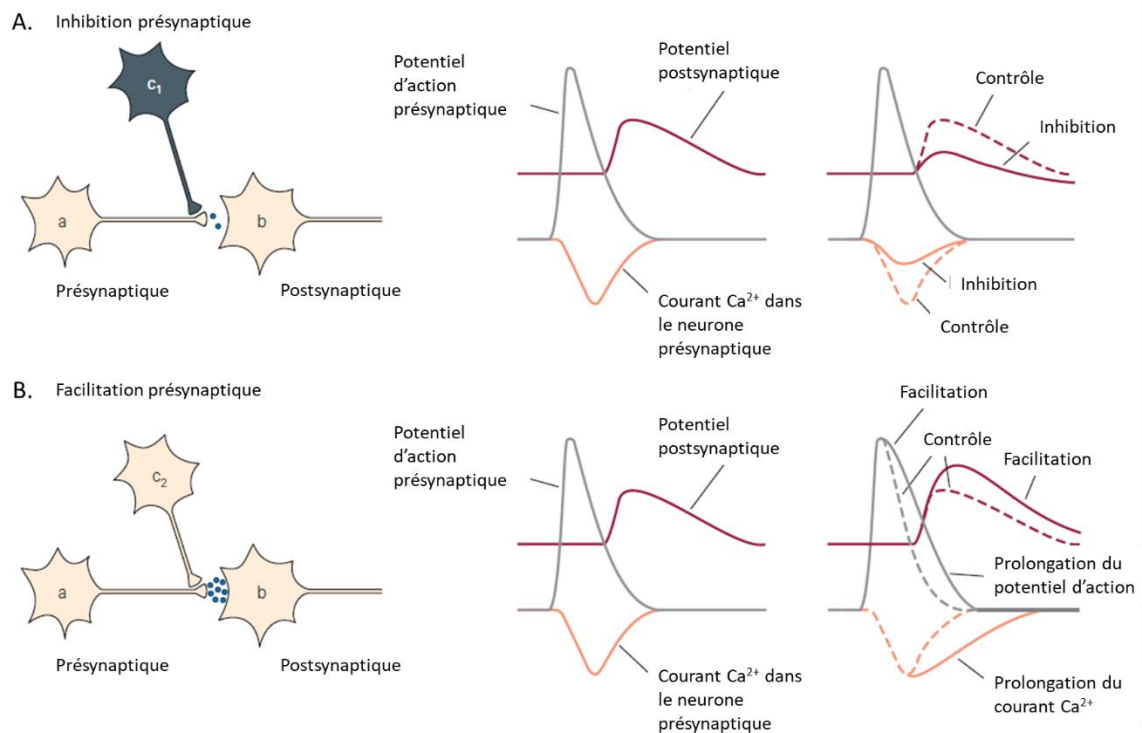


Figure 2 : Les synapses axo-axonales peuvent inhiber ou faciliter la libération des neurotransmetteurs

A. Le neurone inhibiteur c_1 forme une synapse sur la terminaison axonale du neurone a . La libération de neurotransmetteurs par c_1 active les récepteurs GABAergiques sur la terminaison synaptique du neurone a , ce qui inhibe l'influx de Ca^{2+} . Il y a alors réduction de la libération de neurotransmetteurs par a sur le neurone b , induisant une réduction de l'amplitude du potentiel exciteur postsynaptique dans le neurone b . Ce processus a été nommé inhibition présynaptique. **B.** Le neurone facilitateur c_2 forme une synapse sur l'axone du neurone a . La libération de neurotransmetteurs par c_2 active des récepteurs métabotropiques qui vont par exemple phosphoryler la PKA, qui va indirectement induire une augmentation de l'influx calcique dans la terminaison synaptique de a . Il en résulte une augmentation de la libération de neurotransmetteurs par a sur le neurone b , induisant une augmentation de l'amplitude du potentiel exciteur postsynaptique dans le neurone b . Ce processus a été nommé facilitation présynaptique. Adapté de *Kandel et al.* (2013).

1.2. Plasticité à long terme

Les processus de plasticité à court terme présentés précédemment permettent de modifier l'efficacité synaptique sur une échelle de temps relativement courte, c'est-à-dire de l'ordre de quelques jours au maximum. Ils ne peuvent donc pas sous-tendre les changements neuronaux responsables de changements dont les effets sont toujours observés des années après, tels que la formation puis la consolidation de souvenirs. Ces phénomènes de plasticité à long terme vont

impliquer d'une part l'activation, la phosphorylation, la déphosphorylation, ou encore l'inhibition de molécules, mais aussi la modification de l'expression génique, afin d'induire des modifications durables des réseaux neuronaux.

1.2.1. Bases de la plasticité à long terme

La complexité des réseaux neuronaux chez l'Homme et chez les autres mammifères rend difficile l'étude de ces processus de plasticité à long terme chez ces espèces. Leur étude chez des organismes possédant des réseaux neuronaux simples a donc été initialement privilégiée. Ainsi, le modèle ayant permis de mettre en évidence les processus sous-tendant les formes simples d'apprentissage est l'aplysie (Pinsker et al., 1970; Mauelshagen et al., 1996; Kandel, 2001).

Le principe d'habituation a été démontré physiologiquement chez l'aplysie. Le fait de toucher son siphon active des mécanorécepteurs sensoriels qui vont, par l'intermédiaire d'interneurones et de motoneurones, provoquer la rétractation immédiate de la branchie. Si ce stimulus est répété plusieurs fois, les connexions monosynaptiques du mécanorécepteur vers l'interneurone et le motoneurone vont s'affaiblir. Ce phénomène va induire une réduction de la réponse réflexe de retrait de la branchie. Les changements d'efficacité des synapses peuvent ici durer de quelques minutes à plusieurs semaines selon le nombre de trains et de répétitions de stimulation du siphon (Pinsker et al., 1970).

Un processus à la fois complémentaire, mais inverse à celui de l'habituation est la sensibilisation. La répétition d'un stimulus non nocif va induire de l'habituation comme décrit plus haut (diminution du retrait de la branchie), alors que la répétition d'un stimulus nociceptif va induire une réponse de retrait ou de peur chez les animaux (par exemple, retrait de la branchie chez l'aplysie), et cette réponse sera par la suite retrouvée pour des stimuli non nociceptifs, mais similaires appliqués à posteriori. Tout comme l'habituation, la sensibilisation peut être de courte ou de longue durée. Ce phénomène résulte d'une augmentation de la transmission synaptique en partie au niveau des interneurones et des motoneurones impliqués dans le circuit réflexe de retrait de la branchie et impliquant des interneurones modulateurs. Le type de modulateur le plus étudié est sérotoninergique et son mode d'action correspond à celui de la facilitation présynaptique décrite dans le paragraphe précédent. Cette facilitation présynaptique (tout comme l'inhibition présynaptique) est à la base de l'habituation et de la sensibilisation à long terme.

Chez l'aplysie, c'est la sensibilisation à long terme qui a été le processus le plus étudié. En plus de la modification de l'efficacité synaptique, elle implique aussi des processus de croissance de nouvelles connexions synaptiques. Le passage de la mémoire à court terme à la mémoire à long terme est appelé « consolidation » et requiert la synthèse de nouvelles protéines. Une concentration intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) prolongée suite à une application

répétée de sérotonine induit une plus longue activation de la PKA. Ses sous-unités catalytiques peuvent alors se transloquer dans le noyau du neurone sensoriel, où elles vont phosphoryler le facteur de transcription « C-AMP Response Element-binding protein » -1 (CREB). CREB-1 se fixe ensuite sur son promoteur « cAMP recognition element » (CRE). Deux des gènes alors exprimés et importants dans les processus de plasticité sont l'hydrolase (augmente l'activité de la PKA) et la « CAAT box enhancer binding protein » (C/EBP) (induit la formation de nouveaux cônes de croissance axonaux) (Kandel et al., 2013) (Figure 3). Il a par la suite été montré que la synthèse locale de molécules à la synapse était impliquée dans le contrôle de l'efficacité synaptique à la jonction neurone sensoriel – motoneurone (Martin et al., 1997).

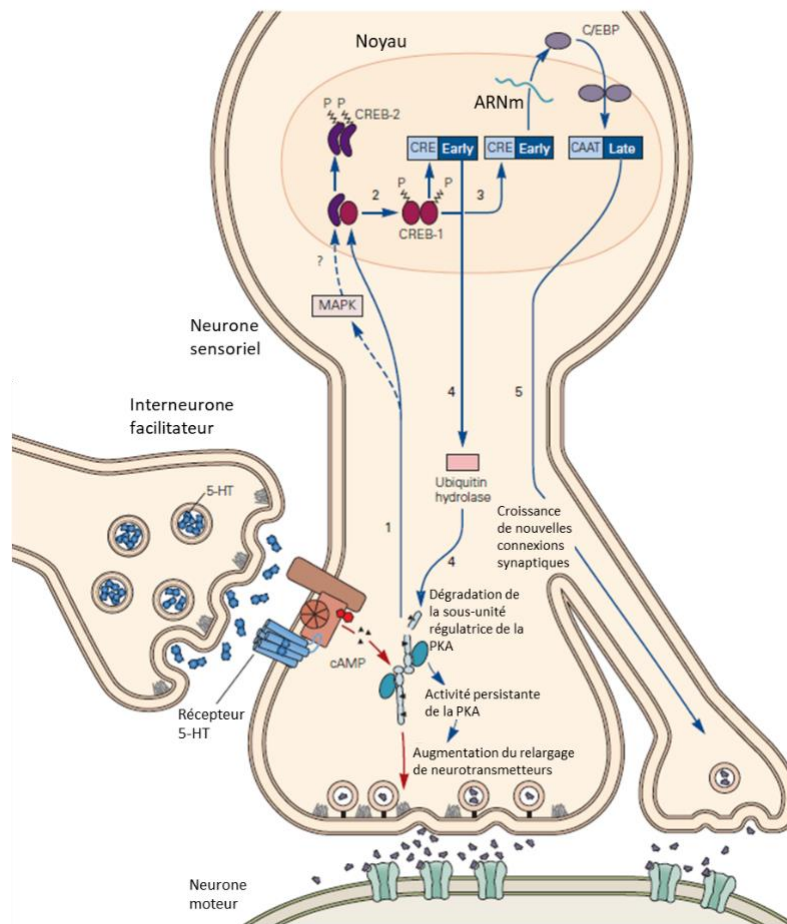


Figure 3 : la sensibilisation à long terme repose sur la facilitation synaptique et la formation de nouvelles connexions synaptiques

La sensibilisation à long terme du réflexe de retrait de la branchie chez l'aplysie mène à une activité persistante de la PKA, ce qui induit la croissance de nouvelles connexions synaptiques. Des chocs électriques répétés sur la queue induisent une augmentation plus prononcée d'AMPc, produisant une facilitation à long terme (qui dure 1 ou plusieurs jours) qui dure bien après que le taux d'AMPc soit de retour à l'état basal, et nécessite la synthèse de nouvelles protéines. La PKA va se transloquer dans le noyau où elle va phosphoryler CREB-1. CREB-1 se fixe sur le site régulateur CRE, ce qui va induire la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité à long terme, incluant l'hydrolase qui induit une activité persistante de la PKA, et C/EBP qui est impliquée dans la formation de nouvelles synapses. Adapté de *Kandel et al. (2013)*.

1.2.2. Potentiation et dépression à long terme

Pour la potentialisation synaptique à plus long terme, deux processus bien connus sont la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD). En ce qui concerne la LTP, elle a été découverte en 1973 dans l'hippocampe par Bliss et Lømo, chez le lapin anesthésié (Bliss and Lømo, 1973). Ils ont stimulé à haute fréquence la voie perforante, ce qui a induit une augmentation des potentiels synaptiques évoqués dans les cellules granulaires du gyrus denté. La LTP concerne la plupart des synapses glutamatergiques et n'est pas spécifique de l'hippocampe. Elle a été mise en évidence

chez plusieurs autres espèces, dont l'Homme. Elle est cependant spécifique des synapses activées et peut influencer l'efficacité synaptique des synapses voisines. L'induction de la LTP passe initialement par les récepteurs kaïnate, les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA), qui sont des récepteurs canaux dont le ligand est le glutamate. Le canal des récepteurs NMDA est normalement bloqué par le magnésium au repos. Une première dépolarisation de la membrane induite par l'activation des récepteurs AMPA est nécessaire pour éjecter le magnésium du canal du récepteur NMDA. Cela permet l'entrée d'une grande quantité de Ca^{2+} par les récepteurs AMPA et NMDA ce qui entraîne des cascades de kinases telles que la CaMK, la PKC ou la MAPK (Davis et al., 2000; Herring and Nicoll, 2016). Ces molécules vont phosphoryler les protéines impliquées à la fois dans l'insertion de récepteurs AMPA supplémentaires à la membrane, mais aussi dans la production de molécules qui initient et/ou maintiennent la LTP, telles que Homer, Arc, le facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF), CREB ou encore Zif268 (Bozon et al., 2003; Inoue et al., 2009; Bramham et al., 2010; Panja and Bramham, 2014; Veyrac et al., 2014).

La LTD peut quant à elle être induite dans l'hippocampe lorsque la stimulation est faite à basse fréquence (<5 Hz). Elle est tout comme pour la LTP spécifique des synapses actives et se déclencherait lorsque le taux de calcium est faible au niveau postsynaptique suite à une stimulation par le glutamate. Le calcium présent activerait préférentiellement des phosphatases, qui déphosphoryleraient alors leurs cibles, telles que la calcineurine, et induiraient *in fine* une internalisation des récepteurs AMPA (Connor and Wang, 2016).

Ces deux processus sont basés sur une interaction entre le calcium et des molécules sur lesquelles il se fixe, plus ou moins préférentiellement, soit des kinases impliquées dans la LTP si en forte concentration, soit des phosphatases si en faible concentration, et cela après fixation du glutamate sur ses différents récepteurs sur la membrane postsynaptique. Les changements induits peuvent ainsi perdurer et sous-tendent les processus d'apprentissage et de mémoire à long terme.

Ainsi, les synapses présentent plusieurs formes de plasticité à plus ou moins long terme, impliquant divers processus et molécules. Ces modifications sont cependant généralement basées sur des changements dans la signalisation calcique. Ces processus trouvent donc leur écho dans la recherche de thérapeutiques visant à moduler la plasticité synaptique après trauma spinal, à l'image de ce qui est présenté dans ce manuscrit.

1.3. Remodelage des réseaux sains

1.3.1.1. Pendant la période post-natale

Les circuits neuronaux du cerveau finissent leur développement durant la période postnatale, c'est-à-dire à partir de la naissance et jusqu'à plusieurs mois ou années selon la durée de vie de l'espèce.

Le cerveau finit son modelage, qui est basé sur l'expérience de l'individu durant des périodes dites « critiques » ou « sensibles » (Hubel and Wiesel, 1970). Ces périodes critiques correspondent à des fenêtres de temps où la plasticité de l'individu est potentialisée pour ses différentes modalités. Ces périodes critiques ont été bien documentées chez les modèles animaux dans le système sensoriel, en particulier dans le système visuel (Hensch, 2005; Kasamatsu and Imamura, 2020).

Chez plusieurs espèces, dont le chat, le fait de garder un seul œil fermé durant une brève période postnatale (période critique) induit une perte irréversible de l'acuité visuelle pour cet œil malgré l'absence de dommage physique au niveau de la rétine ou du thalamus visuel, ce qui représente donc une forme de plasticité inappropriée (Hubel and Wiesel, 1965, 1970; Shatz and Stryker, 1978). L'amblyopie se développe en fait dans le cortex visuel primaire où les informations venant des deux yeux convergent et entrent en compétition pour l'espace leur étant chacun dédié (Berardi et al., 2000). Ainsi, les cellules recevant les informations venant de l'œil ouvert seront plus nombreuses et prendront donc plus de place que celles dédiées à l'œil fermé dans le cortex visuel primaire, d'où la dominance oculaire observée par la suite chez ces chatons. Plus précisément, le néocortex des mammifères est organisé en colonnes corticales (unités fondamentales). Ainsi, obstruer un œil durant la période critique conduit à l'expansion des colonnes recevant leurs informations de l'œil ouvert, au détriment, donc, des colonnes recevant leurs informations de l'œil obstrué. Ces dernières perdent donc en taille et ne peuvent plus interpréter correctement les informations « complexes » qu'elles reçoivent par la suite (lorsque l'œil n'est plus obstrué) (Wiesel and Hubel, 1963; Shatz and Stryker, 1978; Rauschecker and Singer, 1982). La compétition binoculaire sous-tend donc les modifications induites par la perturbation des afférences visuelles, comme l'ont caractérisé Hubel et Wiesel (Hubel and Wiesel, 1965; Wiesel and Hubel, 1965). Le système GABAergique est en partie impliqué dans ces modifications observées. En effet, bloquer le système GABAergique dans le cortex visuel par l'utilisation de souches de souris génétiquement modifiées (privation du gène codant pour la « glutamate acid carboxylase » (GAD) 65) rend celles-ci insensibles à l'obstruction monoculaire (Hensch et al., 1998; Fagiolini and Hensch, 2000). De plus, augmenter l'inhibition locale durant la période critique par injection de benzodiazépines (diazépam), des modulateurs allostériques positifs des récepteurs GABA_A, induit une augmentation de 30% de la taille des colonnes corticales visuelles, alors que l'injection d'un modulateur allostérique négatif des récepteurs GABA_A (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-β-carboline, DMCM) induit une réduction de leur taille chez des chatons (Hensch and Stryker, 2004). Le système adrénergique dans le cortex visuel serait aussi impliqué dans la plasticité visuocorticale après obstruction monoculaire. En effet, la perfusion locale de propranolol (β-bloquant) réduit la modification de dominance oculaire normalement observée (Kasamatsu and Shirokawa, 1985; Kasamatsu and Imamura, 2020).

De même, il existe des périodes critiques pour la mise en place des systèmes neuronaux en ce qui concerne la posture et la locomotion, et durant lesquelles les afférences vestibulaires et les voies descendantes locomotrices se développent (Clarac et al., 1998). En effet, chez le rat, un développement graduel des voies descendantes impliquées dans le contrôle de la posture et de la locomotion est observé dans le funicule ventral. Les motoneurones aussi sont dans une forme immature à la naissance. Ainsi, il a été observé par traçage rétrograde (horseradish peroxidase ou fluorescent dextran amine) qu'à la naissance, chez le rat, les motoneurones innervant les quadriceps sont de petite taille et ne possèdent que peu, voire pas de dendrites, et dont la taille est plus petite que la normale. D'un à trente jours post-naissance, les dendrites se développent, et entre cinq et quatorze jours post-naissance, le soma des motoneurones gagne en taille. De plus, la densité de l'innervation sérotoninergique, qui n'est que peu développée à la naissance, augmente avec l'âge (Tanaka et al., 1992). Ainsi, l'injection d'un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase (p-chlorophenylalanine) en intrapéritonéal chez des rats nouveau-nés a montré que ceux-ci présentaient un retard dans le développement locomoteur (Myoga et al., 1995). Les voies descendantes qui participent à l'activité des « central pattern generators » (CPG) ne sont ainsi que partiellement fonctionnelles à la naissance.

La période critique durant laquelle une plasticité accrue de ce système nerveux immature est observée ne doit donc pas être perturbée au risque d'observer des retards de développement sensoriels ou locomoteurs.

1.1.1.1. Chez l'animal adulte

La transition à l'âge adulte est caractérisée par une réduction du potentiel plastique des circuits neuronaux (Hooks and Chen, 2020; Ribic, 2020). Des expériences chez les modèles animaux et l'Homme ont cependant montré que des phénomènes plastiques pouvaient aussi être observés dans le cortex adulte (Binda et al., 2018; Baroncelli and Lunghi, 2021).

Une série d'expériences a montré que la modulation de la plasticité du cortex visuel décrite dans la partie précédente n'était pas restreinte à la période postnatale. L'obstruction monoculaire peut ainsi stimuler la réorganisation fonctionnelle des circuits visuels adultes (Hofer et al., 2006), bien que l'effet soit qualitativement et quantitativement différent chez les animaux juvéniles par rapport aux animaux adultes (Hofer et al., 2006; Morishita and Hensch, 2008; Sato and Stryker, 2008). Plus précisément, chez des souris juvéniles durant la période critique, l'obstruction monoculaire induirait une réduction des réponses corticales en raison de l'œil obstrué, suivit d'une potentialisation des réponses induites par l'œil ouvert, alors que chez l'adulte, le cortex visuel ne présente qu'une potentialisation différée des réponses induites par l'œil ouvert (Frenkel and Bear, 2004).

Des résultats similaires ont été montrés dans le cortex somatosensoriel. Ainsi, couper une partie des vibrisses induit une augmentation de la réponse à la stimulation des vibrisses restantes chez la souris adulte (Glazewski et al., 2000). De même, chez la souris adulte, couper les vibrisses induit aussi un remodelage structural des épines dendritiques des neurones du cortex somatosensoriel. En particulier, la croissance des épines dendritiques précède la formation des synapses, et ces nouvelles synapses ont plutôt tendance à se former à partir de boutons synaptiques préexistants (Knott et al., 2006). Ces résultats mettent en évidence que la plasticité corticale chez l'adulte passe en partie par un remodelage du nombre et du poids des synapses impliquant les dendrites (Figure 4). Ces modifications des patterns de connexion synaptique sous-tendraient aussi les processus de stockage de la mémoire à long terme, et passeraient par la formation et l'élimination, ainsi que la croissance et la rétractation des épines dendritiques (Stepanyants et al., 2002; Chklovskii et al., 2004).

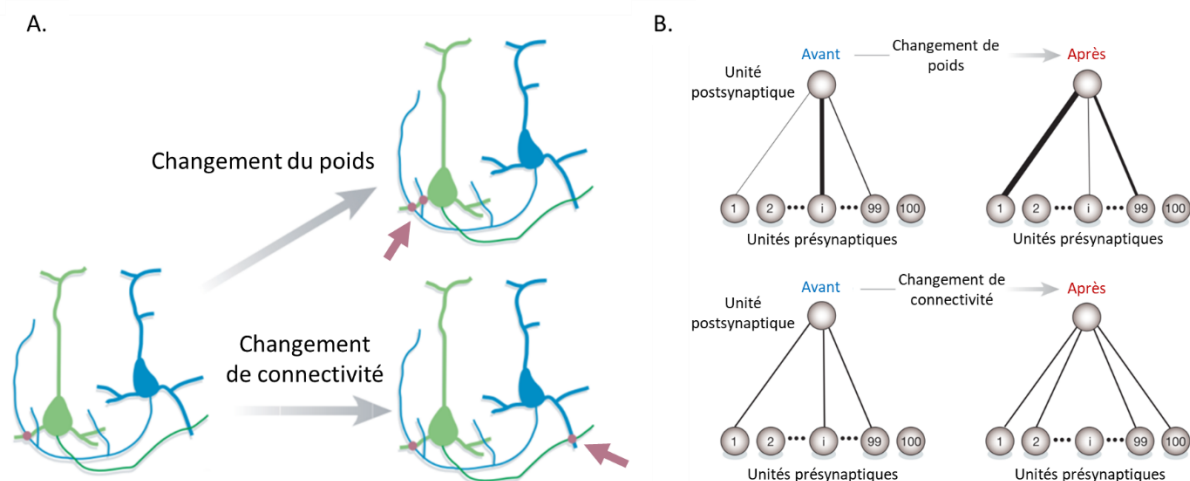


Figure 4 : Plasticité structurale, poids *versus* connectivité

En A, deux neurones (en bleu et vert). Les lignes épaisses représentent des dendrites, les lignes fines des axones, et les points rouges des synapses. Le neurone bleu a une configuration initiale de connexion sur le neurone vert (schéma de gauche). La formation et l'élimination de synapses peuvent induire un changement du poids de la connexion entre les deux neurones (schéma du haut), ou induire un changement dans la connectivité entre les deux neurones (schéma du bas). En B, une autre représentation de ces processus de plasticité. Le changement de poids (schéma du haut) ne modifie pas le nombre de connexions entre les neurones, et le changement de connectivité (schéma du bas) induit une modification du nombre de connexions entre les neurones. Adapté de Chklovskii et Svoboda (2004).

Néanmoins, le phénomène de plasticité le plus attrayant chez l'adulte semblerait être la neurogenèse, soit la génération de nouveaux neurones chez l'adulte. Ce phénomène a lieu lors du développement du système nerveux central, mais jusqu'à récemment, le système nerveux central était considéré comme un organe non régénérable, contrairement à la peau ou au sang où les cellules sont constamment renouvelées (Fuchs and Flügge, 2014). Bien qu'il puisse parfois fonctionnellement compenser la perte de neurones suite à un trauma en générant de nouvelles connexions synaptiques

entre les neurones restants, le système nerveux central n'a pas la capacité de se « réparer », la majorité des régions étant dépourvues de cellules souches nécessaires aux processus de régénération neuronale. Ce manque de neuroplasticité chez les mammifères a d'abord été décrit par Santiago Ramón y Cajal en 1930 lors de l'étude de fibres dégénérantes (Cajal, 1930). Par la suite, Altman a tenté de mettre en évidence la production de nouveaux neurones chez le rat et chez le chat. Il a réalisé une injection intrapéritonéale (rat) ou intraventriculaire (chat) de ^3H -thymidine (thymidine tritiée), détectable par autoradiographie. La ^3H -thymidine s'incorpore dans les brins d'ADN en formation, permettant ainsi de détecter les cellules nouvellement produites par prolifération cellulaire. Il a pu observer d'une part que les cellules gliales se multiplient dans le cerveau de rats et chats adultes, mais aussi que de potentiels neurones marqués dans le néocortex et dans le gyrus denté de l'hippocampe étaient présents, supportant l'hypothèse de neurogenèse adulte (Altman, 1963). Celle-ci a ensuite été confirmée par autoradiographie chez le rat, dans le gyrus denté et le bulbe olfactif en 1977 (Kaplan and Hinds, 1977), ainsi que dans le cortex visuel en 1981 par Kaplan (Kaplan, 1981). Le fait que les neurones sensoriels de l'épithélium olfactif des mammifères soient continuellement renouvelés tout au long de la vie de l'individu a été établi pour la première fois chez le singe-écureuil (Graziadei et al., 1980). Plus tard, ce phénomène a aussi été démontré pour les neurones du bulbe olfactif des mammifères adultes. Ces neurones nouvellement formés proviennent de la zone subventriculaire du ventricule latéral où les neuroblastes sont générés et se différencient en neurones fonctionnels. Ils migrent ensuite jusqu'au bulbe olfactif via la voie migratoire rostrale (Kornack and Rakic, 2001) (Figure 5).

La neurogenèse hippocampale a été plus difficile à mettre en évidence, de façon fiable, chez les mammifères adultes. En particulier, Eckenhoff et Rakic ont essayé de mettre en évidence cette neurogenèse dans l'hippocampe et dans le bulbe olfactif de primate (macaque rhésus) par injection intraveineuse de ^3H -thymidine. Malgré la présence de cellules macrogliales et microgliales marquées, ils n'ont pas pu révéler la présence de neurones marqués, remettant en question l'existence de neurogenèse adulte chez les primates (Rakic, 1985; Eckenhoff and Rakic, 1988). La démocratisation du 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), un analogue du ^3H -thymidine plus simple et plus rapide d'utilisation (Miller and Nowakowski, 1988), a permis de mettre en évidence la neurogenèse adulte chez tous les mammifères (Gould, 2007). Actuellement, les zones reconnues comme spécialisées dans la neurogenèse chez l'adulte sont la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe et la zone subventriculaire près des ventricules latéraux (Feliciano et al., 2015; Niklison-Chirou et al., 2020). D'autres structures sont aussi soupçonnées d'être des lieux de neurogenèse tels que le néocortex (Gould et al., 2001), le striatum (Bédard et al., 2006), l'amygdale (Bernier et al., 2002), l'hypothalamus (Kokoeva et al., 2005), la substantia nigra (Zhao et al., 2003), le cortex piriforme (Pekcec et al., 2006), ainsi que le complexe vagal dorsal dans le tronc cérébral (Bauer et al., 2005) (Figure 5). Ces zones de

neurogenèse adulte peuvent cependant varier en fonction des espèces (Alunni and Bally-Cuif, 2016), et les différentes études, en particulier touchant aux primates (Homme inclus) restent controversées.

La présence de cellules souches dans la moelle épinière a de même été étudiée (Weiss et al., 1996; Johansson et al., 1999). Horner et ses collaborateurs ont ainsi montré grâce à un marquage au BrdU que dans la moelle épinière adulte intacte de rat, des progéniteurs gliaux, soit issus de la zone épendymaire, soit des zones en bordure (« outer circumference »), étaient présents (Horner et al., 2000). Ils ont cependant déterminé que ces cellules ne pouvaient se différencier qu'en cellules gliales. Plus tard, Rusanescu et Mao ont montré que suite à une constriction du nerf sciatique chez le rat, des populations de cellules marquées au 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, analogue du BrdU) présentaient un co-marquage avec le marqueur neuronal NeuN au niveau de la lamina I et II à six semaines post-trauma, indiquant que les cellules souches de la moelle épinière seraient capables de se différencier en neurones matures en cas de trauma, mais apparemment pas chez l'animal sain (Rusanescu and Mao, 2015).

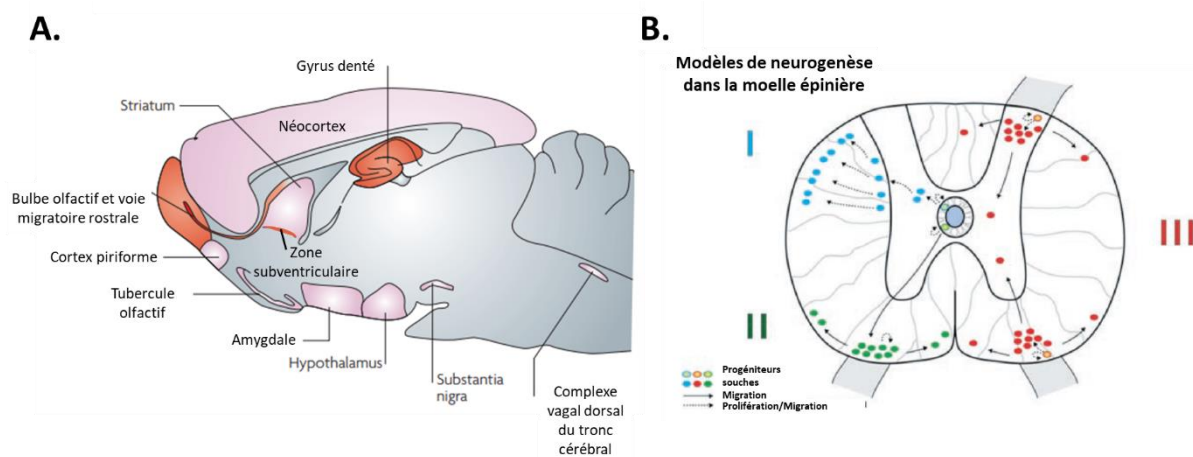


Figure 5 : Schéma des zones neurogéniques chez l'adulte dans le cerveau et la moelle épinière

A) En gris, les zones non-neurogéniques. En rouge, les zones neurogéniques (le bulbe olfactif est la destination des cellules souches de la zone subventriculaire). En rose, les zones neurogéniques sujettes à controverse. Adapté de *Gould (2007)*. **B)** Les trois modèles de prolifération et de migration des cellules souches dans la moelle épinière. Adapté de *Horner et al., 2000*.

2. Réorganisation des voies nerveuses après trauma spinal

2.1. Remodelage tissulaire et facteurs impliqués dans la plasticité post-lésionnelle

2.1.1. Processus délétères aigus au niveau de la zone lésionnelle

Un trauma de la moelle épinière induit la destruction initiale de tissus, qualifiée de lésion primaire. L'axotomie au niveau des voies descendantes conduit à la déafférentation des neurones sous-lésionnels, accompagnée par l'apoptose des cellules lésées. Ce trauma spinal, quel qu'il soit,

inclut de plus un élément initial contusif. La déformation des tissus engendrée induit une force compressive au niveau des axones non lésés et des vaisseaux sanguins, conduisant à divers processus pathologiques, auxquels s'ajoutent tous les autres événements secondaires touchant les tissus intacts. Ces processus sont qualifiés de lésions secondaires. Ce concept a été décrit pour la première fois au début du XX^{ème} siècle par Allen, qui a observé une amélioration des fonctions neurologiques suite au retrait de la zone lésée après trauma spinal (Allen, 1911; Allen, 1914). Ces résultats suggéraient que des molécules provenant de la zone lésée induisent des dégâts dans la zone saine entourant la lésion.

La lésion initiale des tissus spinaux peut être caractérisée en partie par un trauma vasculaire. Il en résulte une hémorragie conduisant à l'accumulation de sang, et donc d'un œdème (Mautes et al., 2000). L'ischémie des tissus sains qui s'ensuit conduit à la mort de cellules initialement épargnées par la lésion et participe donc à la propagation de la zone endommagée. Cette ischémie peut être renforcée si les voies descendantes du système nerveux sympathique ont été touchées, ce qui va réduire d'autant plus la vascularisation des tissus (Tator and Fehlings, 1991). La lésion induit aussi l'apparition rapide de facteurs cellulaires et extracellulaires qui vont représenter des signaux de danger dits « stériles » pour l'organisme et sont qualifiés de « motifs moléculaires associés aux dommages » (DAMPs). Ces DAMPs, telles que l'adénosine triphosphate (ATP), sont donc des stimuli inflammatoires stériles qui permettent l'induction de cytokines proinflammatoires par les cellules gliales (Chen and Nuñez, 2010; Gaudet and Popovich, 2014). En effet, l'ATP libérée par les cellules endommagées par la lésion ou par l'ischémie est un chimioattractant pour les cellules microgliales via leurs récepteurs purinergiques. Celles-ci vont alors migrer en direction des cellules endommagées afin de limiter la propagation des dégâts en ayant un rôle de « tampon » entre la zone endommagée et la zone saine (Davalos et al., 2005; Bellver-Landete et al., 2019). D'autres types cellulaires possèdent aussi des récepteurs purinergiques et sont donc stimulés par l'importante concentration en ATP dans le milieu après trauma spinal, tels que les astrocytes et les oligodendrocytes (Bradbury and Burnside, 2019).

Une accumulation d'acides aminés excitateurs, dont le glutamate, est aussi observée après trauma spinal au niveau de la zone lésée. Cette accumulation, en particulier de glutamate, peut s'avérer toxique en raison d'une suractivation des récepteurs au glutamate. En effet, l'excitotoxicité est définie comme une exposition excessive ou prolongée au glutamate induisant la mort neuronale, bien que d'autres cellules telles que les cellules gliales puissent aussi être touchées (Park et al., 2004). En effet, l'augmentation de la concentration en glutamate observée induit l'activation excessive des récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate (Choi, 2020), ce qui favorise la production de radicaux libres. Cette production excessive participe en partie à l'augmentation de la quantité d'ATP décrite précédemment. En effet, l'excès de radicaux libres induit la peroxydation des lipides membranaires, résultant en une dysfonction de l'ATPase (Park et al., 2004). De plus, les trois types de récepteurs sont perméables aux cations monovalents (sodium et potassium), ainsi qu'au calcium pour les NMDA et pour certains

récepteurs AMPA (selon la composition en sous-unités). Une suractivation de ces récepteurs ionotropiques conduit à une forte entrée de calcium dans le neurone postsynaptique, ayant pour conséquence, entre autres, un stress oxydant (Jia et al., 2015). Plus précisément, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induit une augmentation de son entrée dans les mitochondries, stimulant ainsi la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela conduit *in fine* à l'augmentation de la production d'espèces dérivées de l'oxygène (ROS) par la mitochondrie et à leur accumulation dans le corps cellulaire (Gorlach et al., 2015). Les oligodendrocytes sont aussi vulnérables à l'excitotoxicité au glutamate, qui serait médiée par les récepteurs AMPA et kainate exprimés à leur surface (Barron and Kim, 2019; Choi, 2020). En effet, l'ajout d'un antagoniste à ces récepteurs chez une culture d'oligodendrocytes bloque l'excitotoxicité induite par l'ajout de glutamate (Yoshioka et al., 1995). De façon intéressante, les astrocytes, à l'inverse, semblent y être insensibles (Choi, 2020).

L'axotomie des axones, consécutive au trauma spinal, induit une dégénérescence de la partie distale de l'axone, la partie proximale se rétractant en bulbe dystrophique pouvant rester fonctionnel. La dégénérescence axonale est couplée à une démyélinisation de cet axone, produisant des débris de myéline dans la zone périlésionnelle. En effet, les oligodendrocytes, à l'opposé des astrocytes, meurent après lésion spinale en raison entre autres de l'excitotoxicité au glutamate et des dérégulations homéostatiques extracellulaires et d'une augmentation importante des concentrations en calcium. Or, les oligodendrocytes sont les cellules permettant de former les gaines de myéline autour des axones dans le système nerveux central. L'axotomie, ainsi que la perte des oligodendrocytes, induisent donc une dégénérescence Wallérienne (ou dégénérescence orthograde) (Bradbury and Burnside, 2019). Les axones non touchés par la lésion peuvent aussi subir une démyélinisation. En effet, un oligodendrocyte peut former la myéline de plusieurs neurones. Si un de ces neurones est axotomisé, l'oligodendrocyte dégénère, entraînant la démyélinisation des autres neurones intacts. De plus, si un oligodendrocyte formant la myéline de plusieurs neurones intacts se trouve autour de la zone lésée et subit une excitotoxicité au glutamate, celui-ci peut dégénérer et mourir, induisant ainsi la démyélinisation d'axones de neurones sains (Park et al., 2004).

La lésion initiale induit aussi l'activation de la microglie environnante, déclenchant la réponse neuroinflammatoire via la production de différentes cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine (IL) -1- β , le facteur de nécrose tumoral α (TNF α) ou l'IL-6. Les neutrophiles sont recrutés au site lésionnel dans les heures suivant la lésion et s'y accumulent, avec un pic de présence à vingt-quatre heures post-lésion. Les monocytes s'infiltrent quant à eux dans les jours suivants au site de la lésion, où il se différencient en macrophage M1 ou M2, de même que les lymphocytes (Donnelly and Popovich, 2008) (Figure 6). Le recrutement de ces cellules inflammatoires et l'activation des cellules résidentes permettent la formation de la cicatrice gliale qui sera détaillée dans la partie suivante.

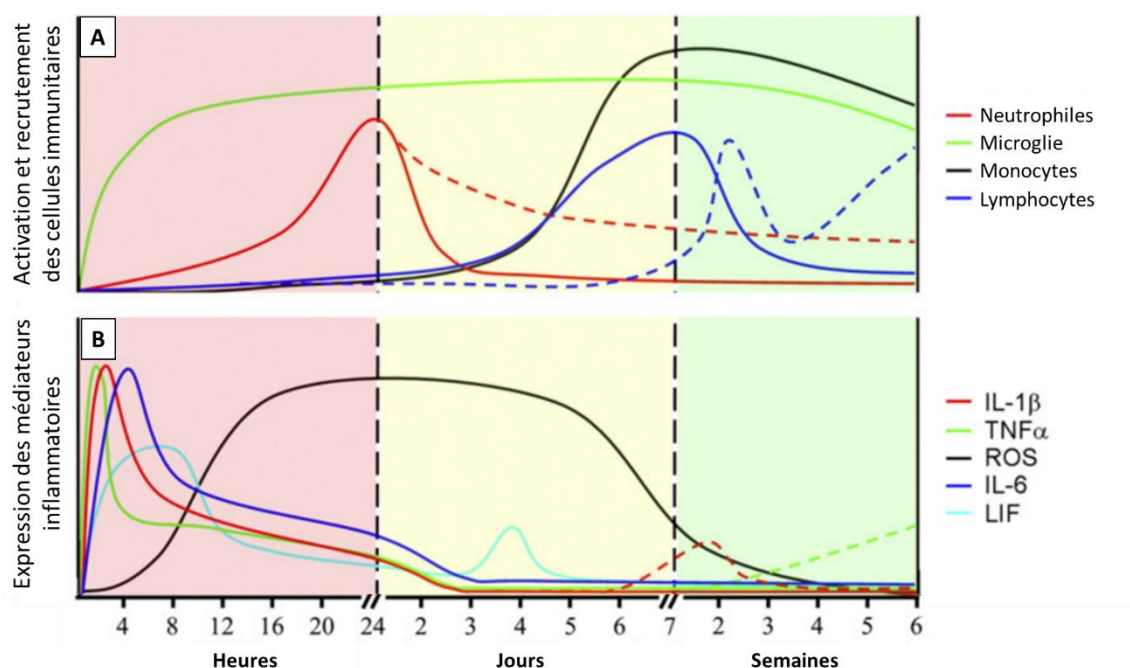


Figure 6 : Corrélation entre les cinétiques d'expression des cytokines proinflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires

A. Activation de la microglie résidente et accumulation intraspinal de leucocytes circulants. Les lignes pleines représentent les données obtenues chez le rat, et les lignes en pointillés les données obtenues chez la souris après trauma spinal. Les lignes pleines avant séparation représentent les données pour les deux espèces. **B.** Expression des cytokines proinflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Adapté de *Donnelly et Popovich, 2008*.

2.1.2. Formation de la cicatrice gliale

La cicatrice qui se forme après trauma spinal comprend deux éléments : la zone centrale de la lésion qui est majoritairement composée de cellules immunitaires et de fibroblastes, et la zone de pénombre qui entoure la zone centrale, composée principalement d'astrocytes réactifs (Fawcett et al., 2012; Cregg et al., 2014; Bradbury and Burnside, 2019). Divers acteurs et molécules composent ainsi cette cicatrice gliale et participent aux dégâts secondaires observés au niveau du site lésionnel (Figure 7).

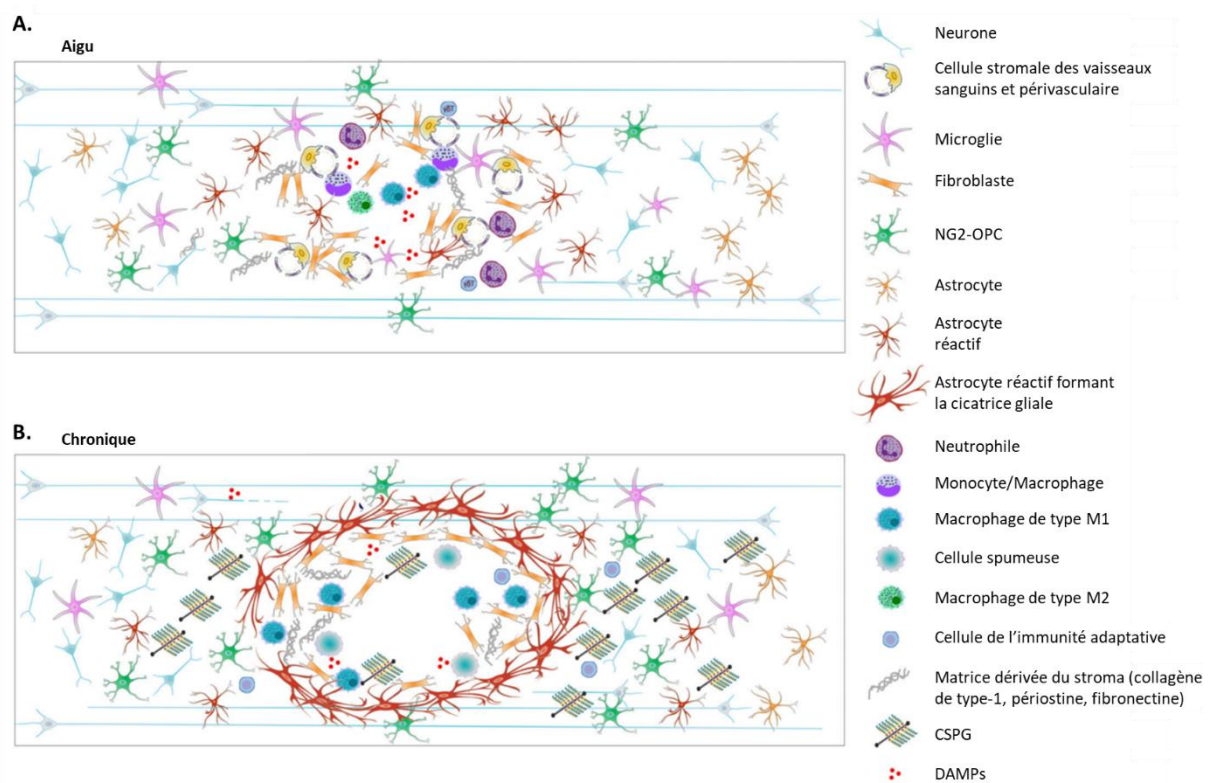


Figure 7 : Composition cellulaire et extracellulaire de la cicatrice post-trauma spinal

Un trauma de la moelle épinière induit une cascade d'évènements dont la concentration est la plus importante au niveau du site de la lésion. Ces évènements concernent plusieurs types cellulaires et plusieurs molécules faisant parti de la matrice extracellulaire. A. Durant la phase aigüe (0-72h post-lésion), la mort des cellules et dégâts tissulaires conduit à la libération de DAMPs (patterns moléculaires associés aux dommages). Représentant un fort stimulus inflammatoire, ces DAMPs vont induire l'activation de plusieurs types de cellules (microglie, astrocytes...). Les cellules activées vont surexprimer des molécules de la matrice extracellulaire tels que les CSPGs (chondroïtine sulfate protéoglycane). Les cellules circulantes sont aussi recrutées sur le site de la lésion où elles vont participer à la réponse inflammatoire et au nettoyage du site lésé. B. Durant la phase chronique, les macrophages et la microglie adoptent majoritairement un profil M1 proinflammatoire, résultant en une inflammation non-résolutive et permanente. L'organisation des astrocytes réactifs permet la séparation du tissu lésé du tissu sain, et les fibroblastes contribuent au remodelage fibrotique du tissu. Une cavité cystique se développe au centre de la lésion. La dégénérescence Wallérienne contribue à la présence continue de DAMPs, qui avec les CSPGs, inhibent les processus de régénération et de neuroplasticité à long terme. Adapté de *Bradbury et Burnside, 2019*.

Après lésion spinale, les astrocytes prolifèrent et deviennent « réactifs », en réponse à la présence de DAMPs et de cytokines proinflammatoires (Sofroniew, 2014a). Ce processus est caractérisé par l'augmentation de l'expression de la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP), de la nestine et de la vimentine par ces astrocytes (Baldwin et al., 1998; Sofroniew, 2014b). Ils vont alors s'organiser architecturalement sous forme de barrière afin de séparer le tissu lésé/cicatriciel du tissu sain (Sun and Jakobs, 2012). Même si les astrocytes seuls ne sont pas responsables de la formation de la cicatrice gliale, ils sont l'un des composants et acteurs majeurs de la cicatrice en aiguë et en chronique

après trauma spinal. Ils surexpriment en continu des chondroïtines sulfate protéoglycane (CSPG), molécules connues pour inhiber les processus de plasticité synaptique (Kwok et al., 2011).

Des cellules fibroblastiques sont aussi observées dans la cicatrice. Celles-ci sont normalement ubiquitaires dans les tissus et organes et font partie de la matrice extracellulaire (Bradbury and Burnside, 2019). En réponse au trauma (via signalisation par le TGF β), ces cellules se mettent à sécréter plus de composants extracellulaires, tels que du collagène IV, qui peuvent inhiber directement la régénération et la repousse axonale (Grotendorst, 1997). Elles peuvent aussi interagir avec les cellules inflammatoires et favoriser leur activation (Bradbury and Burnside, 2019). Ces fibroblastes entourent les astrocytes et forment la partie fibrotique de la cicatrice. Ils peuvent proliférer à partir des méninges si celle-ci est compromise (Klapka and Müller, 2006).

Les précurseurs des oligodendrocytes (OPC), aussi connus sous le nom de cellules NG2, deviennent réactifs et prolifèrent après trauma spinal (Bradbury and Burnside, 2019). Ils contribuent à la remyélinisation par différenciation en oligodendrocytes, mais peuvent aussi s'hypertrophier et augmenter leur production de NG2, une molécule qui médierait le piégeage des neurones, et donc indirectement inhiberait les processus de plasticité (Hackett and Lee, 2016; Levine, 2016). À l'image des astrocytes, ils se mettent aussi à surexprimer des CSPG (Levine, 1994). Leur rôle exact est cependant sujet à controverse en raison des marqueurs utilisés pour les identifier. En effet, NG2 est aussi exprimé par les cellules périvasculaires et les péricytes, et les OPC expriment la molécule GFAP (commune aux astrocytes). Les OPC ont de plus la capacité de se différencier en astrocytes dans la cicatrice gliale après trauma spinal, permettant d'y augmenter leur nombre (Hackett and Lee, 2016).

La microglie est un type de macrophage résidant du système nerveux central. La microglie survivante s'active après trauma dû à la présence DAMPs et de débris de myéline qui se fixent sur leurs récepteurs présents à la surface de la membrane des cellules microgliales. Elles se mettent alors à sécréter des cytokines proinflammatoires et rétractent leurs processus et deviennent alors indistinguables des monocytes infiltrants recrutés sur le site lésionnel, et des macrophages dérivés de ces monocytes. Les macrophages et la microglie peuvent présenter un vaste panel de profils, allant du profil proinflammatoire dit « M1 », caractérisé par une sécrétion de TNF α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-12, au profil anti-inflammatoire dit « M2 », caractérisé par une sécrétion d'IL-10 et d'IL-13 (Kigerl et al., 2009). Durant la phase aigüe, un mélange de M1 et M2 est présent au site de la lésion, et leur production de cytokine attire d'autres cellules afin de nettoyer le site lésionnel (Gensel and Zhang, 2015). Ces cellules contribuent aux dommages en sécrétant des cytokines proinflammatoires (type M1), de ROS, d'oxyde nitrique (NO) et de protéases (Popovich et al., 2002). Ils participent cependant aussi au nettoyage de la zone lésée et secrètent des cytokines neuroprotectives (type M2) aidant à la régénération neuronale, à la réparation et la guérison du tissu (Rabchevsky and Streit, 1998). Dans le cas où une lésion est irrésolvable, comme dans le cas d'un trauma spinal, la microglie et les macrophages restent

indéfiniment au site lésé, et ne présentent principalement plus qu'un profil de type M1 proinflammatoire (Donnelly and Popovich, 2008; Kigerl et al., 2009).

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées depuis la circulation sanguine via la signalisation CXCL1/2, sur le site lésionnel après trauma spinal où ils vont alors s'accumuler. Leur rôle exact n'est pas encore tout à fait compris actuellement (Zivkovic et al., 2021). Une fois sur place, ils vont alors à leur tour sécréter des cytokines comme le TNF- α qui participe au recrutement d'autres cellules de l'inflammation, et libérer des protéases et des enzymes oxydatives qui dégradent les tissus, telles que des ROS, ou encore la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9) (Noble et al., 2002; Nguyen et al., 2007). Ils participent donc à la réponse inflammatoire et aux dommages secondaires. Ils vont aussi phagocytter les débris de myéline, et participent donc au nettoyage de la zone blessée (Zivkovic et al., 2021).

Les lymphocytes T et B s'infiltrent au site de la lésion et sont responsables de l'immunité adaptative. En particulier, les lymphocytes B participeraient aux dégâts secondaires en produisant des anticorps dirigés contre les débris de myéline, plus particulièrement la « myelin basic protein » (MBP) (Ankeny et al., 2009). Il semblerait que ces lymphocytes B activés produisant ces auto-anticorps s'accumulent de façon persistante dans la matière blanche après trauma du système nerveux central (Hickey et al., 1991; Ankeny et al., 2009). Ces auto-anticorps peuvent avoir un effet bénéfique dans le sens où la destruction de ces débris de myéline empêche la propagation de la lésion secondaire (Moalem et al., 1999). Ils pourraient cependant, dans certains cas, induire la destruction de cellules gliales et de la myéline intacte et ainsi provoquer la démyélinisation d'axones sains par auto-immunité, et donc aggraver la pathologie (Popovich et al., 1996; Ankeny et al., 2009).

Ainsi, les différents types cellulaires présents forment la cicatrice lésionnelle qui se met en place rapidement après trauma spinal. Cette cicatrice est donc issue du remodelage de la zone lésée et celle-ci perdure dans le temps, résultant en une inflammation chronique. Les différentes molécules qui vont inhiber ou favoriser les processus de plasticité neuronaux qui se mettent en place après trauma spinal sont de plus secrétées par ces cellules. Elles participent donc aussi à la formation de la matrice extracellulaire lésionnelle et périlésionnelle (Figure 8).

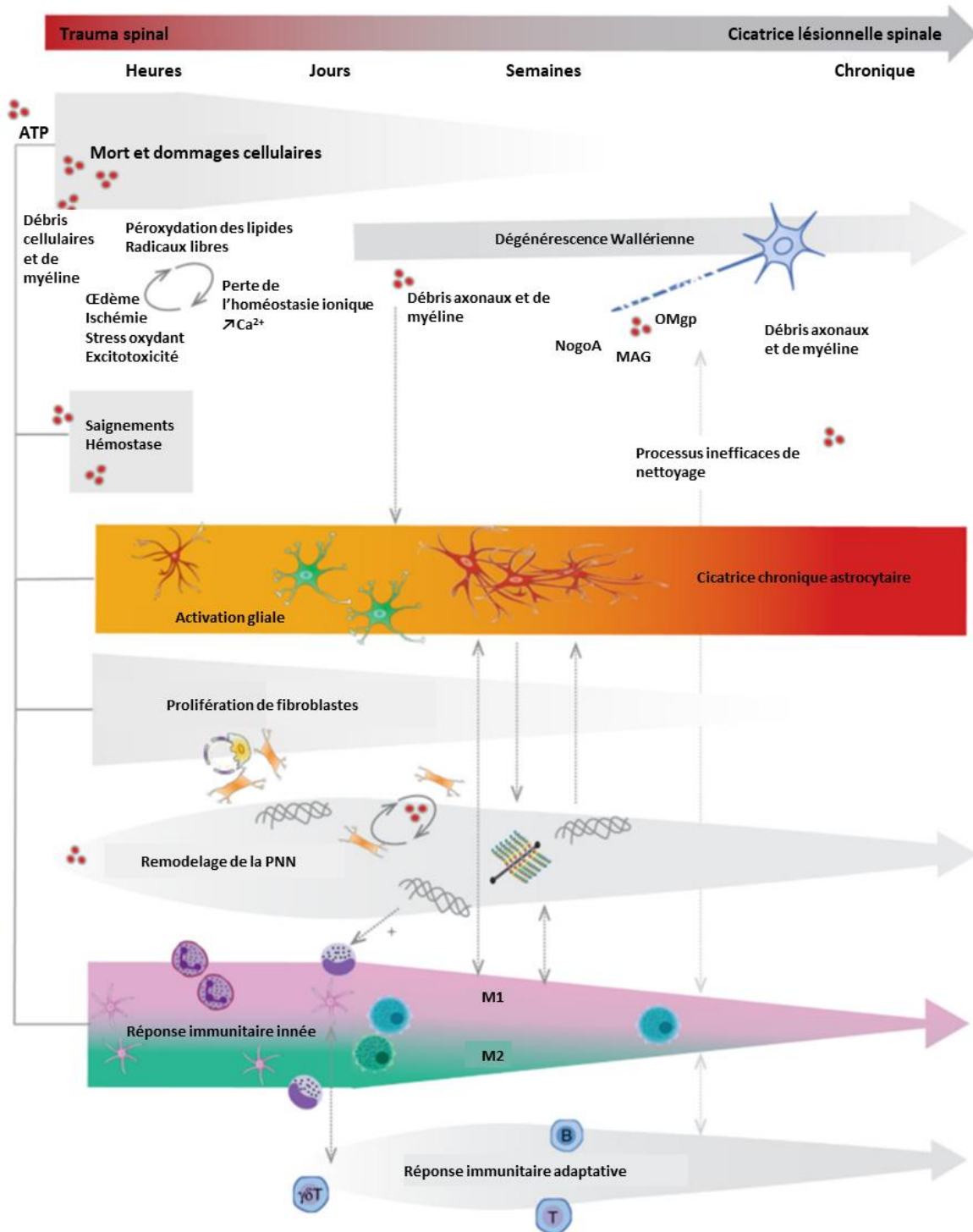


Figure 8 : Temporalité de la formation de la cicatrice

Schéma montrant l'interrelation entre les différents acteurs et composants de la cicatrice lésionnelle depuis le moment de la lésion et jusqu'à la phase chronique. MAG et OMgp : protéines associées à la myéline (DAMPs). PNN : réseau/matrice périneuronale.

2.1.3. Facteurs favorisant la régénération et la repousse

Les processus de neuroinflammation, ses différents acteurs, ainsi que ses conséquences sur les cellules neurales vont ainsi avoir un impact sur la composition de la matrice extracellulaire périneuronale, modifiant ses propriétés initialement physiologiques et stabilisatrices pour les cellules neuronales et gliales. Des processus de régénération et de plasticité se mettent donc par la suite en place au niveau des cellules lésées et épargnées afin de tenter de rétablir les connexions détruites ou endommagées. Ainsi, l'expression locale de facteurs de croissance et de neurotrophines tels que la neurotrophine-3 (NT-3), le facteur de croissance basique des fibroblastes-2, le IL-6, le TGF- β , le facteur neurotrophique dérivé de la glie, le facteur neurotrophique ciliaire, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance nerveuse (NGF) ou encore le BDNF (Logan and Berry, 1993; Bareyre and Schwab, 2003; Madiari et al., 2003; Brown et al., 2004; Zhang et al., 2004; Garraway and Huie, 2016; Fan et al., 2018) est augmentée dans les heures qui suivent le trauma. Cela pourrait constituer une tentative de retour à un environnement de type ontogénique, et donc favoriser les processus de croissance et de repousse axonale. Les métalloprotéases telles que MMP3 ou MMP7 peuvent aussi être considérées comme des molécules favorisant la plasticité. En effet, elles agissent au niveau de la matrice extracellulaire en clivant les formes pro-neurotrophiques en neurotrophines matures (Keefe et al., 2017).

Les neurotrophines les plus étudiées sont le NGF, le BDNF et le NT-3, qui agissent avec la plus grande affinité sur les récepteurs tyrosine kinases (Trk), TrkA, TrkB et TrkC respectivement (Ip et al., 1993). Leur fixation sur leurs récepteurs Trk induit la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus de tyrosine, ce qui conduit à l'activation de cascades de signalisation intracellulaires connues pour leur rôle dans la survie neuronale, la croissance axonale et la plasticité synaptique (Blum and Konnerth, 2005). Le NGF est connu pour induire une croissance axonale robuste des axones nociceptifs (Romero et al., 2000). En effet, l'inhibition de NGF ou de TrkA réduit cette croissance axonale nociceptive (Christensen and Hulsebosch, 1997). Le NT-3 est quant à lui majoritairement impliqué dans la survie neuronale, ainsi que dans la croissance des neurones sensoriels et sympathiques (Rosenthal et al., 1990; Keefe et al., 2017). Il a ainsi été montré que suite à une lésion de la moelle épinière, la greffe de neurones exprimant spécifiquement NT-3 au site de la lésion induisait la croissance des axones du tractus corticospinal (CST) sur des courtes (Ma et al., 2010) et des longues distances (Tuszynski et al., 2003). Le BDNF exerce globalement un rôle neuroprotecteur et promeut la croissance axonale après trauma spinal. Il a été montré que le BDNF diminue la mort cellulaire induite par l'excitotoxicité au glutamate (Almeida et al., 2005). De plus, l'infusion de BDNF au niveau des neurones rubrospinaux empêche leur atrophie après trauma spinal (Keefe et al., 2017). Cet effet est retrouvé avec du NT-4 qui se fixe de façon similaire au récepteur TrkB (Klein et al., 1992). De même, le blocage de la voie de signalisation BDNF/TrkB empêche la récupération fonctionnelle spontanée diaphragmatique observée

normalement après hémisection spinale cervicale (Mantilla et al., 2013a). Une autre étude a montré que la greffe de fibroblastes sécrétant du BDNF au niveau lésionnel augmente la survie des motoneurones spinaux, mais n'induit pas de croissance axonale au niveau du CST. Ces résultats sont corrélés avec le fait que cette même étude montre que les récepteurs TrkB sont exprimés au niveau du corps cellulaire et des dendrites des motoneurones corticospinaux, mais pas au niveau de leur axones (Lu et al., 2001).

Les molécules de la matrice extracellulaire peuvent aussi servir de support pour les processus de croissance et de repousse axonale, en particulier le collagène, la fibronectine et la laminine (Haggerty et al., 2017). Il a en effet été montré que le collagène est un support pour la croissance axonale *in vitro* (Ebendal, 1976), et que l'application d'un conduit multicanal de collagène au site de la lésion spinale après transection en T9, et associée à une injection de NT-3, promeut la croissance axonale dans la moelle épinière lésée (Yao et al., 2013). La fibronectine est quant à elle associée à la régénération de la matière blanche par les astrocytes, ainsi qu'à la régénération axonale périphérique (Haggerty et al., 2017). La laminine est typiquement associée à la croissance axonale. En effet, lorsque de la polylaminine (un polymère de laminine) est introduite dans la moelle épinière lésée, elle induit de la croissance axonale, accompagnée d'une récupération fonctionnelle locomotrice après compression thoracique chez le rat (Menezes et al., 2010). De même, l'administration de laminine dans la moelle épinière lésée de poisson rouge induit la croissance axonale des fibres dopaminergiques et sérotoninergiques, et guiderait ces fibres à travers de la cicatrice lésionnelle (Takeda et al., 2015).

Ces molécules, bien qu'insuffisantes par elles-mêmes pour induire une régénération et une croissance axonale efficace et complète menant à une récupération fonctionnelle, représentent un support important pour les processus de plasticité neuronale post-trauma spinal.

2.1.4. Facteurs inhibiteurs de la plasticité

Les processus favorisant la plasticité présentés précédemment sont cependant contrecarrés par la synthèse, au niveau de la matrice périneuronale (PNN), de plusieurs molécules ayant un effet chimiorépulseur pour les cônes de croissance axonaux. En effet, en plus des DAMPs, d'autres molécules confèrent une inhibition extrinsèque aux neurones, dont Nogo-A, la sémaphorine 3, Slit ou encore les CSPG, ces dernières ayant le plus fort potentiel répulsif (Silver and Miller, 2004).

2.1.4.1. Chondroïtines sulfate protéoglycanes (CSPG)

Comme décrit précédemment, l'inflammation qui se met en place suite à un trauma spinal induit également la formation d'une cicatrice gliale au niveau du site lésé. Celle-ci est formée principalement de macrophages, de fibroblastes et d'astrocytes réactifs (Silver and Miller, 2004; Bradbury and

Burnside, 2019) (Figure 7). Fitch et Silver ont montré que suite à une hémicompaction spinale au niveau thoracique, les astrocytes présents dans la cicatrice lésionnelle et présentant un phénotype réactif surexprimaient des CSPG, induisant l'augmentation de leur proportion dans la PNN, et rendant celle-ci hautement défavorable à toute repousse axonale (Fitch and Silver, 1997). Par la suite, il a été montré que le type de CSPG produit dans ces circonstances était régulé de façon différentielle en fonction du temps post-lésionnel (Jones et al., 2003). Les CSPG exprimés durant le développement servent à la guidance axonale et sont nécessaires à certains processus développementaux. Dans le système mature, leur expression sert à empêcher la croissance neuronale et axonale anarchique (Bartus et al., 2012). Ils sont composés d'un corps protéique auquel est attachée une chaîne de glycosaminoglycane (chaîne GAG) sulfatée composée de sucres modifiés (Rhodes and Fawcett, 2004) (Figure 9). Suite à un trauma spinal, les CSPG sont surexprimés à la fois au niveau de la zone lésée, mais aussi au niveau des motoneurons qui ont été déafférentés par la section des axones les innervant.

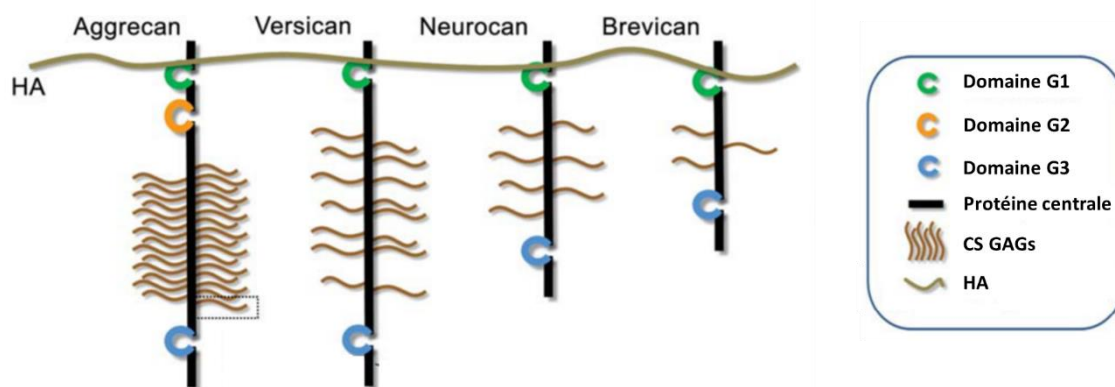


Figure 9 : Schéma montrant la structure des lecticans

Les Aggrecans, les Brevicans, les Neurocans et les Versicans sont des lecticans. Ils possèdent tous un domaine G1 en N-terminal (une répétition d'Ig et deux modules link), une région d'attache centrale de glycosaminoglycane (GAG) et un domaine G3 en C-terminal (deux répétitions d'un domaine lectine-like et une protéine complémentaire régulatrice). Les Aggrecans ont en plus un domaine G2 dont la fonction n'est pas encore claire. Le domaine G1 est important pour l'attache entre la protéine noyau et le chaîne hyaluronique (HA). Les chaînes chondroïtines sulfate GAG (CS GAG) sont composées de résidus de sérine et fixées à la protéine noyau.

Les lecticans sont des CSPG qui sont tous exprimés à un niveau physiologique dans le SNC. Les Aggrecans sont l'un des composants majeurs de la PNN, les Brevicans sont spécifiques du SNC et réguleraient les propriétés plastiques de la PNN, les Neurocans sont aussi spécifiques du SNC et sont connus pour être très présents dans la moelle épinière, et les Versicans sont exprimés aux nœuds de Ranvier et sont donc présents à la fois dans la matière grise et la matière blanche. Ces quatre principaux sous-types de lecticans sont exprimés au niveau des motoneurons de la corne ventrale de la moelle

épinière, mais dans des proportions deux fois plus importantes pour les Brevicans et les Neurocans par rapport aux Aggrecans et aux Versicans (Irvine and Kwok, 2018).

Ces CSPG agissent via leurs chaînes CS-GAG, qui se fixent avec une haute affinité sur leurs récepteurs Protein tyrosine phosphatase σ (PTP σ), leukocyte common antigen-related phosphatase (LAR) et les récepteurs Nogo 1 et 3 (NgR) présents à la membrane des cônes de croissance axonaux (Shen et al., 2009; Lang et al., 2015; Smedfors et al., 2018). Les récepteurs PTP σ et LAR vont activer la voie de signalisation RhoA et inactiver les voies Akt/mTOR (« mechanistic target of rapamycin ») et Erk, ce qui va moduler l'activité de plusieurs molécules et facteurs de transcription et ainsi induire l'inhibition de la croissance axonale (Ohtake et al., 2016). À titre d'exemple, après hémisection spinale cervicale, l'injection au site lésionnel d'un peptide LAR sous forme libre induit sa fixation sur les CSPG (compétition avec la fixation sur le récepteur LAR), ce qui conduit à une récupération fonctionnelle diaphragmatique chez le rat (Cheng et al., 2021a).

Les chaînes CS-GAG sont ainsi connues pour leur action inhibitrice sur la plasticité neuronale après trauma spinal, car leur suppression permet une récupération anatomique et fonctionnelle (Bradbury et al., 2002). La protéine centrale (Figure 9) serait aussi une source d'inhibition pour la croissance axonale (Ughrin et al., 2003; Bradbury and Burnside, 2019).

2.1.4.2. Autres molécules extracellulaires inhibitrices

Les molécules associées à la myéline comptent Nogo-A, la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) et la glycoprotéine de myéline d'oligodendrocyte (OMgp). En particulier, Nogo-A est un inhibiteur de la régénération et de la plasticité neuronale après trauma spinal. Il empêcherait les axones de traverser l'environnement périlésionnel (Schwab and Strittmatter, 2014). Les récepteurs, dont NgR1 et Nogo-66 sur lesquels il se fixe, utilisent la voie RhoA/ROCK, ce qui résulte en une déstabilisation du cytosquelette d'actine et en l'arrêt des cônes de croissance axonaux, qui se collapsent alors (Niederöst et al., 2002). Le même type d'effet est observé pour MAG qui se fixe sur le récepteur NgR2 (Smedfors et al., 2018).

Des molécules chimiorépulsives de guidance axonale telle que la sémaphorine 3A voient leur expression augmenter après trauma spinal (De Winter et al., 2002; Hashimoto et al., 2004). La sémaphorine 7A pourrait aussi être impliquée dans la repousse restreinte des fibres sérotoninergiques après trauma spinal. En effet, une repousse axonale exubérante est observée après hémisection thoracique dorsale chez les souris KO pour la sémaphorine 7A comparée aux souris contrôles lésées (Loy et al., 2021). Ces résultats laissent supposer qu'après trauma spinal, la sémaphorine 7A inhiberait les processus de repousse axonale, du moins sérotoninergique, après trauma spinal.

Le couple slit/Roundabout (Robo) qui est impliqué dans la guidance axonale durant le développement (Kidd et al., 1998) pourrait lui aussi avoir un rôle dans l'inhibition des processus de repousse et de croissance axonale après trauma spinal. Les récepteurs Robo sont exprimés à la membrane des cônes de croissance axonaux (Russell and Bashaw, 2018), et les molécules Slit sécrétées par les macrophages et la microglie activée (Wehrle et al., 2005). En effet, la quantité d'ARN messagers de *slit-1* et *slit-3* est augmentée dans les cellules au centre de la lésion huit jours post-trauma chez la souris (Wehrle et al., 2005). L'effet de Slit-1/3, tout comme pour les CSPG, passe par RhoA qui est la voie de signalisation utilisée par les molécules inhibitrices de la plasticité synaptique dans le système nerveux central.

Ainsi, un certain nombre de molécules de la matrice extracellulaire inhibent les processus de régénération et de repousse axonale après trauma spinal. Ces processus agissent en contrebalançant l'action des molécules favorisant les processus de plasticité.

2.1.5. Facteurs intrinsèques

En plus de l'action des molécules de la matrice extracellulaire, certains facteurs cellulaires intrinsèques agissent en inhibant ou en favorisant les processus de plasticité après trauma du système nerveux central.

À titre d'exemple pour l'inhibition, la « phosphatase and tensin homolog » (PTEN) est une phosphatase faiblement exprimée à l'état basal. Son expression est augmentée dans les cellules en présence de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire, ce qui est le cas après trauma spinal comme expliqué précédemment (Keniry and Parsons, 2008). PTEN va inhiber l'action de Akt et donc l'empêcher de convertir le phosphatidylinositol (4,5) trisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol (3,4,5) bisphosphate (PIP₃) dans le corps cellulaire et les terminaisons synaptiques des neurones. Akt induit l'activation de la voie mTOR et coordonne normalement en partie la croissance axonale durant la régénération axonale post-axotomie (Park et al., 2010). Il a ainsi été démontré que la délétion ou le blocage génétique de PTEN augmentait la croissance axonale après trauma spinal (Lewandowski and Steward, 2014; Willenberg et al., 2016). De même, l'administration d'un inhibiteur de PTEN induit une croissance axonale accompagnée d'une récupération fonctionnelle diaphragmatique après trauma spinal cervical, montrant le potentiel régénératif neuronal de la voie Akt/ PIP₂ et le rôle inhibiteur de PTEN après trauma spinal (Gutierrez et al., 2013; Urban et al., 2019b).

D'autres facteurs intrinsèques exprimés intracellulairement par les neurones supportent quant à eux les processus de plasticité synaptique après trauma spinal. La « growth-associated protein-43 » (GAP-43) est une molécule impliquée dans la croissance axonale durant le développement, ainsi que dans les processus de neuroplasticité dans le système nerveux central mature (Skene and Willard,

1981). Elle est synthétisée au niveau du corps cellulaire des neurones et transportée à la membrane des cônes de croissance axonaux ainsi qu'à la membrane cytoplasmique le long de l'axone. GAP-43 permet la repousse axonale via ses interactions avec les protéines du cytosquelette (Oestreicher et al., 1997). Il a ainsi été montré que, du côté lésé, le niveau d'expression de l'ARNm de GAP-43 est augmenté dans les neurones rubrospinaux après axotomie (Tetzlaff et al., 1991). Son expression protéique est aussi augmentée autour des motoneurones phréniques, mais réduite dans le funicule ventrolatéral en raison de l'axotomie des neurones, du côté lésé, sept jours post-lésion spinale cervicale dans la moelle épinière C3-C6 chez le rat (Vinit et al., 2009). L'inhibition de la voie de signalisation RhoA induit de plus une augmentation de l'expression de GAP-43, accompagnée d'une amélioration de la fonction locomotrice après contusion thoracique (Wang et al., 2018).

Des facteurs de transcription sont aussi impliqués dans la capacité des neurones à induire des processus de repousse axonale et de régénération neuronale. Le facteur de transcription « cAMP response element-binding protein » (CREB) est connu pour son rôle dans la régulation de la plasticité synaptique, ou encore la survie neuronale (Carlezon et al., 2005). Sa phosphorylation se fait par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), une molécule de signalisation cellulaire qui est aussi un indicateur de la compétence de régénération axonale du neurone (Filbin, 2003). Son expression, ainsi que celle de sa forme phosphorylée, est ainsi augmentée du côté lésé de la moelle épinière à trois et cinq jours post-hémisection cervicale (Singh et al., 2012). Sachant que CREB est un effecteur en aval de la voie de signalisation de TrkB (Mantilla et al., 2013a), l'augmentation de son niveau de phosphorylation est donc corrélée à l'augmentation de l'expression de BDNF et de TrkB décrite précédemment. Un autre facteur de transcription voyant son expression augmenter dans les neurones lésés après trauma du système nerveux central est c-Jun (Vinit et al., 2011). C-Jun est un facteur de la réponse précoce du neurone après axotomie, et entraîne soit la mort neuronale, soit la survie et la régénération axonale (Herdegen et al., 1997). Une axotomie neuronale provoque l'activation des JUN kinases (JNK), qui sont alors transportées de manière rétrograde vers le corps cellulaire du neurone. Les JNK informent le corps cellulaire de la lésion axonale distale, ce qui entraîne la phosphorylation de c-Jun (Herdegen and Waetzig, 2001). Cette activation de c-Jun entraîne de plus sa dimérisation, soit en homodimère, soit en hétérodimère avec d'autres facteurs de transcription tels que c-fos ou « activating transcription factor » (ATF). Le dimère se transloque alors dans le noyau afin de déclencher la transcription de différents gènes cibles en fonction de l'association dimérique, dont la transcription de c-Jun lui-même (Angel and Karin, 1991). Il a de plus été montré que le niveau de surexpression de c-Jun et d'autres molécules variait selon la proximité de la lésion au corps cellulaire. Leur expression est en effet plus élevée lorsque la lésion est proximale du corps cellulaire par rapport à une lésion plus distale (Jenkins et al., 1993). De plus, l'inhibition de la phosphorylation de c-Jun *in vitro* empêche la

repousse axonale après axotomie (Lindwall et al., 2004), confirmant le rôle crucial de l'activation de c-Jun pour la croissance axonale après lésion neuronale.

Après axotomie, les neurones lésés ont la capacité de déclencher des programmes de croissance axonale et de régénération neuronale au travers de l'expression de divers facteurs de transcriptions et autres molécules intracellulaires, et des molécules neurotrophiques présentes dans la matrice extracellulaire donnent, de plus, des signaux positifs aux neurones pour enclencher ces processus régénératifs. Ce potentiel régénératif a pu être mis en évidence par le passé suite à une greffe de nerf périphérique au niveau d'axones lésés du système nerveux central. En effet, une repousse axonale a pu être observée à travers ce nerf, démontrant que cette repousse est possible dans un environnement défini comme étant permissif (David and Aguayo, 1981).

Suite à un trauma spinal, malgré la capacité des neurones à régénérer et la présence de molécules plutôt favorables aux processus de régénération et de plasticité synaptique, l'environnement périneuronal non permissif vient contrebalancer les facteurs favorisant via l'expression de différentes molécules répulsives ou inhibitrices de ces processus de plasticité. Il en résulte des processus de plasticité synaptique limités après lésion spinale.

2.2. Réorganisation des circuits nerveux après lésion des voies corticospinales

2.2.1. Processus de bourgeonnement et de croissance axonale

Un trauma spinal peut conduire à l'axotomie des neurones descendants et ascendants au niveau du site de la lésion. Des différences entre les espèces, même au sein des vertébrés, existent en ce qui concerne les processus de régénération neuronale après trauma du système nerveux chez l'adulte. La salamandre (amphibien urodèle) est en effet connue pour sa capacité à régénérer sa queue, sa mâchoire, son cœur, ses pattes, sa rétine, son cristallin, son cerveau, ainsi que sa moelle épinière (Brockes and Kumar, 2008). La régénération observée au niveau du système nerveux central n'est cependant pas totale, car les connexions sont en général moins nombreuses qu'avant lésion, et la guidance axonale ne se fait pas parfaitement (Ferreira et al., 2012). De façon curieuse, la grenouille (amphibien anoure) qui est proche de la salamandre dans l'évolution, perd cette capacité au cours de son développement, similairement aux oiseaux ou aux mammifères. Cette régénération est bien sûr en partie due à une prolifération cellulaire, mais aussi à une croissance axonale, afin de pouvoir créer les connexions neuronales nécessaires au fonctionnement de l'organisme. Comme décrit précédemment, chez les mammifères adultes, les neurones lésés ont la capacité de régénérer dans un environnement permissif (David and Aguayo, 1981), mais l'environnement périneuronal lésionnel ne le leur permet pas (Bradbury and Burnside, 2019). La régénération neuronale semble limitée aux

mammifères nouveau-nés. En effet, des opossums ayant reçu une transection spinale à sept-huit jours post-naissance ne présentent aucune différence fonctionnelle à l'âge adulte par rapport à des animaux contrôles. De plus, une analyse morphologique montre qu'une restauration structurelle neuronale a eu lieu après lésion (Saunders et al., 1998).

La croissance axonale se fait au travers d'une dynamique du cytosquelette dans les cônes de croissance axonaux. Ces cônes de croissance sont composés d'actine organisée en faisceaux parallèles dans les filipodes, ou organisée en réseau dans les lamellipodes. Dans la zone centrale, les microtubules projettent leur extrémité en polymérisation dans les filipodes centraux (Figure 10A et 10B). Le processus d'élongation est divisé en trois étapes. Durant la protrusion, les filaments d'actine polymérisent leur extrémité vers les bordures du cône de croissance, ce qui induit l'élongation des filipodes et des lamellipodes. Durant la seconde étape dite d'engorgement, l'actine se dépolymérise, ce qui laisse une ouverture pour les microtubules qui polymérisent alors à la place vacante laissée par l'actine. La dernière étape est la consolidation, durant laquelle les microtubules nouvellement polymérisés se stabilisent (Blanquie and Bradke, 2018). La répétition de ces trois étapes permet l'élongation de l'axone, et donc la croissance axonale. Après trauma spinal, et donc autour du site lésé, les cônes de croissances axonaux laissent la place à des bulbes terminaux dystrophiques (ou bulbes de rétractation) (Tom et al., 2004; Ertürk et al., 2007). Il s'agit de structures ovales composées de lamellipodes, mais sans filipode. Cette structure est dynamique, dans le sens où les lamellipodes se déplacent d'avant en arrière (Tom et al., 2004). De plus, les microtubules continuent leurs cycles de polymérisation et dépolymérisation, mais uniquement dans le centre du bulbe et de façon désorientée (Figure 10C). Cette dynamique anormale des microtubules pourrait ainsi participer à l'incapacité des terminaisons axonales à reformer des cônes de croissance axonaux après axotomie. En effet, l'administration de nocodazole (une drogue induisant la dépolymérisation des microtubules) au niveau de la racine ganglionnaire dorsale induit la transformation des cônes de croissances en des structures ressemblant à des bulbes dystrophiques (Ertürk et al., 2007). Si cette désorganisation immédiate du cytosquelette est provoquée par l'axotomie, les processus sous-tendant l'impossibilité des bulbes dystrophiques à redevenir des cônes de croissance axonaux ne sont pas très bien compris actuellement. L'hypothèse la plus probable serait que les facteurs extrinsèques tels que les CSPG, Nogo-A et autres molécules, médient ce maintien du bulbe dystrophique, peut-être via la voie RhoA/ROCK, comme ce qui a été décrit précédemment (Blanquie and Bradke, 2018).

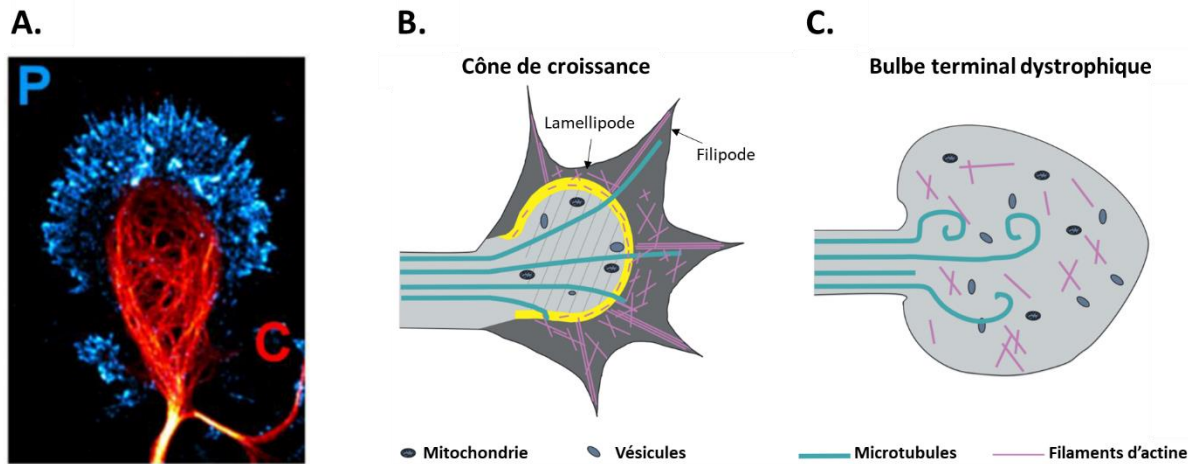


Figure 10 : Organisation du cône de croissance axonal et du bulbe terminal dystrophique

A. Cône de croissance axonal avec l'actine en bleu (P) et les microtubules en rouge (C). Adapté de *Omotade et al., 2017*. **B.** Le réseau de filaments d'actine contrôle la progression des microtubules vers la bordure de l'axone et empêche les organelles d'aller vers la périphérie du cône de croissance. **C.** Le bulbe dystrophique qui se forme après axotomie empêche la régénération axonale. La ségrégation entre les différentes parties de la structure est perdue. Les microtubules sont majoritairement dépolymérisés, et ceux restants sont désorganisés. Adapté de *Blanquie et al., 2018*.

2.2.2. Réorganisation des circuits nerveux après lésion des voies corticospinales

De manière générale, les lésions de la moelle épinière sont rarement complètes, ce qui permet aux voies épargnées ou lésées de se réorganiser afin de pallier la perte des fonctions perdues. Cette réorganisation a été très étudiée, en particulier la plasticité au niveau du tractus corticospinal, car son anatomie est relativement bien connue, que ce soit à l'âge adulte ou au cours du développement (Bernstein and Stelzner, 1983). Le CST contribue de façon importante aux mouvements chez les mammifères. En effet, ses projections sont originaires du cortex moteur primaire (mouvement volontaire), ainsi que de l'aire prémotrice dorsale et ventrale (mouvements guidés par les sens), de l'aire motrice supplémentaire (planification et coordination du mouvement) et de l'aire motrice cingulaire (aspect émotionnel du mouvement) (Lemon, 2008). À titre d'exemple, chez l'Homme, le CST est composé de 75% d'axones qui croisent et sont localisés dans la partie dorsale de la colonne latérale, et de 25% d'axones qui ne croisent pas et sont localisés dans la partie médiane de la colonne ventrale (Oudega and Perez, 2012). Chez les rongeurs, la majorité des voies croisent la ligne médiane, et environ 95% d'axones sont localisés dans la partie ventrale de la colonne dorsale et environ 3-5% dans la partie médiane de la colonne ventrale (Oudega and Perez, 2012). Ces données mettent donc en avant la modification de l'organisation des réseaux corticospinaux au cours de l'évolution des espèces, d'autant que comme précisé précédemment, la plasticité de ce réseau varie aussi au cours de l'âge de l'individu.

La période postnatale est la période la plus favorable (*ex utero*) aux processus de plasticité neuronale post-traumatique. En effet, après lésion unilatérale cervicale couplée à une ablation corticale ipsilatérale chez le rat nouveau-né, les fibres du CST contralatéral traversent la ligne médiane sous la lésion vers la moelle épinière déafférentée, et ce phénomène est atténué avec l'âge (Firkins et al., 1993). Des résultats similaires ont été obtenus précédemment par traçage rétrograde des fibres du CST après lésion unilatérale thoracique et ablation corticale ipsilatérale chez le rat nouveau-né (Bernstein and Stelzner, 1983). De même, après lésion unilatérale du cortex sensorimoteur, il a été montré que les axones corticospinaux contralatéraux décussaient normalement (décussation pyramidale), descendaient dans la moelle épinière jusqu'à atteindre leur zone cible, puis décussaient une nouvelle fois pour aller innover les neurones ipsilatéraux (normalement cible des neurones du cortex lésé) (Barth and Stanfield, 1990; Rouiller et al., 1991; Aisaka et al., 1999). Cette « récupération » est cependant abolie si le cortex intact est ensuite lésé au stade jeune adulte. Les animaux présentent alors des déficits locomoteurs bilatéraux alors que des rats jeunes adultes initialement sains ne présentent qu'un déficit unilatéral après lésion unilatérale du cortex sensorimoteur. Ces résultats mettent en évidence que la récupération fonctionnelle observée chez les nouveau-nés est due aux fibres du CST issues du cortex contralatéral à la lésion (Barth and Stanfield, 1990) (Figure 11).

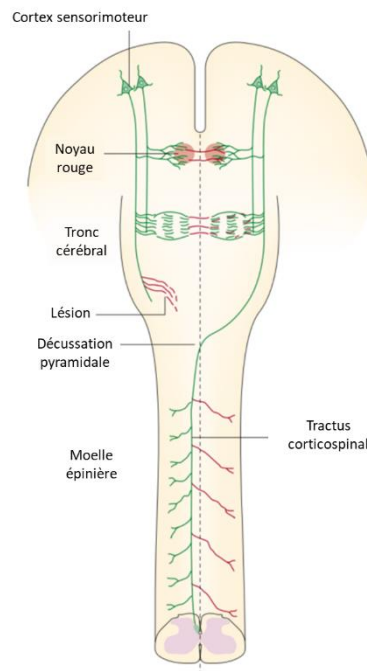


Figure 11 : Représentation schématique des projections du tractus corticospinal (CST) après lésion unilatérale de la moelle épinière

Une lésion unilatérale du CST au-dessus de la zone de décussation pyramidale induit l'axotomie des axones originaires du cortex sensorimoteur ipsilatéral, et qui projettent normalement dans la moelle épinière contralatérale. Les fibres du CST du côté sain (fibres en vert) développent spontanément des bourgeonnements (fibres en rouge) qui vont croiser la ligne médiane vers les neurones déafférentés contralatéraux dans la moelle épinière. Adapté de *Raineteau et Schwab, 2001*.

Ces processus de récupération observés après lésion du cortex sensorimoteur durant la période postnatale s'atténuent avec l'âge, et ne sont plus observables chez l'animal adulte (Barth and Stanfield, 1990).

Malgré les faibles capacités de régénération des neurones du système nerveux central, des processus de récupération fonctionnelle spontanée ont été observés après trauma spinal incomplet dans divers organismes adultes tels que le rat (Bareyre et al., 2004; Ballermann and Fouad, 2006), la souris (Courtine et al., 2008; Liu et al., 2010), le chat (Rossignol et al., 2002; Martinez et al., 2011), le singe (Courtine et al., 2005), ou encore l'Homme (Raineteau and Schwab, 2001). L'hypothèse proposée a été que cette récupération fonctionnelle locomotrice était associée à un bourgeonnement collatéral, comme ce qui est observé après lésion du cortex sensorimoteur chez les nouveau-nés. Cette hypothèse a donc été vérifiée, et il a donc été montré que les axones contralatéraux généraient de nouvelles connexions en contournant le site lésé, et permettaient la récupération fonctionnelle observée (Ballermann and Fouad, 2006; Courtine et al., 2008; Rossignol and Frigon, 2011). Chez le rat, après hémisection latérale spinale thoracique, il a également été montré grâce à des techniques de marquage neuronal rétrograde et antérograde transynaptique qu'à douze semaines post-lésion, les axones lésés du tractus corticospinal bourgeonnaient vers la matière grise cervicale contralatérale pour contacter des neurones propriospinaux à longue portée. Ces neurones créent alors de nouveaux circuits axonaux permettant d'innervier les motoneurones lombaires cibles des axones lésés, et sont corrélés avec la récupération fonctionnelle locomotrice observée (Bareyre et al., 2004) (Figure 12). Ces derniers résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une lignée transgénique de souris dont les fibres du CST expriment une molécule fluorescente, et plus particulièrement que la lésion du CST dorsal induit la formation de nouvelles collatérales sur les motoneurones lombaires depuis les fibres du CST ventral et dorsolatéral (Bareyre et al., 2005). En effet, si après lésion du CST dorsal, une lésion du CST ventral est effectuée, les animaux ne montrent aucune amélioration fonctionnelle, démontrant bien l'implication du bourgeonnement des fibres du CST ventral dans la récupération fonctionnelle observée chez le rat (Weidner et al., 2001). Il semblerait donc qu'un circuit intraspinal axonal se crée au niveau des motoneurones lombaires afin de se substituer, au moins en partie, à l'arrêt de l'innervation par les voies lésées (Figure 12C).

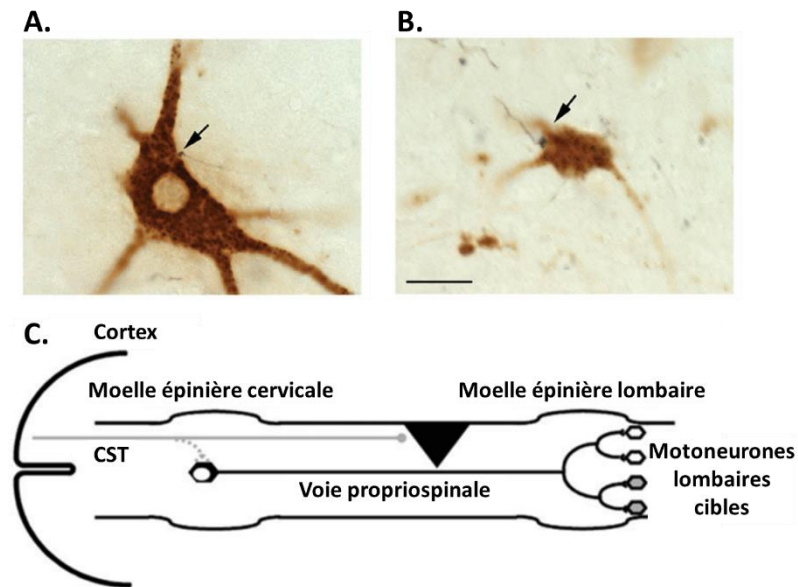


Figure 12 : Bourgeonnement des fibres du CST sur les neurones propriospinaux

Apposition entre un neurone propriospinal à courte (A) ou à longue portée (B) en marron, et une fibre du CST en noir montré par les flèches. C. Les voies lésées du CST bourgeonnent et créent de nouvelles synapses sur les neurones propriospinaux à longue portée, qui vont aller innerver les motoneurones lombaires cibles des axones lésés du CST. Adapté de Bareyre et al., 2004.

Cette récupération fonctionnelle locomotrice induite par le bourgeonnement du CST contralatéral à la lésion peut être évaluée de différentes façons. Une manière simple et couramment utilisée pour évaluer les performances motrices chez le rat après trauma spinal est le BBB score (pour Basso, Beattie et Bresnahan). Ce test est divisé en vingt et un points sur lesquels les animaux sont évalués. Basso et ses collaborateurs ont ainsi montré que suite à une contusion modérée ou légère des voies du CST dorsal au niveau thoracique, une réduction drastique de ce BBB score était observée à un jour post-lésion, et qu'une amélioration progressive était observée au cours des jours suivants, ce qui peut être corrélé aux phénomènes de bourgeonnement axonaux décrits précédemment (Basso et al., 1995) (Figure 13). Ce BBB score a depuis été décliné pour une utilisation chez la souris (Basso et al., 2006). Des techniques de stimulation électrique (Fouad et al., 2001; Sasaki et al., 2004; Oudega and Perez, 2012) et magnétique (McKay et al., 1997; Zhang et al., 2008; Oudega and Perez, 2012; Petrosyan et al., 2017) ont aussi été développées pour évaluer électrophysiologiquement l'intégrité des voies descendantes, le CST inclus. À titre d'exemple, l'évaluation des potentiels évoqués moteurs (PEM) des pattes avant (biceps brachial) et arrières (tibialis antérieur) a montré qu'après lésion du CST dorsal cervical chez le rat, l'amplitude des PEM avec une latence élevée (voies polysynaptiques) était réduite, alors que celle des PEM avec une latence faible (voies monosynaptiques) restait inchangée. Ces résultats semblent montrer d'une part que le CST ne connecte qu'indirectement les motoneurones

locomoteurs, et d'autre part, que d'autres voies descendantes sont impliquées dans l'innervation des motoneurones locomoteurs (Nielsen et al., 2007).

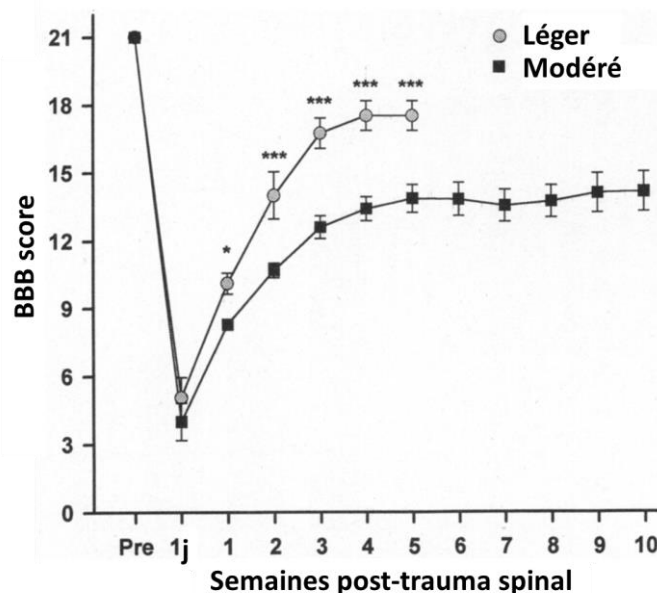


Figure 13 : Restauration de la fonction locomotrice évaluée par le BBB score après contusion thoracique chez le rat

Le trauma spinal induit une réduction drastique du BBB score, mais une récupération fonctionnelle locomotrice est cependant observée dans les semaines suivant le trauma, qu'il soit léger ou modéré. Adapté de *Basso et al., 1995*.

2.2.3. Réorganisation des circuits au niveau des centres corticaux

Le cortex est organisé de façon somatotopique, c'est-à-dire que chaque zone corticale est assignée à une fonction particulière et a donc des cibles corticales et subcorticales diverses (Nieoullon and Rispol-Padel, 1976; Donoghue et al., 1990). Les cartes corticales sont plastiques et peuvent se réorganiser en réponse à l'apprentissage de mouvements précis, à des stimuli sensoriels, lors d'une amputation, de la lésion de nerfs périphériques, ou encore dans le cas de trauma spinaux (Donoghue et al., 1990; Sanes et al., 1990; Qi et al., 2000; Mohammed and Hollis, 2018). La surface corticale étant fixe, il en résulte forcément une réduction de la surface occupée par certaines zones au profit de la surface occupée par des zones adjacentes plus actives (Figure 14).

Suite à un trauma spinal, la réorganisation des circuits neuronaux se fait d'une part au niveau spinal, comme vu précédemment, mais peut donc aussi avoir lieu au niveau cortical. En effet, même si le cortex reste intact, les entrées et sorties vers certaines zones corticales sont interrompues. Les différentes zones corticales impliquées dans les fonctions perdues vont alors devoir s'adapter, ce qui

déclenche des mécanismes de plasticité corticale. Ce phénomène a été observé chez plusieurs espèces, dont l'Homme, le singe et le rongeur (Kokotilo et al., 2009; Nardone et al., 2013; Mohammed and Hollis, 2018). Ainsi, chez l'animal sain, les pattes avant et les pattes arrière sont contrôlées par des zones corticales distinctes. Cependant, douze semaines après hémisection thoracique dorsale chez le rat, des neurones contrôlant les pattes arrière ont été trouvés dans la zone corticale dédiée aux pattes avant grâce à un traçage rétrograde transynaptique, ce qui montre qu'un réarrangement des zones corticales a eu lieu après lésion spinale au cours du temps (Bareyre et al., 2004). De même, quatre semaines post-trauma, la stimulation corticale d'une zone spécifiquement dédiée aux muscles des pattes arrière chez des rats après transection bilatérale des CST, induit une réponse des pattes avant, des vibrisses et du tronc (Fouad et al., 2001). Ces résultats sont à corrélérer avec l'apparition de processus de bourgeonnement axonaux provenant du CST dans la région cervicale (Fouad et al., 2001; Bareyre et al., 2004).

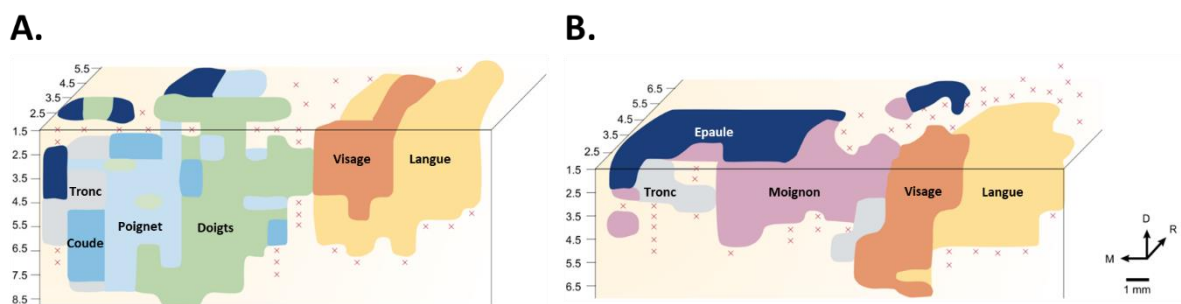


Figure 14 : Réorganisation de la carte corticale motrice après amputation du bras chez le macaque

A. Carte corticale normale. B. Carte corticale après amputation du bras correspondant, plusieurs mois auparavant. Les zones correspondant au bras amputé ont disparu de la carte corticale, au profit d'une zone correspondant au moignon. La zone correspondant à l'épaule a de plus colonisé les zones adjacentes. Les zones notées x sont des zones ne répondant à aucun stimulus. M : médian, D : dorsal, R : rostral. Adapté de Qi et al., 2000 et de Raineteau et Schwab. 2001.

Ainsi, après trauma spinal, les processus d'adaptation structurale observés au niveau corticospinal sont donc à la base de la réorganisation des cartes corticales impliquées dans la motricité. Ils pourraient ainsi contribuer à la récupération fonctionnelle après lésion spinale incomplète.

PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LES SYSTEMES NEURORESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE

1. Lésion en C2 au niveau du système neurorespiratoire

1.1. Réseau respiratoire chez l'animal sain

1.1.1. Physiologie respiratoire : anatomie fonctionnelle

La fonction respiratoire a pour but de réaliser des échanges gazeux (apport en oxygène et élimination du dioxyde de carbone) avec le milieu extérieur, afin de maintenir les pressions partielles en O₂ (pO₂) et en CO₂ (pCO₂) stables dans l'organisme au cours de la vie de l'individu.

Cette mécanique ventilatoire permet de faire passer l'oxygène dans les capillaires pulmonaires, puis dans le système circulatoire sanguin. Cet oxygène venant du milieu extérieur est nécessaire au fonctionnement cellulaire et métabolique de l'organisme, notamment grâce aux mitochondries qui oxydent les nutriments apportés par l'alimentation en présence d'oxygène (phénomène de respiration cellulaire). Il existe ainsi deux zones d'échange de l'oxygène et du dioxyde de carbone. La première se situe entre les alvéoles et les capillaires pulmonaires. Elle permet d'apporter l'oxygène dans le système circulatoire sanguin et d'évacuer le dioxyde de carbone hors de ce dernier. La deuxième est localisée entre les capillaires systémiques et les tissus. L'oxygène y est extrait de la circulation sanguine et est utilisé par les cellules de ces tissus pour leur métabolisme. Le dioxyde carbone est quant à lui libéré par ces mêmes cellules dans la circulation, étant un « déchet » métabolique produit par la cellule.

La cage thoracique possède un caractère élastique, tout comme le parenchyme pulmonaire. Ces deux organes sont rattachés ensemble par la plèvre, une membrane composée de deux feuillets, qui joue un rôle essentiel, car spontanément, la cage thoracique a tendance à s'expandre vers l'extérieur alors que le poumon a tendance à aller vers l'intérieur. La plèvre est présente pour les maintenir solidaires. La paroi thoracique, composée du sternum, des côtes, des muscles intercostaux internes et externes, et du diaphragme, est musculo-squelettique (Figure 15).

Le principal muscle inspiratoire est le diaphragme, situé à la base de la cage thoracique. À chaque inspiration, le diaphragme se contracte, induisant l'expansion de la cage thoracique. Ce mouvement provoque une augmentation du volume pulmonaire. La pression intrapulmonaire va alors être inférieure à la pression atmosphérique, ce qui permet l'entrée d'air dans les poumons. Cette suite de contractions et relâchements du diaphragme est la base sur laquelle repose le cycle respiratoire des mammifères.

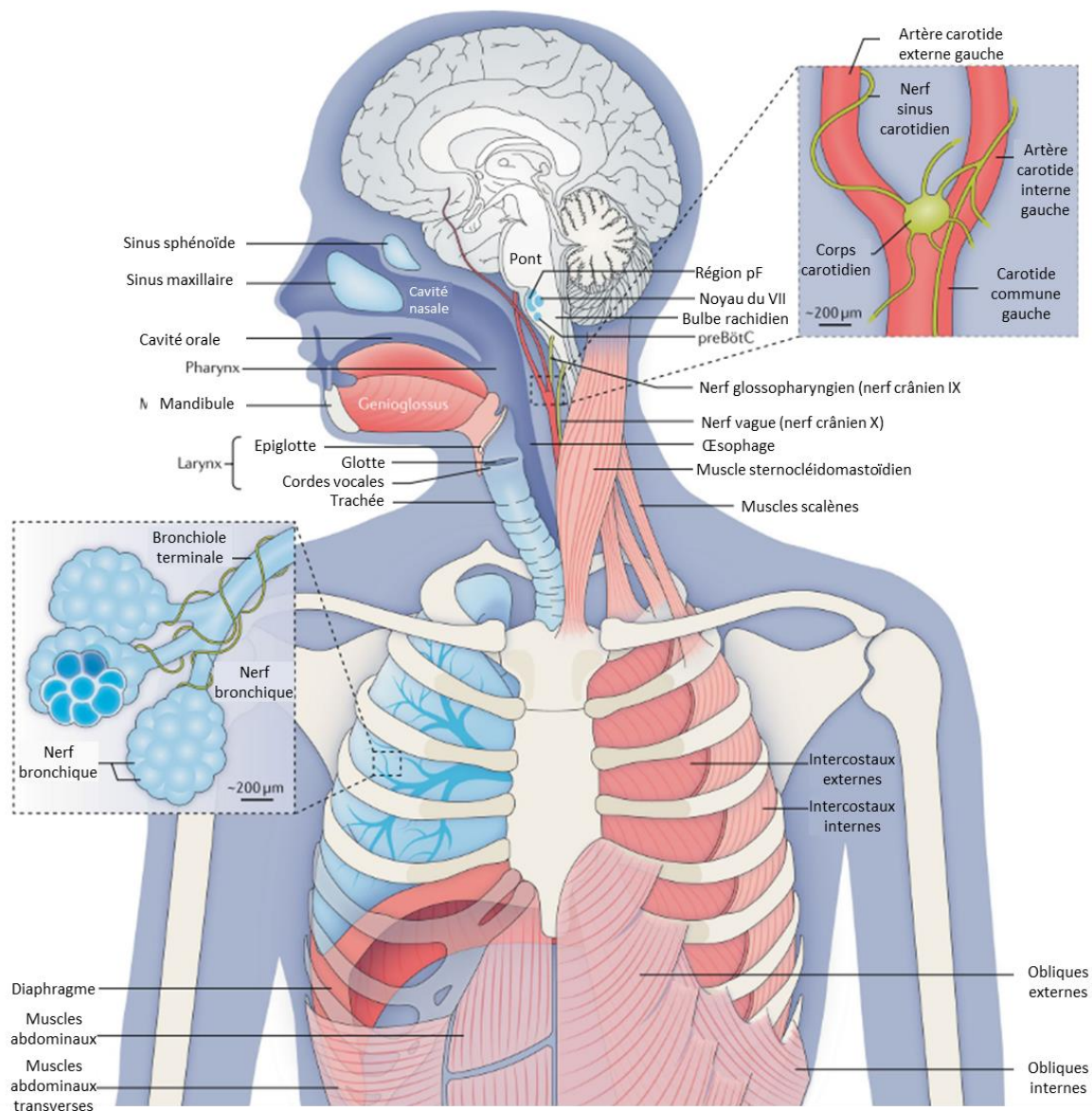


Figure 15 : Anatomie du système respiratoire

L'air inspiré entre dans l'organisme par la cavité orale et/ou la cavité nasale, puis le pharynx, le larynx et la trachée. Il arrive ensuite dans les poumons où il est transporté dans les bronches. Le diaphragme est le principal muscle inspiratoire. L'expiration se fait de façon passive par relâchement de ce diaphragme. En cas de modification des valeurs de pO_2 , pCO_2 et/ou de pH plasmatique, les chémorécepteurs centraux (région parafaciale du tronc cérébral, pF) et périphériques au niveau des corps carotidiens vont être stimulés. Les muscles respiratoires accessoires sont alors recrutés et l'expiration devient active, réduisant la durée entre chaque cycle respiratoire. Adapté de *Del Negro et al. 2018*.

1.1.2. Cycle respiratoire chez les mammifères

À l'instar des CPG qui existent dans le système locomoteur, ce rythme respiratoire est généré par un CPG localisé dans le tronc cérébral, plus précisément dans le Complexe preBötzing (preBötC) (Smith et al., 1991b; Wenninger et al., 2004). Le preBötC est localisé bilatéralement dans la zone ventrolatérale. Les neurones respiratoires du preBötC projettent leurs axones bilatéralement (vers le

preBötC opposé) afin de se synchroniser, et projettent également sur les régions respiratoires prémotrices du tronc cérébral liées à l'inspiration tels que le groupe respiratoire ventral rostral (rVRG) (Feldman et al., 1985; Dobbins and Feldman, 1994). L'activité de ces neurones est par conséquent en phase avec l'acte inspiratoire (Tan et al., 2010). Le preBötC est donc à la fois suffisant et nécessaire pour la génération du rythme inspiratoire. Le passage de la phase inspiratoire/post-inspiratoire à la phase expiratoire se fait grâce au complexe Bötzinger (BötC). Celui-ci est en effet majoritairement composé de neurones glycinergiques et GABAergiques qui inhibent les neurones inspiratoires du preBötC (inhibition réciproque) en suivant un schéma de décharge adapté à cette transition/alternance de phases respiratoires (Bryant et al., 1993; Tian et al., 1999).

En eupnée, l'expiration est un acte passif (chez l'Homme), induit par le relâchement du diaphragme. Elle peut cependant devenir active lorsque la demande en oxygène augmente (lors d'un exercice aérobie par exemple). Elle permet d'éliminer l'air pauvre en O₂ et chargé en CO₂ du sang arrivant dans les poumons.

La consommation d'O₂ par l'organisme va alors augmenter, induisant donc une augmentation de la production de CO₂. Il en résulte donc une augmentation de la pCO₂, une réduction de la pO₂ et une variation du pH sanguin. Les chémorécepteurs centraux et périphériques vont détecter ces variations et stimuler la ventilation afin de diminuer la durée d'un cycle respiratoire et donc d'augmenter la fréquence respiratoire. Les muscles abdominaux et intercostaux internes sont alors recrutés pour aider à expulser l'air des poumons plus rapidement, cet air étant pauvre en O₂ et chargé en CO₂, afin de rétablir des pressions partielles en O₂ et CO₂ et un pH plasmatique physiologique. Le rythme expiratoire actif est ainsi généré de façon « conditionnelle » par les neurones du noyau parafacial latéral (pFL) dont les axones projettent sur les neurones expiratoires du groupe respiratoire ventral caudal (cVRG) (Janczewski and Feldman, 2006).

L'étape de post-inspiration prend lieu immédiatement après l'inspiration. Elle va induire une augmentation de la durée de contraction du diaphragme, ainsi qu'une réduction de la durée de contraction des muscles abducteurs du larynx. Cela permet ainsi de retarder l'expiration et donc de garder l'air inspiré plus longtemps dans les poumons, bénéfique pour les échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires (Dutschmann et al., 2014). Les neurones responsables de cette post-inspiration seraient localisés dans une zone proche du pF, caudale au noyau du VII, et nommée complexe post-inspiratoire (PiCo) (Anderson et al., 2016).

Ces trois étapes, d'inspiration via le preBötC, de post-inspiration via le PiCo et d'expiration via le pFL sont interdépendantes, générées par des mécanismes excitateurs (glutamatergique), mais modulées, coordonnées et connectées par des mécanismes inhibiteurs (GABAergique) (Anderson et al., 2016) (Figure 16).

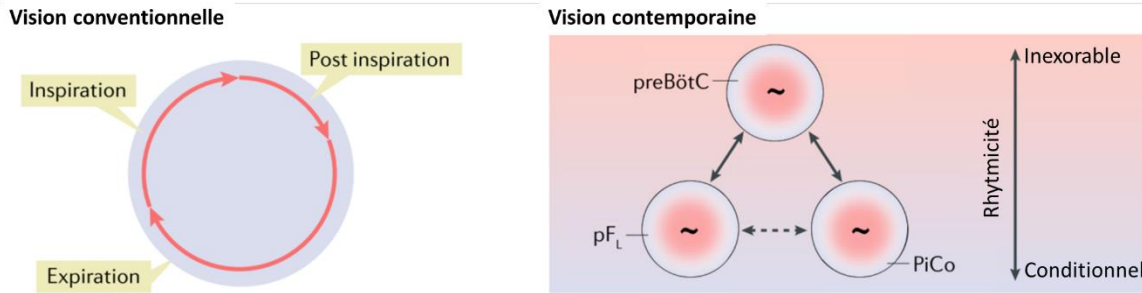


Figure 16 : Représentation schématique des étapes du cycle respiratoire

Dans la vision conventionnelle du cycle respiratoire, la respiration est vue comme la succession des trois phases : inspiration, post-inspiration et expiration. Selon la vision contemporaine, l'inspiration est la seule partie inexorablement présente lors de chaque cycle, alors que la post-inspiration et l'expiration sont des parties conditionnelles chacune générées par leur propre oscillateur (noyau parafacial latéral (pFL) et complexe post-inspiratoire (PiCo) respectivement), eux-mêmes coordonnés par le Complexe preBötzing (preBötC). Adapté de *Del Negro et al. 2018*.

L'alternance de ces différentes phases repose donc sur la coordination de l'activité entre les différentes régions respiratoires du tronc cérébral (Figure 17).

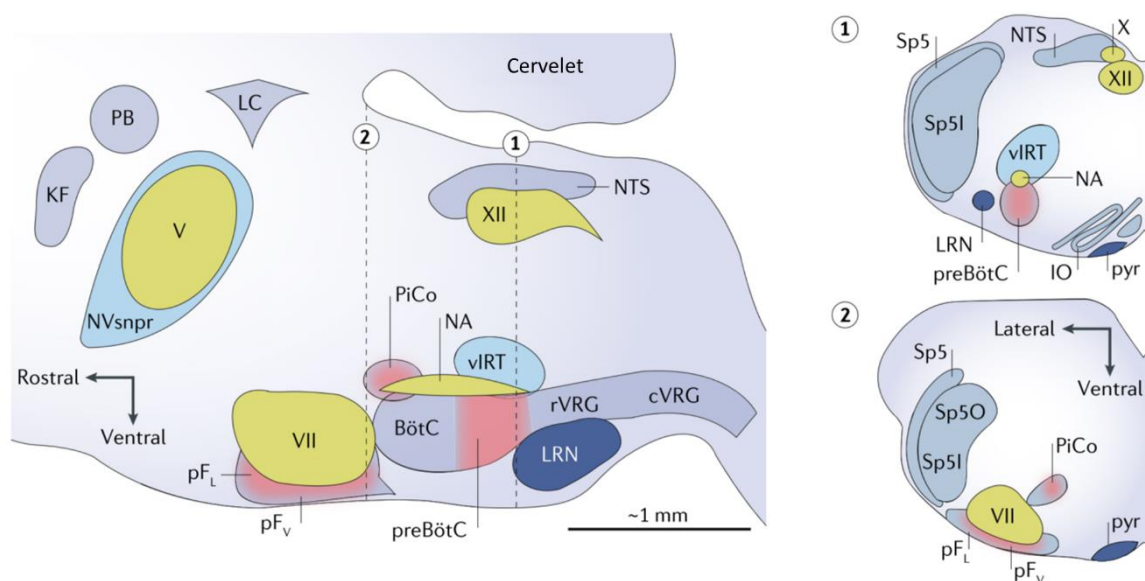


Figure 17 : Schéma des régions respiratoires du tronc cérébral

Vue para-sagittale du tronc cérébral où est localisé le CPG respiratoire. Les régions responsables du rythme respiratoire sont représentées en rouge : le complexe préBötzinger (preBötC, inspiration), le groupe respiratoire parafacial latéral (pFL, expiration), le groupe respiratoire parafacial ventral/noyau rétrotrapézoïde (pFV/RTN, chimiosensitif) et le complexe post-inspiratoire (PiCo, post-inspiration). En bleu : formation réticulée ventrale impliquée dans le mouvement des moustaches (vIRT) et le noyau sensoriel principal trigéminal masticatoire (NVsnpr). En vert, les noyaux moteurs crâniens contrôlant la résistance des voies aériennes supérieures : le noyau moteur de l'hypoglosse (XII) et le noyau ambigu (NA) ; les noyaux moteurs crâniens contrôlant les muscles faciaux : noyau moteur facial (VII) et le noyau moteur trigéminal (V). En gris, les zones du tronc cérébral associées aux « patterns » moteurs respiratoires et à l'intégration des informations sensorimotrices : le groupe respiratoire ventral rostral (rVRG, pré-motoneurons inspiratoires, *i.e.*, phréniques et intercostaux externes), le groupe respiratoire ventral caudal (cVRG, pré-motoneurons expiratoires, *i.e.*, abdominaux et intercostaux externes internes). Les autres zones en gris comprennent le locus coeruleus (LC) qui reçoit les projections du preBötC, et le noyau réticulaire latéral (LC). Les encarts 1 et 2 montrent des sections transverses au niveau du preBötC (ligne en pointillés 1) et au niveau du pF (ligne en pointillés 2). Y sont représentés : le noyau du tractus solitaire (NTS), le tractus trigéminal spinal (Sp5), la partie oralis du noyau sensoriel trigéminal spinal (Sp5O) et la partie interpolaris (Sp5I), l'olive inférieure (IO) et le tractus pyramidal (pyr). Adapté de *Del Negro et al.* 2018.

1.1.3. Génération du rythme respiratoire

L'origine de la rythmicité respiratoire est discutée depuis la découverte du preBötC (Smith et al., 1990; Smith et al., 1991a), et plusieurs modèles ont depuis été développés pour tenter de l'expliquer. Bien que ces modèles aient tous contribué à une meilleure compréhension de la génération du rythme respiratoire, certains restent plus controversés que d'autres, voire remis en question.

Le modèle en trois phases (correspondant à la vision conventionnelle du rythme respiratoire montré en Figure 16) propose que le rythme respiratoire repose sur la propriété des conductances membranaires des neurones inspiratoires et sur une inhibition synaptique réciproque entre les

neurones pré-inspiratoires précoces (e-I) et post-inspiratoires (p-I). Ces deux types de neurones sont ensuite inhibés durant la phase inspiratoire par les neurones E (expiration). La phase inspiratoire suivante débute avec l'arrêt des décharges des neurones E (Richter et al., 1986). L'efficacité de ce modèle a été testée entre autres par Feldman et al. qui ont bloqué cette inhibition synaptique dans un modèle *ex vivo* de moelle épinière/tronc cérébral isolé de rat au stade néonatal en milieu extracellulaire contrôlé. Plus précisément, le milieu a été déplété en ions Cl^- et des antagonistes spécifiques GABAergiques ont été ajoutés pour bloquer les courants Cl^- et K^+ . Leurs résultats ont montré que ces conditions n'affectaient que peu le rythme observé. Ils en ont donc conclu que l'inhibition n'est pas nécessaire à la rythmogenèse et ont émis l'hypothèse de l'existence de cellules respiratoires « pacemakers » (Feldman et al., 1990).

Le modèle d'un système « pacemaker » repose sur l'existence de neurones « pacemaker-like » dans le preBötC. Ces neurones sont caractérisés par des courants I_{NAP} (courants Na^+ persistants) et des courants I_{CAN} (courants cationiques activés par le Ca^{2+}), qui fonctionneraient de concert avec un circuit exciteur pour assurer la génération et le maintien du rythme respiratoire (Koizumi et al., 2013; Chevalier et al., 2016). L'utilisation de drogues atténuant ces courants au niveau et autour du preBötC induit une perturbation voire l'arrêt du rythme du preBötC ou des nerfs *in vitro*, mais perturbe aussi d'autres propriétés neuronales (Guinamard et al., 2013). Cependant, l'utilisation de ces mêmes drogues uniquement au niveau du preBötC n'a aucun effet sur ces mêmes rythmes (Pace et al., 2007). Cette hypothèse de neurones « pacemakers » est donc remise en question (Del Negro et al., 2002; Kosmidis et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Del Negro et al., 2018).

Une autre alternative aux deux précédents modèles est celle de l'excitation récurrente proposée par l'équipe de Jack L. Feldman (Kam et al., 2013; Del Negro et al., 2018; Ashhad and Feldman, 2020). Selon ce modèle, une petite partie des neurones inspiratoires excitateurs du preBötC déchargent spontanément de façon aléatoire (différents neurones à chaque inspiration), d'abord avec une amplitude et une fréquence faible (formation de « burstlets »). Ces neurones projetant chacun sur un peu moins d'un quart des autres neurones du même type dans le preBötC, le nombre de neurones activés, leur synchronisation ainsi que leur amplitude de décharge augmentent. Il en résulte la formation d'un « burst » qui va se propager aux cibles de ces neurones (noyau moteur de l'hypoglosse (XII), neurones prémoteurs, moteurs...) (Del Negro et al., 2018; Ashhad and Feldman, 2020). Cette phase inspiratoire est ensuite suivie d'une période réfractaire durant laquelle les neurones redeviennent quiescents (phase d'expiration) (Figure 18).

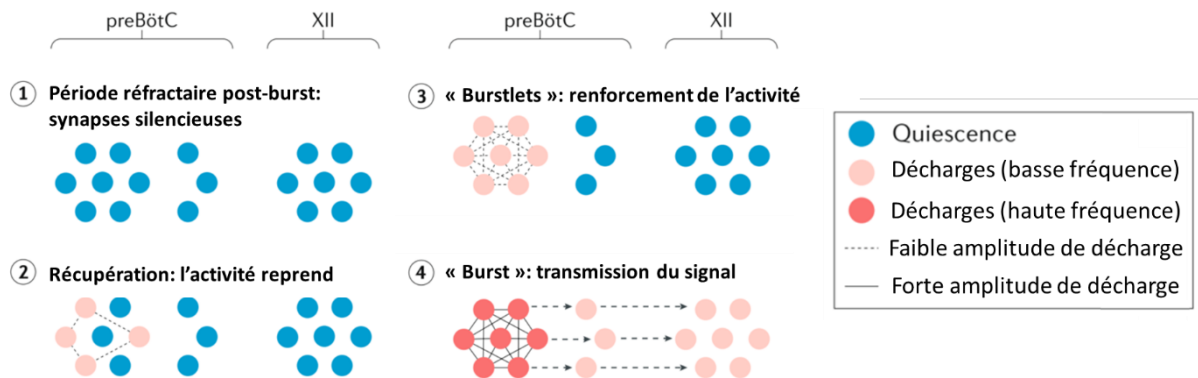


Figure 18 : Schéma représentant la théorie des « Bursts et burstlets »

1) Période réfractaire durant la phase d'expiration. 2) L'activité spontanée reprend dans des neurones excitateurs aléatoires du preBötC. 3) Les neurones actifs renforcent leurs interconnexions et augmentent leur fréquence et leur amplitude de décharge (formation de « burstlet » lors de l'activité pré-inspiratoire). 4) Déclenchement d'un « burst » qui va propager le signal aux neurones cibles dans le PreBötC et dans les autres structures, ainsi qu'au noyau moteur de l'hypoglosse (XII). Adapté de *Del Negro et al.* 2018.

1.1.4. Modulation du rythme respiratoire

Lors d'une augmentation de la demande métabolique qui peut survenir en cas de stress ou lors d'une activité physique, la pression partielle en oxygène (pO_2) peut être amenée à diminuer, et la pression partielle en dioxyde de carbone (pCO_2) à augmenter, conduisant à une variation du pH. Ce sont les corps carotidiens situés au niveau des artères carotidiennes qui vont détecter les variations sanguines de pO_2 , pCO_2 , et pH, et transmettre ces informations au tronc cérébral via le nerf glossopharyngé (nerf crânien IX). Au niveau du réseau respiratoire, c'est le noyau parafacial ventral (pF_V) aussi connu sous le nom de noyau rétrotrapézoïde (RTN), qui va détecter les variations de la pCO_2 et du pH dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) via des chimiorécepteurs. Il va aussi recevoir les informations sanguines (efférences excitatrices) des corps carotidiens (Takakura et al., 2006; Guyenet et al., 2009). Les neurones du pF_V /RTN projettent leurs axones sur plusieurs régions du tronc cérébral comprenant entre autres le rVRG, le cVRG, ou encore le preBötC afin de moduler la fréquence des différents oscillateurs (inspiratoire, préinspiratoire et expiratoire) (Bochorishvili et al., 2012; Smith et al., 2013). Il permet aussi une régulation de la résistance des voies aériennes supérieures de par son action sur le noyau Kölliker–Fuse du noyau pontique (Dutschmann and Herbert, 2006). Le pF_V /RTN est donc un centre de régulation qui permet de moduler et d'adapter l'activité respiratoire afin de maintenir les valeurs de pressions partielles en O_2 , CO_2 , et de pH relativement stables et adaptées à la demande métabolique cellulaire et la survie de l'organisme.

1.1.5. Transmission du rythme respiratoire aux motoneurones phréniques médullaires

Comme expliqué précédemment, en eupnée, la phase active du cycle respiratoire est l'inspiration, qui passe par la contraction du muscle diaphragmatique. Ce sont les motoneurones phréniques qui innervent le diaphragme via les nerfs phréniques (Ellenberger and Feldman, 1988; Feldman et al., 2013; Richter and Smith, 2014). Ceux-ci sont localisés bilatéralement au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière cervicale et regroupés en clusters au niveau des segments métamériques C3-C6 (Figure 19). Les neurones pré moteurs inspiratoires du rVRG projettent ainsi de façon monosynaptique sur les corps cellulaires des motoneurones via les voies descendantes respiratoires spinales, et de façon bilatérale, la décussation se faisant au niveau du tronc cérébral (Ellenberger and Feldman, 1988; Lipski et al., 1994). Ces voies descendantes bulbo-spinales sont localisées dans les funicules latéraux (projettent préférentiellement vers les motoneurones phréniques, plus impliqués dans la respiration spontanée) et les funicules ventro-médians (projettent préférentiellement vers les motoneurones intercostaux, moins impliqués dans la respiration spontanée) (Feldman et al., 1985; Lipski et al., 1994; Vinit et al., 2006).

Pour identifier et étudier les motoneurones phréniques de manière spécifique, la sous-unité B inactivée de la toxine du choléra (CTB pour Cholera Toxin subunit B) est couramment utilisée (Mantilla et al., 2009; Vandeweerd et al., 2018). Elle a pour particularité d'être un traceur rétrograde neurotrope qui est transporté jusqu'au corps cellulaire des motoneurones, après être entré par leurs terminaisons synaptiques actives. En effet, le CTB se fixe sur le récepteur Galactosyl-N-Acetylgalactosaminyl (GM1) présent sur la membrane des terminaisons axonales des motoneurones au niveau de la jonction neuromusculaire, permettant son entrée par endocytose dans ces cellules (Nichols et al., 2015). Certaines équipes appliquent directement le CTB sur, ou dans le diaphragme après laparotomie (Warren et al., 2018; Urban et al., 2019b), d'autres préfèrent l'injecter dans l'espace intrapleurale (ne requiert pas de chirurgie, donc moins invasif) où il va entrer en contact avec le diaphragme (Nicaise et al., 2012). L'identification des motoneurones phréniques peut aussi se faire par incubation du nerf phrénique dans de l'hydroxystilbamidine (Fluoro-Gold™) après axotomie (Boulenguez et al., 2007b). Il s'agit d'un traceur rétrograde qui va donc marquer tous les neurones dont les axones ont été lésés et en contact avec l'hydroxystilbamidine. Bien que cette méthode permette donc techniquement de marquer l'ensemble des motoneurones phréniques ipsilatéraux à l'axotomie du nerf phrénique, elle reste très invasive.

Au niveau de la jonction neuromusculaire entre les nerfs phréniques et le diaphragme, la libération d'acétylcholine va engendrer la contraction des fibres musculaires diaphragmatiques.

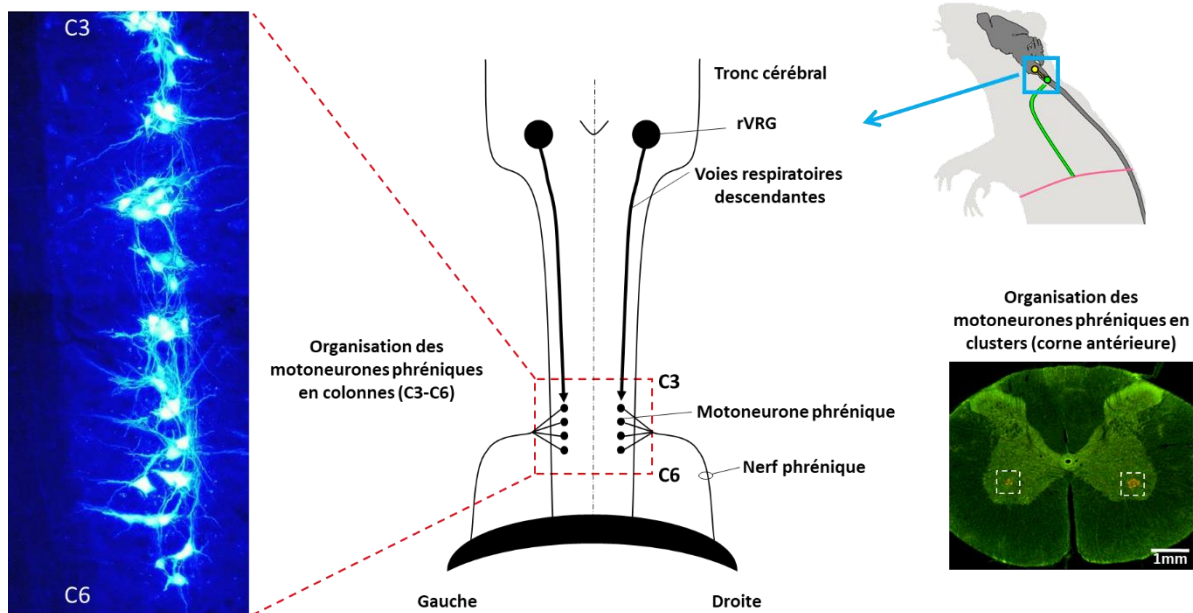


Figure 19 : Voies descendantes respiratoires innervant les motoneurones phréniques

Les motoneurones phréniques sont regroupés en clusters organisés en colonne au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière C3-C6. A gauche, une coupe longitudinale de moelle épinière cervicale de rat : les motoneurones phréniques sont identifiés en bleu (hydroxystilbamidine). En bas à droite, une coupe transversale de moelle épinière cervicale de rat, adaptée de *MacFarlane et al.* 2011. Vert : 5-HT2B. Rouge : motoneurones phréniques (sous-unité B de la toxine du choléra).

1.2. Physiopathologie respiratoire suite à un trauma spinal cervical

Les lésions hautes de la moelle épinière induisent des déficits ventilatoires lorsque les voies descendantes respiratoires décrites précédemment sont impactées. L'un des enjeux les plus importants pour les patients et le personnel soignant impliqué est de réduire ces déficits ventilatoires, en particulier pour les patients dont la survie est dépendante d'une assistance ventilatoire mécanique (Winslow and Rozovsky, 2003). La compréhension des mécanismes délétères et bénéfiques qui prennent place dans la moelle épinière suite à un trauma spinal est donc nécessaire. Plusieurs modèles précliniques ont été développés afin d'étudier la physiopathologie des traumas spinaux cervicaux.

1.2.1. Modèle préclinique de trauma spinal cervical en C2

Il existe à ce jour plusieurs modèles précliniques de trauma spinaux cervicaux, soit de compressions (Forgione et al., 2017; Cheng et al., 2021b), de contusions (Baussart et al., 2006; Golder et al., 2011; Nicaise et al., 2012; Allen et al., 2019; Wen et al., 2019; Wu M., 2019; Wu et al., 2020) ou encore de sections (Vinit et al., 2006; Lee et al., 2014a; Bezdudnaya et al., 2018), à différents niveaux de la moelle épinière cervicale et avec une étendue de lésion plus ou moins complète. En ce qui concerne la physiopathologie respiratoire, l'un des modèles les plus documentés et qui a par ailleurs été utilisé dans ce travail doctoral, est le modèle d'hémisection spinale cervicale latérale au niveau du segment métamérique C2 chez le rat (Goshgarian, 1979; Moreno et al., 1992b; Goshgarian, 2003; Vinit et al., 2006; Lane et al., 2008c; Navarrete-Opazo et al., 2015; Satkunendrarajah et al., 2018; Warren et al., 2018) et chez la souris (Minor et al., 2006; Mantilla et al., 2014; Zholudeva et al., 2017). Cette hémisection en C2, réalisée de façon dorso-ventrolatérale, induit une hémiparésie motrice chez les animaux lésés, ainsi qu'une réduction de moitié des efférences sympathiques (Voir chapitre « PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LES SYSTEMES NEURORESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE », partie 2.2.). En particulier, cette lésion provoque une axotomie des prémotoneurones du rVRG qui projettent sur les motoneurones phréniques, et dont les axones, forment le nerf phrénique qui innerve le diaphragme. Il en résulte une paralysie hémidiaphragmatique du côté ipsilatéral à la lésion (côté lésé), le côté contralatéral intact permettant à l'animal de survivre (Figure 20).

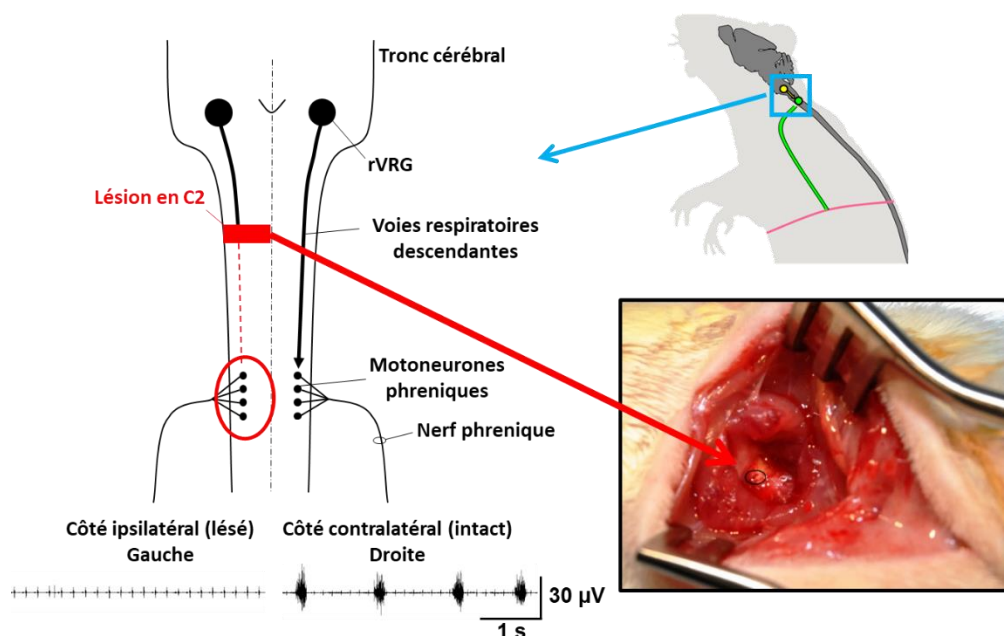


Figure 20 : Modèle d'hémisection spinale en C2 chez le rongeur

L'hémisection en C2 (côté gauche sur le schéma) induit une axotomie des prémotoneurones du rVRG qui projettent sur les pools de motoneurones phréniques dans la moelle épinière (C3-C6). Il en résulte une paralysie hémidiaphragmatique du côté lésé (évaluable par une électromyographie diaphragmatique, comme présenté en bas du schéma).

Le principal avantage de ce modèle réside dans le fait qu'il soit reproductible et que les motoneurones phréniques ne soient pas directement lésés, mais « seulement » déafférentés. Cela permet d'étudier l'activité spécifique de ces motoneurones, les processus plastiques neurorespiratoires les impliquant, ainsi que les changements moléculaires et cellulaires liés à la neuroinflammation dans, et autour de ces motoneurones, en réponse à leur déafférentation.

1.2.1.1. Impact ventilatoire d'une lésion spinale cervicale en C2

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer les différents paramètres respiratoires impactés par la lésion en C2. Du point de vue ventilatoire, plusieurs laboratoires ont mis en évidence une diminution du volume courant (résultant de la paralysie hémidiaphragmatique) ainsi qu'une augmentation de la fréquence respiratoire chez les rats lésés (Golder et al., 2001; Fuller et al., 2008; Lovett-Barr et al., 2012). Cette augmentation de la fréquence respiratoire est associée à une diminution des temps inspiratoire et expiratoire (Lee et al., 2014a), et permet aux animaux de compenser la diminution de leur volume courant. Ces animaux lésés ont ainsi un volume minute (volume d'air respiré par minute) équivalent à celui des animaux sains. Cependant, ces compensations éloignent ces différents paramètres de leur valeur physiologique. C'est la raison pour laquelle la récupération fonctionnelle du système respiratoire doit être privilégiée.

Pour aider à compenser ce déficit ventilatoire induit par la lésion, les muscles respiratoires accessoires peuvent être recrutés, dont les muscles abdominaux et intercostaux internes. En effet, comme expliqué précédemment, ces muscles n'interviennent normalement pas dans les processus respiratoires physiologiques. Ils peuvent cependant être mis à contribution de façon « conditionnelle » via le pF_L lors d'exercice physique, de respiration forcée, ou, dans notre cas, de déficit respiratoire. Dougherty et al. ont ainsi montré que le rôle des muscles intercostaux dans la récupération ventilatoire observée à la suite d'une lésion en C2 était non négligeable (Dougherty et al., 2012b).

1.2.1.2. Plasticité après lésion spinale cervicale : le « CPP »

W.T. Porter a été en 1895 le premier à démontrer qu'à la suite d'une lésion spinale cervicale partielle, une récupération fonctionnelle de l'hémidiaphragme paralysé survenait après section du nerf phrénique contralatéral chez le chien et le lapin (Porter, 1895). Il a plus précisément réalisé une hémisection spinale dans la région cervicale, abolissant l'activité hémidiaphragmatique ipsilatérale à cette lésion, puis montré qu'une phrénicotomie contralatérale induisait une activité immédiate au niveau de l'hémidiaphragme précédemment paralysé. En effet, la phrénicotomie contralatérale provoquerait une asphyxie immédiate de l'animal, qui se retrouverait par conséquent en déficit respiratoire important. Cela conduirait alors à une augmentation de la force de la commande

respiratoire, qui permettrait l'expression d'une activité compensatoire spécifique au système respiratoire. Ce phénomène a par la suite été nommé « crossed phrenic phenomenon » (CPP) (Figure 21). L'existence du CPP a ainsi été démontrée chez diverses espèces telles que le chien (Porter, 1895; Deason and Robb, 1911; Rosenblueth and Ortiz, 1936; Lewis and Brookhart, 1951), le chat (Deason and Robb, 1911; Seligman and Davis, 1941; Rosenbaum and Renshaw, 1949; Lewis and Brookhart, 1951), le lapin (Rosenblueth and Ortiz, 1936; Chatfield and Mead, 1948; Rosenbaum and Renshaw, 1949), le cochon d'Inde (Goshgarian and Guth, 1977), le rat (Goshgarian, 1981; O'Hara and Goshgarian, 1991) et la souris (Minor et al., 2006).

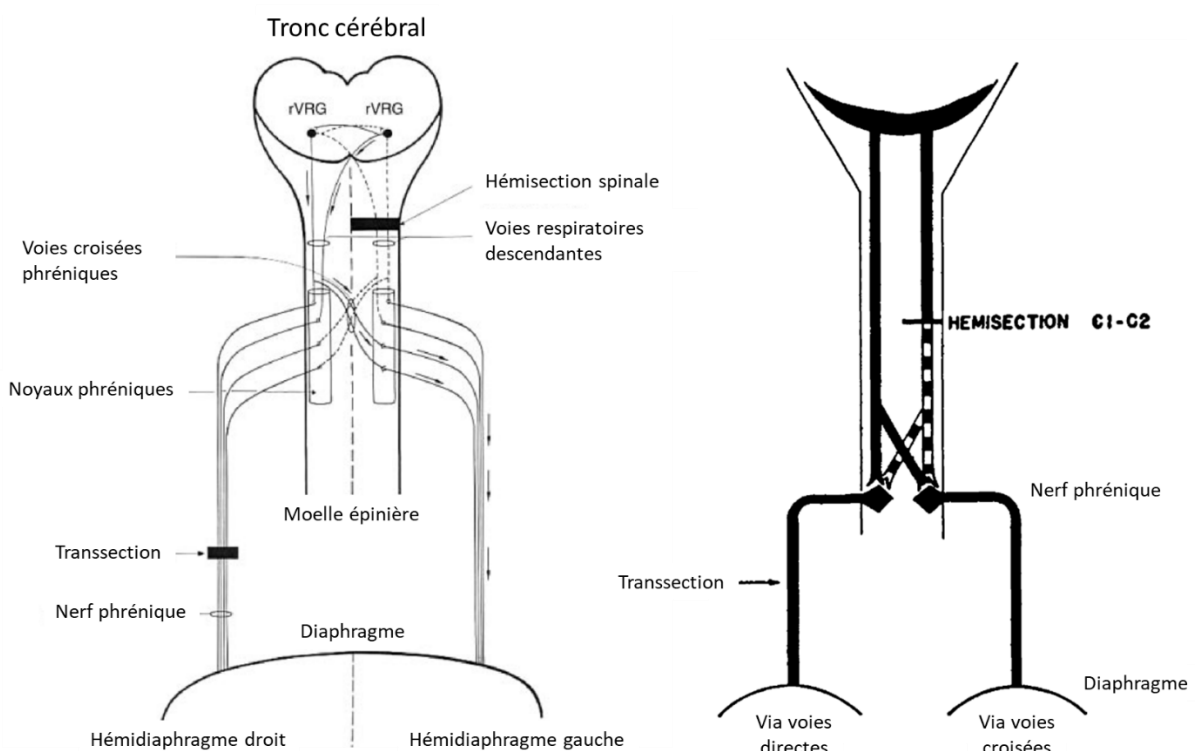


Figure 21 : Schéma illustrant le mode de déclenchement du « CPP »

Les efférences inspiratoires projetant sur les motoneurones phréniques sont modulées par les neurones médullaires dans la division rostrale du rVRG. Ces neurones projettent bilatéralement sur les noyaux phréniques, il y a donc décussation spinale pour les deux voies descendantes. Une hémisection spinale cervicale rostrale aux motoneurones phréniques interrompt la voie descendante respiratoire ipsilatérale à la lésion et induit donc une hémiparésie diaphragmatique du côté gauche. La transsection du nerf phrénique contralatéral (nerf phrénique droit) immédiatement après l'hémisection spinale paralyse l'hémidiaphragme droit et induit le phénomène de CPP. Adapté de *Goshgarian 2009* et de *Lewis and Brookhart 1951*.

1.2.1.2.1. Substrat anatomique du CPP

Chez le cochon d'Inde, Goshgarian et Guth ont montré que le CPP pouvait être activé dans les heures suivant l'hémisection spinale cervicale, excluant de fait l'hypothèse d'une croissance axonale collatérale qui viendrait innover les motoneurones déafférentés (Goshgarian and Guth, 1977). En effet,

une croissance axonale collatérale ne peut être observée qu'à partir d'un mois post-hémisection (Bernstein and Bernstein, 1973). Ces données suggèrent qu'anatomiquement parlant, les structures sur lesquelles repose le CPP sont déjà présentes chez les mammifères sains, et que suite au blocage ou à la section du nerf phrénique du côté intact, ces voies phréniques initialement silencieuses deviennent fonctionnellement actives et permettent d'observer une activité phrénique et diaphragmatique du côté lésé. De plus, des projections dendritiques phréniques vers les motoneurones phréniques du côté opposé existent chez les rats nouveau-nés (Lindsay et al., 1991), et il a été montré que les dendrites des motoneurones phréniques croisaient la ligne médiane chez le chat adulte (Cameron et al., 1983). Néanmoins, il semblerait que ces connexions disparaissent avec l'âge chez le rat (Prakash et al., 2000) car elles ne sont plus observables chez des rats adultes (Furicchia and Goshgarian, 1987). Ces données sont cependant en contradiction d'autres travaux qui montrent que suite à l'activation du CPP par asphyxie après hémisection en C2, l'activité phrénique croisée enregistrée est presque quatre fois plus importante chez des rats adultes par rapport à des rats jeunes adultes (Yu and Goshgarian, 1993). Dans le même temps, il a été montré que durant l'activation du CPP, un marquage rétrograde transynaptique du nerf phrénique (côté lésé) induit le marquage des motoneurones phréniques du côté lésé et le marquage des neurones du rVRG, mais pas le marquage des motoneurones du côté intact. Ces résultats ont mis en évidence que l'origine anatomique du CPP se situait au niveau des neurones respiratoires du rVRG, et donc des voies bulbospinales du funicule latéral et du funicule ventro-médian (Moreno et al., 1992a; Goshgarian, 2003; Minor et al., 2006). Il a aussi été montré que ces voies descendantes silencieuses croisaient de plus la ligne médiane au niveau des motoneurones phréniques (Goshgarian et al., 1991), ce qui a été confirmé par la suite (Boulenguez et al., 2007a).

1.2.1.2.2. Adaptations cellulaires et morphologiques supportant l'activité phrénique croisée

L'expression du CPP repose donc sur l'activation de voies respiratoires descendantes fonctionnelles silencieuses et projetant sur les motoneurones phréniques contralatéraux (Goshgarian, 2003; Goshgarian, 2009). Goshgarian et ses collaborateurs se sont demandé si cette activation du CPP était spécifique du modèle d'hémisection en C2 utilisé. Ils ont montré que l'application d'un bloc froid au niveau C2 permettait aussi d'induire l'expression du CPP. Ils en ont donc déduit que l'activation du CPP reposait sur une modification morphologique touchant les motoneurones phréniques, et donc que le trauma spinal cervical n'était pas nécessaire à son activation. Il a de plus été montré par une analyse morphométrique qu'une hémisection ou l'application d'un bloc froid en C2 induisent des changements ultrastructuraux dans la cytoarchitecture des noyaux phréniques (Castro-Moure and Goshgarian, 1997; Goshgarian, 2009). Les auteurs ont plus particulièrement observé que : 1) une rétractation des

prolongements astrogliaux souvent présents au niveau des dendrites des noyaux phréniques, laisse la place à, 2) une augmentation du nombre de synapses dendro-dendritiques entre les motoneurones phréniques. De plus, 3) les terminaisons synaptiques des prémotoneurones du rVRG contactent plus de dendrites de motoneurones phréniques, et 4) un élargissement des zones actives de ces synapses dendro-dendritiques et axo-dendritiques est là aussi observé (Castro-Moure and Goshgarian, 1997) (Figure 22). Ces résultats reflètent une augmentation du nombre, et un renforcement des synapses non seulement entre les terminaisons synaptiques des prémotoneurones respiratoires du rVRG et les motoneurones phréniques, mais aussi entre les motoneurones phréniques eux-mêmes. Cela permet donc à un nombre plus restreint de fibres bulbospinales d'activer les motoneurones phréniques cibles, mais permet aussi d'optimiser l'activation de ces motoneurones en synchronisant leurs décharges. De plus, la rétractation des processus astrogliaux observée devrait induire une réduction de la recapture des ions potassium par les astrocytes, entraînant une élévation de leur concentration extracellulaire autour des motoneurones phréniques. Or, une augmentation de la concentration en ion potassium dans le milieu extracellulaire devrait conduire à une augmentation de l'excitabilité des neurones environnants par une dépolarisation partielle de leur membrane plasmique (Hatton, 1986). Ces résultats sont en accord avec d'autres observations faites suite à l'enregistrement d'axones individuels du nerf phrénique du côté ipsilatéral à l'hémisection en C2. Ils ont observé que suite à l'activation du CPP, la fréquence de décharge des motoneurones enregistrés était augmentée, et que des motoneurones auparavant silencieux se mettaient à décharger. Ceci démontre que des modifications intrinsèques dans l'excitabilité et le recrutement des motoneurones phréniques sont observées après hémisection en C2. Ils ont aussi observé que ces nouvelles unités recrutées déchargeaient préférentiellement pendant la phase tardive de l'inspiration (« late-onset inspiratory ») que pendant la phase précoce de l'inspiration (« early-onset inspiratory ») (El-Bohy and Goshgarian, 1999).

Ainsi, l'augmentation du drive respiratoire, la modulation de l'excitabilité des motoneurones phréniques et leur ordre de recrutement, ainsi que ces renforcements synaptiques au niveau des noyaux phréniques, peuvent expliquer l'activation des voies respiratoires silencieuses descendantes après hémisection spinale en C2 (Ghali, 2017).

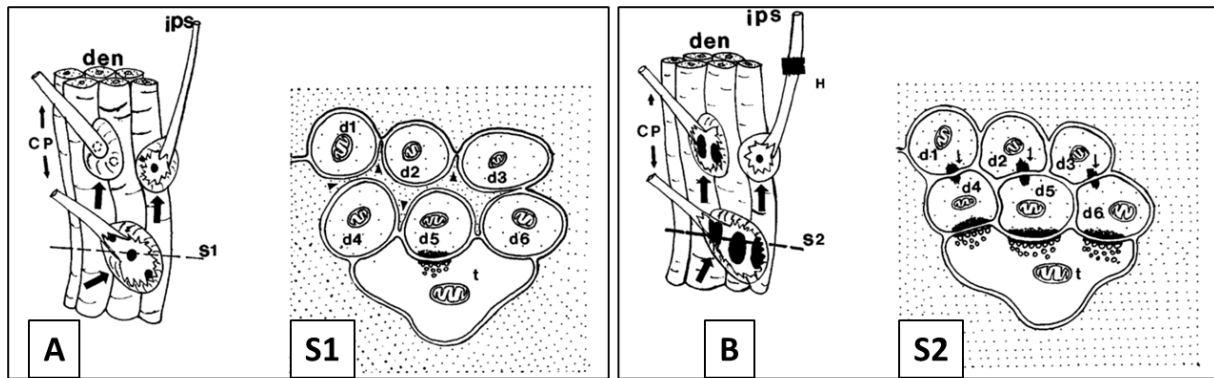


Figure 22 : Modifications morphologiques sous-tendant le « CPP » au niveau des noyaux phréniques

A et B représentent un faisceau de dendrites (den) dans le neuropil phrénique et leurs contacts avec les terminaisons synaptiques des neurones du rVRG (flèches larges). A montre les caractéristiques morphologiques synaptiques chez un animal sain, et B montre les modifications ayant lieu au niveau de la zone active des synapses chez un animal hémilésé en C2 (H). Les ovales noirs représentent les zones synaptiques actives des terminaisons axonales des prémotoneurones du rVRG ipsilatéraux (ips) sur les motoneurones phréniques, ainsi que les voies phréniques croisées (CP). Après hémisection spinale en C2, une augmentation du nombre de synapses dendro-dendritiques des motoneurones phréniques (d1 et d4, d2 et d5, et d3 et d6) et axo-dendritiques (entre la terminaison synaptique venant du rVRG, t, et d4, d5 et d6) est observée en B comparé à A (contrôle), ainsi qu'une augmentation de la taille de ces zones actives. Adapté de *Castro-Moure et Goshgarian 1997*.

1.2.1.2.3. Autres facteurs induisant l'activation du CPP après hémisection en C2

Par la suite, il a été montré que le CPP pouvait être induit par d'autres stress respiratoires à la suite d'une hémisection en C2, tels que l'hypercapnie (augmentation de la pression partielle en CO₂ dans le sang), l'hypoxie (diminution de la pression partielle en O₂ dans le sang), tous induisant une augmentation de la décharge des centres respiratoires par chémoréflexe (Mitchell and Johnson, 2003). Le CPP peut aussi être induit par administration de diverses drogues telles la gabazine ou la bicuculline, des antagonistes aux récepteurs GABA_A (Zimmer and Goshgarian, 2007), ainsi que par injection d'agonistes ou d'antagonistes aux récepteurs à la sérotonine (5-HT) (Ling et al., 1994; Zhou et al., 2001), les neurones sérotoninergiques du raphé ayant des connexions directes avec les neurones respiratoires prémoteurs du tronc cérébral, ainsi qu'avec les motoneurones phréniques (Pilowsky et al., 1990; Ling et al., 1994; Kinkead et al., 2001b). Les méthylxantines telles que la théophylline ont aussi été utilisées pour activer le CPP (Nantwi et al., 1996; Basura et al., 2002). La théophylline est à la fois un inhibiteur non sélectif de la phosphodiesterase et un antagoniste aux récepteurs A1 et A2 à l'adénosine. Les deux actions induisent une augmentation de la 3–5-cyclic adénosine monophosphate (cAMP) (Horn and McAfee, 1977; Waltereit and Weller, 2003; Marks et al., 2005), qui est connue pour être impliquée dans les processus de plasticité synaptique après trauma spinal (Pearse et al., 2004). Nantwi et ses collègues ont montré que l'injection de théophylline de façon aiguë (unique injection)

induisait une activation du CPP chez le rat. Cette activation n'est cependant que transitoire et aucun effet n'est plus observable 3h post-injection (Nantwi et al., 1996). En revanche, une administration chronique (3 jours) induit une activation du CPP qui persiste jusqu'à au moins 1 mois post-administration (Nantwi et al., 2003). Cette action de la cAMP passerait par la modulation de PKA, connue pour augmenter l'excitabilité des motoneurones via entre autres la modulation des récepteurs AMPA (Lee et al., 2000).

Ces techniques de challenge respiratoire ainsi que ces agents pharmacologiques permettant de démasquer les synapses dormantes des voies croisées phréniques ont ainsi participé à la meilleure compréhension de ce phénomène « modulateur » de l'activité respiratoire en post-traumatique.

1.2.1.2.4. CPP spontané (sCPP)

Une récupération respiratoire à long terme a déjà été démontrée chez l'Homme, plus précisément chez un tiers des patients. Elle est caractérisée par une récupération fonctionnelle diaphragmatique du côté lésé (Oo et al., 1999). Certains patients mécaniquement ventilés arrivent même à récupérer une ventilation autonome minimale (DiMarco, 2005). Cette récupération spontanée et durable, bien que limitée, de l'activité phrénique a également été observée chez le rat dans les semaines et mois suivant l'hémisection en C2 (Nantwi et al., 1999; Golder et al., 2003; Fuller et al., 2006; Vinit et al., 2006; Fuller et al., 2008; Vinit et al., 2008; Dougherty et al., 2012a; Mantilla et al., 2013c). Cette récupération représente approximativement 25 % de l'activité du nerf phrénique d'un rat sain à sept jours post-lésion, et environ 40 % à trois mois post-lésion (Vinit et al., 2008). Cependant, malgré cette récupération progressive de l'activité phrénique dans les mois suivant la lésion, celle-ci n'est malheureusement pas corrélée à une augmentation du volume courant en eupnée (Fuller et al., 2006). Néanmoins, une phrénicotomie réalisée du côté lésé à deux mois post-lésion réduit le volume courant des animaux lésés, suggérant que l'amélioration de l'activité phrénique participe néanmoins à la récupération fonctionnelle (Golder et al., 2003), et sa contribution devient significative lors d'une augmentation des décharges respiratoires (Oo et al., 1999; Sandhu et al., 2009b; Ghali, 2017).

Cette récupération spontanée a été nommée CPP spontané (sCPP) (Lane et al., 2008a; Goshgarian, 2009; Ghali, 2017), celle-ci ne nécessitant aucun stress respiratoire pour sa mise en place contrairement à l'activation du CPP (Fuller et al., 2008; Ghali, 2017). Il n'a actuellement pas encore été déterminé si les mécanismes sous-tendant le sCPP sont exactement les mêmes que pour le CPP. Cependant, la récupération observée a été attribuée à l'activation progressive des voies bulbospinales croisées, à de la croissance axonale et une dérivation des projections bulbospinales (Vinit et al., 2011; Darlot et al., 2012), ainsi qu'à la formation de nouvelles connexions polysynaptiques par les interneurones spinaux cervicaux sur les motoneurones phréniques (Lane et al., 2008b; Fuller et al.,

2009; Lane et al., 2009; Sandhu et al., 2009a; Zholudeva et al., 2017). Il a ainsi été montré que le sCPP dépend de la plasticité des afférences glutamatergiques (Alilain and Goshgarian, 2007; Gransee et al., 2017; Mantilla et al., 2017b), sérotoninergiques (Basura et al., 2001; Fuller et al., 2005; Lee and Gonzalez-Rothi, 2017; Mantilla et al., 2017a) et adénosinergiques (Nantwi, 2009; Minic et al., 2017) sur les motoneurones phréniques et survenant après hémisection en C2.

1.2.2. Effets moléculaires et cellulaires

Le modèle d'hémisection en C2 induit des modifications cellulaires et moléculaires dans les différentes régions impactées, soit au niveau des neurones du tronc cérébral dont les axones ont été coupés, au niveau de la zone lésée, ainsi qu'au niveau des motoneurones phréniques déafférentés (C3-C6).

1.2.2.1. Dans le tronc cérébral

Dans le tronc cérébral, les neurones lésés se mettent à exprimer c-Jun, un facteur de la réponse précoce du neurone après axotomie, qui entraîne soit la mort neuronale, soit la survie et la régénération axonale (Vinit et al., 2005). De même, l'expression de phospho-c-Jun est augmentée dans les neurones lésés et les neurones intacts, alors que l'expression de phospho-HSP27, activée en cas de stress, n'est augmentée que dans les neurones lésés (Vinit et al., 2011). L'expression de l'oxyde nitrique synthase (NOS), qui catalyse la formation NO, un radical libre, est augmentée dans les neurones lésés du rVRG et du Gi 30 jours post-lésion, et les neurones axotomisés et HSP27 positifs présentent une réduction de l'expression du marqueur neuronal NeuN à 7 et 30 jours post-lésion (Darlot et al., 2017). Les neurones lésés respiratoires du tronc cérébral présentent donc un stress cellulaire dû à leur axotomie, mais ont le potentiel pour régénérer leurs axones lésés si l'environnement est permissif, comme cela est le cas au niveau du système périphérique. L'équipe d'Aguayo a en effet montré qu'une greffe de nerf sciatique au niveau de neurones lésés localement et identifiés grâce à l'enzyme horseradish peroxidase (jonction entre le tronc cérébral et la moelle épinière thoracique ou deux segments de la moelle épinière de rat), induisait une croissance axonale au travers du nerf greffé (Richardson et al., 1980; David and Aguayo, 1981). Ils ont ainsi confirmé les observations et hypothèses de Cajal faites cinquante ans auparavant (Cajal, 1930; Fawcett, 2018). Ainsi, même si ces neurones lésés ont la capacité de régénérer et expriment des molécules en lien avec l'activité cellulaire, l'environnement extracellulaire inhibiteur présent dans le système nerveux central après trauma empêche ces neurones de se régénérer, comme décrit précédemment dans la partie d'introduction 2.2.3.

1.2.2.2. Dans la corne ventrale de la moelle épinière C3-C6

1.2.2.2.1. Rôle de la sérotonine

Suite à une hémisection en C2 chez le rat, il a été observé que l'augmentation de l'amplitude de l'activité phrénique était corrélée à la réinnervation sérotoninergique au niveau des motoneurones phréniques à deux, quatre et huit semaines post-lésion (Golder and Mitchell, 2005). Au niveau de ces motoneurones phréniques, l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} est augmentée dans les motoneurones phréniques et dans la matière grise du côté lésé deux semaines post-lésion chez le rat (Fuller et al., 2005; Mantilla et al., 2012; Lee and Gonzalez-Rothi, 2017). Plus récemment, le rôle de cette augmentation d'expression a été précisée. Du ketanserin (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A}) injecté par voie intraveineuse chez le rat après lésion spinale induit une réduction de l'activité diaphragmatique du côté lésé, mais n'induit aucun effet chez des animaux sains. L'activation de ces récepteurs 5-HT_{2A} contribue donc bien à la récupération fonctionnelle diaphragmatique post-lésion (Lee and Gonzalez-Rothi, 2017). De plus, l'administration d'un protocole d'hypoxie intermittente, seul ou en combinaison avec l'injection de chondroïtinase ABC au niveau des motoneurones phréniques induit une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT au niveau de ces motoneurones, associée à une forte récupération de l'activité diaphragmatique chez le rat (Warren et al., 2018). Lorsque ce paradigme est associé à une autogreffe de nerf tibial entre la partie rostrale de la lésion et la moelle épinière en C4 du côté lésé, les fibres sérotoninergiques ont la capacité de régénérer au travers de ce nerf, participant ainsi à la récupération fonctionnelle diaphragmatique observée (Alilain et al., 2011). De plus, suite à l'activation de ces récepteurs 5-HT_{2A/2C} vingt-quatre heures post-lésion, une « récupération » de l'activité du nerf phrénique du côté lésé est observée, activité qui est ensuite abolie par l'injection d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (Zhou et al., 2001). Ces résultats montrent globalement le rôle important de la sérotonine dans la récupération fonctionnelle respiratoire post-hémisection en C2.

1.2.2.2.2. Rôle du glutamate et de ses récepteurs

L'expression des récepteurs glutamatergiques est régulée par le récepteur « tropomyosin related kinase receptor subtype B » (TrkB) dans divers systèmes neuronaux. De plus, l'augmentation de l'expression de ce récepteur dans les motoneurones phréniques améliore la récupération fonctionnelle après hémisection en C2 (Gransee et al., 2013; Mantilla et al., 2014).

Il a aussi été montré que la sous-unité NR2A du récepteur NMDA et les sous-unités GluR1 et GluR2 du récepteur AMPA étaient impliquées dans la récupération spontanée chronique observée après hémisection en C2 chez le rat. En effet, à six, douze et seize semaines post-lésion, l'expression

de la sous-unité GluR1 est augmentée par rapport à des rats contrôles, alors que l'expression de la sous-unité GluR2 est diminuée à seize semaines post-hémisection par western blot dans la région des motoneurones phréniques. La sous-unité NR2A, quant à elle, présente une augmentation d'expression à six et douze semaines post-lésion (Alilain and Goshgarian, 2008). De même il a été montré par rtqPCR que vingt-et-un jours après hémisection en C2, l'expression des transcrits des récepteurs NMDA y était augmentée et celle des récepteurs AMPA y était diminuée (Mantilla et al., 2012).

1.2.2.2.3. Rôle d'autres molécules liées à la plasticité

En plus de la sérotonine et du glutamate, il a été montré que d'autres molécules voyaient leur activité modulée après hémisection latérale en C2. Ainsi, le niveau d'expression de GAP-43, une molécule présente dans les cônes de croissance axonaux, est réduit dans le funicule ventrolatéral, mais augmenté autour des motoneurones phréniques 7 jours post-lésion dans la moelle épinière C3-C6, du côté lésé (Vinit et al., 2009), montrant ainsi la mise en place de processus de plasticité autour des motoneurones déafférentés.

L'activité et l'expression la protéine kinase C atypique (aPKC), une molécule de signalisation impliquée dans les processus de plasticité, a aussi été étudiée au niveau des motoneurones phréniques. Son activité est ainsi augmentée à un et vingt-huit jours post-hémisection en C2 chez le rat. De même, elle est exprimée dans de putatifs motoneurones phréniques à vingt-huit jours post-hémisection, mais pas dans les cellules microgliales et astrocytaires environnantes (Guenther et al., 2012). L'aPKC pourrait ainsi contribuer aux processus de récupération fonctionnelle observée après C2 hémisection.

1.2.2.2.4. Rôle des cellules neurales supports

Windelborn et Mitchell ont montré que la microglie et les astrocytes s'activaient dans la moelle épinière C4-C5 après hémisection en C2 chez le rat. Plus précisément, ils ont observé que la microglie était activée à un, trois, quatorze et vingt-huit jours post-hémisection, et les astrocytes à trois et quatorze jours post-hémisection comparé à des animaux sham (Windelborn and Mitchell, 2012). Cette activation microgliale et astrocytaire post-lésion participe ainsi aux processus d'inflammation à long terme observés dans la moelle épinière, mais sont aussi un support neural pour les processus de récupération fonctionnelle, via par exemple, le relargage de BDNF, de VEGF et de TNF α souvent impliqués dans les processus de plasticité (Bessis et al., 2007; Di Filippo et al., 2008). La microglie permet aussi de recapter le glutamate, aidant ainsi à limiter la réponse inflammatoire dans les neurones déafférentés subissant une excitotoxicité au glutamate provenant des axones lésés (van Landeghem et al., 2001).

Ces processus de neuroinflammation et de plasticité observés après hémisection spinale en C2, auxquels s'ajoutent tous les processus délétères ou bénéfiques décrits dans la partie générale « PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL », participent ainsi activement à la fois aux processus délétères initiaux, mais aussi aux processus de remodelage, modulation et plasticité sous-jacents au CPP ainsi qu'à la récupération fonctionnelle observée à long terme (ou sCPP), à la fois au niveau des neurones axotomisés du tronc cérébral, de la zone lésée, mais aussi au niveau des neurones déafférentés en sous-lésionnels.

2. Impact d'un trauma cervical au niveau cardiovasculaire

2.1. Système cardiovasculaire chez l'animal sain

2.1.1. Anatomie cardiaque et vasculaire

Le système cardiovasculaire est composé du cœur, des vaisseaux sanguins, ainsi que du sang qui transporte divers types de cellules et de molécules dans l'organisme afin de maintenir celui-ci en vie et de lui permettre de répondre à tous types de perturbations (Figure 23) (Silverthorn, 2010).

Les vaisseaux qui transportent le sang vers le cœur sont les veines, et ceux qui transportent le sang du cœur vers la périphérie sont les artères. Les veines transportent le sang pauvre en O₂ et riche en CO₂, et les artères transportent le sang pauvre en CO₂ et riche en O₂, exception faite pour les artères et veines pulmonaires pour lesquelles l'inverse est observé. Les hématies du sang artériel qui sort du cœur distribuent aux cellules de l'organisme l'oxygène nécessaire à leur fonctionnement, en échange duquel les hématies reçoivent du dioxyde de carbone produit par ces mêmes cellules. L'oxygène et le dioxyde de carbone existent aussi sous forme soluble dans le sang. Au fur et à mesure des échanges gazeux, le sang se charge donc en CO₂ et s'appauvrit en O₂.

Le cœur est séparé en deux hémisphères par le septum. Les oreillettes reçoivent le sang veineux, le transfèrent aux ventricules qui eux chassent le sang dans les artères. Le cœur droit reçoit le sang pauvre en oxygène provenant de la périphérie et l'envoie dans les poumons via l'artère pulmonaire où il se charge d'oxygène et libère du dioxyde de carbone. Le cœur gauche quant à lui reçoit le sang oxygéné des poumons via les veines pulmonaires et le propulse dans la circulation systémique via l'aorte. La contraction du cœur passe par la contraction de ses cardiomyocytes. La contraction se fait de façon spontanée grâce à un petit groupe de cellules dites « pacemaker », situées au niveau du nœud sinusal de l'oreillette droite. La dépolarisation se forme donc à cet endroit et se propage dans le reste du cœur, induisant sa contraction et imposant donc sa fréquence cardiaque basale.

Une fois éjecté par le ventricule gauche, le sang passe par l'aorte, qui va alors se distendre. La valve sigmoïde séparant le ventricule gauche de l'aorte se ferme suite au relâchement du ventricule gauche. Les parois artérielles de l'aorte se contractent ensuite afin de faire reprendre au vaisseau sa

position initiale, poussant le sang dans la circulation systémique à cause de la pression exercée par ces parois aortiques. Cette poussée permet d'entretenir la pression nécessaire pour faire circuler le sang dans l'organisme. Cette onde de pression crée initialement par la contraction du ventricule gauche est ainsi transmise dans les vaisseaux où elle s'atténue au fur et à mesure de son avancée. La pression sanguine systémique est donc plus importante dans les artères et moindre dans les veines et veinules. Les parois de l'aorte et des grosses artères sont ainsi à la fois résistantes et élastiques pour pouvoir transmettre cette onde de pression, et sont donc riches en tissu élastique, ainsi qu'en muscle lisse. Les veines sont quant à elles plus rigides et donc moins distensibles. La pression artérielle moyenne est ainsi la force motrice permettant au sang de s'écouler dans la circulation. Le but de l'organisme est de répondre aux besoins des différents organes. L'apport en sang va donc varier en fonction de l'activité de l'organisme, et donc reposer sur l'adaptabilité du système cardiovasculaire. La pression artérielle moyenne peut être modulée via une modification du débit cardiaque (débit de sang entrant dans le réseau sanguin en sortie du ventricule gauche) ou/et des résistances vasculaires. Elles peuvent ainsi varier en fonction de la force de contraction du cœur ou encore de la volémie. Généralement, si le débit cardiaque diminue, il va y avoir vasoconstriction des vaisseaux sanguins (par les muscles lisses vasculaires), et inversement, afin de maintenir une pression artérielle adaptée aux besoins de l'organisme. Ces modulations du système cardiovasculaire sont régulées par les systèmes sympathique et parasympathique (Silverthorn, 2010).

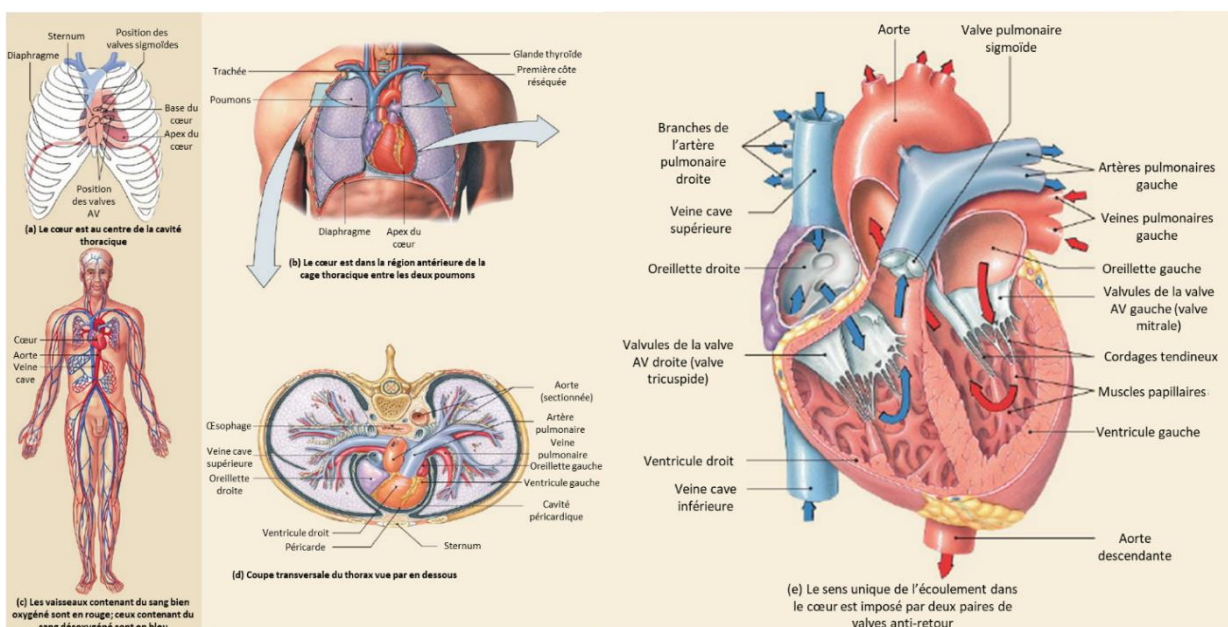


Figure 23 : Anatomie schématique cardiaque et vasculaire

Représentation schématique du cœur et du système vasculaire. AV : auriculo-ventriculaire. Adapté de Silverthorn, 2010.

2.1.2. Système nerveux autonome chez l'animal sain

Le système cardiovasculaire régulant la fonction cardiaque et la fonction vasculaire est modulé par le système sympathique (qui agit en augmentant l'activité cardiovasculaire) et le système parasympathique (qui agit en diminuant l'activité cardiovasculaire). Ces deux systèmes font partie du système nerveux autonome responsable de la régulation physiologique involontaire de l'organisme.

Les afférences primaires du système nerveux autonome proviennent de récepteurs localisés dans divers organes ou tissus. En ce qui concerne le système sympathique, les barorécepteurs de l'arche de l'aorte, des sinus carotidiens et des artères coronaires détectent les variations de pression artérielle, alors que les chémorécepteurs des corps carotidiens répondent aux changements de pH, de pO₂ et pCO₂, comme décrit précédemment (partie d'introduction « PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LES SYSTEMES NEURORESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE », 1.1.). Les fibres afférentes vagales et glossopharyngiennes venant des barorécepteurs parasympathiques induisent une inhibition sur le noyau du tractus solitaire (NTS). Celui-ci est donc informé de l'état cardiovasculaire de l'organisme (Spyer, 1994; Coote and Spyer, 2018). Les neurones du NTS projettent ensuite sur différentes zones de l'hypothalamus et du tronc cérébral à l'origine des efférences sympathiques et parasympathiques qui régulent le système cardiovasculaire (Coote, 1988; Coote and Spyer, 2018).

2.1.2.1. Le système sympathique

Le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire implique la régulation tonique du système nerveux sympathique. Les neurones sympathiques innervent ainsi le cœur et les vaisseaux sanguins. La régulation de la résistance périphérique de ces vaisseaux permet de maintenir à la fois une pression artérielle, mais aussi une volémie dite physiologique (Guyenet, 2006). Les efférences sympathiques cardiovasculaires qui innervent les neurones préganglionnaires de la moelle épinière sont issues principalement de la médulla ventrolatérale rostrale (RVLM) du tronc cérébral et du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus.

La RVLM est une des régions les plus importantes pour le contrôle de l'activité sympathique réflexe et basale, en particulier la régulation tonique de la pression artérielle (Coote, 2007). L'activité de ses neurones est régulée principalement par des efférences glutamatergiques (excitatrices) de la part de neurones de la formation réticulée. Plusieurs études ont en effet montré que l'injection de glutamate ou d'analogue du glutamate au niveau du RVLM induisait une forte augmentation de l'activité nerveuse sympathique et de la pression artérielle (Goodchild et al., 1982; Sakima et al., 2000; Mischel et al., 2015). Les neurones du RVLM reçoivent aussi des efférences GABAergiques (inhibiteur) provenant des barorécepteurs artériels (Coote and Spyer, 2018).

Le PVN a aussi un rôle important dans la maintenance de l'homéostasie cardiovasculaire, en particulier dans la régulation de la volémie (Coote, 2007). Il peut aussi participer avec le RVLM à la régulation de la pression artérielle, les neurones du PVN ayant des connexions directes et indirectes avec les neurones préganglionnaires de la moelle épinière (Sawchenko and Swanson, 1982), ainsi que des connexions directes avec le RVLM (Pyner and Coote, 1999). En effet, il a été montré que l'inhibition bilatérale du PVN chez des rats en hypertension induisait une diminution significative de la pression artérielle moyenne, montrant l'implication du PVN dans la régulation de la pression artérielle (Allen, 2002).

Deux régions supplémentaires sont connues pour aider à la modulation du système sympathique cardiovasculaire, la médulla ventromédiale rostrale (RVMM), ainsi que la région A5 (Llewellyn-Smith, 2009; Coote and Spyer, 2018). Les neurones de la RVMM sont impliqués dans la modulation de la pression artérielle. Leur stimulation induit ainsi une augmentation de la pression artérielle, alors que leur inhibition induit une réduction de la pression artérielle (Babic and Ciriello, 2004; Llewellyn-Smith, 2009).

La région A5 se situe du côté ventrolatéral du pont. Elle est composée de neurones noradrénergiques qui projettent sur les neurones préganglionnaires de la moelle épinière. Lorsqu'ils sont stimulés, ces neurones induisent une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Dawid-Milner et al., 2001; Dawid Milner et al., 2003).

Les neurones sympathiques préganglionnaires sont localisés au niveau de la colonne intermédiolatérale de la corne latérale de la moelle épinière des régions thoracique et lombaire (Coote, 1988; Jänig, 2006) (Figure 24). Les axones de ces neurones émergent par les nerfs spinaux (T1 à L2) au niveau de la racine ventrale de la moelle épinière, puis rejoignent les ganglions sympathiques de la chaîne sympathique paravertébrale via les rameaux communicants. Les fibres sympathiques peuvent alors monter ou descendre dans cette chaîne de ganglions jusqu'à leur neurone post-ganglionnaire cible, au niveau desquels elles libèrent de l'acétylcholine (ACh), qui va se fixer sur ses récepteurs nicotiques. L'axone des neurones post-ganglionnaires rejoint ensuite le nerf spinal via les rameaux communicants gris. Les neurones sympathiques post-ganglionnaires libèrent en majorité de la noradrénaline au niveau de leurs tissus cibles qui possèdent donc des récepteurs adrénergiques (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 et β_3). En particulier, les récepteurs spécifiques du cœur sont en majorité les β_1 , et ceux spécifiques des vaisseaux sont en majorité les α_1 et les β_2 . Les neurones sympathiques post-ganglionnaires peuvent aussi libérer des neuropeptides tels que le neuropeptide Y ou la somatostatine. Ce sont les neurones noradrénergiques et libérant le neuropeptide Y qui innervent le cœur et les vaisseaux sanguins (Sternini, 1997). Le système nerveux sympathique est constamment actif, même hors situation de stress.

2.1.2.2. Le système parasympathique

Le contrôle parasympathique du cœur est exercé par les neurones préganglionnaires du bulbe rachidien. Plus précisément, les efférences parasympathiques cardiaques proviennent principalement du noyau dorsal du nerf vague (via le nerf X vague), qui va contrôler la conduction atrioventriculaire et l'état ionique du cœur. Elles proviennent aussi, bien que de façon moindre, du noyau ambigu (via le nerf IX glossopharyngé) qui contient les neurones qui vont majoritairement réguler la fréquence cardiaque (Figure 24). Ces efférences parasympathiques cardiovasculaires émergent au niveau du tronc cérébral. Ces neurones préganglionnaires projettent sur les neurones post-ganglionnaires de l'épicaarde ou sur les parois cardiaques adjacentes au nœud sinusal et au nœud atrioventriculaire (Hou and Rabchevsky, 2014; Coote and Spyer, 2018). Ils libèrent de l'acétylcholine, accompagnée ou non de neuropeptides, à l'image des neurones adrénérgiques. Il existe aussi des neurones préganglionnaires spinaux au niveau sacral, mais ceux-ci ne sont pas impliqués dans la régulation cardiovasculaire (Jänig, 2006).

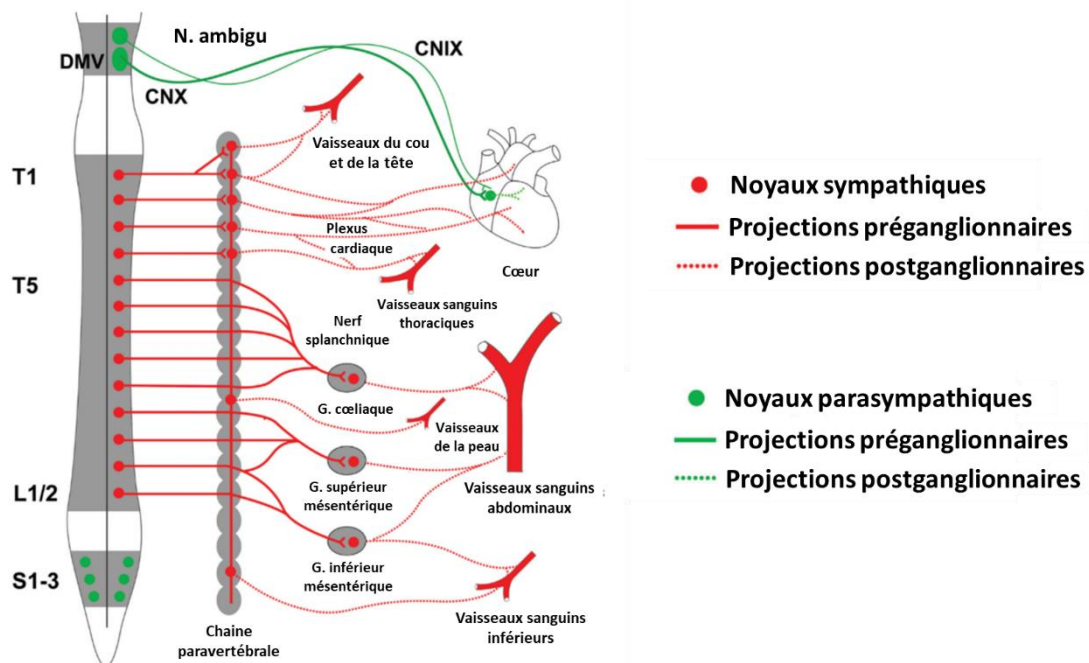


Figure 24 : Schéma illustrant le contrôle sympathique et parasympathique du système cardiovasculaire

Les neurones sympathiques préganglionnaires sont principalement situés dans la colonne intermédiolatérale des segments spinaux T1 à L2. Le cœur reçoit à la fois des afférences sympathiques (neurones préganglionnaires T1-T4) et parasympathiques (noyau dorsal du nerf vague (DMV) via le nerf vague (CNX) et noyau ambigu (N. ambigu) via le nerf glossopharyngé (CNIX)). La majorité des vaisseaux périphériques n'ont que des innervations sympathiques (pas de parasympathique). Les fibres préganglionnaires entre T5 et L2 projettent sur les ganglions coeliaque, supérieur mésentérique et inférieur mésentérique, qui sont à l'extérieur de la chaîne paravertébrale. Les neurones préganglionnaires spinaux au niveau sacral ne sont pas impliqués dans la régulation cardiovasculaire. CNIX : nerf crânial IX. CNX : nerf crânial X. Adapté de Hou et Rabchevsky, 2014.

La fréquence, ainsi que la force de contraction du cœur, sont donc ajustées majoritairement par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique, qui ont un effet opposé sur les paramètres hémodynamiques.

2.2. Physiopathologie cardiovasculaire après trauma spinal

Les traumatismes de la moelle épinière interrompent les connexions entre les centres supraspinaux et la moelle épinière, résultant non seulement en des déficits somatomoteurs comme vu précédemment avec le système respiratoire, mais aussi des dysfonctions autonomiques, incluant des déficits cardiovasculaires. Pour comprendre les réponses cardiovasculaires après trauma spinal et en quoi ces réponses diffèrent en fonction du niveau de la lésion, deux points doivent être soulignés. Premièrement, le cœur reçoit une double innervation, à la fois par le système sympathique, mais aussi par le système parasympathique (Figure 24). Ainsi, une lésion spinale jusqu'en T5 va impacter les voies descendantes sympathiques cardiovasculaires, induisant une déafférentation des neurones sympathiques préganglionnaires. Cela entraîne une diminution du contrôle sympathique, tandis que le contrôle parasympathique demeure inchangé au niveau cardiaque, conduisant donc à une augmentation du contrôle parasympathique. Il en résulte donc une modification de la balance sympathique/parasympathique, accompagnée par des déficits cardiovasculaires, en particulier dans le cas de lésions complètes (Hou and Rabchevsky, 2014; Biering-Sorensen et al., 2017). Deuxièmement, des segments spécifiques des efférences sympathiques contrôlent le tonus vasculaire de segments vasculaires spécifiques, et cela sans aucune influence du système parasympathique (Figure 24). Ces observations peuvent permettre d'expliquer les différentes réponses cardiovasculaires observées selon la sévérité et la localisation du trauma, soit en cervical, dans la partie thoracique haute ou la partie thoracique basse (Wecht et al., 2021).

2.2.1. Chez l'Homme

Plusieurs études cardiovasculaires ont été réalisées dans le cadre des traumatismes spinaux chez l'Homme. Cependant, l'étude poussée de l'impact aigu des traumatismes spinaux reste limitée en raison de l'urgence de la prise en charge des patients. En effet, immédiatement après trauma spinal, en particulier au niveau cervical, le pronostic vital des patients est souvent engagé. D'après le « Guidelines for the Management of Acute Cervical Spine and Spinal Cord Injuries » publié en 2002 et mis à jour en 2013, la première recommandation consiste à immobiliser les patients présentant un trauma spinal cervical, un trauma spinal, ou une blessure ayant le potentiel d'aboutir à un trauma spinal (Walters et al., 2013). Les patients sont ensuite transportés de préférence jusqu'à un centre spécialisé dans le

traitement aigu des traumatismes de la moelle épinière. Sur le plan cardiopulmonaire, il est alors recommandé de maintenir une pression artérielle moyenne comprise entre 85 et 90 mmHg chez ces patients. En ce qui concerne les évaluations réalisées, elles concernent uniquement la zone du trauma, où il est recommandé de passer la zone aux rayons X pour évaluer les dégâts sur la colonne vertébrale, ainsi que de réaliser une IRM fonctionnelle dans les 48h suivant le trauma afin d'évaluer la gravité de la lésion spinale (Walters et al., 2013). Ainsi, les études visant à évaluer les déficits cardiovasculaires aigus (< 30 jours post-lésion) chez ces patients sont plutôt centrées sur les paramètres hémodynamiques ou enregistrés par électrocardiographie (ECG), facilement accessibles chez les patients. Les études évaluant les effets cardiovasculaires chroniques sont quant à elles nombreuses. Elles incluent des patients blessés médullaires depuis plusieurs mois, et jusqu'à plusieurs années post-lésion. Elles prennent de plus en compte les paramètres cardiaques en plus des paramètres hémodynamiques, les patients étant plus disposés à supporter des examens poussés (Furlan and Fehlings, 2008).

2.2.1.1. Effets cardiovasculaires aigus

L'intégrité de la moelle épinière est nécessaire pour le contrôle autonome des organes, en particulier du cœur et des vaisseaux sanguins. Il a ainsi été montré dans plusieurs études que le degré de dysfonction cardiovasculaire était corrélé à la sévérité de la lésion. Ainsi, les individus blessés au niveau cervical et présentant les plus importants déficits cardiovasculaires dans la phase aiguë post-trauma spinal sont ceux qui présentent une étendue de dégénérescence la plus importante dans la matière blanche sous lésionnelle (Furlan et al., 2003; Krassioukov et al., 2003).

Les symptômes généralement observés en aigu chez les patients caractérisent le « choc neurogénique », et incluent une hypotension sévère et des fréquences cardiaques instables dues à la perte des efférences sympathiques, ainsi qu'une hypothermie (Krassioukov and Claydon, 2006; Hou and Rabchevsky, 2014). Ces observations sont accompagnées de complications cardiovasculaires majeures, telle que l'hypotension orthostatique. Cette dernière survient lorsque les patients passent de la position horizontale à la position verticale. Leur pression artérielle moyenne, déjà basse suite au trauma spinal, est encore plus réduite à cause de la gravité et de la baisse de l'activité sympathique (diminution de la pression systolique supérieure à 20 mmHg) (Mathias, 1995; Furlan and Fehlings, 2008; Krassioukov et al., 2020). Des épisodes soudains de dysrèflexie autonome peuvent aussi survenir (Teasell et al., 2000; Furlan and Fehlings, 2008; Krassioukov et al., 2020). Il s'agit d'une augmentation extrême de la pression artérielle moyenne accompagnée d'une surréaction du système nerveux autonome en réponse à un stimulus nociceptif ou non-nociceptif en dessous du niveau de la lésion, tel qu'une distension de la vessie (Mathias, 1995; Linsenmeyer et al., 1996). Les arythmies cardiaques

observées sont majoritairement des bradycardies. En effet, 77 % des individus avec des lésions cervicales présentent une bradycardie (fréquence cardiaque inférieure à 60 bpm) dans les deux premières semaines suivant le trauma (Hector et al., 2013). Ces arythmies ont été attribuées à l'instabilité autonome post-trauma spinal, ce qui inclut des modifications dans la repolarisation cardiaque ou encore l'apparition de blocs atrioventriculaires (Piepmeier et al., 1985; Johnson et al., 1998). Ces modifications de la fréquence cardiaque ont tendance à s'atténuer lors de la phase chronique (Furlan et al., 2003). Une autre complication souvent retrouvée consiste en l'apparition de thromboses veineuses dans les membres inférieurs en raison principalement de leur immobilisation, raison pour laquelle les patients sont généralement traités avec un antithrombotique (Merli et al., 1993; Furlan and Fehlings, 2008; Lowery et al., 2021).

2.2.1.2. Effets cardiovasculaires chroniques

Les phénomènes d'hypotension orthostatique et de dysréflexe autonome présentés précédemment sont aussi retrouvés dans la phase chronique (Furlan and Fehlings, 2008; Hou and Rabchevsky, 2014), alors qu'en ce qui concerne la fréquence cardiaque, il a été montré qu'aucune différence n'était observable entre des personnes contrôles et des patients blessés médullaires (Prakash et al., 2002).

Les déficiences cardiovasculaires, en particulier cardiaques, sont l'une des principales causes de décès chez les patients en phase chronique (Myers et al., 2007). En clinique, l'échographie est l'outil d'imagerie cardiaque le plus utilisé pour l'évaluation de la fonction et de la structure cardiaque (Lang et al., 2016). Elle est donc très utilisée pour évaluer les modifications cardiaques qui peuvent survenir après trauma spinal. En effet, surveiller la fonction cardiaque chez les individus atteints de trauma spinal peut permettre de prévenir le développement de dysfonction cardiaque pouvant mener à leur décès.

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de trauma spinal présentent une modification anatomique cardiaque comparé à des individus sains (Nash et al., 1991; Eysmann et al., 1995; Huonker et al., 1998; de Groot et al., 2006). Ainsi, les patients tétraplégiques possèdent des dimensions du muscle cardiaque significativement plus faibles que des témoins sains, ainsi qu'une masse du ventricule gauche réduite. Aucun déficit systolique ou diastolique n'a cependant observé chez ces patients (de Groot et al., 2006). Ces résultats sont en accord avec une précédente étude où des observations similaires ont pu être faites (Eysmann et al., 1995). Récemment, chez une cohorte de soixante-dix patients blessés médullaires chronique (majoritairement au niveau cervical), une réduction des dimensions et de la masse du ventricule gauche chez les patients a été observée, sans aucune dysfonction systolique ou diastolique du ventricule gauche (Ditterline et al., 2020). A l'opposé,

d'autres études ont montré qu'aucune différence de dimensions du ventricule gauche ou de masse n'était observée chez des individus tétraplégiques ou paraplégiques par rapport à des témoins contrôles (Matos-Souza et al., 2011), ou encore une paroi du ventricule gauche plus importante mais des dimensions du ventricule gauche réduites (Driussi et al., 2014).

Si beaucoup d'études n'ont pas pu mettre en évidence quelque modification de la fonction cardiaque, d'autres ont pu montrer qu'il existait une association entre fonction cardiaque et trauma spinal (Matos-Souza et al., 2011; Driussi et al., 2014; Currie et al., 2016; Sharif et al., 2017). Plus précisément, il a été montré que les patients blessés médullaires présentent une dysfonction diastolique comparé à des individus sains (Matos-Souza et al., 2011; Driussi et al., 2014). De plus, un débit cardiaque réduit et une augmentation de la vitesse de contraction systolique du myocarde chez ces patients ont aussi été observés, mais sans modification de la fraction d'éjection du ventricule gauche (Driussi et al., 2014; Currie et al., 2016). Une autre équipe a quant à elle observé un volume de pré-remplissage réduit, mais sans modification de la fonction diastolique du ventricule gauche (Sharif et al., 2017).

Les différences observées entre les études récentes et les études plus anciennes peuvent s'expliquer par l'amélioration de la prise en charge des patients, et donc de la différence de traitement reçus, ainsi que par l'amélioration des techniques d'échographie qui sont passées d'une vue en deux dimensions à une vue en trois dimensions pour évaluer les volumes et les masses cardiaques (Biering-Sorensen et al., 2017), ou encore par, potentiellement, un biais expérimentateur dépendant. De plus, même si les groupes étudiés sont classés selon l'âge, le sexe ou encore la position de la lésion sur la moelle épinière, la durée écoulée depuis le trauma ou encore l'étendue ou la forme de la lésion ne peuvent être homogènes. Les évaluations fonctionnelles cardiaques durant la phase aigüe chez l'Homme sont donc très limitées. L'utilisation de modèles précliniques est donc nécessaire pour étudier et comprendre la physiopathologie des traumas médullaires au niveau cardiovasculaire à des temps post-lésionnels courts, et ainsi développer des traitements permettant de prévenir les déficits cardiovasculaires observés en chronique.

2.2.2. Chez les modèles précliniques

2.2.2.1. Effets cardiovasculaires aigus

Depuis le milieu du XX^{ème} siècle, plusieurs études utilisant divers espèces et moyen d'anesthésie ont été réalisées dans le but d'identifier l'impact hémodynamique d'un trauma spinal. Cette diversité de méthodologies a mené à des résultats divers et parfois contradictoires, et donc sujets à controverse (Gondim et al., 2004). Les premières études réalisées chez le chat en 1945 par Groat et ses collaborateurs ont montré que sous anesthésie au chloralose, une compression en T3 induit une

augmentation de la pression artérielle moyenne (Groat and Peele, 1945). Ces résultats ont été par la suite reproduits chez le chat sous méthoxyflurane et sous chloralose après compression au niveau cervical, thoracique ou lombaire. Cette augmentation apparaît avec une latence de deux à six seconde, et disparaît au bout de quatre à cinq minutes post-trauma. Ils ont de plus montré que cette augmentation de pression artérielle était abolie par l'administration d' α -bloquant, montrant le rôle des catécholamines au niveau vasculaire dans ce phénomène (Eidelberg, 1973). De même, après transection totale en C6 chez le chien anesthésié au pentobarbital, une hypertension d'environ deux minutes, suivie d'une hypotension prolongée, ainsi qu'une augmentation des résistances vasculaires systémiques et de la contractilité du ventricule gauche ont été observées (Tibbs et al., 1978). Chez le rat anesthésié à l'uréthane/chloralose, une compression en T1 induit aussi une hypertension suivie d'une hypotension prolongée, ainsi qu'une réduction du débit cardiaque et une bradycardie transitoire (Guha and Tator, 1988). Plus tard, une réduction immédiate de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, suivie à environ neuf minutes post-contusion en T5-6, d'une augmentation de pression artérielle d'une durée d'approximativement vingt minutes, ont été observées chez le rat anesthésié à la kétamine/xylazine. Ce rebond, la diminution de pression artérielle, ainsi que la réduction de la fréquence cardiaque sont cependant réduits par administration d'atropine (antagoniste aux récepteurs cholinergiques muscariniques), d'un inhibiteur de NO synthase et par vagotomie bilatérale, suggérant que les modifications des paramètres cardiovasculaires observés sont en partie dues à une hyperexcitabilité du système parasympathique (Bravo et al., 2001). D'autres chercheurs se sont par la suite demandé d'où pouvait provenir ces différences de variation de pression artérielle post-trauma. Ils ont donc comparé l'effet de deux types d'anesthésie, soit de l'éther, soit de l'hydrate de chloral, chez le rat après transection cervicale. Ils ont ainsi observé que sous anesthésie à l'éther, aucun pic d'hypertension n'était observable contrairement à l'anesthésie sous hydrate de chloral, suggérant que le type d'anesthésie pouvait impacter différemment les paramètres cardiovasculaires en réponse à un trauma spinal (Gondim et al., 2004). Après mesure des concentrations plasmatiques de noradrénaline chez le rat anesthésié, il a été montré que suivant le type d'anesthésique utilisé, ces concentrations variaient, pouvant expliquer les différences d'activités sympathiques observées et donc leurs effets sur la pression artérielle enregistrée après trauma spinal (Maignan et al., 2000).

D'autres groupes ont de même observé ces variations cardiovasculaires après trauma spinal chez le rat. Ainsi, vingt-quatre heure après transection en T5, la pression artérielle moyenne est diminuée, puis suivie d'un retour proche de l'état basal à partir de cinq jours post-lésion et accompagnée d'une augmentation de fréquence cardiaque à cinq et sept jours post-trauma (Krassioukov and Weaver, 1995). De même, une réduction de pression artérielle, trois jours après transection en T4, puis un retour à des valeurs proches des contrôles à partir de cinq jours post-lésion ont pu être observées chez le rat (Laird et al., 2006). Dans un modèle de trauma non-complet, le même

phénomène à un jour post-compression en T5 a été observé, avec un retour à des valeurs physiologiques à trois jours post-trauma. De façon intéressante, une augmentation de la fréquence cardiaque à partir d'un jour, avec un maintien dans le temps a aussi pu être enregistrée (Mayorov et al., 2001). Plus récemment, il a été montré qu'une transection totale en T2-3 induisait une réduction persistante de la pression artérielle moyenne à partir d'un jour post-lésion, accompagnée d'une augmentation persistante de la fréquence cardiaque (Lujan and DiCarlo, 2020). Dans la même étude, les auteurs ont montré qu'une même transection en C6-7 induit aussi une réduction persistante de la pression artérielle moyenne, mais sans variation des valeurs de fréquence cardiaque, démontrant que le niveau de la lésion, et donc « la quantité » de voies sympathiques impactée avait un effet important sur la physiopathologie observée après trauma spinal (Lujan and DiCarlo, 2020).

La restauration de la pression artérielle, lorsqu'elle est observée, indique qu'un système de compensation se met en place dans les jours suivant le trauma afin de maintenir des valeurs de pression artérielle physiologique malgré la perte d'une partie, voire de toutes les innervations sympathiques sous le niveau de la lésion. Une hypothèse pour expliquer cette compensation serait le développement d'une hypersensibilité ou d'une surexpression des récepteurs α -adrénergiques au niveau vasculaire, permettant une vasoconstriction similaire des vaisseaux en réponse à une quantité moindre de catécholamines libérée, induisant une restauration de la pression artérielle enregistrée (Hou and Rabchevsky, 2014).

Le phénomène de dysrèflexe autonome, caractérisé par une augmentation abrupte de la pression artérielle moyenne et une bradycardie et qui est observé chez l'Homme, est aussi retrouvé chez le rat. Expérimentalement, le stimulus déclencheur utilisé est la distension colorectale. En aigu, soit trois jours après compression spinale en T5, un début d'hypertension et une bradycardie après distension colorectale sont observés, indiquant que le phénomène de dysrèflexe autonome est observable relativement tôt après le trauma spinal. Cependant, la réponse n'est pas maximale à ce temps post-lésionnel, raison pour laquelle ce phénomène est plutôt étudié durant la phase chronique (Mayorov et al., 2001).

2.2.2.2. Effets cardiovasculaires subaigus et chroniques

Durant la phase chronique, même si beaucoup d'études ont montré qu'un retour des valeurs de pression artérielle à des valeurs physiologiques était observé (Krassioukov and Weaver, 1995; Mayorov et al., 2001; Laird et al., 2006), d'autres au contraire observent une réduction persistante de la pression artérielle moyenne, à l'image de ce qui est généralement observé chez l'Homme (Hou and Rabchevsky, 2014; Biering-Sorensen et al., 2017). Ainsi, une transection en T4 chez le rat induit des pressions

artérielles significativement réduites chez leurs animaux comparé à des animaux intacts à deux et huit semaines post-lésion, mais sans variation de fréquence cardiaque (Hou et al., 2013a). Ces résultats sont donc similaires à ceux d'une autre équipe qui a observé une réduction persistante de la pression artérielle moyenne chez leurs animaux après transection en C6-7 (sans modification de la fréquence cardiaque) ou T2-3 (avec augmentation de la fréquence cardiaque) (Lujan and DiCarlo, 2020).

Le phénomène de dysrèflexe autonome est étudié chez le rat plutôt durant la phase chronique, là où son expression est la plus importante après distension colrectale, soit à environ deux semaines (Rabchevsky et al., 2012; Hou et al., 2013a), quatre semaines (Krassioukov and Weaver, 1995; Laird et al., 2006) et un mois (Cormier et al., 2010) après transection thoracique, et à partir de trois jours et jusqu'à deux mois et demi après compression thoracique (Mayorov et al., 2001; Weaver et al., 2001). L'enregistrement en continu des variations de pression artérielle chez le rat en télémétrie après transection en T3 a permis de mettre en évidence des phénomènes de dysrèflexe autonome spontanés, survenant entre deux et trois semaines post-lésion. Ils sont distinguables des phénomènes de dysrèflexe autonome induits par distension colrectale, grâce à l'amplitude de variation de la pression artérielle enregistrée lors de ces événements, qui est plus importante après distension colrectale que lorsqu'elle est spontanée (Rabchevsky et al., 2012). De plus, le dysrèflexe autonome serait spécifiquement associé au modèle de déafférentation bilatérale totale des neurones de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière. Ce phénomène n'est en effet pas observable en réponse à la distension colrectale dans des modèles d'hémisection latérale ou d'hémisection dorsale spinale en T4, indiquant que la préservation, même partielle, des voies supraspinales vasomotrices permet de maintenir en partie les paramètres cardiovasculaires physiologiques (Hou et al., 2013a). Une autre équipe s'est quant à elle intéressée aux types de voies de projection impliquées dans le dysrèflexe autonome. Ainsi, chez un modèle de transection thoracique ainsi que des modèles de compression thoracique plus ou moins sévère, l'administration intrathécale d'un agoniste aux récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} induit une augmentation de la pression artérielle au repos (qui est normalement diminuée après lésion) et bloque les épisodes d'hypertension après distension colrectale. A l'inverse l'administration d'un antagoniste aux récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} induit une plus forte réduction de la pression artérielle au repos, et les événements de dysrèflexe autonome ont bien lieu. De plus, l'amplitude des événements de dysrèflexe autonome étant corrélée avec la sévérité du trauma et à la densité des fibres sérotoninergiques résiduelles. Les auteurs ont donc pu en conclure que la préservation des voies descendantes sérotoninergiques qui projettent sur les neurones sympathiques pré-ganglionnaires de la moelle épinière permettait de maintenir une certaine régulation cardiovasculaire et de prévenir les épisodes de dysrèflexe autonome (Cormier et al., 2010).

Au niveau anatomique cardiaque, il a été montré que suite à une contusion en T2-3 (lésion incomplète) chez le rat, une réduction globale du diamètre du ventricule gauche est observée en raison

d'une atrophie due à la dénervation sympathique prolongée (West et al., 2014; West et al., 2016; Squair et al., 2017; Squair et al., 2018b; Squair et al., 2018a; Poormasjedi-Meibod et al., 2019) entre un mois et un mois et demi post-lésion. Au niveau fonctionnel, ce même type de contusion en T2-3 induit de plus des défauts de contractibilité du ventricule gauche (West et al., 2014; Squair et al., 2017; Squair et al., 2018b), caractérisés par une dysfonction systolique à un mois post-lésion (Squair et al., 2018b). Une autre étude a démontré qu'une contusion en T10 chez le rat n'a pas d'impact fonctionnel cardiaque au repos entre une et dix semaines post-lésion. Une contusion en T3 induit quant à elle une réduction du volume interne du ventricule gauche, du volume diastolique tardif à cinq et dix semaines post-lésion. Le volume d'éjection systolique, ainsi que le débit cardiaque sont quant à eux réduits transitoirement à cinq semaines post-lésion, avec un retour à des valeurs physiologiques à dix semaines post-lésion (Harman et al., 2018).

A l'image de ce qui est observé pour les études réalisées chez l'Homme, les résultats obtenus chez les modèles précliniques peuvent varier selon l'étendue et le niveau de la lésion, mais aussi peut-être en fonction de la méthode expérimentale qui peut varier d'un laboratoire à l'autre (méthode d'anesthésie, médication post-opératoire...). Cependant, ces modèles présentent le même type de déficits et dysfonction cardiaque et cardiovasculaire que ce qui est observé chez l'Homme, rendant ces modèles pertinents pour l'étude des déficits cardiovasculaires après trauma spinal, ainsi que pour le développement de traitements visant à réduire ces déficits.

THERAPEUTIQUES VISANT A AMELIORER LES FONCTIONS RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE APRES TRAUMA SPINAL

1. Stratégies thérapeutiques connues

Si la prise en charge et la stabilisation des patients est la priorité absolue après trauma spinal, la récupération fonctionnelle des capacités perdues est une source d'espoir et de motivation pour les patients blessés médullaires sur le long terme. Divers types de thérapeutiques ont donc été développées et testées dans ce but.

1.1. Défi respiratoire : protocoles d'hypoxie intermittente

Après trauma spinal cervical, l'une des approches utilisées afin d'améliorer la fonction respiratoire perdue est de s'appuyer sur les voies spinales résiduelles épargnées par la lésion, et qui connectent les motoneurones phréniques. Une façon non invasive d'induire de la plasticité au niveau de ces voies consiste en l'application de défis respiratoires. Ainsi, un des inducteurs de plasticité respiratoire le plus caractérisé est l'hypoxie, qui consiste à réduire le pourcentage d'oxygène dans l'air inspiré (normalement composé de 21% d'oxygène). La réponse ventilatoire de l'organisme à l'hypoxie va dépendre de la durée et du pattern d'application (continu ou intermittent), ainsi que de la sévérité du protocole d'hypoxie appliqué (Bach and Mitchell, 1998; Powell et al., 1998; Mitchell et al., 2001; Fuller and Mitchell, 2017; Nichols and Mitchell, 2021).

Ainsi, chez des rats sains anesthésiés et ventilés, un épisode unique d'hypoxie aigu (appliqué durant cinq minutes) induit une réponse aiguë caractérisée par une augmentation de l'activité phrénique ainsi que de la fréquence respiratoire. Dans les minutes suivant cet épisode d'hypoxie continue, l'amplitude de décharge des nerfs phréniques revient à des valeurs pré-hypoxie, alors que la fréquence respiratoire est significativement réduite (Bach et al., 1999). Ce phénomène de dépression de l'activité phrénique post-hypoxie est connu sous le nom de déclin de la fréquence post-hypoxie (Dick and Coles, 2000) (Figure 25). Il est aboli après lésion du pont au niveau ventrolatéral et à proximité de l'aire adrénérique A5, d'où sa modulation possible via les récepteurs α 2-adrénériques (Powell et al., 1998; Bach et al., 1999). L'amplitude de ce déclin de la fréquence post-hypoxie varie cependant en fonction de la souche de rat utilisée, ainsi qu'en fonction du passif hypoxique de l'animal. En effet, ce phénomène est de plus faible intensité lors d'un épisode hypoxique enregistré trente minutes après un premier épisode hypoxique. Ces résultats suggèrent que ce phénomène présenterait une certaine forme de métaplasticité, car son expression est réduite avec l'expérience, soit des épisodes répétés d'hypoxie (Powell et al., 1998).

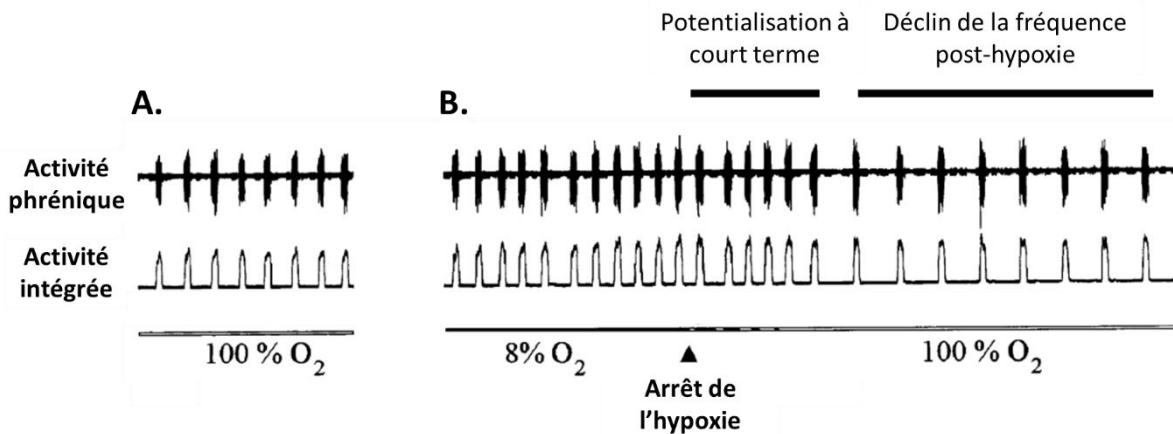


Figure 25 : Tracés représentatifs du déclin phrénique post-hypoxie

A. Activité du nerf phrénique enregistrée chez un rat témoin anesthésié. **B.** Activité enregistrée pendant et après un épisode hypoxique. La fréquence de décharge du nerf phrénique est diminuée dans les minutes suivant l'épisode hypoxique, ce qui est caractéristique du phénomène de déclin phrénique post-hypoxie. Adapté de *Dick et Coles, 2000*.

Une exposition prolongée à l'hypoxie induit à l'inverse une forte plasticité au niveau des neurones innervés par les corps carotidiens, ainsi que sur les neurones du NTS sur lesquels ils projettent. Cette forme de plasticité est caractérisée par une augmentation progressive de la ventilation qui serait due à une sensibilité accrue des chémorécepteurs des corps carotidiens à l'hypoxie (Powell et al., 1998; Bisgard, 2000; Mitchell et al., 2001). L'hypoxie prolongée induit de plus l'expression du facteur de transcription HIF-1, ce dernier permettant la synthèse de molécules permettant d'augmenter l'approvisionnement en oxygène de l'organisme, telle que l'érythropoïétine (Powell and Fu, 2008).

1.1.1. Réponse à une hypoxie intermittente

Contrairement un épisode unique, des épisodes hypoxiques successifs séparés de cinq minutes induisent une augmentation durable de l'activité phrénique (supérieure à une heure), qualifiée de facilitation à long terme phrénique (pLTF) chez des rats sains (Bach and Mitchell, 1996; Powell et al., 1998; Fuller et al., 2000). Plus précisément, des épisodes aigus d'hypoxies intermittentes (AIH) sévère (Nichols et al., 2012; Nichols and Mitchell, 2021) ou modéré (Bach and Mitchell, 1996; Baker-Herman and Mitchell, 2002) induisent des mécanismes de pLTF au niveau des motoneurones phréniques, mais pas de mécanismes de LTF au niveau des corps carotidiens, ce qui montre que les mécanismes impliqués sont différents (Fuller and Mitchell, 2017) (Figure 26).

Les mécanismes induisant la pLTF sont cependant différents selon s'il sont induit par des épisodes d'AIH modérés ou sévères (Fuller and Mitchell, 2017). La « voie dite Q » est associée à l'AIH modéré et est dépendante de la sérotonine, et nécessite donc un relargage épisodique de sérotonine

dans la moelle épinière (Kinkead et al., 2001a) et l'activation des récepteurs à la sérotonine (type 2) 5-HT₂ (Fuller et al., 2001; Baker-Herman and Mitchell, 2002) auxquels sont souvent associés des protéines Gq (Dale-Nagle et al., 2010), ainsi que l'activation ou la synthèse de divers autres molécules telles que TrkB, le BDNF ou encore la PKC- θ (Fuller and Mitchell, 2017). La « voie dite S » est quant à elle indépendante de la sérotonine et est associée à l'AIH sévère. Elle nécessite une accumulation d'adénosine spinale et l'activation des récepteurs adénoenergiques 2A (Nichols et al., 2012) auxquels sont souvent associés les protéines Gs (Dale-Nagle et al., 2010). Cette voie passe par la signalisation de l'AMPC, ainsi que par l'activation de la PKB/Akt, de mTOR et par la synthèse de l'isoforme immature de TrkB (Fuller and Mitchell, 2017; Perim et al., 2020). Ces deux voies Q et S interagissent via une inhibition croisée. Ainsi, l'inhibition de la voie S augmente l'expression de la voie Q après un protocole d'AIH sévère (Hoffman and Mitchell, 2013).

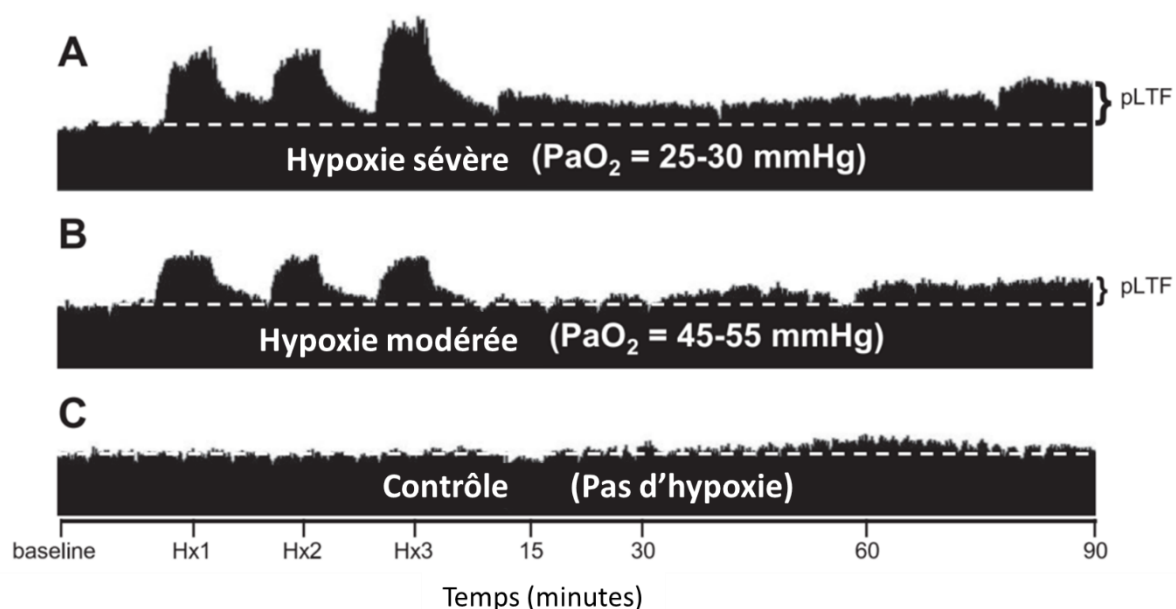


Figure 26 : pLTF induite par AIH sévère ou modérée

Tracés intégrés représentatifs de neurogrammes phréniques chez le rat anesthésié traités par AIH sévère (A), AIH modérée (B) ou non traités (C). Hx : hypoxie. Adapté de Nichols et al., 2012.

Les protocoles d'AIH n'induisent qu'une pLTF lorsqu'appliqués de façon aiguë. En revanche, si ces protocoles sont appliqués de façon journalière, ils peuvent aussi induire un renforcement des synapses détectable par l'enregistrement de potentiels évoqués phréniques (Perim et al., 2021), ainsi qu'une augmentation de la taille et de la présence de structures sérotoninergiques autour des motoneurons phréniques (Ciesla et al., 2021). La plasticité respiratoire induite par l'AIH serait aussi en partie due au recrutement d'interneurones spinaux phréniques excitateurs et à une augmentation des connexions excitatrices et une réduction des connexions inhibitrices au niveau de ces interneurons phréniques (Streeter et al., 2017).

Ces données montrent qu'il est ainsi possible d'entraîner les voies synaptiques respiratoires afin d'augmenter la force des sorties motrices respiratoires chez des animaux sains. Cette approche thérapeutique a donc été utilisée afin d'améliorer la fonction respiratoire après trauma spinal cervical, d'abord chez des modèles précliniques, puis chez l'Homme.

1.1.2. Chez les modèles précliniques de trauma spinal cervical

La première démonstration de l'utilisation de protocole chronique d'hypoxie intermittente (CIH) a été faite par l'équipe de Mitchell. Après hémisection latérale en C2 chez le rat, le protocole de CIH (alternance de cinq minutes entre 11% d'oxygène et normoxie) a été appliqué douze heures par nuit et pendant sept jours consécutifs. Les animaux présentent alors une amplitude d'activité phrénique plus importante du côté lésé par rapport aux animaux non traités, ce qui montre que le protocole de CIH permet de renforcer l'activité des voies croisées phréniques après trauma spinal cervical (Fuller et al., 2003). Ces protocoles peuvent cependant provoquer des effets secondaires néfastes, tels que de l'hypertension systémique (Fletcher et al., 1992) ou de l'apoptose hippocampale (Gozal et al., 2001).

Par la suite, il a été déterminé que les protocoles d'hypoxie sévère (2-8% d'oxygène inspiré) ainsi que de trop nombreuses répétitions par jour amenaient à plus d'effets néfastes que bénéfiques, tels que de l'hypertension, de la mort neuronale, ainsi que des déficits d'apprentissage. Des protocoles d'hypoxie modérée (9-16% d'oxygène inspiré) ainsi qu'un nombre faible de répétitions par jour seraient plus sûrs et plus simple d'application, et seraient donc plus facilement transposable en clinique (Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014). En effet, un protocole d'AIH journalier (dix épisodes de cinq minutes par jour à 10,5% d'oxygène avec un intervalle de cinq minutes en normoxie, pendant sept jours) induit une amélioration persistante des fonctions respiratoire (Lovett-Barr et al., 2012; Dougherty et al., 2018) et locomotrice chez des rats hémilésés en C2, associée à une augmentation de l'expression du BDNF ainsi que de son récepteur TrkB (Lovett-Barr et al., 2012). Ces effets bénéfiques sur la récupération de la fonction respiratoire ont été retrouvés et/ou confirmés dans différentes études chez le modèle d'hémisection en C2 chez le rat (Golder and Mitchell, 2005; Doperalski and Fuller, 2006; Navarrete-Opazo et al., 2014; Navarrete-Opazo et al., 2015; Navarrete-Opazo et al., 2017a; Dougherty et al., 2018; Gonzalez-Rothi et al., 2021) et chez la souris (Komnenov et al., 2016), ainsi que chez les modèles de contusion cervicale chez le rat (Lee et al., 2017; Wen et al., 2019; Wu et al., 2020; Lin et al., 2021). De plus, la latence d'application de l'AIH journalier ne fait pas intervenir les mêmes voies dans l'amélioration de la fonction respiratoire observée. Un protocole d'AIH journalier appliqué en aigu (une semaine) après hémilésion latérale en C2 chez le rat fait intervenir la voie S (indépendante de la sérotonine), alors qu'appliqué en chronique (sept semaines) après lésion, il fait intervenir la voie Q (dépendante de la sérotonine) (Dougherty et al., 2018). La CIH induit aussi la modulation de l'expression de diverses protéines après hémisection en C2 chez le rat, telles que la

réduction de l'expression de PTEN et l'augmentation de l'expression de mTOR, S6 et c-Fos dans les motoneurones phréniques, montrant que ce protocole induit lui aussi des processus favorisant la plasticité neuronale (Gutierrez et al., 2013).

L'application de protocoles d'AIH journalier semble donc être un moyen non invasif et sûr d'améliorer la fonction ventilatoire après trauma spinal cervical, aucun effet secondaire néfaste n'étant observé (Fuller and Mitchell, 2017). L'AIH présente aussi des effets bénéfiques amplifiés lorsqu'elle est associée à d'autres thérapeutiques telles que la chondroïtinase ABC (digère les CSPG) (Warren et al., 2018), ou encore la prednisolone (corticostéroïde anti-inflammatoire) administrée en prétraitement avant AIH (Sandhu et al., 2019).

1.1.3. Chez l'Homme après trauma spinal cervical

Les études précliniques chez l'animal ont ainsi démontré la faisabilité et les effets bénéfiques de l'hypoxie intermittente à faible doses après trauma spinal cervical. Elle a donc été par la suite appliquée chez l'Homme afin de vérifier si ces effets bénéfiques pouvaient être retrouvés chez en clinique. Ainsi, chez des patients avec une lésion spinale cervicale incomplète depuis au moins un an, un protocole d'AIH journalier (cinq jours par semaine, pendant deux semaines) consistant en huit épisodes à 8% d'oxygène et séparés par deux minutes d'intervalle, induit une augmentation du volume minute dans les deux premiers jours du protocole, ce qui correspond à une LTF ventilatoire. Cette LTF est maintenue durant les dix jours de du protocole d'AIH journalier, mais n'est cependant pas augmentée au cours du temps (Tester et al., 2014). L'AIH journalier a aussi été combinée avec d'autres types de thérapeutiques. Ainsi, un protocole d'AIH journalier associé à un entraînement moteur améliore la fonction locomotrice chez des patients blessés médullaires (Hayes et al., 2014; Navarrete-Opazo et al., 2016; Navarrete-Opazo et al., 2017b). Elle potentialise aussi la plasticité synaptique spinale évaluée par l'enregistrement des potentiels évoqués moteurs des muscles de la main, induits par stimulation magnétique transcrânienne (TMS) (Christiansen et al., 2021).

Ainsi, l'hypoxie intermittente induit des effets bénéfiques au niveau de la récupération fonctionnelle ventilatoire et non ventilatoire chez l'Homme et chez les modèles précliniques après trauma spinal, et son effet est potentialisé lorsqu'associé avec d'autres thérapeutiques.

1.2. Stimulation électrique épидurale

La stimulation électrique épидurale (EES) consiste à stimuler électriquement de manière répétée la moelle épinière pour d'induire une forme de neuromodulation du système nerveux spinal afin d'augmenter l'excitabilité du système après trauma spinal et ainsi favoriser les processus de plasticité neuronale. L'EES était initialement utilisée afin de réduire les douleurs chroniques chez les

patients blessés médullaires ou amputés, principalement en neuromodulant négativement l'excitabilité du système afin de réduire voire bloquer les signaux de douleur (Kumar et al., 1991; Moreno-Duarte et al., 2014). Plus précisément, l'EES recrute les afférences proprioceptives lors de leur entrée dans la moelle épinière via les racines dorsales (Capogrosso et al., 2013). Les vastes projections de ces afférences permettent d'une part de connecter les interneurons moteurs et les motoneurons au niveau du segment spinal stimulé, mais aussi d'augmenter l'excitabilité du système lorsque l'ESS est en fonctionnement et donc de recruter plus de neurones prémoteurs, permettant aux voies descendantes motrices résiduelles d'initier des mouvements musculaires plus facilement après trauma spinal (Moraud et al., 2016; Bonizzato et al., 2021). Cette thérapie induit une amélioration de la marche chez les modèles précliniques de trauma spinal (Gerasimenko et al., 2003; Ichiyama et al., 2005; Gerasimenko et al., 2006), mais aussi chez l'Homme (Herman et al., 2002; Harkema et al., 2011).

Au niveau du système respiratoire, l'utilisation de l'EES a été utilisée afin de déclencher des processus de neuroplasticité au niveau du réseau phrénique, en particulier au niveau des motoneurons phréniques déafférentés. Des études ont ainsi montré certains bénéfices de l'EES après trauma spinal cervical (Kowalski et al., 2013; Dale et al., 2016; Gonzalez-Rothi et al., 2017; Bezdudnaya et al., 2018; Dale et al., 2019). En effet, l'EES répétée (déclenchée par l'inspiration, soit à environ 0,5Hz) appliquée durant vingt heures par jour et pendant quatre jours, au niveau cervical chez des rats éveillés après hémisection spinale latérale en C2, induit l'augmentation de l'expression de gènes de facteurs neurotrophiques, soit le VEGF et le BDNF, au niveau ventral de la moelle épinière C3-C5 (Dale et al., 2019). Après transection spinale en C1 chez le rat anesthésié, l'application de l'EES délivrée à 100-300Hz au niveau C4 permet de maintenir une concentration du dioxyde de carbone en fin d'expiration et une pression artérielle physiologique. Elle induit aussi une facilitation à court terme du circuit moteur phrénique (Bezdudnaya et al., 2018). De même, un protocole d'EES délivré à 300Hz chez le rat anesthésié et ventilé après hémisection latérale en C2, soit au niveau C4, soit au niveau T2, induit une potentialisation de l'activité phasique phrénique inspiratoire ipsilatérale, aussi bien à deux (stimulation en T2) qu'à douze semaines (stimulation en C4 et en T2) post-lésion (Gonzalez-Rothi et al., 2017).

Malgré les effets bénéfiques de l'EES, la récupération fonctionnelle n'est jamais complète, raison pour laquelle elle commence à être couplée à d'autres thérapeutiques telles que la stimulation corticale profonde au niveau du cortex prémoteur, ce qui va « stimuler » la volonté de marcher durant l'application des protocoles d'EES spinaux (Bonizzato et al., 2021). Cette thérapie a cependant comme désavantage d'être invasive, des techniques non-invasives ayant le même potentiel neuromodulateur commencent donc à être explorées telle que la stimulation magnétique transcrânienne qui sera traitée plus tard dans ce manuscrit (Chapitre « THERAPEUTIQUES VISANT A AMELIORER LES FONCTIONS RESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE APRES TRAUMA SPINAL », partie 2.3.).

1.3. Modification de l'environnement extracellulaire

Différentes études ont été réalisées avec pour objectif de réduire la quantité de molécules matricielles inhibitrices présentes au niveau de la cicatrice gliale après trauma spinal, en particulier les CSPG (Kwok et al., 2011; Bartus et al., 2012). Ainsi, il a été montré que le clivage sélectif par la chondroïtinase ABC de la chaîne GAG de ces CSPG, majoritairement responsable de l'effet répulsif contre les cônes de croissance axonaux, promeut la croissance axonale des axones lésés et des axones résiduels après trauma spinal (Bradbury et al., 2002; García-Alías et al., 2009; Kwok et al., 2014; James et al., 2015). En effet, l'injection de chondroïtinase ABC au niveau des motoneurones phréniques, que ce soit à douze semaines, ou à un an et demi post-hémisection latérale en C2 chez le rat, induit une récupération durable de l'activité hémidiaphragmatique initialement paralysé (Figure 27). Cette récupération s'accompagne d'une réduction de l'expression des CSPG, ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur TrkB et de la densité des fibres sérotoninergiques (représentée par le marquage de la sérotonine endogène) (Warren et al., 2018).

La digestion des CSPG par la chondroïtinase ABC induit de plus une modulation de l'inflammation dans la moelle épinière lésée de rat (neuroprotection). Elle est accompagnée d'une altération du phénotype des macrophages présents en favorisant leur polarisation en macrophages M2 réparateurs au détriment des macrophages M1 proinflammatoires (Bartus et al., 2014). Ce phénomène résulte en une réponse anti-inflammatoire médiée par l'IL-10 et donc plutôt pro-réparatrice (Didangelos et al., 2014). D'autres études ont montré que l'administration intraspinale d'inhibiteurs des récepteurs PTP σ et LAR (récepteur aux CSPG) induit une récupération fonctionnelle respiratoire associée à de la repousse axonale bulbospinale après trauma spinal, (Lang et al., 2015; Urban et al., 2019a; Cheng et al., 2021a).

Les effets de la digestion des CSPG par la Chondroïtinase ABC peut de plus être combinée à d'autres thérapeutiques telle qu'une greffe de nerf tibial (dont les extrémités ont été greffées en C2 et en C4), qui chez le rat, induit une augmentation de l'activité diaphragmatique (plasticité synaptique) associée à une régénération des fibres bulbospinales, suite à une lésion spinale cervicale (Alilain et al., 2011). Son association à un protocole d'hypoxie intermittente semble amplifier l'effet sur la modulation de l'expression des molécules (CSPG, TrkB, et sérotonine) induite par la chondroïtinase ABC, mais n'induit pas de récupération plus importante de l'activité diaphragmatique (Warren et al., 2018) (Figure 27).

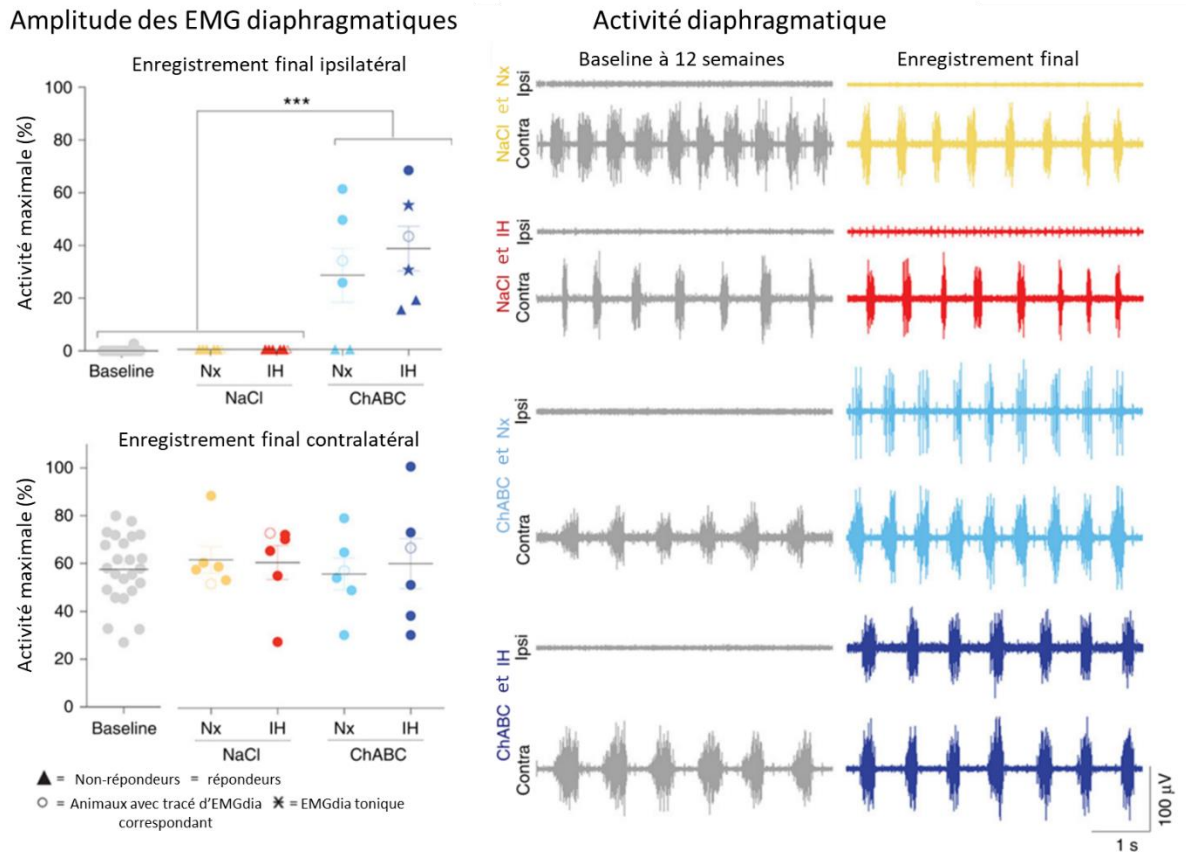


Figure 27 : Effet de la chondroitinase ABC l'activité diaphragmatique

La digestion des CSPGs par la chondroitinase ABC induit la restauration de l'activité diaphragmatique du côté lésé comme le montrent les tracés représentatifs et leur quantifications associées. De façon intéressante, la combinaison chondroitinase ABC/hypoxie intermittente n'améliore pas l'activité diaphragmatique observée par rapport au traitement par la chondroitinase ABC seule. ChABC : chondroitinase ABC ; IH : hypoxie intermittente ; Nx : normoxie ; Contra : contralatéral ; Ipsi : ipsilatéral. Adapté de *Warren et al.*, 2018.

1.4. Greffes de nerfs

Le système nerveux périphérique possède un fort potentiel régénératif, contrairement au système nerveux central. Cette dichotomie est due au fait que l'environnement spinal n'est pas permissif aux processus de croissance et repousse axonale, ce qui n'exclut pas que les neurones ont le potentiel de faire croître leurs axones. Comme décrit précédemment (Chapitre « PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LES SYSTEMES NEURORESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE », partie 1.2.), l'équipe d'Aguayo a montré que la greffe d'un nerf sciatique entre le tronc cérébral et la moelle épinière thoracique crée un « pont » entre les deux zones, et qu'ainsi les neurones des deux zones sont capables de croître dans ce nerf et de rejoindre l'autre bout du nerf pour y connecter d'autres neurones (Richardson et al., 1980; David and Aguayo, 1981). Le potentiel thérapeutique de la greffe de nerf périphérique a donc été exploré dans des modèles précliniques de trauma spinal, en particulier

le modèle d'hémisection spinale en C2 induisant un déficit respiratoire. En effet, une cavité dans la moelle épinière est requise pour la greffe de nerf, rendant les modèles de contusion difficiles à traiter avec cette thérapeutique. Cela reste cependant possible car des cavités cystiques se forment à partir de sept jours post-trauma, mais il reste nécessaire d'enlever les débris cellulaires pour placer la greffe (Côté et al., 2011).

Ainsi, dans des modèles de trauma spinal en C2, la greffe de nerf périphérique induit la régénération des voies respiratoires impactées par la lésion. La greffe d'une extrémité du nerf fibulaire commun dans la moelle épinière cervicale en C2 chez le rat induit la lésion des voies respiratoires descendantes durant la procédure. L'autre extrémité du nerf greffé est laissée tel quel durant deux à quatre mois, puis l'activité de ce nerf est enregistrée. Le nerf greffé présente alors la même pattern d'activité que le nerf phrénique, montrant que les axones des neurones respiratoires lésés ont crû à l'intérieur du nerf greffé (Decherchi et al., 1996) (Figure 28). Ces résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique de la greffe de nerfs périphériques de façon aigue après lésion de la moelle épinière.



Figure 28 : Activité spontanée d'une unité d'un nerf périphérique greffé dans la moelle épinière C2

Certaines unités du nerf fibulaire commun greffé dans la moelle épinière C2 présentent le même pattern de décharge que le nerf phrénique, montrant que les axones lésés des voies inspiratoires descendantes ont repoussé dans le nerf périphérique greffé. Adapté de Decherchi et al., 1996.

Cette greffe de nerf périphérique réalisée en aigu permet donc une régénération axonale des neurones lésés. Cette même greffe réalisée trois semaines après lésion spinale permet la régénération axonale des neurones respiratoires lésés, montrant que ces neurones restent fonctionnels et gardent un fort potentiel régénératif de façon chronique (Decherchi and Gauthier, 2002). De même, une greffe du nerf fibulaire commun réalisée au niveau des neurones respiratoires du tronc cérébral induit une lésion de ces neurones, qui trois mois plus tard, ont fait croître leurs axones dans le nerf greffé. Trois mois post greffe, une hémisection latérale de la moelle épinière en C3 et l'implantation de l'autre extrémité du nerf greffé en C4 au niveau des motoneurones phréniques sont réalisées. Puis, quatre mois plus tard, la stimulation du nerf périphérique greffé induit des réponses au niveau du nerf

phrénique enregistré, montrant que les neurones respiratoires du tronc cérébral sont bien connectés aux motoneurones phréniques (Gauthier et al., 2002).

Cette régénération axonale permise par la greffe de nerf périphérique a été retrouvée chez plusieurs espèces, et pour d'autres fonctions que la respiration (Lee et al., 2004; Campos et al., 2008; Côté et al., 2011; Hanna et al., 2011). Cet effet régénératif est accentué lorsque la zone greffée est traitée à la chondroïtinase ABC, rendant l'environnement plus permissif aux processus de croissance axonale (Houle et al., 2006).

Chez l'Homme, une thérapeutique appliquée et proche de la greffe de nerf consiste à rerouter un nerf proche du muscle dont la fonction a été perdue, soit effectuer un « transfert de nerf » (Senjaya and Midha, 2013).

1.5. Greffe de cellules

La transplantation de cellules dans la zone lésée après trauma spinal a pour but, soit induire de la neuroprotection, de la remyélinisation ou encore moduler la réponse inflammatoire dans le cas de cellules non-neuronales, soit de créer un réseau neuronal, de nouvelles connections et d'interagir avec les cellules gliales alentour dans le cas de progéniteurs neuronaux (Zholudeva and Lane, 2019; Fischer et al., 2020). Cette thérapeutique a été testée chez des modèles précliniques de trauma spinaux et induit une amélioration fonctionnelle de diverses fonctions lorsqu'administrée dans la bonne fenêtre. A titre d'exemple, la fonction locomotrice (Stokes and Reier, 1992; Rosenzweig et al., 2018), le système autonome (Hou et al., 2013b), ou encore la fonction respiratoire (Fischer et al., 2020) ont montré une amélioration suite à une transplantation de cellules dans la zone lésée.

Différents types de cellules ont été utilisés pour ces transplantations. Ainsi, la transplantation de cellules souches pluripotentes humaines différenciées en astrocytes chez des rats et souris immunodéprimées après contusion cervicale montre certains effets bénéfiques. Notamment, elle permet de réduire la taille de la lésion, d'augmenter l'amplitude des électromyographies (EMG) diaphragmatiques dorsaux et des potentiels évoqués moteurs diaphragmatiques du côté ipsilatéral à la lésion. Ces résultats montrent que fournir un support neural pour limiter l'inflammation et maintenir l'homéostasie est bénéfique aux processus de récupération post-lésion (Li et al., 2015). La moelle épinière foetale (FSC) peut aussi être utilisée, celle-ci étant riche en précurseurs neuronaux (NPC). Après hémisection en C2 chez le rat, les cellules FSC transplantées ont intégré le réseau phrénique déafférenté, et une partie de ces cellules sont innervées par des cellules de l'hôte (White et al., 2010). De plus, l'enregistrement de l'activité spontanée de ces cellules transplantées a montré que certaines étaient synchronisées avec la phase inspiratoire ou la phase expiratoire, et que leur activité pouvait être modifiée lorsque les animaux sont soumis à des défis respiratoires tel que l'hypoxie (Lee et al.,

2014b). La transplantation de ces cellules FSC induit donc une amélioration de l'activité phrénique après trauma spinal cervical (Fischer et al., 2020). Ces résultats ont été retrouvés avec la transplantation de NPC. Plus particulièrement, la transplantation de cellules enrichies en interneurones V2a conduit à une amélioration fonctionnelle respiratoire (Zholudeva et al., 2018). Les cellules précurseurs des oligodendrocytes ont aussi montré des effets bénéfiques en contribuant à la remyélinisation et à l'homéostasie du milieu extracellulaire (Watson and Yeung, 2011; Priest et al., 2015) et en participant à l'amélioration de la récupération fonctionnelle, qu'elle soit respiratoire ou encore locomotrice ou sensorimotrice, en post-trauma spinal (Zholudeva and Lane, 2019) (Figure 29).

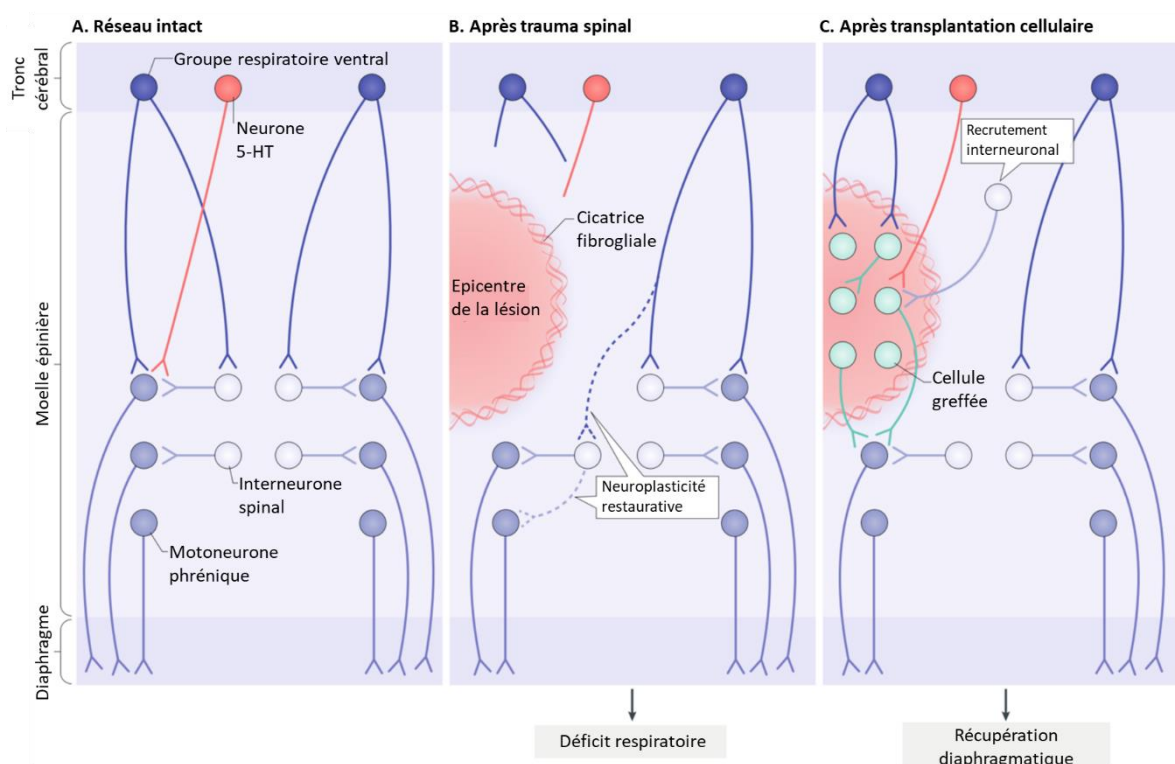


Figure 29 : Restauration du système respiratoire après trauma spinal par transplantation cellulaire

Après trauma spinal cervical, les axones des neurones respiratoires du tronc cérébral innervant les motoneurones de la moelle épinière en A. sont lésés, ce qui induit un déficit respiratoire malgré les processus de neuroplasticité que se mettent en place (B). La transplantation de cellules souches permet de recréer des connexions dans le réseau phrénique afin de reconnecter les neurones lésés aux motoneurones phréniques, ce qui fait intervenir entre autres les interneurones phréniques (C).

D'autres types de cellules peuvent être utilisées, telles que les cellules souches ectomésenchymateuse olfactives. Celles-ci peuvent se différencier en cellules du mésoderme et en cellules neurales (Murrell et al., 2005; Tomé et al., 2009), et sont facilement accessibles que ce soit chez l'Homme ou les rongeurs (Girard et al., 2011; Stamegna et al., 2014). Ainsi, après contusion spinale en C2 chez le rat et transplantation deux jours post-trauma de cellules souches

ectomésenchymateuses olfactives, une amélioration des activités locomotrice, diaphragmatique et phrénique est observée quatre mois plus tard, accompagnée d'une réduction de l'inflammation spinale (Stamegna et al., 2018). De même, la transplantation de cellules primaires ectomésenchymateuses olfactives déficientes pour la protéine ADAMTS4 (cette délétion permet d'augmenter la sécrétion de facteurs neurotrophiques *in vitro*) après transection en T10 chez la souris permet d'observer une récupération fonctionnelle locomotrice (Delarue et al., 2020).

La transplantation de cellules souches est donc une thérapie attrayante. Des essais réalisés chez l'Homme ont montré que cette méthode est sans risque pour la transplantation de divers types de cellules dont les précurseurs des oligodendrocytes (Manley et al., 2017) et les cellules myélinisantes olfactives (Watzlawick et al., 2016).

1.6. Réhabilitation par l'exercice

Les protocoles de réhabilitation physique sont généralement utilisés pour améliorer la fonction des membres postérieurs chez les modèles précliniques et les patients blessés médullaires. Ces protocoles d'exercice appliqués chez les modèles précliniques, principalement chez le rongeur, sont soit volontaires ou forcés. L'action volontaire repose sur l'enrichissement, tel que des roues placées dans la cage des animaux, tandis que l'action forcée repose sur des activités telles que la marche sur tapis roulant avec ou sans support corporel, le vélo ou encore la nage (Loy and Bareyre, 2019) (Figure 30). La récupération fonctionnelle locomotrice est généralement évaluée par le BBB score (Basso et al., 1995; Basso et al., 2006).

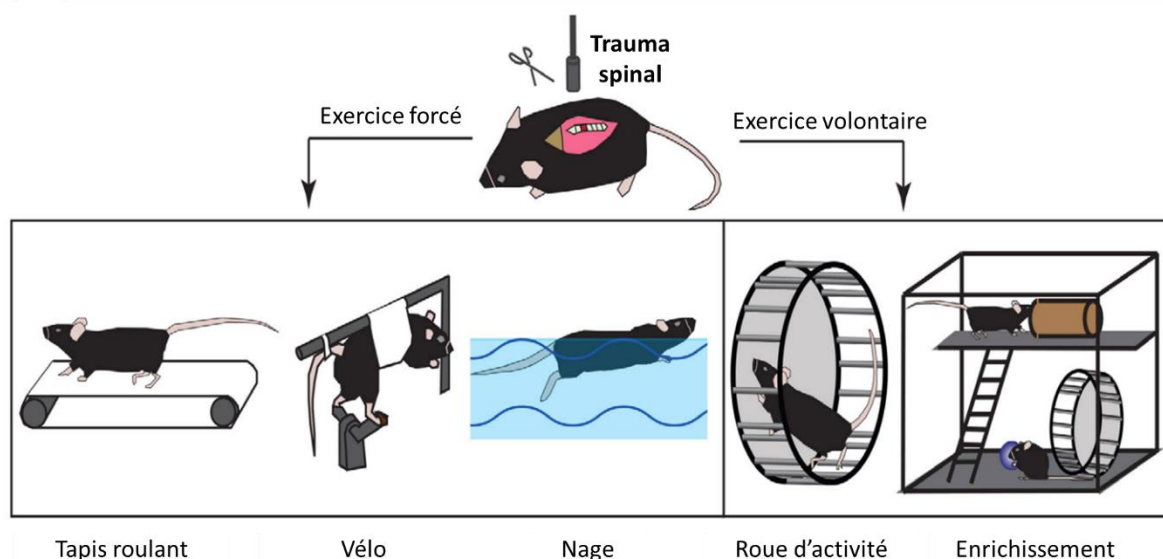


Figure 30 : Exercice forcé versus exercice volontaire après trauma spinal

Divers paradigmes sont utilisés pour les protocoles de réhabilitation fonctionnelle après trauma spinal, soit forcés, soit volontaires, afin d'induire une récupération fonctionnelle. Adapté de Loy et Bareyre, 2019.

L'étude préclinique de leurs effets permet de comprendre quelles sont les modifications axonales qui sous-tendent la récupération fonctionnelle motrice observée chez l'Homme. Chez le rat, l'application d'un protocole d'entraînement sur tapis roulant après contusion en T9-10 induit une récupération locomotrice évaluée par le BBB score, ainsi qu'une augmentation de l'expression de BDNF et une réduction de la taille de la cavité cystique au site lésionnel (Jung et al., 2016). Une autre étude similaire montre que ce type de protocole induit aussi une augmentation de l'expression de GAP-43, mais n'induit pas de variation de l'expression de BDNF (Sun et al., 2013). Chez la souris, il a de plus été montré qu'un entraînement sur tapis roulant une semaine après hémisection latérale en T10, et durant trois semaines, induit une augmentation de l'excitabilité des fibres descendantes de la colonne dorsale (du tractus corticospinal), mais sans affecter les propriétés intrinsèques des neurones (Flynn et al., 2013).

Au niveau respiratoire, les effets bénéfiques de la réhabilitation par des protocoles d'entraînement ont pu être observés chez des patients blessés médullaires (Vivodtzev et al., 2020), en particulier chez les athlètes après entraînement des muscles respiratoires (Gee et al., 2019; Hardy et al., 2019; Lemos et al., 2020). Ces entraînements permettent à des athlètes avec trauma spinal cervical d'augmenter le volume maximal d'air inspiré, ainsi que le volume maximal d'air expiré (Gee et al., 2019; Hardy et al., 2019).

A l'image des autres thérapeutiques présentées, une récupération fonctionnelle complète n'est jamais observée, raison pour laquelle des protocoles de réhabilitation combinés à d'autres thérapeutiques sont développés et testés. Ainsi, après section du funicule dorsal en C4 chez le rat, l'association entre administration de chondroïtinase ABC et soit le renforcement de la dextérité manuelle des pattes (habilité à attraper des pellets), soit une réhabilitation locomotrice, conduit à une amélioration de la récupération fonctionnelle dans les deux cas comparé aux animaux n'ayant reçu que l'un des traitements seul (García-Alías et al., 2009).

Un grand nombre de thérapeutiques sont donc actuellement étudiées chez les modèles précliniques et/ou disponibles en clinique humaine (Hutson and Di Giovanni, 2019). Cependant, l'association de ces différentes thérapeutiques semble être la clef pour obtenir une récupération fonctionnelle totale des capacités perdues après trauma spinal. De plus, l'étude de l'effet de ces différentes méthodes chez les modèles précliniques devrait permettre d'améliorer les protocoles d'administration existant afin d'augmenter leurs effets bénéfiques et de potentialiser la récupération fonctionnelle déjà observée. Etudier et trouver les meilleures combinaisons et approches permettrait d'établir le protocole thérapeutique optimal et utilisable en clinique.

2. Stratégies thérapeutiques potentielles étudiées

2.3. Stimulation magnétique transcrânienne (TMS)

Le fonctionnement de la TMS est basé sur le fait que l'énergie électrique peut être convertie en énergie magnétique. L'appareil de TMS est composé d'une alimentation électrique qui va permettre de stocker des charges électriques. Ces charges sont alors déchargées rapidement et de façon transitoire ($\sim 200 \mu\text{s}$) dans une bobine de cuivre, ce qui permet de générer un champ magnétique à partir d'un courant électrique, et inversement, ce qui correspond au principe d'induction mutuelle électromagnétique de Faraday (Carson et al., 2016). Ainsi, lorsque le champ magnétique est placé à proximité du crâne, il induit un champ électrique au niveau cortical qui va provoquer des déplacements de charges (ioniques) à travers la membrane des neurones. Si ces variations sont suffisantes, elles induisent la dépolarisation de ces neurones, voir le déclenchement de potentiels d'actions permettant de dépolariser les neurones connectés, jusqu'à induire la contraction des muscles (Grunhaus et al., 2002). Cette contraction musculaire est enregistrable sous forme de potentiel évoqué moteur (PEM), et peut être considérée comme un reflet de l'excitabilité générale du système nerveux central. La TMS appliquée de façon répétée (rTMS) peut aussi servir à neuromoduler les réseaux neuronaux (Figure 31). Elle représente donc une alternative non-invasive à la stimulation électrique épidurale présentée précédemment.

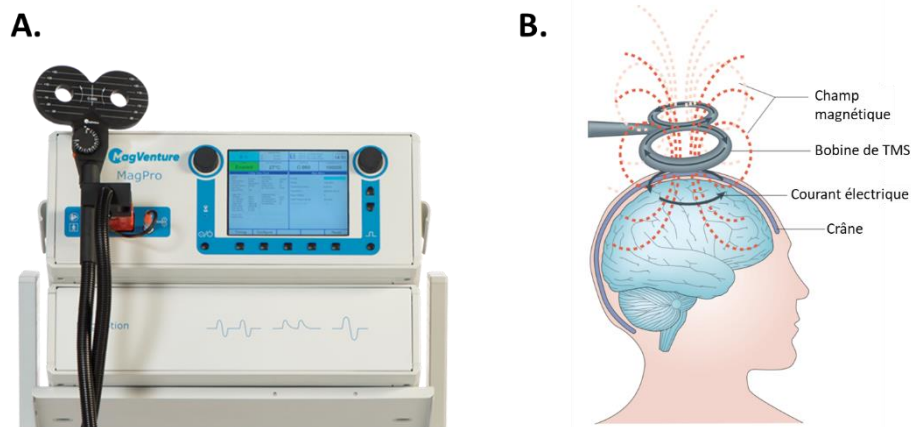


Figure 31 : Stimulation magnétique transcrânienne

A. Appareil de stimulation magnétique connecté une bobine en forme de huit (8). Image issue de magventure.com. B. Schéma de de l'application un protocole de TMS. Adapté de *Ridding et Rothwell, 2007.*

2.3.1. Utilisation comme outil de diagnostic de l'intégrité des voies nerveuses

L'application de la TMS ou de la stimulation magnétique trans-spinale avec une puissance au-dessus du seuil moteur (induisant donc une réponse musculaire), induit des PEM enregistrables dans les muscles innervés par les motoneurons activés chez l'Homme (Hiwaki and Ueno, 1990; Pascual-Leone et al., 1995; Kindred et al., 2021) et chez les modèles précliniques (Linden et al., 1999; Vinit et al., 2014; Sykes et al., 2016; Tang et al., 2016; Petrosyan et al., 2017) (Figure 32).

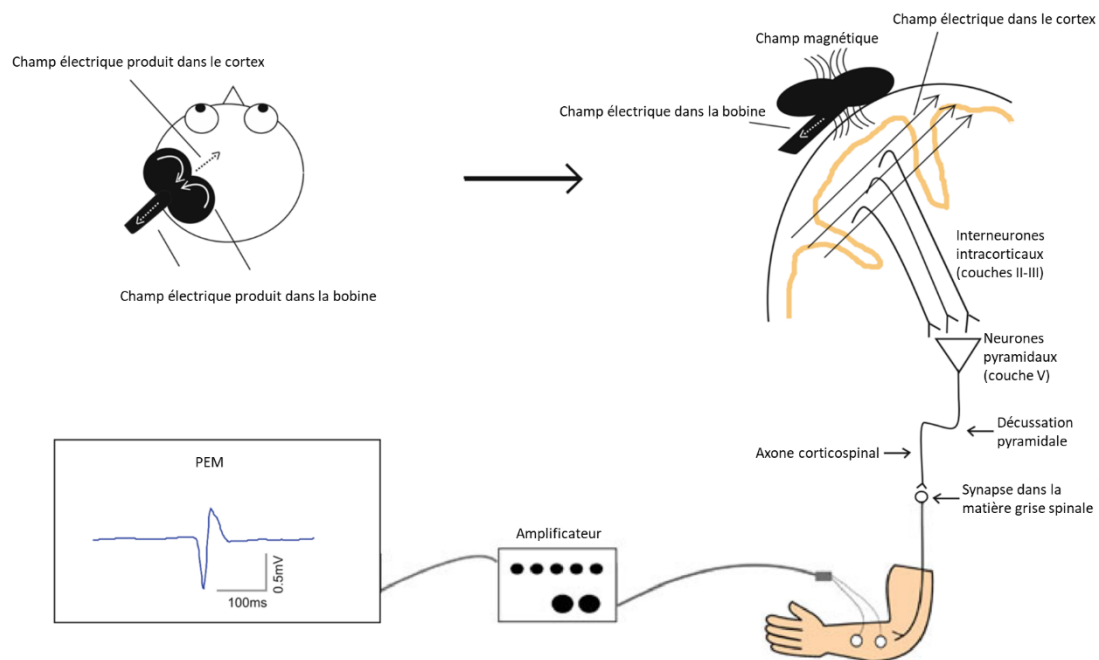


Figure 32 : Représentation schématique d'une stimulation magnétique transcrânienne (TMS) avec enregistrement de PEM

La bobine délivre un champ magnétique au niveau du crâne, qui se change en champ électrique lorsqu'il atteint le cortex. La dépolarisation des neurones qui s'ensuit est transférée aux neurones suivant si le champ magnétique est assez puissant pour le permettre. Lorsque le signal nerveux atteint le muscle cible, une contraction involontaire du muscle se produit, appelée potentiel évoqué moteur (PEM) qui peut être enregistrée par des méthodes électrophysiologiques. Adapté de Carson et al., 2016.

Ces PEM sont le reflet de la capacité du signal nerveux à être transmis à partir du premier neurone dépolarisé, jusqu'au muscle enregistré. Ils sont distinguables des mouvements volontaires des muscles de par leur forme et la latence avec laquelle ils apparaissent lors de leur enregistrement électromyographique (Ridding and Rothwell, 2007). L'amplitude et la latence de ces potentiels évoqués en général peut varier selon les conditions du système nerveux, comme après un trauma spinal (Vinit et al., 2016), l'état neuroinflammatoire du système (Mazeraud et al., 2020), ou encore le niveau de vigilance (Sykes et al., 2016).

2.3.1.1. Stimulation unique

L'évaluation des PEM induits par TMS constitue donc une quantification non-invasive de l'intégrité du système nerveux, ainsi que de l'excitabilité corticale et spinale en neurosciences cognitives et cliniques.

Ainsi, l'excitabilité corticale a été évaluée au travers de l'étude des seuils de déclenchement des PEM et de courbes dose-réponse dans différents muscles (Chiba et al., 2003; Nielsen et al., 2007; Ridding and Rothwell, 2007; Carson et al., 2016; Tang et al., 2017; Lefaucheur, 2019), y compris le diaphragme, chez l'Homme sain ou dans le cadre de pathologies (Similowski et al., 1996a; Similowski et al., 1996b; Demoule et al., 2003; Sharshar et al., 2003; Welch et al., 2020), ainsi que chez les modèles précliniques (Vinit et al., 2014; Vinit et al., 2016; Lee et al., 2021). L'étude des PEM musculaires induit par TMS après trauma de la moelle épinière constitue donc une méthode d'évaluation de l'intégrité des voies corticospinales ou bulbospinales qui peut être modifiée en raison de l'axotomie des neurones innervant les motoneurons spinaux (Vandermeeren et al., 2003; Nielsen et al., 2007; Oudega and Perez, 2012; Vinit et al., 2016; Lee et al., 2021). Ainsi, l'amplitude des PEM enregistrés pour le muscle gastrocnémien est réduite cinq semaines après contusion modérée, et abolie après contusion sévère en T8 chez le rat (Zhang et al., 2008). Cette mise en évidence de la perte d'intégrité du tractus corticospinal après trauma spinal par utilisation de la TMS est retrouvée chez les modèles précliniques (Fujiki et al., 2004; Oudega and Perez, 2012), mais aussi chez l'Homme (Brouwer et al., 1992; McKay et al., 1997; Oudega and Perez, 2012). Cette perte d'intégrité est aussi retrouvée pour d'autres modalités que la locomotion telle que la fonction respiratoire (Vinit et al., 2016). Elle est cependant généralement accompagnée d'une réorganisation des voies descendantes spinales qui peut aussi être évaluée par l'étude des PEM musculaires induits par TMS, au niveau des voies locomotrices (Oudega and Perez, 2012), ou encore au niveau des voies respiratoires via enregistrement des PEM diaphragmatiques (Vinit et al., 2016). En effet, après trauma spinal, la latence des PEM est généralement augmentée pour les muscles dont les voies les innervant ont été impactées. Cela peut s'expliquer par le fait que les axones soient démyélinisés, ou encore par le fait que le signal passe par d'autres neurones intermédiaires avant d'atteindre les motoneurons innervant le muscle enregistré (Oudega and Perez, 2012). Une modulation de l'excitabilité peut aussi être observée. A titre d'exemple, sept jours après hémisection latérale en C2 chez le rat, l'amplitude des PEM diaphragmatiques enregistrés du côté lésé est plus importante que l'amplitude des PEM enregistrés du côté sain, alors que l'enregistrement électromyographique ne montre une activité diaphragmatique que du côté sain (Vinit et al., 2016). Ces résultats suggèrent donc que malgré l'absence d'activité de ces motoneurons, ils restent fonctionnels et surtout que leur excitabilité est augmentée, peut-être en raison de leur déafférentation qui aurait un impact intrinsèque sur leur seuil d'activation, mais aussi au profil inflammatoire environnant.

Certaines études ont aussi montré que l'excitabilité du tractus corticospinal pouvait être modifiée lors d'un apprentissage moteur chez l'Homme (Carson et al., 2016), soit en l'augmentant (Muellbacher et al., 2001; Perez et al., 2004), soit en la diminuant (Coxon et al., 2014; Holland et al., 2015). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales ou le type d'apprentissage qui peut varier d'une étude à l'autre (Carson et al., 2016). A titre d'exemple, une étude menée chez des sujets sains a montré qu'un apprentissage fin visuomoteur durant quatre semaines induisait une augmentation de l'amplitude des PEM enregistrés au niveau du biceps brachial, ainsi qu'une réduction du seuil de déclenchement de ces PEM, associées à une amélioration de la performance à effectuer la tâche donnée (Jensen et al., 2005). Cette même étude montre qu'à l'inverse, un entraînement de quatre semaines demandant de porter de lourdes charges n'induit pas de modification au repos. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec le fait que l'apprentissage moteur fin est associé à une modification dans l'organisation de la représentation des mouvements au niveau du cortex moteur primaire chez l'Homme (Classen et al., 1998; Hund-Georgiadis and von Cramon, 1999). A l'inverse, les apprentissages moteurs non fin ou passifs ne sont associés à aucune forme, ou alors faible, de plasticité (Pascual-Leone et al., 1995; Lotze et al., 2003). L'évolution de l'amplitude des PEM étant donc corrélée à l'amélioration des performances lors de l'apprentissage de mouvements fins, la variation de l'amplitude des PEM peut donc être utilisée comme outil de diagnostic de la modification de l'excitabilité du réseau corticospinal ou neuronal à corréler avec la modification des performances observées.

La conduction nerveuse peut aussi être évaluée par stimulation magnétique et enregistrement des PEM correspondants. Chez des patients atteints par exemple du syndrome du muscle piriforme (compression du nerf sciatique par le muscle piriforme), la stimulation magnétique et l'enregistrement des PEM des muscles innervés par le nerf sciatique permet de détecter les PEM anormaux et d'évaluer le degré d'atteinte du nerf sciatique chez les patients (Chang et al., 2006). De même, la stimulation des racines motrices permet de diagnostiquer les traumatismes du nerf sciatique par l'évaluation de la forme des PEM des muscles innervés par le nerf sciatique chez les patients (Matsumoto et al., 2013). Cette technique est aussi utilisée chez les modèles précliniques pour la mise au point de nouvelles méthodes d'évaluation fiables de la conduction nerveuse du nerf sciatique (Kagan et al., 2016; Kosta et al., 2019; Kosta et al., 2020), ainsi que pour l'étude des voies corticospinales (Kamida et al., 1998).

L'enregistrement des PEM est aussi utilisé pour le suivi de l'intégrité des voies corticospinales durant des chirurgies, en l'occurrence des chirurgies spinales ou à proximité des racines nerveuses spinales. Ces chirurgies invasives peuvent en effet induire la destruction de tissus et donc de voies nerveuses, raison pour laquelle la variation de l'amplitude des PEM musculaires, reflet de l'intégrité des voies corticospinales enregistrées, sont monitorées au cours de ce type de chirurgies (Macdonald

et al., 2012; Tsutsui and Yamada, 2016). Cette intégrité des voies corticospinales est aussi évaluée après trauma du système nerveux central par simple stimulation par TMS.

2.3.1.2. Stimulations pairées

L'utilisation de stimulations de TMS pairées s'avère aussi utile pour évaluer de façon non-invasive les circuits corticaux excitateurs ou inhibiteurs (Kamida et al., 2007; de Goede et al., 2016). Une première stimulation dite « conditionnante » (SC) et appliquée sous le seuil d'activation des PEM précède la seconde stimulation dite « test » (ST), appliquée au-dessus du seuil d'activation des PEM, et sert à activer les circuits corticaux excitateurs ou inhibiteurs. Ces deux stimulations sont appliquées avec une durée inter-stimulus variable. Lorsque la ST est appliquée de 1 à 5 ms après la SC, une inhibition intracorticale courte se produit, c'est-à-dire que le ST est d'amplitude plus faible que pour une stimulation simple (Kujirai et al., 1993). La SC induirait l'activation de mécanismes corticaux inhibiteurs, et cette activation serait effective au moment de la ST, ce qui expliquerait l'amplitude réduite observée (Di Lazzaro et al., 1998). Cet effet inhibiteur serait médié par les récepteurs GABA_A (Kujirai et al., 1993). Lorsque l'intervalle inter-stimulation est compris entre 6 et 30 ms, une facilitation intracorticale se produit, soit une augmentation de l'amplitude du PEM induit par la ST (Ziemann et al., 1996). Cette facilitation serait le résultat d'une modification de la balance excitatrice médiée par les récepteurs NMDA (Ziemann et al., 1996) et de la balance inhibitrice médiée par les récepteurs GABA_A (Hanajima et al., 1998). Une inhibition corticale longue peut aussi être provoquée. La SC et la ST doivent être toutes deux être délivrées au-dessus du seuil d'activation des PEM et être séparées de 50 à 400 ms (de Goede et al., 2016). La SC induit donc un PEM avec une amplitude égale à celle obtenue pour une unique stimulation, alors que le PEM induit par la ST a une amplitude réduite (Valls-Solé et al., 1992). Cet effet serait médié par les récepteurs GABA_B (McDonnell et al., 2006) (Figure 33).

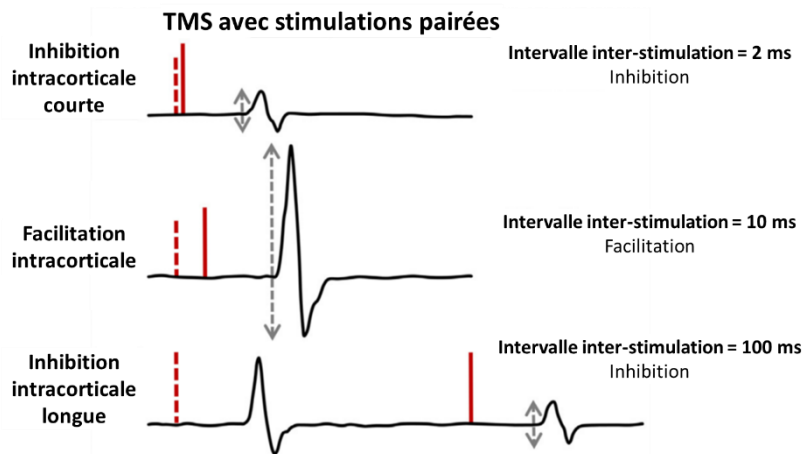


Figure 33 : Représentation des modulations intracorticales induites par stimulations pairées de TMS

Les lignes rouges en pointillés représentent la stimulation conditionnante, et les lignes rouges continues, la stimulation test. Adapté de *de Goede et al., 2016*.

La découverte de ces différents patterns d'activation des voies excitatrices et inhibitrices corticales permet donc d'évaluer leur fonctionnement dans différentes pathologies liées à une modification de l'excitabilité corticale, telle que l'épilepsie (Kamida et al., 2007; de Goede et al., 2016).

2.3.2. Stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS)

La TMS peut aussi être utilisée dans le but de neuromoduler l'activité neuronale. Les pulses de TMS sont alors délivrés de façon répétée et en-dessous du seuil moteur (n'induisant pas de réponse musculaire). La rTMS peut ainsi induire une modification de l'excitabilité corticale ou spinale selon le site d'application, soit en l'augmentant, soit en la diminuant. Les effets de cette neuromodulation peuvent de plus être observables après la fin de la période de stimulation. L'augmentation de l'excitabilité neuronale est généralement observée suite à l'administration de protocoles dits de haute fréquence et correspond à un mécanisme de LTP-like (> 5 Hz) (Vlachos et al., 2012; Lenz et al., 2015; Tang et al., 2017), alors que la réduction de l'excitabilité est plutôt associée aux protocoles dits de basse fréquence (≤ 1 Hz) et correspond à un mécanisme de LTD-like (Lenz and Vlachos, 2016; Tang et al., 2017).

Un autre type de stimulation dit « stimulation thêta burst » (TBS) consiste généralement à appliquer trois stimulation à 50 Hz, répétées à une fréquence de 5 Hz (fréquence comprise dans les ondes thêta), et peut, à l'image des protocoles de rTMS, induire un effet excitateur si le protocole de TBS est délivré de façon intermittente, ou inhibiteur si le protocole est délivré de façon continue (Huang et al., 2005; Tazoe and Perez, 2015; Lefaucheur, 2019) (Figure 34).

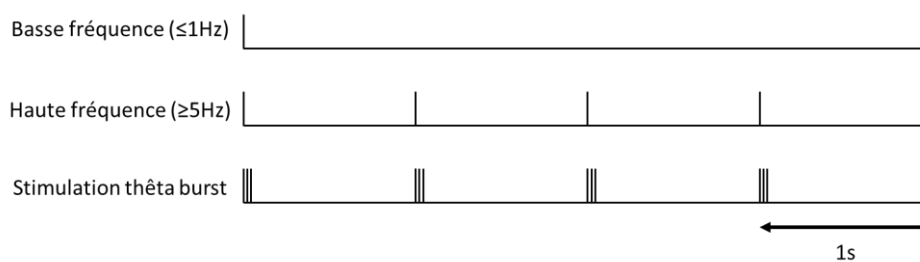


Figure 34 : Exemple de protocoles de rTMS et de stimulation thêta burst

Les protocoles de stimulation par rTMS à basse fréquence sont connus pour induire des phénomènes d'inhibition, alors que ceux à haute fréquence sont connus pour induire des phénomènes d'excitation. Les protocoles de stimulation thêta burst sont quant à eux plutôt connus pour leur potentiel inhibiteur lorsque délivrés de façon continue, et leur potentiel excitateur lorsque délivré de façon intermittente. Adapté de *Tang et al. 2017*.

2.3.2.1. La rTMS dans le traitement de traumatismes du système nerveux

La rTMS est une thérapie non-invasive relativement récente et de plus en plus utilisée en clinique. Elle a montré des effets bénéfiques dans le traitement de nombreuses pathologies neurologiques telles que la dépression (Martin et al., 2017a; McClintock et al., 2018; Jassova et al., 2019), le stress post-traumatique (Yan et al., 2017; Kozel, 2018), l'anxiété, la bipolarité (Kozel, 2018), les douleurs chroniques (Moreno-Duarte et al., 2014; Yang and Chang, 2020), l'épilepsie (Tsuboyama et al., 2020), la maladie de Parkinson (Chou et al., 2015; Aftanas et al., 2018), la maladie d'Alzheimer (Zhao et al., 2017), l'autisme (Oberman et al., 2016), les troubles du sommeil (Nardone et al., 2020), l'addiction aux drogues (Luigjes et al., 2019), ou encore pour la réhabilitation des personnes après un accident vasculaire cérébral (Dionísio et al., 2018). La rTMS est aussi utilisée comme thérapie pour tenter de réduire les déficits et d'induire la récupération des fonctions détériorées ou perdues après un traumatisme de la moelle épinière, ainsi que la spasticité et les douleurs neuropathiques associées (Belci et al., 2004; Tazoe and Perez, 2015; Leszczyńska et al., 2020; Mendonça et al., 2021; Wincek et al., 2021).

Le phénomène de spasticité est retrouvé chez plus de 60% des patients après un traumatisme de la moelle épinière (Adams and Hicks, 2005). Il consiste en une exagération du réflexe myotatique en réponse à une stimulation des tendons. Elle se manifeste chez les patients blessés médullaires en raison de la perte d'une partie ou de toute l'innervation des neurones inhibiteurs, et passerait donc par la diminution de l'activation des récepteurs GABA_B (Kakinohana et al., 2006). L'application de protocoles de rTMS afin de moduler l'activité des neurones résiduels afin d'augmenter cette inhibition a été testée (Korzhovala et al., 2018). A titre d'exemple, l'administration d'un protocole de rTMS à 20 Hz

(haute-fréquence) au-dessus de l'aire motrice primaire, une fois par jour pendant cinq jours, chez des patients atteints de trauma spinal incomplet, induit une réduction de la spasticité au niveau des muscles de la jambe par rapport aux patients non traités (sham rTMS) (Kumru et al., 2010). Il a de même été montré ultérieurement qu'un protocole de rTMS délivré à 20 Hz durant quinze jours induit une réduction de la spasticité, ainsi qu'une amélioration locomotrice. Ces améliorations observées sont de plus maintenues jusqu'à deux semaines post-traitement (Benito et al., 2012). D'autres études ont par ailleurs montré que l'utilisation de protocoles de TBS intermittents induisaient les mêmes effets bénéfiques sur la spasticité post-trauma spinal (Korzhova et al., 2018).

Les douleurs neuropathiques chroniques touchent environ 80% des patients blessés médullaires (Moreno-Duarte et al., 2014; Felix et al., 2021). Ces douleurs sont principalement dues à de la neuroplasticité inappropriée post-trauma. Plusieurs études utilisant des protocoles de rTMS à haute ou à basse fréquence après trauma spinal ont évalué l'effet de ces traitements sur les douleurs neuropathiques chroniques ressenties par les patients (Tazoe and Perez, 2015). Il semblerait que les effets soient variés selon la façon d'évaluer la douleur ainsi que le site d'application de la rTMS. En effet, la première étude à avoir évalué les effets de la rTMS sur la douleur neuropathique chez une réelle cohorte de patients blessés médullaires, a montré que l'application d'un protocole de rTMS à haute fréquence (5 Hz) durant dix jours, réduit le niveau de douleur chez les patients traités par rTMS et chez les patients non-traités (sham rTMS) selon le test de la douleur dit « visual analogue scale ». En revanche, selon le questionnaire sur la douleur de McGill, ce traitement réduit la sensation de douleur chez les patients traités par rapport à ceux non-traités (Defrin et al., 2007). Dans certains cas, l'application d'un protocole de rTMS n'a pas d'effet sur la douleur neuropathique (Yilmaz et al., 2014), et à 10 Hz, il ne fait pas varier la douleur globale après traitement, mais réduit les douleurs les plus fortes une semaine post-rTMS (Kang et al., 2009). Plus récemment, il a été montré que l'application d'un protocole de rTMS durant dix jours à 10 Hz au-dessus du cortex prémoteur et du cortex préfrontal dorsolatéral au lieu du cortex moteur M1, à l'image de ce qui est décrit précédemment, induit une réduction significative des symptômes de douleur par rapport à avant le traitement (Nardone et al., 2017). Ces résultats suggèrent que la rTMS peut avoir des effets bénéfiques sur les douleurs neuropathiques chroniques après trauma spinal, mais que son mode d'utilisation doit être affiné afin d'avoir un effet optimal.

En ce qui concerne l'utilisation de la rTMS pour induire une récupération fonctionnelle des capacités motrices perdues après trauma spinal, plusieurs études ont été menées. Il a été montré qu'un traitement par rTMS délivré au-dessus du cortex moteur M1 et consistant en des doubles stimulations délivrées à 10 Hz, avec une inter-stimulation de 10 s (une heure par jour pendant cinq jours), induit une réduction de l'inhibition corticale et est associée à une amélioration du score moteur ASIA (défini par l'American Spinal Cord Association) chez des patients avec trauma spinal incomplet en C5. Ces résultats

reflètent une amélioration fonctionnelle motrice (Belci et al., 2004). De plus, la stimulation par rTMS à 20-25 Hz bilatérale du cortex moteur M1 de façon chronique durant trois à cinq sessions par mois et durant environ cinq mois induit à la fois une réduction de la spasticité des muscles supérieurs, ainsi qu'une augmentation du recrutement des unités motrices des muscles supérieurs et inférieurs (Wincek et al., 2021). De même, une augmentation durable (au moins soixante minutes) de l'excitabilité au niveau corticale est observée chez les patients avec trauma spinal incomplet suite à l'application aigue d'un protocole de rTMS à 10 Hz, délivrée au niveau du cortex moteur M1. Ce traitement n'induit cependant pas de variation de l'excitabilité spinale, ni de réduction de la spasticité (Mendonça et al., 2021). Le traitement par rTMS à haute fréquence semble donc prometteur pour l'induction de la récupération fonctionnelle motrice chez les patients blessés médullaires, mais reste cependant à affiner pour améliorer ses effets bénéfiques.

À ce jour, aucune étude chez l'Homme n'a tenté d'utiliser la rTMS pour induire de récupération fonctionnelle diaphragmatique ou cardiovasculaire suite à un trauma spinal cervical, bien que les résultats positifs obtenus chez l'Homme et les modèles précliniques dans d'autres pathologies ou chez des sujets sains. En particulier, l'administration aigue d'un protocole de rTMS à 5 Hz chez des Hommes sains induit une réduction du temps inspiratoire, du volume courant et de la ventilation, corrélée à une augmentation du dioxyde de carbone expiré en fin d'expiration. Un protocole aigu de rTMS inhibiteur n'induit quant à lui qu'une augmentation du temps inspiratoire (Nierat et al., 2015). Pour l'effet cardiovasculaire de la rTMS, un protocole de rTMS à basse fréquence (0,7 Hz) induit chez des sujets volontaires sains, une activation du système parasympathique accompagné d'une bradycardie transitoire, mais reste sans effet sur le système sympathique (Gulli et al., 2013).

Les études réalisées chez l'Homme ont donc montré que malgré les effets généralement bénéfiques de la rTMS, des variabilités inter-individuelles existent en réponse à un protocole de rTMS spécifique, certains patients présentant des effets inhibiteurs pour des protocoles sensés induire des effets pro-LTP, et inversement (Ridding and Rothwell, 2007; Hamada et al., 2013). L'analyse poussée des effets de la rTMS au niveau cellulaire et moléculaire doit donc être développée, raison pour laquelle un certain nombre d'études ont été réalisées chez les modèles précliniques (Tang et al., 2017).

2.3.2.2. Evaluation des effets de la rTMS chez les modèles précliniques

Les effets des traitements par rTMS ont de même été étudiés dans plusieurs types de modèles précliniques pour diverses pathologies, en particulier chez le rat, afin de tenter de comprendre les mécanismes de fonctionnement des effets induits par rTMS (Tang et al., 2017). Etant utilisés dans le

cadre des traumatismes de la moelle épinière chez l'Homme, ses effets ont donc été évalués chez des modèles précliniques de trauma spinal.

En ce qui concerne la spasticité, un groupe chinois a étudié l'effet d'un traitement par rTMS à 10 Hz chez le rat, cinq jours par semaines pendant quatre semaines. Ils ont pu observer une réduction de l'expression des récepteurs GABA_A et GABA_B, ainsi que du canal cotransporteur 2 du chlore et au potassium (KCC2) dans le cerveau et la moelle épinière après trauma spinal (Gao et al., 2015; Gao et al., 2017), ce qui est cohérent avec les résultats d'études précédemment menées (Kakinohana et al., 2006; Boulenguez et al., 2010). Le traitement chronique par rTMS à 10 Hz a induit une amélioration du BBB score chez leurs animaux et accompagné d'une réduction de la spasticité, ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs GABA_A et GABA_B dans le cerveau et la moelle épinière (Gao et al., 2015), ainsi qu'une augmentation de l'expression du canal KCC2 (Gao et al., 2017). Ces résultats semblent donc montrer que la rTMS délivrée à haute fréquence permet de moduler l'expression de molécules impliquées dans le phénomène de spasticité afin d'en réduire les effets.

D'autres études se sont plutôt penchées sur les effets de la rTMS sur la récupération fonctionnelle locomotrice et la réhabilitation, parfois couplées à d'autres thérapeutiques (Chalfouh et al., 2020; Delarue et al., 2021). Un traitement par rTMS à 20 Hz dix minutes après contusion en T9 chez le rat induit une amélioration du BBB score dans les semaines suivantes par rapport aux animaux non traités, ainsi qu'une augmentation de l'amplitude des PEM des pattes avant (Krishnan et al., 2019). De même, l'application d'un protocole de TBS intermittente chronique, soit cinq jours par semaines pendant deux semaines, en débutant cinq semaines après compression en T10 chez le rat a montré une modulation de plusieurs paramètres moteurs. En effet, une amélioration du BBB score pour des compressions légères et modérées, mais pas sévères, est observée, et accompagnée d'une augmentation de l'expression de GAP-43. Ces résultats semblent donc indiquer que l'expression de GAP-43 pourrait supporter la récupération fonctionnelle locomotrice observée (Marufa et al., 2021).

Diverses thérapeutiques ont aussi été associées à la rTMS. Ainsi, après hémisection dorsale en T8 chez la souris, l'administration séquentielle d'un anticorps neutralisant dirigé contre la molécule répulsive de guidance axonale a (quatorze jours) et d'un traitement par rTMS à 20 Hz (quarante-deux jours), induit une amélioration locomotrice par rapport à l'administration de l'anticorps seul, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la kinase II dépendante du Ca²⁺ et de la calmoduline (Nakanishi et al., 2019). De même, l'administration d'un protocole de rTMS à 0,5 Hz ou 10 Hz combiné avec une transplantation de cellules souches mésenchymateuses issues d'un cordon ombilical humain après contusion en T10 chez le rat induit une amélioration du BBB score par rapport aux autres groupes d'animaux, ainsi qu'une augmentation de l'amplitude des PEM et une réduction de l'apoptose neuronale (Guo et al., 2020). L'association d'un traitement par rTMS à 10 Hz avec un entraînement sur pédalier (entraînement passif, durant huit semaines) permet d'observer une augmentation

significative du BBB score par rapport aux traitements administrés séparément, qui eux-mêmes ont déjà des effets bénéfiques par rapport aux animaux non traités (Wang et al., 2021).

Le devenir de populations de cellules gliales après traitement par rTMS à haute fréquence a aussi été étudié, en particulier dans un modèle de trauma spinal de compression en T9 chez le rat. Ainsi, l'administration d'un protocole de rTMS à 25 Hz pendant huit semaines provoque une réduction de la surface occupée par les molécules GFAP et Iba1 (pour « ionized calcium-binding adapter molecule 1 ») au niveau des cornes ventrale et dorsale de la moelle épinière L4/5. GFAP et Iba1 sont exprimées par les astrocytes et les cellules microgliales respectivement, qui deviennent réactives et prolifèrent en cas d'inflammation. Ces résultats indiquent donc que le traitement chronique par rTMS induit une réduction de l'inflammation dans la moelle épinière après trauma spinal. Les auteurs associent cette observation à une potentielle réduction de la douleur neuropathique qui survient après trauma spinal, l'activation des cellules neurales dans la corne dorsale étant apparemment impliquée dans ces douleurs (Kim et al., 2013).

Une alternative à la stimulation magnétique du cortex est la stimulation magnétique trans-spinele répétée (rTSMS), en particulier appliquée au-dessus du site lésionnel. Après contusion en T13 chez la souris, un protocole de rTSMS à 15 Hz est appliqué trois semaines post-lésion (stade chronique), pour une durée totale de quatre semaines étalées sur neuf semaines. Ce protocole permet une augmentation du BBB score chez les animaux traités par rapport aux animaux non traités (Leydeker et al., 2013). Une étude similaire mais plus récente a appliqué un protocole de rTSMS à 10 Hz, durant dix minutes par jour et pendant deux semaines chez des souris après transection en T9/10 ou transection du funicule dorsal. Les résultats présentés montrent que ce protocole de rTSMS induit une amélioration de la fonction locomotrice. Une analyse protéomique poussée leur a permis de mettre en évidence qu'environ 160 molécules sont modulées par le traitement rTSMS, et plus particulièrement, que les molécules impliquées dans l'apoptose et la mort neuronale voyaient leur expression diminuer, alors que les molécules impliquées dans le développement neuronal, la genèse axonale, la prolifération neuronale ou encore la croissance axonale, voyaient leur expression augmenter, et que ces observations sont accompagnées d'une réduction de la démyélinisation axonale (Chalfouh et al., 2020). L'utilisation d'un protocole de rTSMS, mais délivré à basse fréquence de façon continue durant 35 minutes après contusion en T10 chez le rat montre que le traitement seul ne permet aucune récupération fonctionnelle motrice durable, ni amélioration de la transmission synaptique neuromusculaire. Cependant, l'administration de ce traitement combiné à des protocoles d'exercice, ou à l'administration de neurotrophine 3 (via adeno-associated virus) permet d'obtenir une amélioration de la fonction locomotrice, ainsi que de la transmission neuromusculaire (Petrosyan et al., 2015). Des études comparant l'effet de la rTMS et de la rTSMS seraient intéressantes afin de

déterminer si l'une des approches est plus bénéfique que l'autre pour la récupération fonctionnelle après trauma spinal.

2.3.2.3. Processus physiologiques et moléculaires impliqués

La rTMS utilisée comme thérapeutique provoque divers effets selon la fréquence et la puissance de stimulation, ou encore le pattern de stimulation utilisé. Les effets qui en découlent sont ensuite plus ou moins quantifiables par divers techniques tel que l'enregistrement des PEM musculaires et autres techniques de biologie moléculaire et cellulaire. Pour améliorer la compréhension des mécanismes physiologiques, moléculaires et cellulaires responsables de la modulation d'excitabilité et des phénomènes plastiques observés post-rTMS, des études réalisées chez des modèles animaux sains sont donc nécessaires. Les approches les plus utilisées lors d'applications de protocoles de rTMS sont des stimulations à 1 Hz et 10 Hz, délivrées avec une puissance égale au seuil d'induction de la réponse motrice du muscle enregistré (Turi et al., 2021).

Un intérêt particulier a été porté sur la capacité des protocoles de rTMS à modifier l'excitabilité du système et d'induire des phénomènes plastiques, en particulier au niveau de la neurotransmission glutamatergique et GABAergique (Lenz and Vlachos, 2016). En ce qui concerne la neurotransmission glutamatergique, l'étude de la modulation des synapses excitatrices au niveau des neurones matures du cortex CA1 par rTMS à 10 Hz *in vitro* a montré que ce protocole induit une augmentation de la force des synapses glutamatergiques. Celle-ci est accompagnée d'un remodelage des épines dendritiques de ces neurones, ainsi que d'une augmentation du nombre de récepteurs AMPA contenant la sous unité GluA1 au niveau post-synaptique. Ce remodelage serait médié par l'activation des canaux sodiques voltages dépendants, des canaux calciques de type L voltages dépendants et des récepteurs NMDA (Vlachos et al., 2012; Lenz et al., 2015). Le même groupe a montré dans ce même modèle que ce protocole induisait une réduction de la force synaptique des synapses GABAergiques qui serait calcium dépendante et impliquerait de même un remodelage en post-synaptique avec une réduction de l'expression des protéines d'échafaudage gephyrines (Lenz et al., 2016). Plus particulièrement pour ce qui concerne la neurotransmission GABAergique, l'application de protocoles de TBS continus ou intermittents a un effet différentiel sur les systèmes corticaux inhibiteurs chez le rat *in vivo*. La TBS intermittente permet une augmentation de l'amplitude des réponses évoquées sensorielles, associée à une réduction de l'expression de la parvalbumine dans les interneurons l'exprimant, signifiant que l'activité de ces interneurons GABAergiques a été modifiée par le protocole de TBS intermittente (Benali et al., 2011). Elle induit de plus une réduction du nombre d'interneurones exprimant la parvalbumine et la GAD67 qui est impliquée dans la synthèse du GABA (Labeledi et al., 2014). La TBS intermittente administrée de façon aiguë provoque, en plus de réduire le nombre d'interneurones

exprimant la parvalbumine, une augmentation de l'expression du neuropeptide Y dans le cortex. Ce peptide serait impliqué dans la réduction de la transmission glutamatergique, ce qui a été confirmé par l'observation de la réduction de l'expression du vGluT1 (transporteur au glutamate) en présynaptique dans les neurones corticaux. Cette dichotomie peut s'expliquer par une prévention du système contre une modification de la balance excitation/inhibition, mais permettant tout de même une forme de plasticité (Jazmati et al., 2018). La TBS continue quant à elle induit aussi une augmentation de l'amplitude des réponses évoquées sensorielles, mais plus tardive, associée à une réduction de l'expression de calbindine-D-28k dans les interneurons l'exprimant. Les effets LTP-like associées aux protocoles de TBS modulerait donc des systèmes corticaux inhibiteurs (Benali et al., 2011). Ces protocoles, ainsi qu'un protocole de rTMS à 1 Hz, permettent une modulation de l'expression d'autres molécules exprimées dans les interneurons inhibiteurs corticaux, soit de la GAD65, la GAD67 et la GAT-1. Ces résultats vont donc dans le sens d'un remodelage des synapses GABAergiques inhibitrices après traitement par TBS intermittente ou continue, ainsi qu'après rTMS à basse fréquence (Trippe et al., 2009). D'autres études ont été réalisées chez le rat avec l'application d'un protocole de rTMS à 0,5 Hz. L'une a montré une modification de la structure des synapses via l'augmentation de l'expression de la synaptophysine et de la kinase II dépendante du Ca^{2+} en réponse à ce protocole, ce qui va dans le sens d'une augmentation de la force synaptique (Li et al., 2019). Une autre a montré que suite à ce protocole administré de façon chronique pendant quatorze jours, une augmentation de la quantité de glutamate et de GABA était observée dans l'hippocampe et le striatum, mais que cette quantité était réduite dans l'hypothalamus, montrant le rôle de ces acides aminés dans l'effet observé après traitement par rTMS (Yue et al., 2009).

Les traitements par rTMS induisent aussi des effets observables à l'échelle cellulaire. Ainsi au niveau neuronal, les effets bénéfiques de la rTMS à haute fréquence passeraient aussi par une neurogenèse dans le gyrus denté, celle-ci pouvant être observée par un nombre augmenté de cellules marquées au BrdU après un protocole de rTMS à 25 Hz par rapport aux rats non traités. Les auteurs suggèrent que ce processus pourrait être responsable de l'effet anti-dépresseur de la rTMS (Ueyama et al., 2011). Au niveau glial, ce même traitement conduit à une augmentation du niveau d'ARN messager de GFAP, indiquant que la rTMS pourrait moduler l'activité astrogliale (Fujiki and Steward, 1997). Une étude plus récente utilisant un protocole de rTMS à 100 Hz durant trois jours chez le rat, n'a observé aucun impact sur les cellules astrogliale et microgliales. Une augmentation de l'expression du marqueur d'activité cellulaire c-Fos a en revanche été observé (Zorzo et al., 2019). Ces différents résultats obtenus sous différents protocoles suggèrent qu'une attention particulière doit être portée sur le choix des protocoles utilisés. Une autre étude a montré que l'application d'un protocole de TBS intermittente chez la souris augmente la survie cellulaire et la myélinisation par les oligodendrocytes,

suggérant que ce traitement peut aider à la remyélinisation des axones dans certaines pathologies telle que la sclérose latérale amyotrophique (Cullen et al., 2019).

D'un point de vue plus moléculaire, l'application de protocoles aigus de rTMS à haute ou à basse fréquence chez le rat résulte en une augmentation de l'expression neuronale de c-Fos et de Zif268 qui sont respectivement des marqueurs de l'activité cellulaire et des processus de formation de la mémoire (Aydin-Abidin et al., 2008). De plus, l'application d'un protocole de cinq jours de rTMS à 5 Hz provoque une augmentation de la phosphorylation du récepteur TrkB, et de l'affinité entre le BDNF et TrkB associées à une activité renforcée de ERK2 et PI-3K qui font partie de la voie de signalisation en aval de l'activation de TrkB, dans les neurones du cortex préfrontal (Wang et al., 2011). L'administration d'un protocole de rTMS à 5 Hz durant quatorze jours chez le rat induit une augmentation de l'expression du BDNF, de la synaptophysine présynaptique et de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA. Ces observations sont associées à une amélioration des performances lors d'un apprentissage spatial (Shang et al., 2016). Ces résultats sont donc en accord avec l'augmentation d'excitabilité du système associée à un effet LTP-like observé pour ce type de protocole. De plus, un protocole aigu de rTMS à 15 Hz chez la souris mène à une augmentation transitoire de l'expression de CDK5 et une réduction transitoire de l'expression de PSD-95 dans le cortex frontal, ces molécules étant impliquées dans la modulation de la plasticité synaptique. Les auteurs ont de plus noté que ces observations étaient associées à une modulation de l'acétylation des histones présentes au niveau du promoteur des gènes codants pour ces deux molécules. Ces résultats mettent donc en évidence un potentiel effet épigénétique de la rTMS (Etiévant et al., 2015).

Les protocoles de rTMS et TBS associés ont donc pour effet d'impacter de façon différentielle la plasticité synaptique au travers de la modulation des systèmes excitateurs glutamatergique et inhibiteurs GABAergiques principalement. Ces modifications passent donc nécessairement par une modification de l'expression de molécules associées aux phénomènes de plasticité. Aucune étude n'a cependant étudié le potentiel effet bénéfique d'un protocole de rTMS à haute fréquence sur la récupération fonctionnelle respiratoire, le potentiel remodelage des voies synaptiques épargnées et la plasticité synaptique après trauma spinal cervical incomplet.

2.4. Le 2-Déoxy-D-Glucose

2.4.1. Voies impliquées

Initialement, il a été montré que le 2-Déoxy-D-Glucose (2-DG) est un analogue du glucose ayant pour caractéristique d'inhiber la glycolyse de façon compétitive, dans les tissus sains, ainsi que dans les tissus cancérigène (Woodward and Hudson, 1954). En effet, le 2-DG est moléculairement identique au glucose, hormis pour le groupement hydroxyle en position 2 qui est remplacé par un hydrogène dans le 2-DG. Le 2-DG entre ainsi en compétition avec le glucose pour l'entrée dans la cellule par les transporteurs GLUTs, ainsi que dans la réaction catalysée par l'hexokinase (HK). Le 2-DG est alors métabolisé en 2-DG-6-phosphate. Le 2-DG-6-phosphate ne pouvant être converti en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase (PGI), celui-ci va alors s'accumuler dans la cellule où il va inhiber partiellement l'activité de l'HK et de la PGI (Wick et al., 1957). De plus, l'inhibition de la PGI va induire l'orientation du glucose-6-phosphate vers la voie des pentoses phosphate, ce qui induit une augmentation de la production de glutathione, un antioxydant (Rho et al., 2019) (Figure 35).

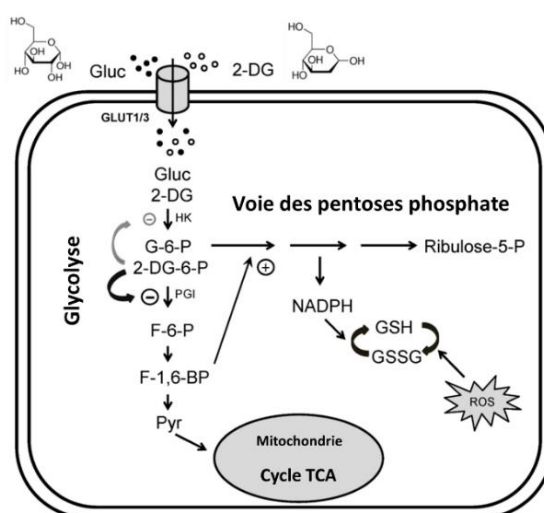


Figure 35 : Réduction de la glycolyse par le 2-Déoxy-D-Glucose (2-DG)

Le 2-DG réduit le flux glycolytique, ce qui réduit la production cellulaire en énergie. En effet, la production de pyruvate, produit final de la glycolyse, est réduite. Son entrée dans la mitochondrie sera donc moindre, induisant une réduction de la production d'ATP par le cycle de Krebs (cycle de l'acide tricarboxylique, TCA). La déviation du glucose-6-phosphate (G-6-P) vers la voie des pentoses phosphates induit une augmentation de la production de glutathione permet cependant d'atténuer les dommages cellulaires dus aux espèces dérivées de l'oxygène (ROS). Adapté de Rho et al., 2019.

Le 2-DG peut entrer dans différents types de cellules, dont les neurones et les cellules gliales, ce qui peut donc altérer leur glycolyse.

La réduction de la glycolyse résultant de l'administration du 2-DG induit inévitablement des réponses cellulaires. Elle induit ainsi une augmentation de l'activité de l'AMP-activated Protein Kinase (AMPK) (Rubin et al., 2005). En effet, l'AMPK est un senseur métabolique qui est normalement activé

en cas de déplétion en énergie dans la cellule (augmentation du rapport AMP/ATP ou du rapport ADP/ATP qui est détecté par l'AMPK et conduit à son activation), ce qui est corrélé ici à la réduction de la production d'ATP induite par la réduction de la glycolyse. Une fois activée par phosphorylation (via la molécule « liver kinase B1 » (LKB1)), l'AMPK est capable de phosphoryler des facteurs de transcription. Cela induit leur translocation au noyau, ce qui permet l'expression de gènes codant pour, entre autres, des protéines du métabolisme et des protéines antioxydantes afin de retrouver une homéostasie énergétique cellulaire (Hardie et al., 2016). L'activation de l'AMPK provoquée par le stress métabolique dû au 2-DG, induit par la suite l'inhibition de mTOR, une molécule connue pour coordonner entre autres les processus de croissance, de prolifération et de survie cellulaire (Sabatini, 2017). Le 2-DG active de plus l'AMPK via une seconde voie. En effet, le 2-DG interfère avec le processus de N-glycosylation, induisant au mauvaise conformation des protéines (réponse UPR, pour « unfolded protein response ») et donc un stress du réticulum endoplasmique (Kurtoglu et al., 2007), ce qui va provoquer une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Or, une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire conduit à la formation du complexe Ca²⁺/calmoduline qui permet l'activation de la CaMK. La CaMK va phosphoryler l'AMPK, ce qui de fait, la rend active (Xi et al., 2013; Xi et al., 2014). Par ailleurs, la modulation de l'activité de l'AMPK par le 2-DG sur des coupes d'hippocampe de souris permet de moduler les processus de LTP, suggérant que la modulation du métabolisme énergétique par administration de 2-DG pourrait entre autres avoir un impact sur les processus de mémoire (Potter et al., 2010).

Diverses études ont aussi mis en évidence une production d'espèces dérivées de l'oxygène (ROS) (Lin et al., 2003; Coleman et al., 2008; Simons et al., 2009). Celle-ci serait due à un blocage de la voie des pentoses phosphates par le 2-DG, ce qui induirait une réduction de la production de glutathione. Or, comme dit précédemment, l'administration de 2-DG peut aussi permettre la synthèse de glutathione. Cette différence de résultat viendrait de la dose de 2-DG utilisée. Une dose modérée permettrait la formation de glucose-6-phosphate qui serait orienter vers la voie des pentoses phosphate, alors qu'une forte dose de 2-DG inhiberait totalement l'activité de l'hexokinase, et donc la formation du glucose-6-phosphate. Sans glucose-6-phosphate, la glutathione ne peut être formée, et les ROS ne sont plus réduites (Xi et al., 2014).

2.4.2. Utilisation du 2-DG dans les modèles cellulaires et précliniques

Le 2-DG a été utilisé dans différents modèles cellulaires et précliniques afin de comprendre et d'évaluer ses effets bénéfiques ou néfastes, en vue d'application thérapeutiques future et actuelles, en particulier pour le traitement du cancer et de l'épilepsie (Stafstrom et al., 2008; Farooque et al., 2009; Xi et al., 2014; Zhang et al., 2014; Rho et al., 2019).

Les cellules cancéreuses diffèrent des cellules saines en raison de changements moléculaires, menant ces cellules à être entre autres auto-suffisantes en signaux de croissance et à devenir insensibles aux signaux d'arrêt de croissance (Hanahan and Weinberg, 2000). Cette croissance cellulaire excessive repose en partie sur une activité glycolytique importante, qui serait de plus corrélée à une résistance des cellules cancéreuses aux thérapies anti-cancéreuses (Kroemer and Pouyssegur, 2008). La réduction de l'activité glycolytique présente donc un intérêt majeur à la fois pour la réduction de la croissance des cellules cancéreuses, mais aussi pour une amélioration de l'efficacité des traitements anticancéreux. D'une part, l'administration de 2-DG permet de réduire l'activité glycolytique, et donc de réduire l'apport en énergie nécessaire à la croissance des cellules cancéreuses, ralentissant considérablement leur croissance. D'autre part, les traitements anticancéreux, lorsqu'administrés à haute dose, sont à la fois toxiques pour les cellules cancéreuses, mais aussi pour les cellules saines, raison pour laquelle le 2-DG a été considéré comme un bon adjuvant pour ces traitements anticancéreux. En effet, l'application de 2-DG induit une réduction des dommages causés par les radiations et la chimiothérapie chez des leucocytes humains (Kalia et al., 1982), et induit l'arrêt de l'apoptose et du cycle cellulaire, ainsi qu'une inhibition de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses HCT116 (Zhang et al., 2016). Il a aussi été montré que la combinaison du 2-DG avec la polydatine, une molécule aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, augmente l'activité anti-cancéreuse du 2-DG chez des cellules cancéreuses du sein MCF-7 et 4T1 (Zhang et al., 2019). De plus, L'administration de 2-DG augmente les dégâts induits aux cellules cancéreuses après traitement par radio ou chimiothérapie, tout en laissant les cellules saines intactes *in vitro* (Kalia et al., 1982; Farooque et al., 2009). *In vivo*, l'administration de 2-DG à 1 g/kg chez des souris saines juste avant une irradiation aux rayons gamma réduit la mortalité et les aberrations chromosomiques (Jain et al., 1979) ainsi que les dommages cytogénétiques (Singh et al., 1990). Chez des souris chez lesquelles une tumeur a été induite, l'administration de 2-DG à 100 mg/kg induit une régression de la tumeur, sans impact sur les organes tels que le cœur, le foie et le rein (Zhang et al., 2019). Ces données mettent donc en évidence le potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies cancéreuses.

L'administration de 2-DG dans le traitement de l'épilepsie est aussi répandue. L'épilepsie est en effet caractérisée par l'apparition récurrente de crises non provoquées. Celles-ci sont dues à une dérégulation de la balance excitation/inhibition dans un réseau neuronal, qui va alors fonctionner de manière synchronisée et excessive, ce qui va perturber des autres réseaux neuronaux initialement non touchés (Thijs et al., 2019). Des méthodes d'imagerie ont permis de démontrer que le métabolisme glycolytique est augmenté avant et pendant les crises épileptiques (Pfund et al., 2000), raison pour laquelle un intérêt a été porté à l'effet du 2-DG dans cette pathologie (Stafstrom et al., 2009). Ainsi, chez modèles précliniques, l'administration de 2-DG (50-200 mg/kg pour les rats et 125-250 mg/kg

pour les souris) a un effet aigu anticonvulsif et un effet chronique antiépileptique (Stafstrom et al., 2009). De même, l'administration de 2-DG à 250 mg/kg chez un modèle de souris épileptique permet de réduire les épisodes épileptiques, et ce phénomène est accompagné d'une réduction de l'activation astrogliale observée dans ce modèle, ainsi qu'une activation microgliale et une augmentation du taux de glucose cérébral en raison du stress métabolique (Leiter et al., 2019). Son effet antiépileptique passerait entre autres par la voie netrin-G1-KATP, les canaux potassiques KATP étant un lien entre le métabolisme cellulaire et l'activité électrique de la cellule. Ceux-ci sont de plus connus pour avoir un rôle anti-crisés épileptiques, et l'administration de 2-DG chez la souris induit une augmentation de l'ARNm de ses sous unités au niveau de l'hippocampe (Long et al., 2019). Ainsi, d'après les données obtenues dans les différents modèles précliniques, le 2-DG permettrait de réduire les crises épileptiques en jouant à la fois directement sur la réduction de la glycolyse nécessaire à l'activité neuronale, mais aussi sur l'expression de molécules impliquées dans la régulation de l'activité électrique des neurones en réponse à un stress métabolique. A ce jour, aucune étude clinique n'a encore, semble-t-il, tenté d'administrer du 2-DG dans le cadre de l'épilepsie.

L'effet du 2-DG a aussi été évalué dans d'autres pathologies telle que la maladie d'Alzheimer. En effet, une étude chez un modèle de souris Alzheimer a observé une augmentation de l'expression de marqueurs cétogéniques. La voie cétogénique est un système compensatoire pour fournir de l'énergie pour le métabolisme cellulaire. Cependant, les auteurs ont observé une diminution de l'expression de ces marqueurs avec l'avancée de la maladie. Le 2-DG réduisant la glycolyse, il permet l'activation d'autres voies métaboliques, dont la voie cétogénique. Ainsi, l'administration d'un régime alimentaire contenant 0,04% de 2-DG pendant sept semaines chez ces souris induit une augmentation du taux de cétones sérique, accompagnée d'une réduction de l'expression de la protéine précurseur amyloïde et de la β -amyloïde, et d'une augmentation de l'expression de BDNF et NGF. Le traitement au 2-DG a donc permis de réduire les effets pathologiques de la maladie (Yao et al., 2011).

Le 2-DG a aussi montré des effets bénéfiques dans le cadre d'infections virales, soit entre autres pour ses propriétés anti-fusogéniques *in vitro*. En effet, comme précisé précédemment, le 2-DG perturbe les processus de N-glycosylation et induit donc une mauvaise conformation des protéines lors de leur formation. Or, les virus à enveloppe fusionnent avec la membrane de la cellule pour entrer dans celle-ci. Cette fusion passe par l'interaction de protéines du virus avec des protéines membranaires. L'administration de 2-DG induit donc d'une part, une mauvaise conformation de ces protéines qui interagissent avec les virus, limitant donc leur entrée. D'autre part, la production des protéines du virus par une cellule en présence de 2-DG induit la production de protéines du virus mal conformées. Il en résulte donc une réduction de l'infection virale et de sa transmission pour les virus à enveloppe tels que le virus de l'immunodéficience humaine ou encore le virus de la rage (Parris, 2008; Coomer et al., 2020). De plus, une infection virale pousse la cellule à adopter un métabolisme

glycolytique, ce qui facilite la réplication virale, et la voie des pentoses phosphates est aussi augmentée (Thaker et al., 2019). L'administration de 2-DG limite donc cette réplication virale, comme dans le cas de l'infection d'une lignée de cellules rénal de singe par le virus de l'herpès après traitement au 2-DG (Courtney et al., 1973), ou encore dans le cas d'une infection par le papillomavirus humain chez des cellules HeLa (Maehama et al., 1998).

Le 2-DG pourrait aussi avoir un rôle anti-inflammatoire. A titre d'exemple, un pré-traitement au 2-DG chez une culture primaire de cellules microgliales de souris permet de réduire l'état inflammatoire induit par du sévoflurane (Wang et al., 2014). De la même manière, un état inflammatoire induit par le LPS dans des cellules microgliales est bloqué par le 2-DG, celle-ci nécessitant une activité glycolytique élevée (York et al., 2021).

En ce qui concerne l'utilisation du 2-DG dans le traitement des traumatismes spinaux, une seule étude récente, réalisée un modèle de compression en T10 chez la souris, a injecté du 2-DG à 500 mg/kg en intrapéritonéal toutes les six heures à partir de deux jours pré-lésion spinale. Les auteurs ont observé une réduction de la présence d'ATP en caudal de la lésion, mais pas en rostral, chez les animaux traités par rapport aux non-traités. Cette réduction du niveau d'ATP en caudal est de plus associée à une dégénération axonale en caudal plus rapide. Ces résultats mettent donc en relief le rôle du métabolisme glycolytique dans le processus de dégénérescence axonale en caudal, alors que la dégénérescence axonale rostrale, relativement immédiate, serait plutôt due au stress oxydatif exacerbé après trauma spinal (Ohnishi et al., 2021).

Ces données obtenues chez les modèles cellulaires et précliniques font ainsi du 2-DG un bon candidat pour des applications cliniques dans les diverses pathologies évoquées, hormis pour son administration dans le cadre de traumatismes spinaux, ce qui pourrait être dû à la forte dose utilisée dans cette étude (Ohnishi et al., 2021).

2.4.3. Utilisation du 2-DG en clinique

Le 2-DG est utilisé dans diverses pathologies chez l'Homme, comme présenté dans la partie cellulaire et préclinique précédente (Dwarakanath and Jain, 2009). Un essai réalisé chez l'Homme a étudié la toxicité, et la tolérance au 2-DG et son utilisation en combinaison avec l'administration de radiations cérébrales dans le cadre de tumeurs cérébrales. Des patients opérés pour ces tumeurs se sont vu administrer oralement du 2-DG à 200 mg/kg durant quatre semaines, suivi d'une irradiation du cerveau, puis deux semaines plus tard, d'une radiation sur site tumoral. Les patients testés ont généralement bien toléré le traitement, même si certains ont présenté des nausées et des vomissements. Ces résultats montrent donc la faisabilité de l'utilisation du 2-DG en association avec des protocoles d'irradiation des zones tumorales (Mohanti et al., 1996). Par la suite, une étude a voulu

tester la tolérance avec des doses plus élevées de 2-DG (200–250–300 mg/kg) chez le même type de patients avec glioblastome, trente minutes avant irradiation. Aucune toxicité aiguë ni dommages cérébraux n’ont ainsi été observés chez l’Homme, montrant la sécurité de ce type de traitement, pour des doses allant jusqu’à 300 mg/kg (Raez et al., 2013; Xi et al., 2014; Pajak et al., 2019).

Dans le cadre de la maladie d’Alzheimer, le 2-DG est utilisé sous une forme modifiée, le ¹⁸Fluoro-2-DG détectable avec une technique de tomographie à émission de positron, qui permet d’évaluer le métabolisme énergétique de zones cérébrales. Les données obtenues dans les différentes études permettent de mettre en évidence les zones cérébrales utilisées lors de différentes tâches de mémoire chez ces patients, les zones en question étant en état hypermétabolique pour la consommation de glucose, et donc de Fluoro-2-DG, ce qui rend ces zones détectables (Rimajova et al., 2008; Staffaroni et al., 2017).

Le 2-DG est aussi prédit pour avoir un effet bénéfique dans la lutte contre les infections virales, comme l’ont démontré les études *in vitro* (Parris, 2008), même si les études réalisées chez l’Homme sont rares dans le cas d’infections virales. A titre d’exemple, chez des femmes atteintes d’herpès génital, un traitement au 2-DG durant trois semaines permet de faire disparaître les vésicules dues au virus ainsi que la charge virale par rapport aux patientes traitées avec un placebo (Blough and Giuntoli, 1979). De récentes suggestions ont aussi été faites prônant l’utilisation du 2-DG dans la lutte contre le SARS-CoV-2 pour ses propriétés anti-fusogéniques et d’inhibition de la réplication virale (Verma et al., 2020; Halder and Mehta, 2021).

Les études réalisées chez l’Homme semblent globalement aller dans le sens d’un effet positif du 2-DG sur les pathologies dans lesquelles il est utilisé, même si le nombre de ces études reste limité par rapport à celui traitant des modèles cellulaires et précliniques. De plus, à ce jour, aucune étude n’a été reportée concernant l’utilisation clinique du 2-DG comme traitement dans le cadre des trauma spinaux.

2.4.4. Potentiels effets néfastes du 2-DG

Les études présentées précédemment mettent en avant principalement les effets bénéfiques du 2-DG, et ont même prouvé que le 2-DG n’avait pas d’effet cognitif ou comportementaux chez le rat pour des doses allant jusqu’à 500 mg/kg/jour (Ockuly et al., 2012). D’autres études ont cependant mis en évidence que le 2-DG pouvait avoir des effets négatifs, voir néfastes, tels que des déficits cardiovasculaires ou une augmentation du taux de mortalité.

Ainsi, des rats avec un régime alimentaire contenant 0,4% de 2-DG présentent une durée de vie moins élevée que des rats avec une alimentation normale ou à 0,25% de 2-DG, accompagnée d’une réduction de la prise de poids. De plus, des déficits cardiaques sont observés chez les rats avec une

alimentation enrichie au 2-DG. En effet, une dilatation, une hypertrophie ventriculaire, une thrombose artérielle et une dégénérescence vacuolaire sont observées au niveau du cœur (Minor et al., 2010). Une autre étude a aussi retrouvé une dégénérescence vacuolaire et une hypertrophie cardiaque pour des doses de 250 et 750 mg/kg/jour chez le rat après 45 jours de traitement, ainsi qu'une augmentation du N-terminal peptide cérébral natriurétique et du peptide natriurétique sanguin, ces derniers retournant cependant à des valeurs physiologiques deux semaines après la fin du traitement (Terse et al., 2016). Ces résultats indiquent donc que des doses trop élevées de 2-DG administrées de façon chroniques peuvent mener à des lésions cardiaques. Administrée de façon aiguë, le 2-DG peut avoir des effets toxiques cardiorespiratoires. Chez le rat et la souris, la demi-dose léthale se situe au-delà de 8000 mg/kg. Cependant, une réduction de la pression artérielle et de la fréquence respiratoire peut être observée suite à l'administration de fortes doses (500-1000 mg/kg pour le rat et 2000 mg/kg pour la souris) (Vijayaraghavan et al., 2006).

L'administration de 2-DG peut aussi avoir un impact sur les processus de plasticité synaptique. A titre d'exemple, l'amplification (via un préconditionnement par un protocole aigu d'hypoxie intermittente répétée) de la facilitation phrénique à long terme induite par un protocole d'hypoxie intermittente modérée chez le rat anesthésié, est bloquée par l'administration orale de 2-DG (80 mg/kg/jour durant quatre semaines). Ces données montrent que ce processus de métaplasticité nécessite une augmentation du métabolisme glycolytique contrairement au processus normal de facilitation phrénique à long terme (MacFarlane et al., 2017). Ces données suggèrent que l'administration de 2-DG pourrait potentiellement avoir un impact sur les processus d'apprentissage et de mémoire.

Malgré ses effets potentiellement néfastes, le 2-DG possède des qualités thérapeutiques non négligeables comme présenté précédemment. C'est la raison pour laquelle son administration couplée à d'autres molécules a été testée afin de réduire ses effets négatifs. A titre d'exemple, l'administration de 2-DG durant un régime cétogénique isocalorique chez la souris permet d'augmenter la tolérance de l'organisme au 2-DG, c'est-à-dire d'augmenter la dose administrée sans aggraver les effets néfastes (Voss et al., 2018). Ces résultats ouvrent des perspectives quant à une meilleure utilisation du 2-DG dans son utilisation dans la prise en charge des pathologies.

Malgré ses potentiels effets négatifs, le 2-DG reste une molécule avec un fort potentiel thérapeutique. A ce jour, son effet n'a jamais été évalué dans la récupération fonctionnelle respiratoire suite à un trauma spinal cervical que ce soit chez l'Homme ou chez les modèles précliniques.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'équipe de recherche que j'ai intégrée pour effectuer mon travail doctoral s'intéressait à divers thématiques gravitant autour de la physiopathologie des traumatismes spinaux cervicaux, la neuroinflammation qui en découle, ses effets respiratoires au niveau neuromoteur, ainsi qu'à l'application de thérapeutiques visant à induire une récupération des fonctions perdues ou réduites suite à ce trauma. En particulier, le modèle utilisé est celui d'hémisection spinale latérale en C2, qui induit une paralysie du diaphragme en raison de la déafférentation des motoneurons du côté ipsilatéral à la lésion (Keomani et al., 2014). La respiration étant un acte autonome et obligatoire pour la survie, le système respiratoire sert ici de base pour l'étude des effets fonctionnels dus à la lésion, mais aussi pour l'étude des potentielles thérapeutiques testées, par l'utilisation de divers techniques d'évaluation.

Bien que la physiopathologie des traumatismes spinaux cervicaux soit étudiée dans plusieurs laboratoires dans le monde, il reste de nombreux points à éclaircir aux niveaux inflammatoires et plastiques dans le réseau phrénique afin de comprendre au mieux les événements moléculaires et cellulaires qui prennent place suite à ce type de trauma. En effet, ce n'est que suite à une compréhension optimale de la physiopathologie des traumatismes médullaires que les thérapeutiques réparatrices ne pourront être appliquées de façon ciblées et optimales. Une partie de mon travail doctoral s'intéresse ainsi aux aspects inflammatoires et plastiques qui prennent place dans la moelle épinière suite à une hémisection en C2, que ce soit au niveau de la lésion (C1-C3) ou au niveau des motoneurons phréniques déafférentés (C3-C6), c'est-à-dire à la physiopathologie du modèle, chez le rat et chez la souris.

Au niveau thérapeutique, mon équipe d'accueil a montré la faisabilité de l'utilisation de la stimulation transcrânienne (TMS) dans l'évaluation de l'excitabilité du réseau phrénique par l'enregistrement des potentiels évoqués moteurs (PEM) diaphragmatiques chez le rat sain (Vinit et al., 2014). Par la suite, l'enregistrement des PEM diaphragmatiques chez le rat après hémisection en C2 a permis de mettre en évidence une réorganisation des voies descendantes respiratoires (Vinit et al., 2016). Si la TMS sert de méthode d'évaluation de l'excitabilité des systèmes neuronaux, la TMS répétée (rTMS) sert quant à elle à neuromoduler cette excitabilité. Une autre partie de mon travail doctoral a donc consisté dans un premier temps à tenter de neuromoduler l'excitabilité du système phrénique par rTMS appliquée de façon aiguë, les traitements à haute fréquence induisant une augmentation d'excitabilité, alors que les traitements à basse fréquence induisent une réduction d'excitabilité. Dans un second temps j'ai cherché à appliquer un protocole à haute fréquence de façon chronique chez

notre modèle d'hémisection en C2 afin d'augmenter l'excitabilité du système phrénique. J'ai ainsi évalué ses effets sur la récupération fonctionnelle diaphragmatique (excitabilité et activité), mais aussi sur l'expression de molécules de l'inflammation et de plasticité dans la moelle épinière et le tronc cérébral.

La seconde thérapeutique que j'ai testée consiste à directement cibler les processus de neuroinflammation. En effet, la neuroinflammation qui prend place dans la moelle épinière est d'une part bénéfique pour ce qui concerne le nettoyage de la zone lésée, mais celle-ci induit aussi un grand nombre de processus délétères conduisant à la démyélinisation des axones, à la mort neuronale, ainsi qu'à la mise en place d'un milieu extracellulaire délétère aux processus de plasticité neuronaux (Rowland et al., 2008). Or, ces processus inflammatoires nécessitent une activité accrue de la glycolyse. J'ai donc tenté de réduire cette neuroinflammation par l'utilisation d'un inhibiteur compétitif dose-dépendant de la glycolyse, le 2-Déoxy-D-Glucose, connu pour principalement réduire, voire inhiber, les processus glycolytiques (Xi et al., 2014). J'ai ainsi vérifié les effets de cette thérapeutique sur les activités diaphragmatique et cardiovasculaire, ainsi que sur l'inflammation spinale.

RESULTATS

Liste des publications présentées dans les résultats

Par ordre d'apparition :

- Fayssoil A, Michel-Flutot P, Lofaso F, Carlier R, El Hajjam M, Vinit S, Mansart A. (2021). Analysis of inspiratory and expiratory muscles using ultrasound in rats: A reproducible and non-invasive tool to study respiratory function. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 285 (2021) 103596.

- Michel-Flutot P, Mansart A, Fayssoil A, Vinit S. (2021). Effect of C2 spinal cord injury on respiratory and cardiovascular functions in rats. Soumis à *Frontiers in Physiology*.

- Michel-Flutot P, Zholudeva LV, Randelman ML, Deramaudt TB, Mansart A, Alvarez JC, Lee KZ, Petitjean M, Bonay M, Lane MA, Vinit S. (2021). High frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation promotes long lasting phrenic motoneuron excitability via GABAergic networks. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 292 (2021) 103704.

- Michel-Flutot P, Jesus I, Vanhee V, Bourcier C, Emam L, Ouguerroudj A, Lee KZ, Lane MA, Mansart A, Bonay M, Vinit S. Effects of chronic high frequency rTMS protocol on diaphragmatic function recovery following C2 spinal cord hemisection in rat. En préparation.

- Michel-Flutot P, Jesus I, Mansart A, Bonay M, Lee KZ, Auré K, Vinit S. Evaluation of motor evoked potentials induced by trans-spinal magnetic stimulation following tibial nerve crush in rat. En préparation.

- Michel-Flutot P, Mansart A, Deramaudt BT, Jesus I, Lee KZ, Bonay M, Vinit S. (2021). Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 284 (2021) 103568.

Jesus I, Michel-Flutot P, Deramaudt TB, Paucard A, Vanhee V, Vinit S, Bonay M. (2021). Effects of aerobic exercise training on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury. *Scientific Reports*, (2021) 11:112.

1. Physiopathologie chez le rat après trauma spinal cervical et application de thérapeutiques innovantes
 - 1.1. Evaluation non-invasive de l'activité des muscles respiratoires chez le rat sain

Publication: Analysis of inspiratory and expiratory muscles using ultrasound in rats: A reproducible and non-invasive tool to study respiratory function. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 285 (2021) 103596

Chez les modèles précliniques de rongeurs, l'évaluation et le suivi de l'activité musculaire respiratoire au cours du temps est rendue possible par des techniques généralement invasives. A titre d'exemple, l'implantation d'électrodes de télémétrie au niveau du diaphragme permet d'enregistrer l'activité diaphragmatique chez l'animal éveillé (Terada and Mitchell, 2011). L'implantation de ces électrodes de télémétrie est initialement extrêmement invasive, mais permet néanmoins un suivi des paramètres au cours du temps pour un même animal. L'activité diaphragmatique peut aussi être évaluée de façon unique lors d'expérimentations terminales via l'application d'électrode d'enregistrement sur le diaphragme après laparotomie chez le rat anesthésié (Vinit et al., 2006). Le développement d'outils non-invasifs d'évaluation de la fonction respiratoire dans des modèles précliniques est donc nécessaire pour évaluer l'effet de l'application de potentielles thérapeutiques.

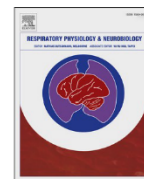
L'échographie est une technique d'imagerie en temps réel non-invasive utilisant les ultrasons pour évaluer entre autres les fonctions d'organes. Son application potentielle chez les rongeurs pour l'évaluation de la fonction respiratoire reste cependant peu répandue.

L'objectif de cette étude a été de valider l'utilisation de cette technique d'échographie chez le rat sain anesthésié en eupnée, pour l'évaluation de l'activité des muscles inspiratoires et expiratoires. Elle nous a aussi permis d'obtenir des valeurs de référence pour les différents muscles et différentes variables enregistrés. Une évaluation des paramètres ventilatoires par pléthysmographie, ainsi qu'une évaluation histologique post-mortem du diaphragme et du *rectus abdominis* ont été utilisées pour aider à la validation de cette technique d'échographie. Cette preuve de principe de l'utilisation de l'échographie dans l'évaluation des muscles respiratoires chez le rat sain nous permettra donc de l'utiliser comme outil d'évaluation de la perte d'activité musculaire respiratoire suite à un trauma spinal cervical.



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol

Analysis of inspiratory and expiratory muscles using ultrasound in rats: A reproducible and non-invasive tool to study respiratory function

Abdallah Fayssol^{a,b}, Pauline Michel-Flutot^a, Frédéric Lofaso^{a,b}, Robert Carlier^{a,c}, Mostafa El Hajjam^d, Stéphane Vinit^a, Arnaud Mansart^{e,*}

^a University of Paris-Saclay, UVSQ, INSERM U1179, END-ICAP, Montigny-le-Bretonneux, France

^b Raymond Poincaré Hospital, APHP, Garches, France

^c APHP, GH Université Paris Saclay, DMU Smart Imaging, Raymond Poincaré Teaching Hospital, Garches, France

^d Radiology Department, Ambroise Paré Hospital, APHP, Boulogne-Billancourt, France

^e University of Paris-Saclay, UVSQ, INSERM U1173, 2I, Montigny-le-Bretonneux, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Ultrasound
Rat
Diaphragm
Rectus abdominis

ABSTRACT

Ultrasound imaging is a non-invasive technique to assess organ function. Its potential application in rodents to evaluate respiratory function remains poorly investigated. We aimed to assess and validate ultrasound technique in rats to analyze inspiratory and expiratory muscles. We measured respiratory parameters to provide normal eupneic values. Histological studies and plethysmography were used to validate the technique and assess the physiological implications. A linear relationship was observed between ultrasound and histological data for diaphragm and rectus abdominis (RA) measurement. The tidal volume was significantly correlated with the right + left RA area ($r = 0.76$, $p < 0.001$), and the rapid shallow breathing index was significantly and inversely correlated with the right + left RA area ($r = -0.53$, $p < 0.05$). In the supine position, the right and left diaphragm expiratory thickness were not associated with tidal volume obtained in the physiological position. Ultrasound imaging is highly accurate and reproducible to assess and follow up diaphragm and RA structure and function in rats.

1. Introduction

Ultrasound imaging is a non-invasive technique to assess organ function, particularly the heart (Coatney, 2001). In animal studies, this technique is used to assess left ventricular systolic function (Fayssol and Tournoux, 2013) but remains uncommon for other organs. Usually, lung and respiratory muscle functions in animals are assessed indirectly by plethysmography (Lim et al., 2014). This technique is often used to evaluate respiratory dysfunction in neuromuscular disorders or after cervical spinal cord injury (Goyenvalle et al., 2015; Wen et al., 2019). Respiratory muscle function analyses in animals also rely on *ex vivo* measurements of isometric force, or *in vivo* electromyography recordings of the diaphragm in anesthetized animals or using telemetry implants in awake animals (Navarrete-Opazo et al., 2015; Vinit et al., 2006). However, these techniques are invasive, cannot provide longitudinal studies, and for the terminal recordings, require sacrifice of the animals. The development of non-invasive tools for evaluating respiratory function in animal models is necessary and will be useful to assess potential

therapeutic applications.

Ultrasound is already used to assess respiratory muscles in humans (Boussuges et al., 2009; Scarlata et al., 2018; Ueki et al., 1995). Among these, the diaphragm is considered the main inspiratory muscle. In preclinical models, several studies have proven the efficacy of ultrasonography to evaluate diaphragmatic function in a canine model of muscular myopathy (Sarwal et al., 2014), diaphragmatic wild-type mice (Zuo et al., 2014), fetal breathing movements in rats (Kobayashi et al., 2001), and a neuromuscular-disordered mouse model of Duchenne dystrophy (Whitehead et al., 2016). However, the expiratory muscles also participate actively in the respiratory behavior, including the rectus abdominis (RA), external obliques (EO), internal obliques (IO), and transversus abdominis (TA) especially for rodents and dogs. Functional activity and efficacy of these respiratory-related muscles can be affected in the case of heavy pathologies such as spinal cord injury (Laghi and Tobin, 2003).

To date, no data have been reported regarding the evaluation of several respiratory-related muscles or even expiratory muscles by

* Corresponding author.

E-mail address: arnaud.mansart@uvsq.fr (A. Mansart).

<https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103596>

Received 24 June 2020; Received in revised form 9 November 2020; Accepted 6 December 2020

Available online 7 December 2020

1569-9048/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ultrasound in a rat model. The present study depicts and evaluates in anesthetized rats using ultrasound technique the physiological values of the diaphragm muscle (thickness, thickening, and inspiratory motion) and RA muscle thickness. Taken together, these data provide a reference for diaphragm and RA ultrasound measurements in eupneic conditions in control rats.

2. Methods

2.1. Animals

All experiments were performed in accordance with French laws concerning animal experimentation (2017111516297308V3) and were approved by our Institutional Animal Care and Use Committee (C2EA-47). Adult male Sprague Dawley rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were acclimated on arrival at a constant temperature (22 °C) and exposed to a 12–12 h light–dark cycle for a minimum of 7 days before any experimentation was performed. They were maintained in a pathogen-free environment with access to food and water *ad libitum* during the experimental procedure.

2.2. Experimental protocol

Initially, 4 control rats (291–300 g body weight) without cardiopulmonary disease were included in this study to validate the ultrasound technique. Different parameters using ultrasound were measured under anesthesia (1.5–2% isoflurane, balanced with 100 % O₂): right and left diaphragm thickness at end expiration and end inspiration in animals on quiet spontaneous ventilation, and right and left RA thickness and area during quiet spontaneous ventilation.

Then, 15 rats (330–599 g body weight) were included to confirm our previous observations and increase statistical power. These additional animals were used to provide basal values for diaphragm thickness,

thickening, and inspiratory motion, as well as values for RA thickness. 13 of these 19 animals were also used for RA area measurements.

Plethysmography, ultrasound recordings, and histological studies were used with this approach for each animal.

2.3. Whole-body plethysmography

Whole-body constant flow (0.5 L/min) plethysmography (EMKA, France) was used to assess global ventilatory function (e.g., tidal volume, minute ventilation, and breathing frequency) in our animals, as previously described (Wen et al., 2019) (Fig. 1D). The system was first calibrated and the rats weighed. After a 30-minute acclimation period in the chambers, the recording began under normoxic conditions (room air). Tidal volume and minute ventilation were reported by body weight (per 100 g) for each animal. Calculation of the rapid shallow breathing index (RSBI: respiratory rate [RR]/tidal volume) was performed. This index reflects the work of breathing and has already been assessed in patients with neuromuscular disorders (Misuri et al., 2000).

2.4. Diaphragm and rectus abdominis ultrasound

Respiratory muscle function was evaluated using a high-resolution ultrasound system (LOGIQ E9; GE, France) and a linear L8-18i probe (GE, France) at high frequency (18 MHz; Fig. 1B,C). All animals were anesthetized by isoflurane (Forene®; Abbott, France) at a concentration of 5% for induction in a chamber (Fig. 1A) at 500 cc/minute in 100 % oxygen. The isoflurane concentration was subsequently reduced to 1.5–2% (balanced with 100 % O₂) for maintenance during handling and ultrasound.

Each animal's anterior thorax and upper abdomen was shaven with depilatory cream before exploration. Then, the animal was placed in the supine position on the imaging platform, and body temperature was continuously monitored using a rectal probe and maintained at 37 ± 0.5

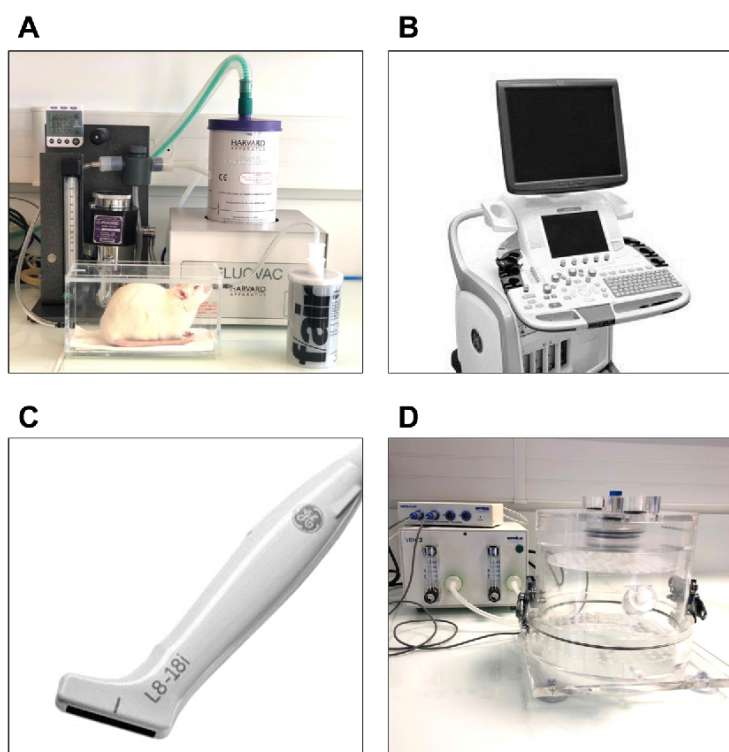


Fig. 1. Overview of the equipment. (A) Anesthetic equipment for induction with inhalation chamber; (B) ultrasound equipment (GE LOGIC E9); (C) linear probe with high frequency (18 MHz); (D) whole-body plethysmograph equipment.

°C. Ultrasound gel was applied to the chest of the rat before diaphragm and RA measurements.

M mode ultrasound was used to assess diaphragm motion from the subcostal view after visualization of the diaphragm (Fig. 2). Diaphragmatic inspiratory motion, inspiratory time, and expiratory time, from the M mode, were recorded (Fig. 2B and C).

2D mode was used to assess diaphragm thickness and thickening from the apposition zone during live breathing. For this setting, the probe was placed perpendicularly to the chest wall at the midaxillary line to visualize the costophrenic sinus. In this apposition zone, a clear visualization of the diaphragm can be recorded, bounded by 2 clear bright lines: the pleural line and the peritoneal line (Fig. 3). The thicknesses of the diaphragm at the end of the expiration and inspiration cycles were also recorded. Thickening fraction (TF) of the diaphragm was calculated using this ratio: $([\text{thickness at end inspiration}] - [\text{thickness at end expiration}]) / [\text{thickness at end expiration}]$ (Matamis et al., 2013).

For the RA analysis, the probe was held vertically on the upper abdomen, just above the umbilicus, then moved over to have the linea alba in the middle. The right and left RA muscles were easily visualized (on each side of the linea alba, surrounded by the muscle sheaths) and the thickness and area were measured (Fig. 3B).

2.5. Histological analysis

The animals were anesthetized with 5% isoflurane and received an

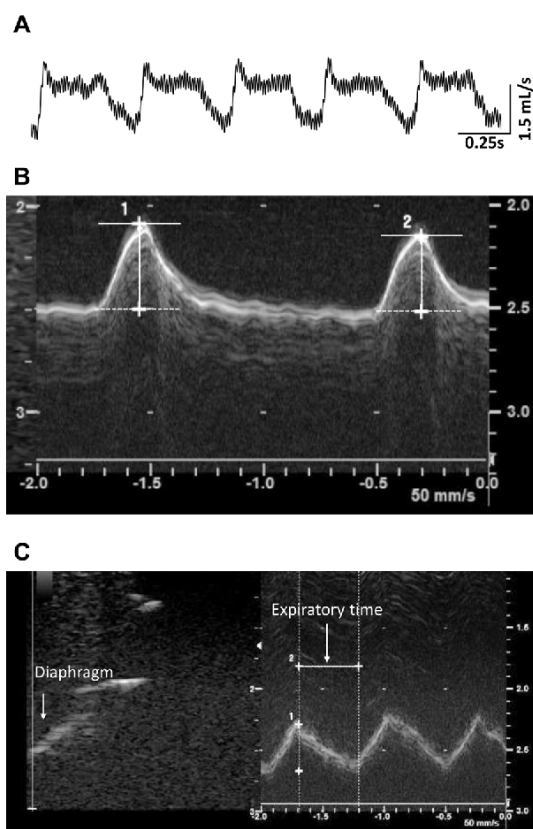


Fig. 2. (A) Representative trace of plethysmography recording in eupnea (B) Representative trace of ultrasound recording showing the movement of the diaphragm during two successive breathing cycles. The measurement of the diaphragm movement amplitude is shown for one respiratory cycle, as the difference (arrow) from the baseline (dashed line) to the peak (continuous line). (C) Diaphragm ultrasound using M mode (left) and 2D mode (right). Expiratory time is measured from the diaphragm M mode trace.

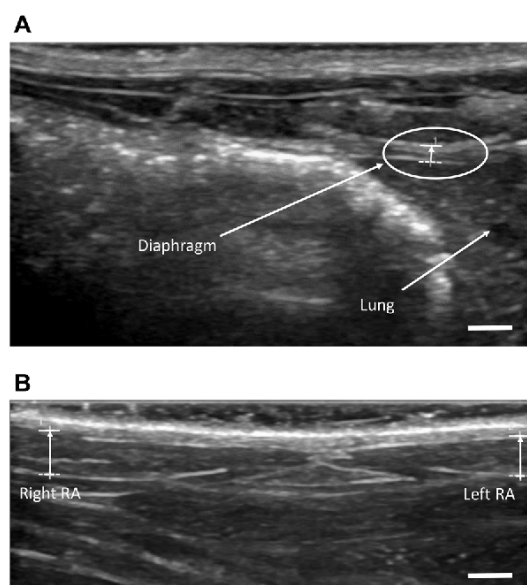


Fig. 3. (A) Measurement of the diaphragm thickness from the right apposition zone using ultrasound. (B) Representative image showing the anatomical structures observed by the ultrasound probe with the right and the left rectus abdominis visualization from a sub xyphoidal view. Scale bars: 2 mm.

intracardiac injection of Exagon (1 mL/kg). The animals were perfused with heparinized saline (0.9 % NaCl) and the diaphragm and RA were dissected out and frozen in isopentane (-45 °C). Transverse frozen sections (7 μm thickness) using a cryostat (Leica) were collected and hematoxylin–eosin stained. Slides were scanned (Leica Scanner, France), and each section was analyzed with ImageJ software (NIH). The thickness and area of the diaphragm and RA were measured. For the diaphragm thickness, 5 different locations were measured and averaged for the same section per animal. For the RA, the thickness was measured at the largest location for each animal.

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SD. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All significant p-values were obtained with a power analysis better than 80 %. Ultrasound imaging was performed by 2 operators with skill in animal ultrasound imaging (Fayssoil and Tournoix, 2013). To test the intra-operator agreement (reproducibility) of ultrasound measurements, one observer performed measurements 5 times within 1 h apart. To test the inter-operator agreement (variability), 2 observers performed the measurements separately. To test the agreement between ultrasound and histological measurements, the method described by Bland and Altman was used (Misuri et al., 1997), including 95 % limits of agreement (LOA). The LOA define the intervals within which we can be 95 % confident that the respective measurements will lie considering their relative variability; hence, the narrowest LOA characterizes the method with the best agreement. In addition, the mean difference between the 2 techniques (bias) was calculated, along with SD. To test intra- and inter-observer agreement, a Bland–Altman plot was used as well. Statistical analysis also involved Spearman's correlation and logistic regression. A Student *t*-test was performed to compare histological and ultrasound values obtained on the same samples. XLSTAT PREMIUM 2016.1.1 (Addinsoft statistical and data analysis solution. Paris, France. <https://www.xlstat.com>) was used for all statistical analyses.

3. Results

3.1. Whole-body plethysmography in unanesthetized rats

14 of the 19 animals were included in this study. Inspiratory time (199 ± 39 ms), expiratory time (396 ± 133 ms), minute ventilation (44.01 ± 10.52 mL/min/100 g), tidal volume (0.39 ± 0.03 mL/100 g) and respiratory rate (113 ± 23 breaths/min) were recorded. The Rapid Shallow Breathing index (RSBI) was also calculated as described in the method section. All results are shown in Table 1.

3.2. Intra-operator reproducibility and inter-operator variability for ultrasound measurements

Inter-operator variability and intra-operator reproducibility are shown in Table 2. These agreements were tested with the 4 first animals. We found a high mean correlation coefficient for all the parameters studied (combinations of area and thickness for the RA or thickness and motion for the diaphragm muscle). Coefficients of variation were between 1.06 (right diaphragm inspiratory motion) and 5.87 % (right diaphragm inspiration thickness) for the operator n°1 versus 1.44 (right rectus abdominis thickness) and 7.66 % (right diaphragm inspiration thickness) for the operator n°2.

3.3. Diaphragm ultrasound

A total of 19 animals were included in this study. Using the high-resolution ultrasound system, the diaphragm end expiratory thickness was 0.74 ± 0.06 mm for the right hemi-diaphragm, similar to the histological finding (0.84 ± 0.03 mm). A linear relationship (r = 0.75, p = 0.02) was observed between ultrasound and histological data. The left hemi-diaphragm thickness at end expiration was 0.78 ± 0.10 mm measured by ultrasound, while with histological analysis, the diaphragm thickness was 0.88 ± 0.05 mm, again with a linear relationship (r = 0.45, p = 0.12) between these 2 different methods of evaluation.

The diaphragm TF was similar for the 2 hemi-diaphragms: 23.54 ± 5.95 % for the right hemi-diaphragm and 23.37 ± 6.17 % for the left hemi-diaphragm. The diaphragm inspiratory motion was also similar for the 2 hemi-diaphragms: 4.04 ± 0.59 mm for the right hemi-diaphragm and 4.28 ± 0.95 mm for the left hemi-diaphragm.

3.4. Rectus abdominis ultrasound

A total of 19 animals were included in the thickness measurement. Using ultrasound, the mean thickness of the RA, during anesthetized quiet poikilocapnic breathing, was 1.55 ± 0.11 mm for the right RA and 1.59 ± 0.12 mm for the left RA. Histological values for mean RA thickness were 2.44 ± 0.30 mm for the right RA and 2.27 ± 0.22 mm for the left RA. A linear relationship between ultrasound data and histological data was observed for both sides (r = 0.7, p = 0.001 for the right RA; r = 0.48, p = 0.001 for the left RA).

Similar findings regarding RA area were observed between the 2

Table 1

Whole body plethysmography in unanesthetized eupneic rats. Inspiratory time (T_I), expiratory time (T_E), minute ventilation (V_M), tidal volume (V_T), RSBI (Rapid Shallow Breathing index), minimum (min) and maximum (max). CV coefficient of variation. Sample size (n) 14.

Parameters	Mean ± SD (min-max)	CV (%)
Weight (g)	386 ± 79 (291–599)	20
T _I (ms)	199 ± 39 (131–298)	20
T _E (ms)	396 ± 133 (256–785)	34
V _M (mL/min)/100 g	44.01 ± 10.52 (26.87–72.67)	8.95
V _T (mL)/100 g	0.39 ± 0.03 (0.32–0.48)	23.90
Respiratory Rate (breaths/min)	113 ± 23 (72–166)	21
RSBI (Respiratory Rate/ V _T)	293 ± 70 (187–425)	24

Table 2

Correlation Coefficient (CC) for reproducibility intra-operator and variability inter-operator. Sample size (n) 4.

combinations	CC (right rectus abdominis area)	CC (right rectus abdominis thickness)	CC (right diaphragm inspiratory thickness)	CC (right diaphragm inspiratory motion)
Variability (inter-operator)	0.93 (p = 0.022)	0.885 (p = 0.046)	0.873 (p = 0.050)	0.962 (p = 0.009)
Reproducibility (intra-operator n°1)	0.916 (p = 0.043)	0.971 (p = 0.014)	0.912 (p = 0.049)	0.971 (p = 0.015)

methods of analyses (ultrasound vs histological values; mean right ultrasound RA area 23.00 ± 1.02 mm² vs 21.90 ± 1.95 mm² with histology [p = 0.35]; mean left ultrasound RA area 22.79 ± 1.00 mm² vs 21.78 ± 0.60 mm² with histology [p = 0.13]). This analysis of RA area was realized on 13 animals.

3.5. Histology of diaphragm and rectus abdominis

Examination of diaphragm and RA muscles stained with hematoxylin-eosin was used to determine size-related parameters in the rats (Fig. 4). The diaphragm thickness was 0.84 ± 0.03 mm for the right side and 0.88 ± 0.5 mm for the left side. For the RA, the muscle thickness was 2.44 ± 0.30 mm for the right side and 2.27 ± 0.22 mm for the left side. The muscle area was 21.90 ± 1.95 mm² for the right side and 21.78 ± 0.65 mm² for the left side.

3.6. Ultrasound and histological agreement and correlation

Using the ultrasound method, the left RA area was 22.80 ± 1.00 mm², while the histology-derived left RA area was 21.78 ± 0.65 mm². For the right RA, the area was 23.00 ± 1.02 mm², and the histology-derived left RA area was 21.90 ± 1.95 mm². Comparison between ultrasound and histological values did not display significant difference. The mean biases (95 % confidence intervals) were 1.02 (-0.79 to 2.82) and 1.1 (-4.42 to 6.62), respectively (Table 3).

3.7. Relationship between rectus abdominis area, tidal volume, and rapid shallow breathing index

The tidal volume was significantly correlated with the right + left RA

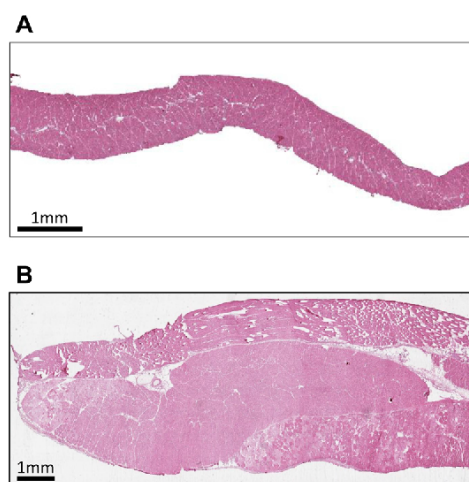


Fig. 4. Representative section of diaphragm (A) and rectus abdominis (B), after transverse sections and hematoxylin-eosin stained.

Table 3
Agreement and correlation between ultrasound and histology measurements. Limits of agreement (LOA).

Analysis	Ultrasound (mm ²)	Histology (mm ²)	Bias	SD of bias	95 % LOA	Estimated sample size
Right rectus abdominis area	23.00 ± 1.02 (22.14–24.04)	21.90 ± 1.95 (19.13–23.73)	1.10	2.82	–4.42 to 6.62	4
Left rectus abdominis area	22.80 ± 1.00 (21.54–23.73)	21.78 ± 0.65 (20.85–22.38)	1.02	0.92	–0.79 to 2.82	4

area ($r = 0.76$, $p < 0.001$) (Fig. 5). The RSBI was also significantly and negatively correlated with the right + left RA area ($r = -0.53$, $p < 0.05$) (Fig. 6).

3.8. Relationship between diaphragm and rapid shallow breathing index

In the supine position, the right and left diaphragm expiratory thicknesses were not associated with tidal volume (respectively $p = 0.89$ and $p = 0.5$). Further, the diaphragm TF was not associated with tidal volume ($p = 0.54$ for the right TF and $p = 0.37$ for the left TF). The RSBI index was inversely but not significantly associated with right + left diaphragm thickness ($r = -0.17$, $p = 0.39$) (Fig. 7).

4. Discussion

This is the first study in rats to report data about diaphragm and RA thickness or area obtained with a non-invasive ultrasound technique, validated by post-mortem histological analyses. In addition, in our rat model, the data support the high reproducibility of this technique for the assessment of diaphragm and RA muscle evaluation.

The echographic findings were validated by the histological findings and previous reports by Farkas about diaphragm thickness (Farkas et al., 1994) and Jeong about rat RA muscle (Jeong et al., 2017). In humans, Wait et al. (Wait et al., 1989) reported in 1989 ultrasound data about diaphragmatic thickness, validated by necropsy studies, with high correlation ($r = 0.93$, $p < 0.001$). This present study found a similar correlation between ultrasound and histological data in rats, using an ultrasound probe with high resolution frequency. The bias found in our study (1 for the left RA and 1.1 for the right RA) may be explained by the histological processing of the tissue before hematoxylin–eosin staining, as the unfixed muscle tissue slices must be dehydrated before staining. On the other hand, the ultrasound probe hold over the muscle could artificially reduce the size of the tissue. Moreover, the animals were alive, so even if we analyzed the size during the muscle relaxation, the muscle would not be fully relaxed. Therefore, the values obtained with the ultrasound technique are close to the histological values and real physiological measures. Our observations underscore the usefulness of ultrasound imaging for the assessment of respiratory muscle in live animals, with the possibility of repeated measures over time.

Ultrasound has previously been used to assess diaphragm function in mice (Zuo et al., 2014), particularly for mdx mice, with significant a correlation between diaphragm inspiratory motion and *ex vivo* specific force values (Whitehead et al., 2016). In this study, no *ex vivo* data were

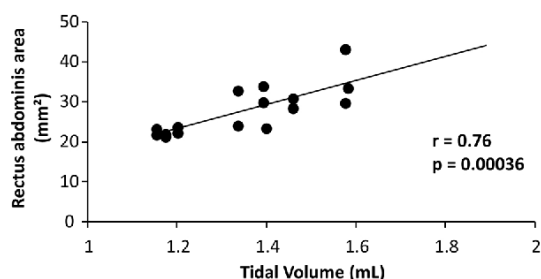


Fig. 5. Relationship between Tidal Volume and rectus abdominis area. Each dot matches with right or left side for each animal (sample size (n) = 8).

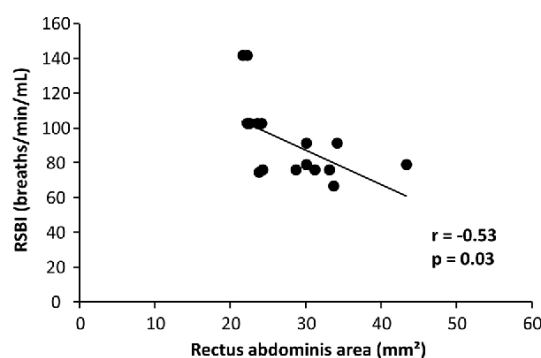


Fig. 6. Relationship between Rapid Shallow Breathing (RSBI) and rectus abdominis area. Each dot matches with right or left side for each animal (sample size (n) = 8).

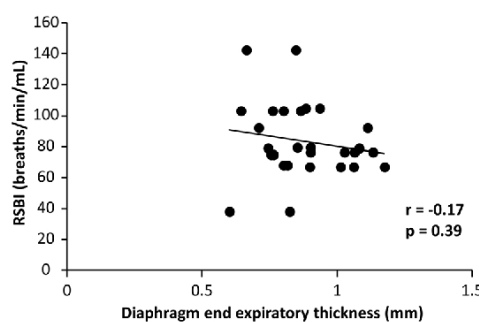


Fig. 7. Relationship between diaphragm end expiratory thickness and rapid shallow breathing (RSBI). Each dot matches with right or left side for each animal (sample size (n) = 14).

reported for the diaphragm or RA. However, significant correlations have been demonstrated between ultrasound measurements in anesthetized animals and plethysmography in conscious animals. Inspiratory time, expiratory time, tidal volume, minute ventilation and respiratory rate values reported in this present study for eupneic quiet breathing in conscious animals were similar to values reported in the literature (Fuller et al., 2008; Lee et al., 2014; Lovett-Barr et al., 2012).

Tidal volume measured in non-anesthetized rats was significantly associated with RA area and thickness. This finding suggests that these muscles are involved during the eupneic respiratory cycle in conscious rats. One explanation may be the anti-gravitational role of these muscles in rats, located in the ventral position, and responsible for maintaining the viscera inside the peritoneal cavity. In humans, during expiratory efforts, expiratory muscles are solicited with a significant increase in thickness, including the RA, TA, and IO (Misuri et al., 1997). The thickness of the TA was particularly related to the gastric pressure developed during expiratory effort. Indeed, the TA muscle is disposed circumferentially in the abdomen, facilitating the increase of gastric pressure during expiratory effort (De Troyer et al., 1989). At residual volume, an increase in thickness has been reported for the RA, IO, and TA in humans (Misuri et al., 1997). In animals, De Troyer et al. (De Troyer et al., 1989) reported data about respiratory muscles, using

electromyograms in conscious dogs during quiet breathing, and confirmed that the TA was the main expiratory muscle involved. In our study, the RA seemed more solicited to maintain tidal volume in the supine ventral position in rats, evidenced by the positive association between the RA area and the tidal volume.

Rats with a high RA area showed a reduced respiratory load, evidenced by the inverse significant relationship between RSBI and RA area. This finding corroborates the fact that these muscles are more solicited in animals during the respiratory cycle. However, we cannot rule out that these muscles may be more solicited during anesthesia, since isoflurane reduces the activity of expiratory muscles.

Inversely, we found a negative relationship between diaphragm inspiratory motion and tidal volume. One explanation may be that these measurements were made in different physiological conditions. Diaphragm ultrasound investigations were performed on isoflurane-anesthetized rats in the supine dorsal position, whereas ventilatory parameters (tidal volume and respiratory frequency) were obtained in fully awake, quiet breathing rats in room air, positioned on their limbs. However, the RSBI seemed to be reduced in rats with an increase of diaphragm thickness, suggesting a relationship between muscle thickness and respiratory loading.

The reference test for the assessment of diaphragm function relies on the measurement of transdiaphragmatic pressure in humans (Polkey, 2019). This technique was not performed in this study. Further, we focused our study on the diaphragm and RA, due to the feasibility to obtain imaging. We did not include the other abdominal muscles: EO, IO, and TA. The TA seems to be the major contributor in generating abdominal expiratory pressure during expiratory effort, but this evaluation remains complicated in control rats using ultrasound during anesthesia. The EO is preferentially involved during trunk rotation, without link with inspiratory or expiratory muscles.

5. Conclusion

Analysis of respiratory function is critical and needs to be explored with relevant parameters close to *in vivo* conditions. In animals, this analysis is limited to *ex vivo* measurements of isometric force, *in vivo* recording by invasive electromyography and telemetry implants, or indirect data from plethysmography. These techniques are often invasive, cannot provide longitudinal studies, and require sacrifice of the animals. The development of non-invasive tools to evaluate the respiratory function in rodent models is necessary and will be useful to assess potential therapeutic applications in humans. Our study provides this tool, proves the feasibility and relevance of ultrasound imaging to study respiratory parameters in rats, and provides a reference for future publications. These results expands on interesting perspectives, especially in animal models of respiratory impairments (such as cervical spinal cord injury or amyotrophic lateral sclerosis) with therapeutics.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

Funding: This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV), the Fondation de France (SV), the Fondation Médisite (SV), INSERM (SV, AM) and Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (SV, AM). The supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or

preparation of the manuscript.

References

- Boussuges, A., Gole, Y., Blanc, P., 2009. Diaphragmatic motion studied by m-mode ultrasonography: methods, reproducibility, and normal values. *Chest* 135, 391–400.
- Coatney, R.W., 2001. Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research. *ILAR J.* 42, 233–247.
- De Troyer, A., Gilmartin, J.J., Ninane, V., 1989. Abdominal muscle use during breathing in unanesthetized dogs. *J. Appl. Physiol.* 66, 20–27.
- Farkas, G.A., Gosselin, L.E., Zhan, W.Z., Schlenker, E.H., Sieck, G.C., 1994. Histochemical and mechanical properties of diaphragm muscle in morbidly obese Zucker rats. *J. Appl. Physiol.* 77, 2250–2259.
- Fayssol, A., Tournoux, F., 2013. Analyzing left ventricular function in mice with Doppler echocardiography. *Heart Fail. Rev.* 18, 511–516.
- 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. *Exp. Neurol.* 211, 97–106.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussenot, R., Ferry, A., Voit, T., Amthor, H., Bühr, C., Schürch, S., Wood, M.J.A., Davies, K.E., Vaillend, C., Leumann, C., Garcia, L., 2015. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21, 270–275.
- Jeong, W.S., Lee, S.S., Park, E.J., Han, J.J., Choi, J.W., Koh, K.S., Oh, T.S., 2017. Comparison of biomechanical and histological outcomes of different suture techniques in rat rectus abdominis muscle repair. *Ann. Plast. Surg.* 78, 78–82.
- Kobayashi, K., Lemke, R.P., Greer, J.J., 2001. Ultrasound measurements of fetal breathing movements in the rat. *J. Appl. Physiol.* (1985) 91, 316–320.
- Laghi, F., Tobin, M.J., 2003. Disorders of the respiratory muscles. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 10–48.
- Lee, K.Z., Huang, Y.J., Tsai, L.L., 2014. Respiratory motor outputs following unilateral midcervical spinal cord injury in the adult rat. *J. Appl. Physiol.* (1985) 116, 395–405.
- Lim, R., Zavou, M.J., Milton, P.-L., Chan, S.T., Tan, J.L., Dickinson, H., Murphy, S.V., Jenkin, G., Wallace, E.M., 2014. Measuring respiratory function in mice using unrestrained whole-body plethysmography. *J. Vis. Exp.* 51755.
- 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. *J. Neurosci.* 32, 3591–3600.
- Matamis, D., Solemezi, E., Tsagourias, M., Akoumianaki, E., Dimassi, S., Bordi, F., Richard, J.-C.M., Brochard, L., 2013. Sonographic evaluation of the diaphragm in critically ill patients. Technique and clinical applications. *Intensive Care Med.* 39, 801–810.
- Misuri, G., Colagrande, S., Gorini, M., Iandelli, I., Mancini, M., Duranti, R., Scano, G., 1997. In vivo ultrasound assessment of respiratory function of abdominal muscles in normal subjects. *Eur. Respir. J.* 10, 2861–2867.
- Misuri, G., Lanini, B., Gigliotti, F., Iandelli, I., Pizzi, A., Bertolini, M.G., Scano, G., 2000. Mechanism of CO(2) retention in patients with neuromuscular disease. *Chest* 117, 447–453.
- Navarrete-Opazo, A., Vinit, S., Dougherty, B.J., Mitchell, G.S., 2015. Daily acute intermittent hypoxia elicits functional recovery of diaphragm and inspiratory intercostal muscle activity after acute cervical spinal injury. *Exp. Neurol.* 266, 1–10.
- Polkey, M.I., 2019. Respiratory muscle assessment in clinical practice. *Clin. Chest Med.* 40, 307–315.
- Sarwal, A., Cartwright, M.S., Walker, F.O., Mitchell, E., Buj-Bello, A., Beggs, A.H., Childers, M.K., 2014. Ultrasound assessment of the diaphragm: preliminary study of a canine model of X-linked myotubular myopathy. *Muscle Nerve* 50, 607–609.
- Scarlata, S., Mancini, D., Laudisio, A., Benigni, A., Antonelli Incalzi, R., 2018. Reproducibility and clinical correlates of supine diaphragmatic motion measured by M-Mode ultrasonography in healthy volunteers. *Respiration* 96, 259–266.
- Ueki, J., De Bruin, P.F., Pride, N.B., 1995. In vivo assessment of diaphragm contraction by ultrasound in normal subjects. *Thorax* 50, 1157–1161.
- Vinit, S., Gauthier, P., Stamegna, J.C., Kastner, A., 2006. High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J. Neurotrauma* 23, 1137–1146.
- Wait, J.L., Nahormek, P.A., Yost, W.T., Rochester, D.P., 1989. Diaphragmatic thickness-lung volume relationship in vivo. *J. Appl. Physiol.* 67, 1560–1568.
- 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. *J. Neurotrauma* 36, 2991–3004.
- Whitehead, N.P., Bible, K.L., Kim, M.J., Odom, G.L., Adams, M.E., Froehner, S.C., 2016. Validation of ultrasonography for non-invasive assessment of diaphragm function in muscular dystrophy. *J. Physiol. (Lond.)* 594, 7215–7227.
- Zuo, L., Roberts, W.J., Evans, K.D., 2014. Diagnostic ultrasound imaging of mouse diaphragm function. *J. Vis. Exp.* 51290.

1.2. Effet d'une hémisection spinale en C2 sur les fonctions respiratoire et cardiovasculaire chez le rat à 7 jours post-lésion

Publication: Effect of C2 spinal cord injury on respiratory and cardiovascular functions in rats. Soumis à *Frontiers in Physiology*.

Les traumatismes spinaux cervicaux induisent des déficits neuromoteurs et autonomes permanents. Le système nerveux sympathique étant impacté par ces lésions, les fonctions respiratoires et cardiovasculaires s'en retrouvent affectées. Jusqu'à présent, les études concernant le système cardiovasculaire se sont plutôt focalisées sur des modèles de contusion ou de section complète aux niveaux des segments métamériques inférieurs cervicaux et thoraciques. L'évaluation de l'activité du diaphragme se fait quant à elle grâce à des méthodes invasives. Nous avons cependant précédemment démontré que l'échographie était une méthode non-invasive, fiable et reproductible pour évaluer l'activité diaphragmatique.

La présente étude a donc consisté à évaluer l'impact d'une hémisection en C2 sur différents paramètres représentatifs des fonctions vitales chez le rat à 7 jours post-lésion. Des méthodes non-invasives et invasives ont été utilisées afin d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie induite par ce type spécifique de trauma spinal cervical. Ainsi, la fonction respiratoire a été évaluée par pléthysmographie, par échographie, ainsi que par électromyographie diaphragmatique. La fonction cardiaque a quant à elle été évaluée par échocardiographie, et la fonction cardiovasculaire par enregistrement invasif de paramètres hémodynamiques. Enfin, la fonction rénale a elle aussi été étudiée.

Aucun déficit ventilatoire n'a pu être observé par pléthysmographie chez les rats vigiles et en eupnée à 7j post-lésion. En revanche, une hémiplegie diaphragmatique permanente a été observée par échographie, puis confirmée par électromyographie diaphragmatique terminale chez les mêmes rats anesthésiés en eupnée. De façon intéressante, la pression artérielle moyenne est réduite de façon abrupte dans les secondes qui suivent l'hémisection en C2, avec une récupération totale à 7 jours post-lésion. En ce qui concerne la fonction rénale, elle ne semble pas être affectée à 7j post-lésion. Cependant, un dysfonctionnement systolique résiduel caractérisé par une fraction d'éjection ventriculaire gauche réduite, est observée à 7j post-lésion.

Ainsi, après hémisection en C2, l'activité du diaphragme et la fonction systolique sont affectées de manière permanente, tandis que les systèmes respiratoire et cardiovasculaire développent une forme de compensation afin de maintenir leurs paramètres dans des valeurs physiologiques. Une meilleure caractérisation générale de la physiopathologie des traumatismes spinaux cervicaux, sur une

période post-traumatique plus longue, pourrait être bénéfique pour optimiser l'application de potentielles thérapeutiques visant à induire une récupération cardiovasculaire et respiratoire.

Effect of C2 spinal cord injury on respiratory and cardiovascular functions in rats

Pauline Michel-Flutot¹, Arnaud Mansart¹, Abdallah FAYSSOIL¹, Stéphane Vinit^{1*}

¹Université Paris-Saclay, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Physiology

Specialty Section:
Respiratory Physiology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
725513

Received on:
15 Jun 2021

Journal website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

Pauline Michel-Flutot: Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - Original Draft, Review & Editing. Abdallah Faysoil: Investigation, Methodology, Review & Editing. Arnaud Mansart: Conceptualization, Investigation, Methodology, Supervision, Funding acquisition, Writing - Review & Editing. Stéphane Vinit: Conceptualization, Methodology, Investigation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - Review & Editing.

Keywords

C2 spinal cord injury, rat model, ultrasound, Respiratory, cardiovascular

Abstract

Word count: 248

High cervical spinal cord injuries (SCI) induce permanent neuromotor and autonomic deficits. These injuries impact both central respiratory and cardiovascular functions through modulation of the sympathetic nervous system. So far, cardiovascular studies have focused on models of complete contusion or transection at the lower cervical and thoracic levels and diaphragm activity evaluations using invasive methods. The present study aimed to evaluate the impact of C2 hemisection (C2HS) on different parameters representing vital functions (i.e., respiratory function, cardiovascular, and renal filtration parameters) at the moment of injury and 7 days post-injury (7 d P.I.) in Sprague-Dawley rats. No ventilatory parameters evaluated by plethysmography were impacted during quiet breathing after 7 d P.I., whereas permanent diaphragm hemiplegia was observed by ultrasound and confirmed by diaphragmatic electromyography in anesthetized rats. Interestingly, the mean arterial pressure was reduced immediately after C2HS, with complete compensation at 7 d P.I. Renal filtration was unaffected at 7 d P.I.; however, remnant systolic dysfunction characterized by a reduced left ventricular ejection fraction persisted at 7 d P.I. Taken together, these results demonstrated that following C2HS, diaphragm activity and systolic function are permanently impacted, whereas the respiratory and cardiovascular systems display vast adaptation to maintain ventilatory parameters and blood pressure homeostasis, with the latter likely sustained by the remaining descending sympathetic inputs spared by the initial injury. A better broad characterization of the physiopathology of high SCI covering a longer time period post-injury could be beneficial for understanding evaluations of putative therapeutics to further increase cardiorespiratory recovery.

Contribution to the field

High cervical spinal cord injuries (SCI) induce permanent neuromotor and autonomic deficits. However, no studies have shown on a high cervical partial injury preclinical and reliable animal model, the neuronal impact of such injury on several organ functions. In the present study, we investigated the impact of a C2 Spinal cord injury-induced deafferentation of descending neuronal pathways on global ventilation (plethysmography), on diaphragm activity (non-invasive ultrasound and corresponding invasive electromyography), on cardiovascular and cardiac function (ultrasound and hemodynamic), and on renal function at 7 days post-injury. Indeed, investigation of the early consequences of a central injury will be beneficial for the understanding of the pathophysiological effects that are known to be impactful on the human lifespan.

Funding statement

This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV), Fondation Medisite (SV), INSERM (SV, AM, AF) and Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (SV, AM, AF). The supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors thank the radiology department of Raymond Poincaré hospital (AP-HP), and also thank Valentin Vanhée for his assistance in revising this manuscript.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: The animal study was reviewed and approved by the Ethics committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and complied with French and European laws regarding animal experimentation (Aparis #2017111516297308).

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

In review

Data availability statement

Generated Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

In review

1 **Title: Effect of C2 spinal cord injury on respiratory and cardiovascular functions in rats**

2

3 **Running Title: C2HS on organ function**

4

5 **Authors and Affiliation:**

6 Pauline Michel-Flutot¹, Arnaud Mansart², Abdallah Fayssol^{1,3}, Stéphane Vinit^{1,*}.

7

8 ¹Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000 Versailles, France

9 ²Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et Inflammation (2I), 78000 Versailles,
10 France

11 ³Raymond Poincaré Hospital, AP-HP, Garches, France

12

13 *Corresponding author:

14 Stéphane Vinit, PhD, HDR

15 E-mail: stephane.vinit@uvsq.fr

16 Phone: +33170429427

17

18 Number of words: 6644

19 Number of figures: 4

20 Number of tables: 4

21

22

23 **Abstract**

24 High cervical spinal cord injuries (SCI) induce permanent neuromotor and autonomic deficits.
25 These injuries impact both central respiratory and cardiovascular functions through modulation
26 of the sympathetic nervous system. So far, cardiovascular studies have focused on models of
27 complete contusion or transection at the lower cervical and thoracic levels and diaphragm
28 activity evaluations using invasive methods. The present study aimed to evaluate the impact of
29 C2 hemisection (C2HS) on different parameters representing vital functions (*i.e.*, respiratory
30 function, cardiovascular, and renal filtration parameters) at the moment of injury and 7 days
31 post-injury (7 d P.I.) in Sprague–Dawley rats. No ventilatory parameters evaluated by
32 plethysmography were impacted during quiet breathing after 7 d P.I., whereas permanent
33 diaphragm hemiplegia was observed by ultrasound and confirmed by diaphragmatic
34 electromyography in anesthetized rats. Interestingly, the mean arterial pressure was reduced
35 immediately after C2HS, with complete compensation at 7 d P.I. Renal filtration was unaffected
36 at 7 d P.I.; however, remnant systolic dysfunction characterized by a reduced left ventricular
37 ejection fraction persisted at 7 d P.I. Taken together, these results demonstrated that following
38 C2HS, diaphragm activity and systolic function are permanently impacted, whereas the
39 respiratory and cardiovascular systems display vast adaptation to maintain ventilatory
40 parameters and blood pressure homeostasis, with the latter likely sustained by the remaining
41 descending sympathetic inputs spared by the initial injury. A better broad characterization of
42 the physiopathology of high SCI covering a longer time period post-injury could be beneficial
43 for understanding evaluations of putative therapeutics to further increase cardiorespiratory
44 recovery.

45 **Keywords:** C2 spinal cord injury; rat model; ultrasound; respiratory; cardiovascular

46 **Introduction**

47 High cervical spinal cord injuries (SCI) induce permanent neuromotor and autonomic deficits
48 in vital functions, such as respiratory, cardiovascular, and renal functions. People living with
49 high SCI are frequently mechanically ventilated and often present cardiac dysfunction (1).
50 However, compensatory mechanisms can occur spontaneously to allow the survival of these
51 patients. To study the pathophysiological processes and subsequent compensatory mechanisms
52 following a high cervical injury, a reliable preclinical animal model is required since human
53 studies are limited. Among preclinical models of high SCI, the rat C2 hemisection (C2HS)
54 model is the most documented, and this injury impacts both the central respiratory and
55 cardiovascular systems (2-4).

56 In the central nervous system, the descending respiratory pathway originates from the rostral
57 ventral respiratory group and is located in the rostro-ventral medulla (5). It bilaterally and
58 monosynaptically connects to the phrenic motoneuron pool (at the C3-C6 spinal segments of
59 the spinal cord) (6-10) that bilaterally innervates the diaphragm (which is the main inspiratory
60 muscle) via the phrenic nerve. Lateral hemisection at the C2 spinal cord segment (C2HS)
61 induces deafferentation of the corresponding phrenic motoneuron pool below the lesion,
62 leading to immediate hemidiaphragm paralysis (11). With this injury, the presence of a
63 contralateral intact spinal cord allows animal survival (2, 12). In this model, modest respiratory
64 recovery can be observed on the injured side and is mainly sustained by silent pathways
65 connected to the deafferented phrenic motoneurons that cross the spinal cord midline at the C3-
66 C6 level. This recovery is termed the crossed phrenic phenomenon (CPP) (12-16). C2HS also
67 induces the loss of half of the descending vasomotor axons that innervate the cardiovascular
68 system. Anatomically, sympathetic regulation of the heart and vessels arises from the
69 metameric thoracic T1-L2 spinal cord levels. Parasympathetic regulation originates from the
70 brainstem and sends information through the vagus and glossopharyngeal nerves. In upper
71 spinal cord injury, following the cervical injury, the parasympathetic activities remain intact
72 and will overcome the sympathetic influence, producing a *de facto* impact on
73 sympathetic/parasympathetic homeostasis and causing autonomic dysfunction, including
74 cardiovascular dysregulation and renal function alteration (17-19). In humans living with
75 chronic high SCI, orthostatic hypotension with episodes of autonomic dysreflexia (high arterial
76 hypertension induced by either noxious or non-noxious stimuli) is often observed (20). In
77 addition, left ventricular remodeling affecting the lower left ventricular (LV) mass, increasing
78 the LV wall thickness, or worsening LV diastolic function can also be observed (21, 22), again
79 depending on the level and extent of injury (23). However, outcomes following acute SCI have
80 not yet been well investigated.

81 Immediately following SCI, patients experience life-threatening conditions. The recommended
82 initial treatment is to immobilize and stabilize the patient, maintaining the mean arterial
83 pressure (MAP) between 85-90 mmHg (24). Functional research evaluations in acute SCI
84 stages are consequently impossible in humans. Therefore, preclinical models are necessary to
85 understand the cardiovascular physiopathology following acute and subacute SCI stages, but
86 unfortunately, no data are available from preclinical models of high cervical spinal cord injury.
87 Transection or contusion of the rat spinal cord at the thoracic level on rats to facilitate
88 evaluations of associated cardiovascular dysfunction is common (25, 26). These models display
89 an increased heart rate and sympathetic tonus and decreased MAP (27) associated with cardiac
90 atrophy and contractile dysfunction 12 weeks post-injury (28). Nevertheless, few studies have
91 used lower-cervical models of SCI, and these studies always applied complete transection, with
92 bradycardia, hypotension, and a reduced heart rate and sympathetic tonus observed weeks after
93 injury (27, 29). These diverse preclinical studies used invasive and terminal experiments to
94 assess the pathophysiology of respiratory insufficiency (*i.e.*, diaphragm electromyography (2,

95 11, 30, 31)) and cardiovascular dysregulation (telemetry (32, 33) and terminal arterial pressure
96 recordings (34)) following SCI.
97 Ultrasound is a non-invasive and reliable clinical method to study moving organs such as the
98 diaphragm (35, 36) and heart (37, 38) under several pathologies, including in patients living
99 with SCI (39, 40). A few preclinical animal studies have used ultrasound to evaluate diaphragm
100 activity in intact animals (41-43), but none have evaluated diaphragmatic dysfunction following
101 cervical SCI. However, this technique is commonly used to evaluate cardiac function in intact
102 rats (44-47) and even following thoracic SCI (26, 48, 49). Although no studies have evaluated
103 the cardiovascular effect of incomplete cervical SCI in a preclinical animal model, most patients
104 living with SCI suffer from high-level (cervical) and often incomplete spinal injury.
105 In the present study, we investigated several vital physiological parameters (respiratory
106 function, cardiovascular function, and renal filtration) 7 days post-C2 spinal cord hemisection
107 in Sprague–Dawley rats.
108

109 **Material and Methods**

110 **Ethics statement**

111 All experiments reported in this manuscript conformed to policies set by the National Institutes
112 of Health (USA) in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and EU Directive
113 2010/63/EU for animal experiments. These experiments were performed on 7-week-old male
114 Sprague–Dawley rats (Janvier, France). The animals were dual-housed in individually
115 ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation
116 A78-322-3, France) with access to food and water ad libitum and a 12-h light/dark cycle. These
117 experiments were approved by the Ethics committee of the University of Versailles Saint-
118 Quentin-en-Yvelines and complied with French and European laws regarding animal
119 experimentation (Apafis #2017111516297308).
120

121 **Chronic C2 spinal cord hemisection**

122 Before anesthesia, the rats were subcutaneously injected with the pre-anesthetic drugs
123 buprenorphine (Buprécare, 0.03 mg/kg), trimethoprim and sulfadoxin (Borgal 24%, 30
124 mg/kg), medetomidine (Médétor, 0.1 mg/kg), and carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg).
125 Approximately 10 minutes after injection, anesthesia was induced in a closed chamber (5%
126 isoflurane in 100% O₂). The rats were then intubated and ventilated with a rodent ventilator
127 (model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), and anesthesia was maintained
128 with isoflurane (2.5% in 100% O₂) throughout the surgical procedure. After the skin and
129 muscles were retracted, laminectomy and durotomy were performed at the C2 level. The
130 spinal cord was then sectioned unilaterally (left side) with microscissors. A microscalpel was
131 used immediately after the microscissors to ensure the existence of a potential section of
132 remaining fibers, as previously described (2). The muscles and skin were then sutured. To
133 reverse the effect of medetomidine, atipamezole (Revertor, 0.5 mg/kg) was intramuscularly
134 injected. The isoflurane anesthesia was then turned off, and when the rats showed signs of
135 waking up, the endotracheal tube was removed. Sham rats received the same surgery without
136 C2 spinal cord hemisection.
137

138 **Whole-body plethysmography**

139 In total, 14 rats were used for whole-body plethysmography recordings. The rats were randomly
140 divided into two different groups: Sham (n = 6) and 7 days post-injury (7d P.I., n = 8).
141 Whole-body constant flow (2 L/min) plethysmography (EMKA, France) was used to assess
142 global ventilatory function (e.g., the tidal volume, minute ventilation, and breathing frequency)
143 in our rats, as previously described (43). The rats were weighed, and the plethysmography

144 system was calibrated before the animals were placed in the chambers. After a 30-minute
145 acclimation period, recording began under normoxic conditions (room air). The minute
146 ventilation and tidal volume were reported according to the bodyweight (per 100 g) for each
147 animal.

148

149 **Echography data acquisition**

150 In total, 14 rats were used for ultrasound data acquisition. The rats were randomly divided into
151 two different groups: Sham (n = 7) and 7d P.I. (n = 7).

152 To evaluate diaphragm activity and cardiac function, a high-resolution ultrasound system
153 (LOGIQ E9; GE, France) and a high-frequency (18 MHz) linear L8-18i probe (GE, France)
154 were used. Anesthesia was induced by isoflurane (5% at 500 cc/minute in 100 % O₂) in a closed
155 chamber and maintained through a nose cone (isoflurane balanced at 1.5-2% in 100% O₂). Each
156 rat's anterior thorax and upper abdomen were shaved before exploration. The rats were placed
157 in the supine position on the imaging platform, and their rectal temperature was monitored and
158 maintained at 37.5 ± 0.5 °C throughout the experiment. Ultrasound gel was applied to the chest
159 skin before measurement.

160 After visualization of the diaphragm, M-mode ultrasound was used to assess the diaphragm
161 motion (diaphragmatic inspiratory motion, inspiratory time, and expiratory time) from the
162 subcostal view (43).

163 2D-mode ultrasound was used to measure the diaphragm thickness and assess thickening from
164 the apposition zone during live breathing, as previously described (43). For this assessment, the
165 probe was placed perpendicularly to the chest wall at the midaxillary line to visualize the
166 costophrenic sinus. In the apposition zone, clear visualization of the diaphragm can be recorded,
167 as bounded by 2 clear bright lines—the pleural line and the peritoneal line. The thicknesses of
168 the diaphragm at the end of the expiration and inspiration cycles were also recorded. The
169 thickening fraction (TF) of the diaphragm was calculated using the following ratio: ([thickness
170 at end inspiration]-[thickness at end expiration])/[thickness at end expiration] (43, 50).

171 For echocardiographic recording, the sweep speed, depth, focus, and gain settings were
172 optimized to obtain the best images. The left ventricular (LV) diastolic and systolic diameters
173 were measured from an M-mode short-axis view of the left ventricle at the papillary muscle
174 level. The LV ejection fraction was calculated from the M-mode measurements. The aortic
175 velocity integral (VTI) was recorded by Doppler echocardiography during the procedure. The
176 mitral inflow Doppler pattern was recorded (peak E, peak A, and deceleration time) from a 4-
177 chamber apical view.

178

179 **Electrophysiological and hemodynamic recordings**

180 In total, 25 rats were used for MAP recordings. The rats were randomly divided into three
181 different groups: Before injury (n=8), in which the rats underwent C2 spinal cord hemisection
182 during recording and were kept until 1 h P.I.; 7d Sham (n = 9) and 7d P.I. (n = 8). All animals
183 used for the echography experiments were also used for diaphragm electromyographic and
184 hemodynamic recordings and were therefore included in the corresponding groups, excluding
185 one animal in the 7d P.I. group that died after the ultrasound experiment.

186 As previously described (2), anesthesia was induced using isoflurane (5% balanced in 100%
187 O₂) in an anesthesia chamber and then maintained through a nose cone (2.5% balanced in 21%
188 O₂). The rats were then tracheotomized and ventilated (Rodent Ventilator, model 683; Harvard
189 Apparatus, South Natick, MA, USA). The ventilation rate was maintained below the animal
190 central apneic threshold throughout the experiment. The rats were placed on a heating pad, and
191 the rectal temperature was continuously monitored throughout the experiment (maintained at
192 37.5 ± 0.5 °C). A catheter was inserted in the right femoral artery to measure the arterial
193 pressure and heart rate. The arterial and tracheal pressures were monitored continuously by

194 transducers connected to a bridge amplifier (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The
195 appropriate depth of anesthesia was confirmed by the absence of any response to toe pinching.
196 The arterial pressure and heart rate were recorded for at least 10 minutes. Then, a laparotomy
197 was performed, and the liver was gently moved caudally to access the diaphragm. To prevent
198 dehydration, gauze soaked with warm phosphate-buffered saline was placed on the liver. A
199 handmade bipolar-surface silver electrode connected to an amplifier (Microelectrode AC
200 amplifier Model 1800; A-M SYSTEMS) was used to record diaphragm electromyographic
201 activity (EMGdia). The electrode was gently placed on each hemidiaphragm during
202 spontaneous poikilocapnic normoxic breathing. The recorded signals were digitized by an 8-
203 channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 100 k/s; AD Instruments, Dunedin,
204 New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 8 Pro software (AD
205 Instruments, Dunedin, New Zealand).

206

207

Renal function evaluation

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

Data processing

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

The amplitudes of the EMGdia recordings were double-integrated (Time Constant Decay = 50 ms) to maximally reduce the heartbeat signal interference. The average of at least 10 diaphragm contractions was calculated with LabChart 8 Pro software (AD Instruments).

A paired t-test was performed to compare values between the intact and injured sides of the same animal (7d P.I.) for inspiratory course and EMGdia analyses. A t-test was used to compare the plethysmography analysis results, aortic diameters, and isovolumetric relaxation times in the 7d Sham and 7d P.I. groups. One-way ANOVA was used to compare the results of the renal function evaluation and MAP experiments between different groups (Control, 1h P.I., 7d Sham, and 7d P.I.). One-way repeated-measures ANOVA was used to compare the MAP and heart rate analysis results obtained from the same animal over time (before injury, 20 s P.I. and 1 h P.I.).

243 All data are presented as the mean \pm SD, and values were considered significant when $p < 0.05$.
 244 For scatter plot analysis, confidence ellipses were calculated using the Khi^2 confidence interval
 245 (95%). SigmaPlot 12.5 software and XLSTAT Premium 2016.1.1 (Addinsoft, Paris, France;
 246 <https://www.xlstat.com>) were used for all analyses.

247

248 **Results**

249 **Effect of C2 spinal cord hemisection on diaphragm activity**

250 No difference in injury size between the 1h P.I. ($87.6 \pm 8.5\%$) and 7d P.I. ($93.1 \pm 4.6\%$) groups
 251 ($p = 0.070$) was observed (Figure 1A and 1B).

252 The plethysmography assessment of global ventilation showed no differences in the inspiratory
 253 time, expiratory time, minute ventilation, tidal volume, and respiratory rate between the 7d
 254 Sham and 7d P.I. groups (Table 1).

255 A deeper diaphragm activity evaluation was also performed, in which the activity was first
 256 assessed non-invasively by ultrasound through inspiratory course evaluation (during diaphragm
 257 contraction) (Figure 2A and 2B). At 7 d P.I., the intact side presented a similar inspiratory
 258 course to that of the 7d Sham group (3.4 ± 1.3 mm vs. 3.6 ± 1.2 mm, respectively; $p = 0.708$),
 259 and a significantly higher value compared to the injured side (intact side vs. injured side = -0.4
 260 ± 0.5 mm; $p < 0.001$) (Figure 2C). Diaphragm activity was invasively evaluated in the same
 261 animals by diaphragm electromyography reflecting diaphragm contraction (Figure 2D). Similar
 262 to the inspiratory course, the integrated diaphragm amplitude in the intact side (7d P.I. group)
 263 showed no difference compared to the 7d Sham group (intact side of 7d P.I. = 0.49 ± 0.1 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$
 264 vs. 7d Sham = 0.37 ± 0.2 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$; $p = 0.081$) but was significantly higher than that in the injured
 265 side (difference between the intact side vs. injured side = 0.06 ± 0.1 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$; $p < 0.001$) (Figure
 266 2E). The relationship between the inspiratory course and integrated diaphragm amplitude was
 267 then explored. A positive relationship was observed, and the injured side of 7d P.I.-group rats
 268 was significantly different compared to 7d Sham-group rats and the intact side of the 7d P.I.-
 269 group rats (Figure 2F).

270 **Effect of C2 spinal cord hemisection on hemodynamic parameters**

271 Immediately following C2 spinal cord hemisection, the MAP significantly decreased (before
 272 injury = 69.2 ± 13.0 mmHg vs. 20 s P.I. = 47.8 ± 5.9 mmHg; $p < 0.001$) (Figure 3A and 3B).
 273 This decreased MAP was maintained at 1 h P.I. (1 h P.I. = 54.8 ± 8.0 mmHg vs. before injury,
 274 $p = 0.002$, and 1 h P.I. vs. 20 s P.I., $p = 0.09$). At 7 d P.I. (74.3 ± 18.8 mmHg), the MAP returned
 275 to pre-injury values, *i.e.*, those of the before injury ($p = 0.424$) and 7d Sham (71.1 ± 12.7 ; $p =$
 276 0.599) groups (Figure 3B and 3C). No significant variation in the heart rate was observed
 277 following injury (Table 2).

278

279 **Effect of C2 spinal cord hemisection on renal function**

280 Renal function, which relies on the MAP, was evaluated following C2 SCI. There were no
 281 differences between the Control, 7d Sham, and 7d P.I. groups. No difference in the glomerular
 282 filtration rate, renal threshold for glucose, and water reabsorption was observed following
 283 C2HS at 7 d P.I. (Table 3).

284

285 **Effect of C2 spinal cord hemisection on cardiac function**

286 Cardiac function was evaluated by ultrasound (Figure 4A) in 7d Sham and 7d P.I. rats. There
 287 was no difference between the two groups in anatomical parameters, including the diastolic left
 288 ventricular (LV) diameter (7d Sham = 8.6 ± 0.5 mm vs. 7d P.I. = 9.2 ± 1.1 mm; $p = 0.277$)
 289 (Figure 4B), systolic LV diameter (7d Sham = 5.8 ± 0.6 mm vs. 7d P.I. = 6.7 ± 1.1 mm; $p =$
 290 0.074) (Figure 4C) and aortic diameter (Table 4). The 7d P.I. rats presented a lower LV ejection
 291 fraction ($57.7 \pm 7.5\%$) compared to 7d Sham rats ($67.2 \pm 7.5\%$; $p = 0.036$) (Figure 4D). The
 292 7d Sham and 7d P.I. rats showed no difference in the E/A ratio (diastolic function) (7d Sham =

293 1.3 ± 0.3 vs. 7d P.I. = 1.5 ± 0.7 ; $p = 0.620$) (Figure 4E), isovolumetric relaxation time (Table 4)
294 and aortic velocity time integral (7d Sham = 5.2 ± 0.5 cm vs. 7d P.I. = 4.6 ± 1.0 cm; $p = 0.186$)
295 (Figure 4F).
296

297 **Discussion**

298 To date, this study is the first to analyze several vital physiological parameters (respiratory and
299 cardiovascular functions and renal filtration) following a cervical C2 partial injury in rats.
300 Surprisingly, at 7 d post-C2HS, the rats did not show any respiratory deficit under quiet
301 breathing conditions when the respiratory parameters were evaluated by plethysmography.
302 Several studies using the same rat model with a similar extent of injury showed an initial
303 decrease in V_T and V_M associated with an increase in the respiratory frequency (53-55) and
304 progressive spontaneous restauration of these parameters over time (54). This discrepancy can
305 be explained by the development of compensatory mechanisms involving respiratory-related
306 muscles not directly impacted by the initial injury (*i.e.*, intercostal and abdominal muscles) (56).
307 Following such an injury, in the resting state under eupneic conditions, these animals can fully
308 maintain respiratory gas exchange homeostasis and respiratory function similar to those of pre-
309 injury animals (4, 57), leading to our observations in the injured rats. Interestingly, in the
310 present study, despite the lack of a deficit according to plethysmography, the diaphragm activity
311 measured by ultrasound (diaphragm displacement) and direct electromyography on the muscle
312 (EMGdia) revealed diaphragm hemiparalysis on the injured side. Both the ultrasound and
313 electromyography evaluations were realized on the same animals and presented a positive
314 relationship, demonstrating the reliability of these evaluations. Respiratory deficits after
315 cervical partial injury have been well described in many studies, mostly using invasive methods
316 such as diaphragm electromyography using telemetry (54, 58), terminal diaphragmatic
317 recordings (2, 11, 16, 59-61), and even terminal phrenic nerve recordings (13, 53, 62). However,
318 this diaphragmatic deficit can be fully investigated in a non-invasive way, *i.e.*, by ultrasound,
319 resulting in a robust correlation with invasive diaphragmatic EMG activities. This correlation
320 between diaphragmatic EMG activities and respiratory ultrasound parameters has been
321 previously described in naïve rats (43), and these data confirm the growing interest in using this
322 non-invasive evaluation to monitor spontaneous respiratory reorganization following C2 injury
323 in individual animals over time.

324 The C2HS that we performed was a complete hemisection, which impacted the bulbospinal
325 respiratory pathway and part of the cardiovascular descending pathway (particularly, the
326 sympathetic part). Immediately after C2HS, an abrupt reduction of the MAP was observed due
327 to the transection of half of the sympathetic innervation responsible for maintaining blood
328 pressure homeostasis. However, this reduction was not permanent, since the MAP returned to
329 pre-injury values by 7 d P.I. This result has previously been observed in several publications
330 using similar injury models but has never been further explored. Cardiovascular parameters
331 were used in these previous studies as a control for analyzing respiratory parameters between
332 animal groups but were not the main research focus (63-65). However, following total
333 transection or contusion at the cervical or thoracic level, the MAP remains low after several
334 weeks P.I. (27, 29, 48, 66). In this study, the spontaneous recovery of the MAP could have been
335 due to vascular compensation (*i.e.*, vascular vasoconstriction) that occurred between the
336 moment of trauma and 7 d P.I. by, for instance, reorganization of the sympathetic neural
337 rewiring (*i.e.*, around preganglionic neurons) (67). This neural plasticity could be sustained by
338 oversensitization or an increase in α_1 -adrenergic receptor expression following spinal cord
339 injury, as observed in preclinical rat models of complete or severe SCI (63-65) and patients
340 with SCI (68). Unfortunately, we cannot confirm this hypothesis since the α_1 -adrenergic
341 receptor antibodies available on the market do not produce convincing and specific labeling of
342 these receptors in immunohistochemistry and western blot analyses (69). Another possibility is

343 suggested by an analysis of raw cardiovascular parameter values. The VTI, heart rate, and aortic
344 diameter (Table 4) were not modulated by C2HS in our model. Thus, blood flow $((d/2)^2 \times$
345 $\pi \times VTI \times \text{heart rate})$ did not appear to be impacted in this model at 7 d P.I., leading to the
346 recovery of the pre-injury MAP. Interestingly, no significant variation in the heart rate after
347 injury was observed, as reported in previous studies of C2HS animals (70-72). This could be
348 partially because the vagus nerve, which is known to mediate the heartbeat rhythmicity (55), is
349 not directly impacted by C2 SCI, and the sympathetic inputs were only partly impacted by the
350 partial spinal injury that spared some sympathetic fibers. However, in models of complete or
351 severe SCI, a reduced heart rate is observed up to 2 weeks P.I. (27, 32). More in-depth studies
352 are needed to confirm these hypotheses.

353 Blood pressure is directly linked to renal function, and blood pressure function and homeostasis
354 are dependent on renal blood flow. A low cardiac output or MAP can damage the kidneys (73,
355 74); however, the renal function evaluation in our C2HS rats at 7 d P.I. showed no modification
356 of any parameters studied, which was unsurprising, given that the MAP was restored to pre-
357 injury values by this timepoint. Nevertheless, we cannot rule out that immediately after injury,
358 our rats may have presented a reduced MAP that could have caused transient renal dysfunction
359 (75).

360 Even though spontaneous recovery of the MAP was observed over time after C2HS injury in
361 rats, cardiac function evaluation by ultrasound at 7 d P.I. revealed remnant systolic dysfunction
362 characterized by a reduced LV ejection fraction. However, no other cardiac parameters (*i.e.*,
363 anatomy and diastolic function) differed from those of the Sham rats. Interestingly, studies
364 depicting cardiac dysfunction often use animals spinally contused at the thoracic level. In a rat
365 model of T2 contusion, reductions in the stroke volume, end-diastolic volume, and cardiac
366 output or LV internal diameter during diastole were observed at 7 d P.I., in addition to a reduced
367 LV ejection fraction. These deficits persisted at least until 5-6 weeks P.I. (48, 49). In contrast,
368 no changes in the LV ejection fraction were found at 5 weeks P.I. following a T3 moderate or
369 severe contusion compared to a T2 contusion (26). The severe T3 contusion led to a reduced
370 stroke volume, LV internal diameter during diastole, systolic volume, and end-systolic volume
371 (26). Several sympathetic descending fibers can remain partially intact after a severe contusion
372 injury, and these residual fibers cannot fully sustain the sympathetic output, leading to heart
373 dysfunction. In the present study, even though half of the descending sympathetic fibers
374 remained intact on the contralateral side after C2HS, the remaining innervation of these
375 sympathetic fibers was not sufficient to maintain a normal LV ejection fraction at 7 d P.I. but
376 was adequate to avoid other cardiac dysfunctions, such as those found in thoracic contusion or
377 transection models (28). A reduced LV ejection fraction is likely to occur acutely after
378 hemisection and could be the cause of the post-injury MAP decrease. However, even when
379 MAP recovery spontaneously occurs over time by some compensatory mechanism at 7 d P.I.,
380 such as compensatory vascular vasoconstriction, the systolic deficit persists. More studies are
381 needed to determine the mechanisms underlying this spontaneous MAP recovery and the
382 putative sympathetic intraspinal neuronal rewiring following C2HS.

383 In conclusion, this study demonstrated that C2HS in a rat model leads to diverse vital
384 pathophysiological defects that can, in some cases, undergo spontaneous restoration. A better
385 broad characterization of the physiopathology of high SCI would benefit the understanding of
386 evaluations of putative therapeutics to further increase observed cardiorespiratory recovery.

387 **Acknowledgements**

388 This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix)
389 (SV), Fondation Medisite (SV), INSERM (SV, AM, AF) and Université de Versailles Saint-
390 Quentin-en-Yvelines (SV, AM, AF). The supporters had no role in study design, data collection
391 and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors thank the
392 radiology department of Raymond Poincaré hospital (AP-HP), and also thank Valentin Vanhée
393 for his assistance in revising this manuscript.

394

395 **Declaration of Competing Interest**

396 The authors report no declarations of interest.

397

398 **CRediT:**

399 **Pauline Michel-Flutot:** Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - Original
400 Draft, Review & Editing. **Abdallah Fayssol:** Investigation, Methodology, Review & Editing.
401 **Arnaud Mansart:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Supervision, Funding
402 acquisition, Writing - Review & Editing. **Stéphane Vinit:** Conceptualization, Methodology,
403 Investigation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - Review &
404 Editing.

405 **References**

- 406 1. **Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A, and Fehlings MG.** Traumatic
407 spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17018, 2017.
- 408 2. **Keomani E, Deramaudt TB, Petitjean M, Bonay M, Lofaso F, and Vinit S.** A murine model of
409 cervical spinal cord injury to study post-lesional respiratory neuroplasticity. *J Vis Exp* 87: e51235,
410 2014.
- 411 3. **Vinit S, Keomani E, Deramaudt TB, Bonay M, and Petitjean M.** Reorganization of Respiratory
412 Descending Pathways following Cervical Spinal Partial Section Investigated by Transcranial Magnetic
413 Stimulation in the Rat. *PLoS one* 11: e0148180, 2016.
- 414 4. **Navarrete-Opazo A, Vinit S, Dougherty BJ, and Mitchell GS.** Daily acute intermittent hypoxia
415 elicits functional recovery of diaphragm and inspiratory intercostal muscle activity after acute
416 cervical spinal injury. *Exp Neurol* 266: 1-10, 2015.
- 417 5. **Feldman JL, Del Negro CA, and Gray PA.** Understanding the rhythm of breathing: so near, yet
418 so far. *Annu Rev Physiol* 75: 423-452, 2013.
- 419 6. **Gandevia SC, and Rothwell JC.** Activation of the human diaphragm from the motor cortex. *J*
420 *Physiol* 384: 109-118, 1987.
- 421 7. **Vandeweerdt J-M, Hontoir F, De Knoop A, De Swert K, and Nicaise C.** Retrograde
422 Neuroanatomical Tracing of Phrenic Motor Neurons in Mice. *J Vis Exp* 56758, 2018.
- 423 8. **Feldman JL, Loewy AD, and Speck DF.** Projections from the ventral respiratory group to
424 phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study. *J Neurosci* 5: 1993-2000,
425 1985.
- 426 9. **Lipski J, Bektas A, and Porter R.** Short latency inputs to phrenic motoneurons from the
427 sensorimotor cortex in the cat. *Exp Brain Res* 61: 280-290, 1986.
- 428 10. **Alexandrov VG, Ivanova TG, and Alexandrova NP.** Prefrontal control of respiration. *J Physiol*
429 *Pharmacol* 58 Suppl 5: 17-23, 2007.
- 430 11. **Vinit S, Gauthier P, Stamegna JC, and Kastner A.** High cervical lateral spinal cord injury
431 results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J Neurotrauma* 23: 1137-1146, 2006.
- 432 12. **Fuller DD, Doperalski NJ, Dougherty BJ, Sandhu MS, Bolser DC, and Reier PJ.** Modest
433 spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Exp Neurol*
434 211: 97-106, 2008.
- 435 13. **Vinit S, and Kastner A.** Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor
436 function following spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol* 169: 115-122, 2009.
- 437 14. **Goshgarian HG.** Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in
438 the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol* 94: 795-810, 2003.
- 439 15. **Ghali MGZ.** The crossed phrenic phenomenon. *Neural Regen Res* 12: 845-864, 2017.
- 440 16. **Bezudnaya T, Hormigo KM, Marchenko V, and Lane MA.** Spontaneous respiratory plasticity
441 following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats. *Exp Neurol* 305: 56-65, 2018.
- 442 17. **Hou S, and Rabchevsky AG.** Autonomic consequences of spinal cord injury. *Compr Physiol* 4:
443 1419-1453, 2014.
- 444 18. **Biering-Sorensen F, Biering-Sorensen T, Liu N, Malmqvist L, Wecht JM, and Krassioukov A.**
445 Alterations in cardiac autonomic control in spinal cord injury. *Autonomic neuroscience : basic &*
446 *clinical* 2017.
- 447 19. **Tuna H, Cermik TF, and Tuna F.** Monitoring of renal function using 99mTc-DMSA and 99mTc-
448 DTPA scintigraphy in patients with spinal cord injury. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 31: 322-327,
449 2012.
- 450 20. **Krassioukov A, and Claydon VE.** The clinical problems in cardiovascular control following
451 spinal cord injury: an overview. *Prog Brain Res* 152: 223-229, 2006.
- 452 21. **Driussi C, Ius A, Bizzarini E, Antonini-Canterin F, d'Andrea A, Bossone E, and Vriza O.**
453 Structural and functional left ventricular impairment in subjects with chronic spinal cord injury and
454 no overt cardiovascular disease. *J Spinal Cord Med* 37: 85-92, 2014.

- 455 22. **Kessler KM, Pina I, Green B, Burnett B, Laighold M, Bilsker M, Palomo AR, and Myerburg RJ.**
 456 Cardiovascular findings in quadriplegic and paraplegic patients and in normal subjects. *Am J Cardiol*
 457 58: 525-530, 1986.
- 458 23. **West CR, Mills P, and Krassioukov AV.** Influence of the neurological level of spinal cord injury
 459 on cardiovascular outcomes in humans: a meta-analysis. *Spinal Cord* 50: 484-492, 2012.
- 460 24. **Hadley MN, Walters BC, Grabb PA, Oyesiku NM, Przybylski GJ, Resnick DK, Ryken TC, and**
 461 **Mielke DH.** Guidelines for the management of acute cervical spine and spinal cord injuries. *Clin*
 462 *Neurosurg* 49: 407-498, 2002.
- 463 25. **Weaver LC, Cassam AK, Krassioukov AV, and Llewellyn-Smith IJ.** Changes in
 464 immunoreactivity for growth associated protein-43 suggest reorganization of synapses on spinal
 465 sympathetic neurons after cord transection. *Neuroscience* 81: 535-551, 1997.
- 466 26. **Squair JW, Liu J, Tetzlaff W, Krassioukov AV, and West CR.** Spinal cord injury-induced
 467 cardiomyocyte atrophy and impaired cardiac function are severity dependent. *Exp Physiol* 103: 179-
 468 189, 2018.
- 469 27. **Lujan HL, Tonson A, Wiseman RW, and DiCarlo SE.** Chronic, complete cervical(6-7) cord
 470 transection: distinct autonomic and cardiac deficits. *J Appl Physiol* 124: 1471-1482, 2018.
- 471 28. **Poormasjedi-Meibod MS, Mansouri M, Fossey M, Squair JW, Liu J, McNeill JH, and West CR.**
 472 Experimental Spinal Cord Injury Causes Left-Ventricular Atrophy and Is Associated with an
 473 Upregulation of Proteolytic Pathways. *J Neurotrauma* 36: 950-961, 2019.
- 474 29. **Lujan HL, and DiCarlo SE.** Direct comparison of cervical and high thoracic spinal cord injury
 475 reveals distinct autonomic and cardiovascular consequences. *J Appl Physiol* 128: 554-564, 2020.
- 476 30. **Warren PM, Steiger SC, Dick TE, MacFarlane PM, Alilain WJ, and Silver J.** Rapid and robust
 477 restoration of breathing long after spinal cord injury. *Nat Commun* 9: 4843-4843, 2018.
- 478 31. **Terada J, and Mitchell GS.** Diaphragm long-term facilitation following acute intermittent
 479 hypoxia during wakefulness and sleep. *J Appl Physiol* 110: 1299-1310, 2011.
- 480 32. **Mayorov DN, Adams MA, and Krassioukov AV.** Telemetric blood pressure monitoring in
 481 conscious rats before and after compression injury of spinal cord. *J Neurotrauma* 18: 727-736, 2001.
- 482 33. **Brockway BP, Mills PA, and Azar SH.** A new method for continuous chronic measurement
 483 and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. *Clin Exp*
 484 *Hypertens* 13: 885-895, 1991.
- 485 34. **Bravo G, Hong E, Rojas G, and Guízar-Sahagún G.** Sympathetic blockade significantly
 486 improves cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 319:
 487 95-98, 2002.
- 488 35. **Faysoil A, Behin A, Ogná A, Mompoin D, Amthor H, Clair B, Laforet P, Mansart A, Prigent**
 489 **H, Orlikowski D, Stojkovic T, Vinit S, Carlier R, Eymard B, Lofaso F, and Annane D.** Diaphragm:
 490 Pathophysiology and Ultrasound Imaging in Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis* 5: 1-10,
 491 2018.
- 492 36. **Ueki J, De Bruin PF, and Pride NB.** In vivo assessment of diaphragm contraction by
 493 ultrasound in normal subjects. *Thorax* 50: 1157-1161, 1995.
- 494 37. **Shimron M, Williams L, Hazanov Y, Ghanim D, Kinany W, Amir O, and Carasso S.** Clinical and
 495 echocardiographic characteristics of patients in sinus rhythm, normal left ventricular function, and
 496 indeterminate diastolic function. *Echocardiography* 35: 792-797, 2018.
- 497 38. **Papadimitriou L, Georgiopoulou VV, Kort S, Butler J, and Kalogeropoulos AP.**
 498 Echocardiography in Acute Heart Failure: Current Perspectives. *J Card Fail* 22: 82-94, 2016.
- 499 39. **Zhu Z, Li J, Yang D, Gao F, Du L, and Yang M.** Ultrasonographic evaluation of diaphragm
 500 thickness and excursion in patients with cervical spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 1-6, 2019.
- 501 40. **Ditterline BL, Wade S, Ugiliweneza B, Singam NSV, Harkema SJ, Stoddard MF, and Hirsch**
 502 **GA.** Systolic and diastolic function in chronic spinal cord injury. *PLoS one* 15: e0236490, 2020.
- 503 41. **Kobayashi K, Lemke RP, and Greer JJ.** Ultrasound measurements of fetal breathing
 504 movements in the rat. *J Appl Physiol* 91: 316-320, 2001.

- 505 42. **Ioannis T, George S, Nikolaos K, George M, Charalampos P, Nikolaos D, Spyridon S, and**
 506 **Michael S.** Evaluation of diaphragmatic mobility following intra-abdominal sub-diaphragmatic
 507 fixation of a double-layered mesh in rats. *Acta Cir Bras* 31: 235-242, 2016.
- 508 43. **Faysoil A, Michel-Flutot P, Lofaso F, Carlier R, El Hajjam M, Vinit S, and Mansart A.** Analysis
 509 of inspiratory and expiratory muscles using ultrasound in rats: A reproducible and non-invasive tool
 510 to study respiratory function. *Respir Physiol Neurobiol* 285: 103596, 2021.
- 511 44. **Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, and Kass DA.** Measurement of cardiac
 512 function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 3:
 513 1422-1434, 2008.
- 514 45. **Haas GJ, McCune SA, Brown DM, and Cody RJ.** Echocardiographic characterization of left
 515 ventricular adaptation in a genetically determined heart failure rat model. *Am Heart J* 130: 806-811,
 516 1995.
- 517 46. **Burrell LM, Chan R, Phillips PA, Calafiore P, Tonkin AM, and Johnston CI.** Validation of an
 518 echocardiographic assessment of cardiac function following moderate size myocardial infarction in
 519 the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 570-572, 1996.
- 520 47. **Harman KA, States G, Wade A, Stepp C, Wainwright G, DeVea K, King N, Shum-Siu A, and**
 521 **Magnuson DSK.** Temporal analysis of cardiovascular control and function following incomplete T3
 522 and T10 spinal cord injury in rodents. *Physiol Rep* 6: e13634, 2018.
- 523 48. **Squair JW, DeVea KM, Harman KA, Poormasjedi-Meibod MS, Hayes B, Liu J, Magnuson**
 524 **DSK, Krassioukov AV, and West CR.** Spinal Cord Injury Causes Systolic Dysfunction and
 525 Cardiomyocyte Atrophy. *J Neurotrauma* 35: 424-434, 2018.
- 526 49. **DeVeau KM, Martin EK, King NT, Shum-Siu A, Keller BB, West CR, and Magnuson DSK.**
 527 Challenging cardiac function post-spinal cord injury with dobutamine. *Auton Neurosci* 209: 19-24,
 528 2018.
- 529 50. **Matamis D, Soilemezi E, Tsagourias M, Akoumianaki E, Dimassi S, Boroli F, Richard J-CM,**
 530 **and Brochard L.** Sonographic evaluation of the diaphragm in critically ill patients. Technique and
 531 clinical applications. *Intensive Care Med* 39: 801-810, 2013.
- 532 51. **Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NO, Malheiros DM, Shimizu MH,**
 533 **Seguro AC, and Andrade L.** Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart
 534 injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R514-524,
 535 2014.
- 536 52. **Liang Y, Arakawa K, Ueta K, Matsushita Y, Kuriyama C, Martin T, Du F, Liu Y, Xu J, Conway B,**
 537 **Conway J, Polidori D, Ways K, and Demarest K.** Effect of canagliflozin on renal threshold for glucose,
 538 glycemia, and body weight in normal and diabetic animal models. *PLoS one* 7: e30555, 2012.
- 539 53. **Lovett-Barr MR, Satriotomo I, Muir GD, Wilkerson JE, Hoffman MS, Vinit S, and Mitchell GS.**
 540 Repetitive intermittent hypoxia induces respiratory and somatic motor recovery after chronic
 541 cervical spinal injury. *J Neurosci* 32: 3591-3600, 2012.
- 542 54. **Navarrete-Opazo A, Dougherty BJ, and Mitchell GS.** Enhanced recovery of breathing
 543 capacity from combined adenosine 2A receptor inhibition and daily acute intermittent hypoxia after
 544 chronic cervical spinal injury. *Exp Neurol* 287: 93-101, 2017.
- 545 55. **Golder FJ, Reier PJ, Davenport PW, and Bolser DC.** Cervical spinal cord injury alters the
 546 pattern of breathing in anesthetized rats. *J Appl Physiol* 91: 2451-2458, 2001.
- 547 56. **Katagiri M, Young RN, Platt RS, Kieser TM, and Easton PA.** Respiratory muscle compensation
 548 for unilateral or bilateral hemidiaphragm paralysis in awake canines. *J Appl Physiol* 77: 1972-1982,
 549 1994.
- 550 57. **Beth Zimmer M, Grant JS, Ayar AE, and Goshgarian HG.** Ipsilateral inspiratory intercostal
 551 muscle activity after C2 spinal cord hemisection in rats. *J Spinal Cord Med* 38: 224-230, 2015.
- 552 58. **Urban MW, Ghosh B, Block CG, Strojny LR, Charsar BA, Goulão M, Komaravolu SS, Smith**
 553 **GM, Wright MC, Li S, and Lepore AC.** Long-Distance Axon Regeneration Promotes Recovery of
 554 Diaphragmatic Respiratory Function after Spinal Cord Injury. *eNeuro* 6: 2019.
- 555 59. **Goshgarian HG.** Developmental plasticity in the respiratory pathway of the adult rat. *Exp*
 556 *Neurol* 66: 547-555, 1979.

- 557 60. **Mantilla CB, Gransee HM, Zhan WZ, and Sieck GC.** Impact of glutamatergic and serotonergic
558 neurotransmission on diaphragm muscle activity after cervical spinal hemisection. *J Neurophysiol*
559 118: 1732-1738, 2017.
- 560 61. **Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, and Silver J.** Functional regeneration of respiratory
561 pathways after spinal cord injury. *Nature* 475: 196-200, 2011.
- 562 62. **Fuller DD, Johnson SM, Olson EB, Jr., and Mitchell GS.** Synaptic pathways to phrenic
563 motoneurons are enhanced by chronic intermittent hypoxia after cervical spinal cord injury. *J*
564 *Neurosci* 23: 2993-3000, 2003.
- 565 63. **Lee JS, Fang SY, Roan JN, Jou IM, and Lam CF.** Spinal cord injury enhances arterial expression
566 and reactivity of α 1-adrenergic receptors-mechanistic investigation into autonomic dysreflexia. *Spine*
567 *J* 16: 65-71, 2016.
- 568 64. **Santajuliana D, Zukowska-Grojec Z, and Osborn JW.** Contribution of alpha- and beta-
569 adrenoceptors and neuropeptide-Y to autonomic dysreflexia. *Clin Auton Res* 5: 91-97, 1995.
- 570 65. **Roudet C, Savasta M, and Feuerstein C.** Normal distribution of alpha-1-adrenoceptors in the
571 rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic
572 study. *J Neurosci Res* 34: 44-53, 1993.
- 573 66. **DeVeau KM, Harman KA, Squair JW, Krassioukov AV, Magnuson DSK, and West CR.** A
574 comparison of passive hindlimb cycling and active upper-limb exercise provides new insights into
575 systolic dysfunction after spinal cord injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 313: H861-h870, 2017.
- 576 67. **Krassioukov AV, and Weaver LC.** Morphological changes in sympathetic preganglionic
577 neurons after spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 70: 211-225, 1996.
- 578 68. **Davies B, Sudera D, Sagnella G, Marchesi-Saviotti E, Mathias C, Bannister R, and Sever P.**
579 Increased numbers of alpha receptors in sympathetic denervation supersensitivity in man. *J Clin*
580 *Investig* 69: 779-784, 1982.
- 581 69. **Jensen BC, Swigart PM, and Simpson PC.** Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic
582 receptor subtypes are nonspecific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 409-412, 2009.
- 583 70. **Lee K-Z, Dougherty BJ, Sandhu MS, Lane MA, Reier PJ, and Fuller DD.** Phrenic motoneuron
584 discharge patterns following chronic cervical spinal cord injury. *Exp Neurol* 249: 20-32, 2013.
- 585 71. **Lee KZ, Huang YJ, and Tsai IL.** Respiratory motor outputs following unilateral midcervical
586 spinal cord injury in the adult rat. *J Appl Physiol* 116: 395-405, 2014.
- 587 72. **Golder FJ, Reier PJ, and Bolser DC.** Altered respiratory motor drive after spinal cord injury:
588 Supraspinal and bilateral effects of a unilateral lesion. *J Neurosci* 21: 8680-8689, 2001.
- 589 73. **Langenberg C, Bellomo R, May C, Wan L, Egi M, and Morgera S.** Renal blood flow in sepsis.
590 *Crit Care* 9: R363-374, 2005.
- 591 74. **Badin J, Boulain T, Ehrmann S, Skarzynski M, Bretagnol A, Buret J, Benzekri-Lefevre D,**
592 **Mercier E, Runge I, Garot D, Mathonnet A, Dequin PF, and Perrotin D.** Relation between mean
593 arterial pressure and renal function in the early phase of shock: a prospective, explorative cohort
594 study. *Crit Care* 15: R135, 2011.
- 595 75. **Rodríguez-Romero V, Guízar-Sahagún G, Castañeda-Hernández G, Reyes JL, and Cruz-**
596 **Antonio L.** Early Systemic Alterations in Severe Spinal Cord Injury: An Experimental Study on the
597 Impact of Injury Level on Renal Function. *Spine* 43: E885-e890, 2018.
- 598
- 599
- 600
- 601
- 602

603 **Tables**

604

Parameters	Mean ± SD (min-max)	
	7d Sham	7d P.I.
T _I (ms)	186 ± 26 (161-230)	208 ± 34 (163-279)
T _E (ms)	350 ± 77 (266-448)	307 ± 53 (215-392)
V _M (ml/min)/100g	43.80 ± 7.00 (35.83-54.19)	42.02 ± 6.71 (31.65-53.23)
V _T (ml)/100g	0.37 ± 0.03 (0.32-0.40)	0.34 ± 0.03 (0.29-0.37)
Respiratory Rate (breaths/min)	120 ± 17 (102-146)	125 ± 20 (92-159)

605

606

Table 1: Whole body plethysmography in unanesthetized eupneic rats.

607

Inspiratory time (T_I), Expiratory Time (T_E), Minute Ventilation (V_M), Tidal Volume (V_T),

608

minimum (min) and maximum (max). 7d Sham (n = 6) and 7d P.I. (n = 8).

609

610

	Mean ± SD (min-max)				
	Control	20s P.I.	1h P.I.	7d Sham	7d P.I.
Heart rate (BPM)	448 ± 26 (411-478)	425 ± 30 (369-458)	439 ± 22 (406-469)	416 ± 41 (375-503)	420 ± 36 (347-465)

611

612

Table 2: Evaluation of heart rate in anesthetized control, 20s P.I., 1h P.I., 7d Sham and 7d

613

P.I. rats. Before injury, 20s and 1h P.I. group (n=8), 7d Sham (n = 9) and 7d P.I. (n = 8).

614

615

Parameters	Mean ± SD (min-max)		
	Control	7d Sham	7d P.I.
GFR (mL/min)	8.88 ± 3.71 (4.24-16.65)	10.52 ± 2.10 (6.68-12.41)	7.92 ± 3.74 (4.51-12.52)
RTG (mg/mL)	5.87 ± 1.14 (4.15-7.35)	6.40 ± 0.26 (6.09-6.76)	6.96 ± 0.73 (6.12-8.06)
Water reabsorption (%)	96.27 ± 1.97 (92.67-98.98)	94.91 ± 1.34 (93.31-97.13)	94.29 ± 1.27 (92.36-95.55)

616

617

Table 3: Evaluation of renal function in anesthetized control, 7d Sham and 7d P.I. rats.

618

Glomerular filtration rate (GFR) and renal threshold for glucose (RTG). Control (n=6), 7d

619

Sham (n=6) and 7d P.I. (n=5).

620

621

622

623

624

625

Parameters	Mean \pm SD (min-max)	
	7d Sham	7d P.I.
Aortic diameter (mm)	3.08 \pm 0.25 (2.65-3.50)	2.83 \pm 0.23 (2.60-3.30)
Isovolumetric relaxation time (ms)	27.5 \pm 4.5 (20.5-35.1)	28.9 \pm 5.8 (19.7-37.6)

626

627

628

629

630

631

Table 4: Supplementary cardiac parameters at 7d post C2 spinal cord hemisection
Sham (n = 7) and 7d P.I. (n = 7).

In review

632 **Figures**633 **Figure 1: Extent of injury following a C2 spinal cord hemisection**

634 **A.** Representative extend of injury in each animal at 1hour post-injury (1h P.I.), and 7 days (7d)
 635 P.I. **B.** Extent of injury quantification in percentage compared to control, *i.e.*, total spinal cord
 636 hemisection (100%). There is no difference between the two groups (t-test, $p=0,070$).

637

638 **Figure 2: Evaluation of diaphragm activity following C2 spinal cord hemisection**

639 Representative traces of diaphragm contraction (inspiratory course) evaluated by ultrasound in
 640 anesthetized rats for intact side (**A**) and injured side (**B**). **C.** Quantification of inspiratory course
 641 measured by ultrasound in Sham animals ($n = 7$) and 7 days post-injury animals ($n = 7$). **D.**
 642 Representative traces of diaphragmatic electromyography (EMGdia) in isoflurane-anesthetized
 643 animals. **E.** Quantification of EMGdia. **F.** Relation between inspiratory course and integrated
 644 diaphragm amplitude with the 95% confidence ellipse. Paired t-test, * $p<0.001$ intact side *vs*
 645 injured side.

646

647 **Figure 3: Mean arterial pressure evaluation following C2 spinal cord hemisection**

648 **A.** Representative traces of mean arterial pressure before, during, immediately after C2 spinal
 649 cord hemisection, 1h P.I. and 7 days post-surgery (Sham and 7d P.I. groups). **B.** Mean arterial
 650 pressure before injury, 20s and 1h P.I. ($n=8$). **C.** Mean arterial pressure at 7d Sham ($n = 9$) and
 651 7d P.I. ($n = 8$) groups. One Way Repeated Measures ANOVA, a $p=0.002$ before injury *vs* 1h
 652 P.I., b $p<0.001$ before injury *vs* 20s P.I.; One Way ANOVA * $p<0.02$ 7d Sham *vs* 20s P.I. and
 653 1h P.I., ** $p<0.004$ 7d P.I. *vs* 20s P.I. and 1h P.I.

654

655 **Figure 4: Cardiac evaluation by ultrasound 7d post C2 spinal cord hemisection**

656 Evaluation of different cardiac parameters by ultrasound at 7 days post-surgery for Sham (7d
 657 Sham) ($n = 7$) and injured (7d P.I.) ($n = 7$) rats. **A.** Representative traces showing left ventricular
 658 (LV) ejection fraction during successive heart contraction cycles. The dotplots show end
 659 diastolic (**B**) and end systolic (**C**) LV diameter, LV ejection fraction (**D**), E/A ratio (**E**) and
 660 aortic velocity time integral (VTI) (**F**). t-test, two tailed values, * $p=0.036$ 7d Sham *vs* 7d P.I.

661

Figure 1.TIF

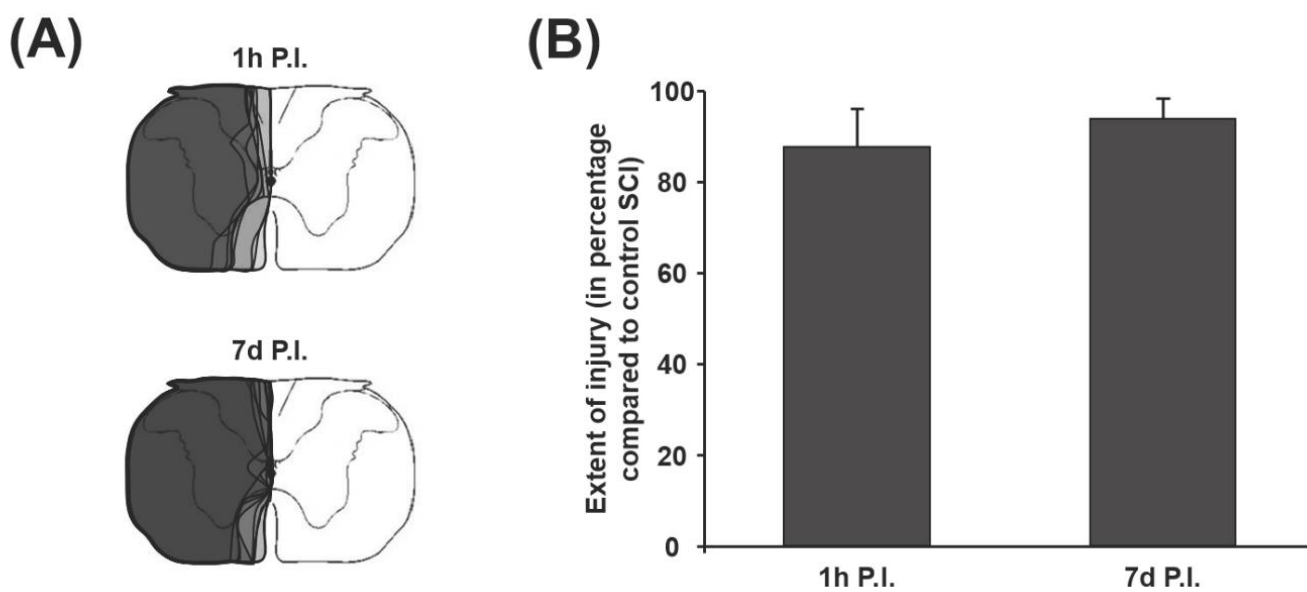


Figure 2. TIF

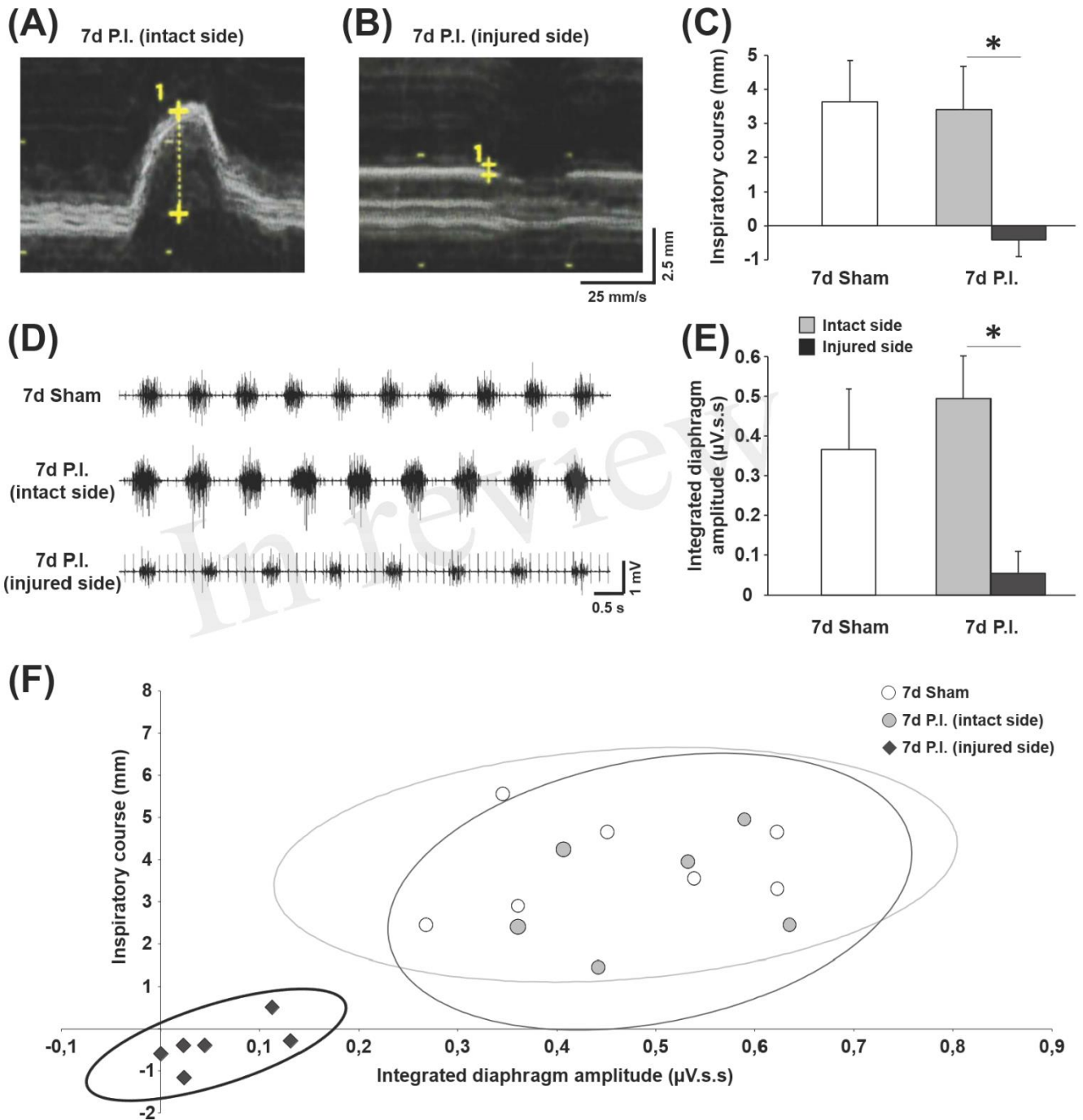


Figure 3. TIF

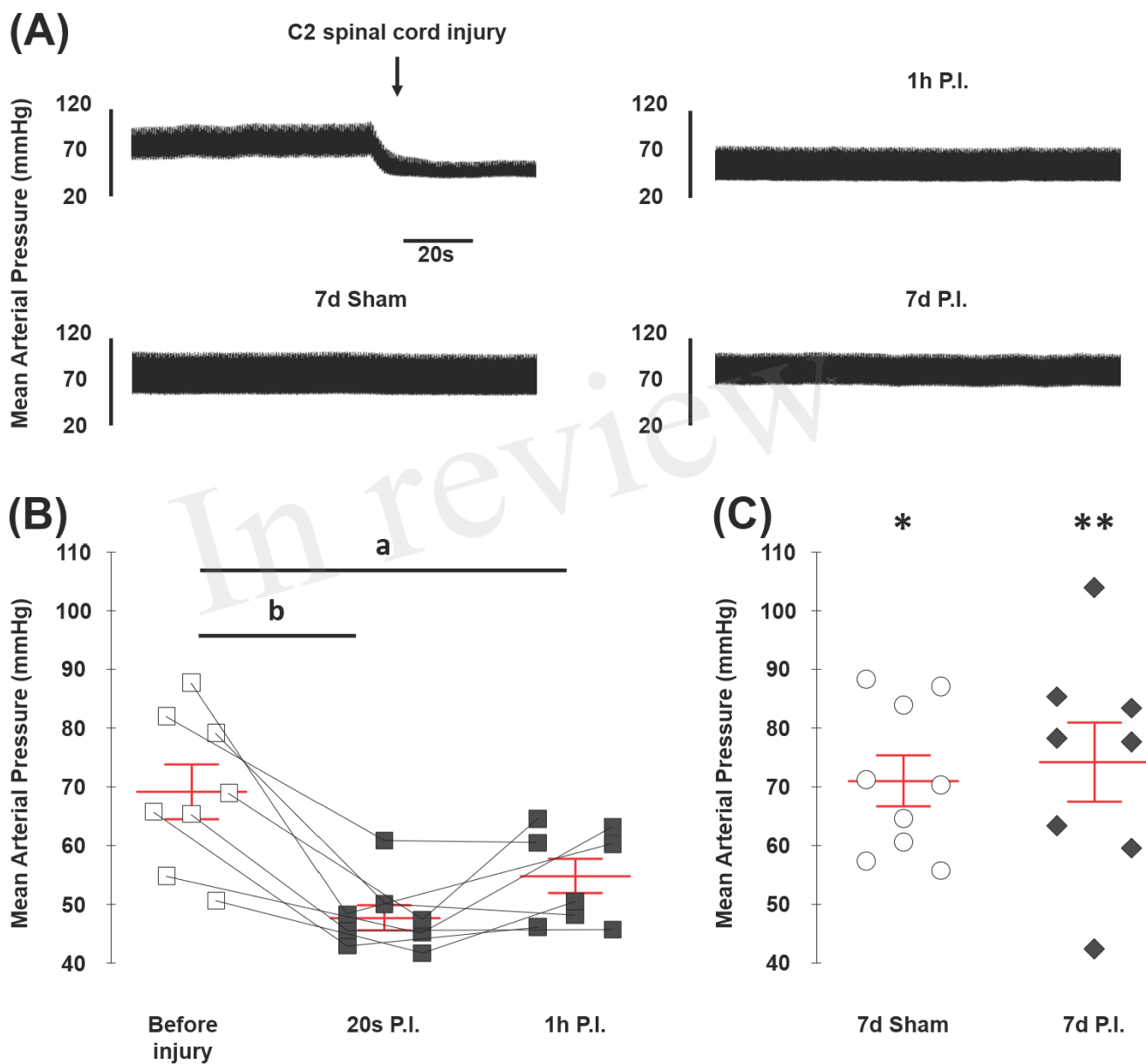
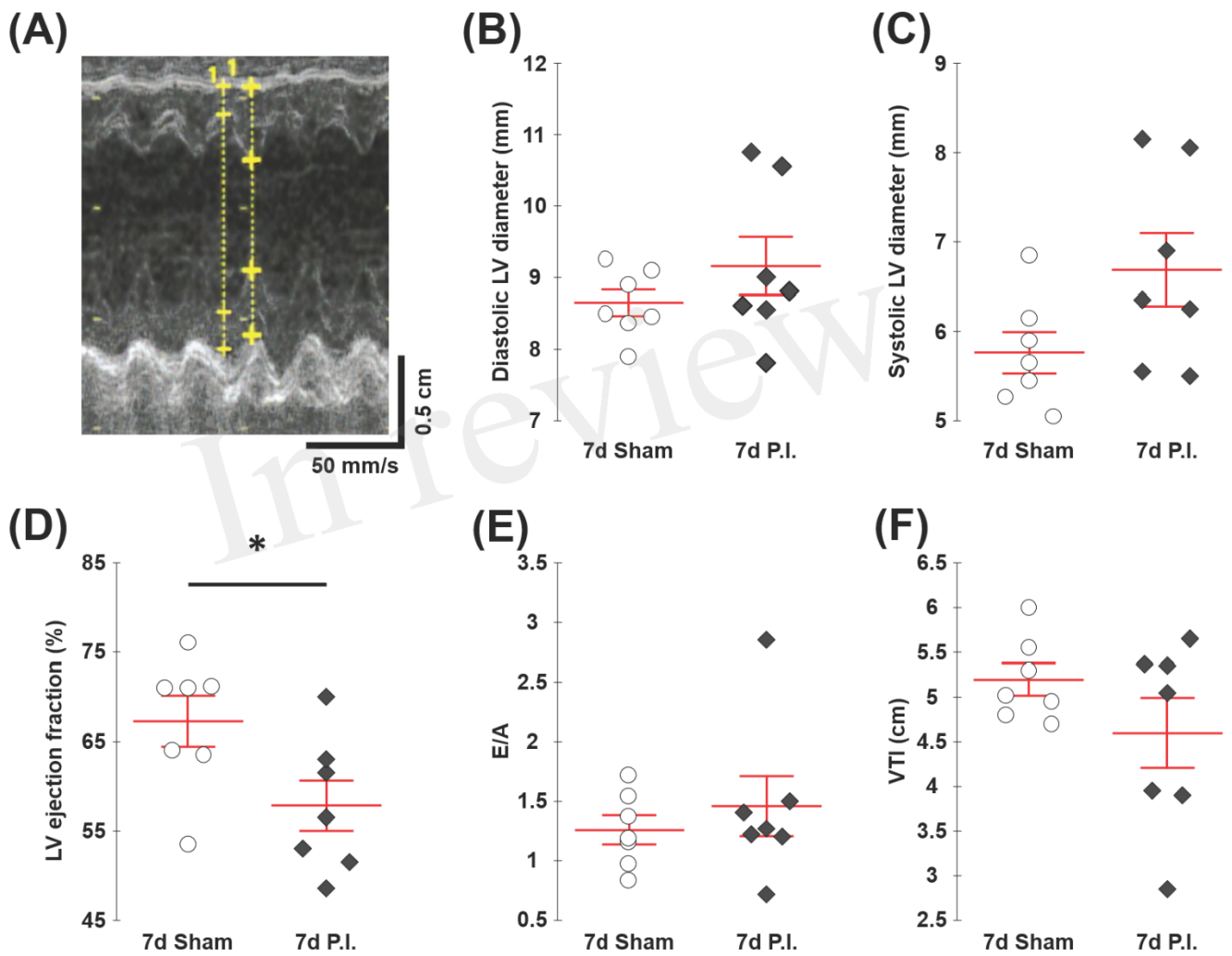


Figure 4.TIF



1.3. Résultats complémentaires : Etude de la neuroinflammation au niveau des motoneurones phréniques après trauma spinal cervical

Les lésions de la moelle épinière conduisent à une succession d'évènements regroupés en deux phases : 1) une phase primaire dite « immédiate » (dommages cellulaires, étirement axonal...) qui est consécutive à la lésion elle-même, conséquence de l'atteinte de l'intégrité physique de la moelle épinière ; et 2) une phase secondaire d'évènements qui vont contribuer à la formation de lésions secondaires, séparés en 3 étapes successives : « aigüe » (production de ROS, excitotoxicité au glutamate, inflammation, mort neuronale...), « intermédiaire » (infiltration des macrophages, activité microgliale et astrocytaire...) et « chronique » (dégénérescence wallérienne...).

Ainsi, la perte de l'intégrité d'un neurone provoque un stress cellulaire pouvant conduire soit à la mort de la celui-ci, par apoptose ou nécrose, ou soit donner lieu à des processus pro-régénératif médiés par l'environnement (Watson and Yeung, 2011). Il y a ainsi au cours de la phase secondaire, création d'un contexte inflammatoire, principalement médié et entretenu par la microglie dans la moelle épinière dans un périmètre relativement large autour du site lésé (Windelborn and Mitchell, 2012), ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif (Watson and Yeung, 2011). Ces deux phénomènes s'inter-amplifient et sont défavorables à une éventuelle récupération cellulaire et amélioration fonctionnelle.

Cette étude étant déjà initiée à mon arrivée dans l'équipe, je l'ai donc poursuivi et complété par l'évaluation de l'activation de la molécule AMPK via la modulation de l'expression de sa forme phosphorylée dans les motoneurones phréniques. Ce projet en effet pour but d'étudier l'inflammation qui se met en place progressivement au niveau des motoneurones phréniques après trauma spinal cervical au niveau des motoneurones déafférentés. Cette inflammation qui se met en place suite à une hémisection spinale latérale en C2 chez le rat (Sprague Dawley) a donc été évaluée à 1h, 1j, 3j et 7j post-lésion, ainsi que chez des animaux Sham (qui ont été rassemblés dans un seul groupe Sham car aucune différence n'a été observée aux différents temps post-chirurgie pour les différentes molécules étudiées). Cette évaluation de l'inflammation s'est faite au travers de l'étude de la présence ou de l'expression de divers marqueurs liés à l'inflammation dans la moelle épinière C3-C6 au niveau des motoneurones phréniques marqués de façon rétrograde par la sous-unité B de la toxine du choléra.

Dans cette étude, les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. Les différents groupes utilisés sont : 1h post-lésion (n=4), 1j post-lésion (n=4), 3j post-lésion (n=4), 7j post-lésion (n=4). Les animaux contrôle sham correspondants pour chaque temps post-chirurgie (n=4 x 4) ont été réunis en un seul groupe Sham. Pour chaque animal, la moelle épinière C3-C6 a été prélevée après euthanasie et perfusion intracardiaque (PBS 1X hépariné, puis PFA 4%). Les moelle épinières ont

ensuite été post-fixées sur la nuit, cryoprotégées dans une solution de sucrose 30%, puis stockées à -80°C. Elles ont ensuite été coupées au cryostat (30 µm d'épaisseur), et ces coupes ont été immunomarquées.

1.3.1. Vérification de l'étendue des lésions en C2

Avant toute analyse, l'étendue de l'hémisection en C2 a été vérifiée chez tous les animaux lésés. Aucune différence n'a été observée entre tous les groupes d'animaux pour les étendues de lésion (Figure 36). Ces résultats montrent donc que les seules différences qui pourraient être observées sont bien liées au temps post-lésion, et non à une variabilité dans l'étendue de la lésion.

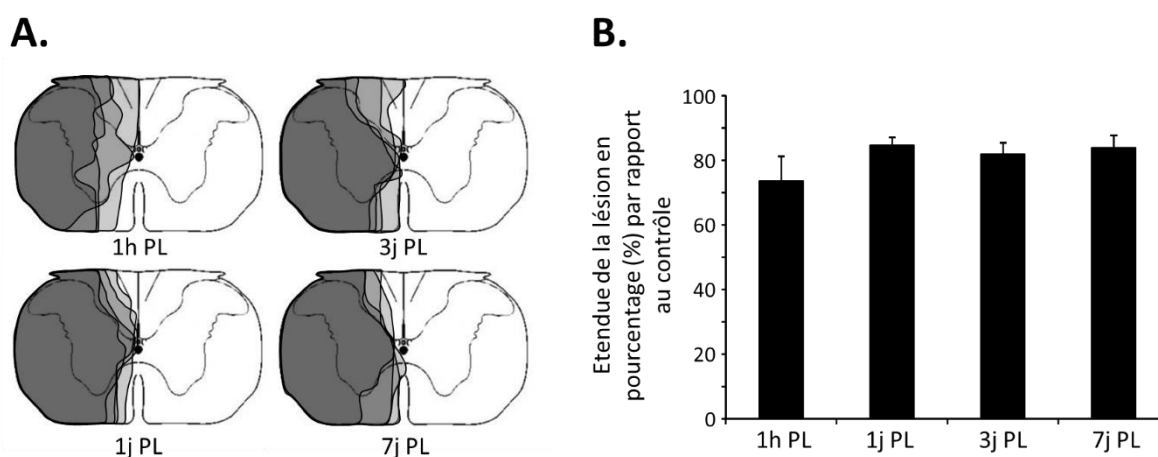


Figure 36 Quantification de l'étendue des lésions spinales en C2

A) Schémas représentatifs des hémisections spinales cervicales (C2) pour les différents groupes étudiés : à 1h, 1j, 3j et 7j post-lésion (PL). B) Quantification de l'étendue des lésions spinales en pourcentage par rapport au contrôle (une héli-moelle sans hémisection spinale aura une étendue de lésion de 0%). T-test ($p > 0,05$).

1.3.2. Recrutement et activation de cellules immunitaires

Dans un premier temps, la présence et l'expression de cellules CD11b et CD68 positives a été évaluée autour des motoneurones phréniques, ces cellules étant impliquées dans la réponse inflammatoire du système nerveux central. La surface occupée par le marquage CD11b est augmentée du côté lésé à partir de 3j post-lésion, et à partir de 7j post-lésion chez les animaux lésés (Figure 37A et 37B), alors que la surface occupée par les cellules CD68 positives est augmentée du côté lésé à partir de 7j post-lésion, sans variation significative du côté sain (Figure 37C et 37D). Ces résultats mettent donc en évidence une infiltration de macrophages activés (CD68) autour des motoneurones

phréniques déafférentés, ainsi que l'activation de cellules majoritairement microgliales (CD11b) dans la moelle épinière C3-C6, plus précoce du côté lésé par rapport au côté intact.

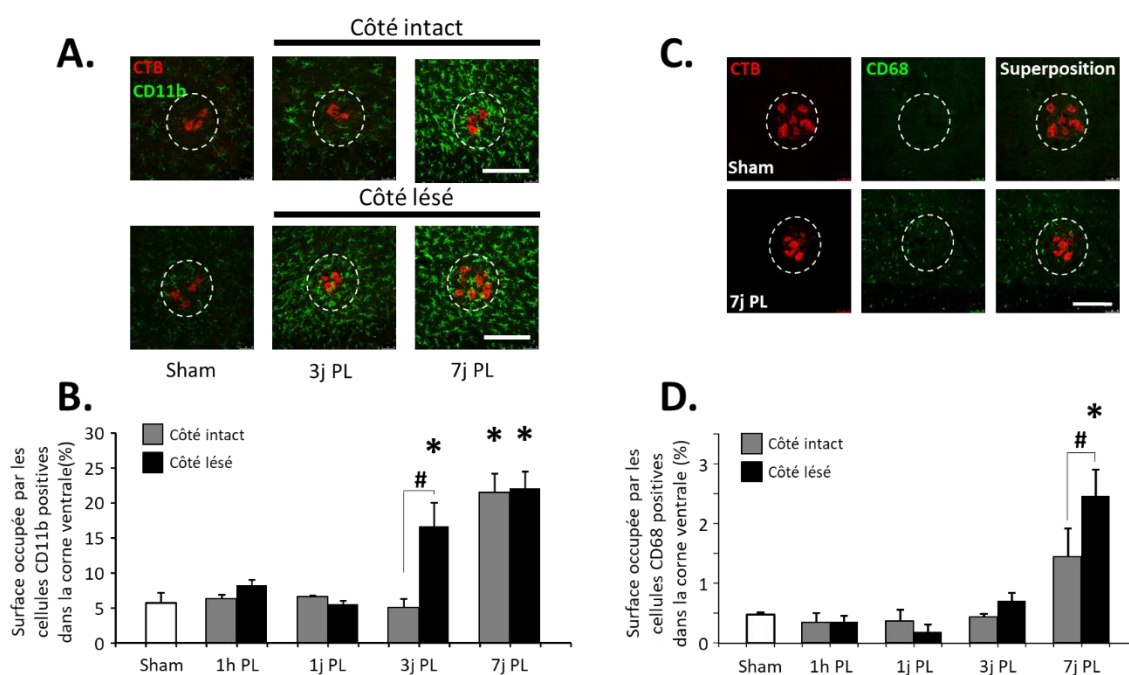


Figure 37 : Surface occupée par les cellules CD11b ou CD68 positives dans la moelle épinière C3-C6

Images représentatives montrant le marquage des motoneurons phréniques en rouge dans la corne ventrale de la moelle épinière (A et C), et en vert le marquage des cellules CD11b positives chez les animaux Sham, à 3j post-lésion (PL) et 7j PL (A), ou des cellules CD68 positives chez les animaux Sham et à 7j PL pour le côté lésé (C). Les images ont été prises au microscope confocal (X10). La barre blanche d'échelle représente 50µm. La délimitation en pointillés blancs met en évidence les motoneurons phréniques. C) Histogrammes représentant la surface occupée par les cellules CD11b positives dans la corne ventrale de la moelle épinière. D) Histogrammes représentant la surface occupée par les cellules C68 positives dans la corne ventrale de la moelle épinière. # p<0,05, paired t-test pour les différences entre côté intact et côté lésé. * p<0,05, comparé au groupe Sham, ANOVA à un facteur suivie d'un Fisher LSD (p<0,05).

Les traumatismes médullaires entraînent une activation de la microglie (Hulsebosch, 2008). En effet, une hémisection en C2 entraîne une activation de la microglie au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière entre C3 et C6 (Windelborn and Mitchell, 2012), ce qui est en accord avec nos résultats. Le délai d'activation des cellules CD11b positives pourrait refléter le temps nécessaire pour que l'inflammation se propage du site post-lésionnel vers les zones sous-lésionnelles, où sont entre autres localisés les motoneurons phréniques. Le traitement médicamenteux post-opératoire (Carprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien) utilisé, connu pour inhiber la cyclo-oxygénase permettant la synthèse des prostaglandines pourrait aussi participer au phénomène observé. Ces dernières sont en effet impliquées dans l'activation de la microglie (Jin et al., 2007).

Malgré l'augmentation importante de la surface occupée par les macrophages mise en évidence autour des motoneurones phréniques déafférentés à 7 jours post-lésionnel, le type de macrophage ne peut être identifié. En effet, l'anticorps utilisé (anti-CD68) est dirigé contre un antigène commun à tous les macrophages. De plus, la zone étudiée est sous-lésionnelle, donc éloignée du site lésé, ce qui peut aussi expliquer le délai d'apparition de ces macrophages. La surface occupée par les macrophages plus importante du côté des motoneurones phréniques déafférentés que du côté contralatéral peut s'expliquer par le fait que les axones lésés dégénèrent de ce côté de la moelle épinière, entraînant une démyélinisation et donc le recrutement et l'activation de cellules de type macrophage et microglie (Bradbury and Burnside, 2019).

1.3.3. Expression de molécules inflammatoires dans les motoneurones phréniques

L'expression de iNOS et de la NADPH-oxydase ont été évaluées dans les motoneurones phréniques en tant que reflet de leur état inflammatoire suite à l'hémisection en C2. L'expression de iNOS y est significativement augmentée à partir de 1j post-lésion du côté intact et du côté lésé, jusqu'à

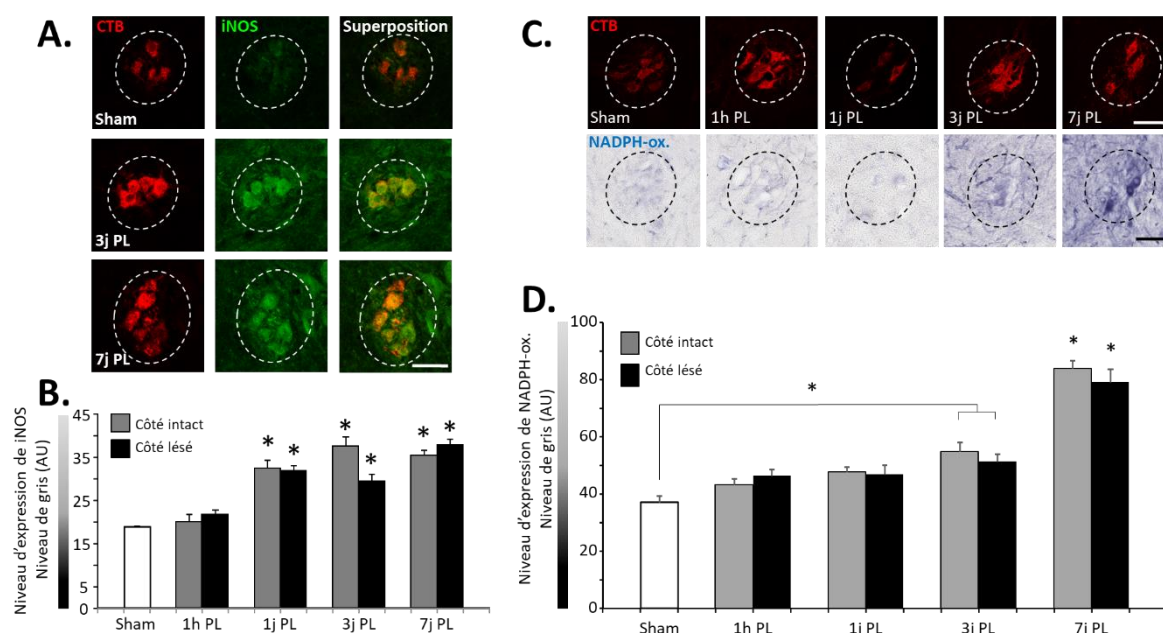


Figure 38 : Expression de iNOS et NADPH-oxydase dans les motoneurones phréniques déafférentés

Images représentatives montrant le marquage iNOS (en vert, en A) chez les animaux Sham, à 3j post-lésion (PL) et 7j PL, et NADPH-oxydase (nitro-blue tetrazodium, en C) chez les animaux Sham, à 1h PL, 1j PL, 3j PL, et 7j PL et 7j PL dans les motoneurones phréniques déafférentés en rouge dans la corne ventrale de la moelle épinière. Les images ont été prises au microscope confocal (X10). La barre blanche d'échelle représente 50µm. La délimitation en pointillés blancs met en évidence les motoneurones phréniques. B) Histogrammes représentant l'expression de marquage en niveau de gris de iNOS. D) Histogrammes représentant l'expression de marquage en niveau de gris de la NADPH-oxydase. * p<0,05, comparé au groupe Sham, ANOVA à un facteur suivie d'un Fisher LSD (p<0,05).

au moins 7j post-lésion (Figure 38A et B). L'expression de la NADPH-oxydase est quant à elle augmentée significativement des deux côtés à partir de 3j post-lésion (Figure 38C et D).

L'augmentation de iNOS dans les cellules durant les premiers jours suivant la lésion spinale est connue (Kigerl et al., 2009). De plus, les motoneurones phréniques expriment iNOS de façon basale, ce dernier participant à leur activité intrinsèque (MacFarlane et al., 2014), et cette expression de iNOS est augmentée dans plusieurs types cellulaires présents dans la moelle épinière après trauma spinal (Yang et al., 2007). Cependant, cette augmentation d'expression est neurotoxique et participe aux processus de dégâts neuronaux (Hamada et al., 1996; Xu et al., 2001). La NADPH-oxydase est aussi connue pour voir son expression augmenter après trauma spinal en tant que reflet du stress oxydatif cellulaire (Cooney et al., 2014). Ces résultats suggèrent donc que l'hémisection en C2 entraîne une inflammation et un stress oxydatif dans les motoneurones phréniques spécifiquement identifiés, indépendamment de leur déafférentation.

1.3.4. Expression du facteur de transcription Nrf2 dans les motoneurones phréniques

Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2), un facteur de transcription de la famille des basic-leucine-zipper, est un régulateur pléiotrope des mécanismes de survie cellulaire (Owuor and Kong, 2002). En condition physiologique, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par une protéine cytosolique nommée « Kelch-like ECH-associated protein 1 », qui le dirige vers la voie du protéasome par lequel Nrf2 est dégradé. Lors d'un stress oxydant, Nrf2 est libéré de Keap1 et se transloque dans le noyau pour lier son élément de réponse anti-oxydant, activant ainsi l'expression de gène codant pour des protéines anti-inflammatoires et des protéines anti-oxydantes (Jin et al., 2008). Il a ainsi déjà été montré que la voie de signalisation Nrf2 pourrait avoir un rôle bénéfique dans l'inflammation qui se met en place après trauma spinal (Samarghandian et al., 2020).

L'expression totale et nucléaire de Nrf2 a donc été évaluée dans les motoneurones phréniques déafférentés suite à une hémisection en C2. Une réduction significative du niveau d'expression totale et nucléaire de Nrf2 est observée à 1h post-lésion par rapport aux animaux Sham. Celle-ci persiste jusqu'à 3j post-lésion pour l'expression de Nrf2 totale (Figure 39A et B). Le niveau d'expression est à nouveau semblable à celui des animaux Sham dès 1j post-lésion (Figure 39C et D). Aucune différence entre les côtés intact et lésé n'est cependant observée.

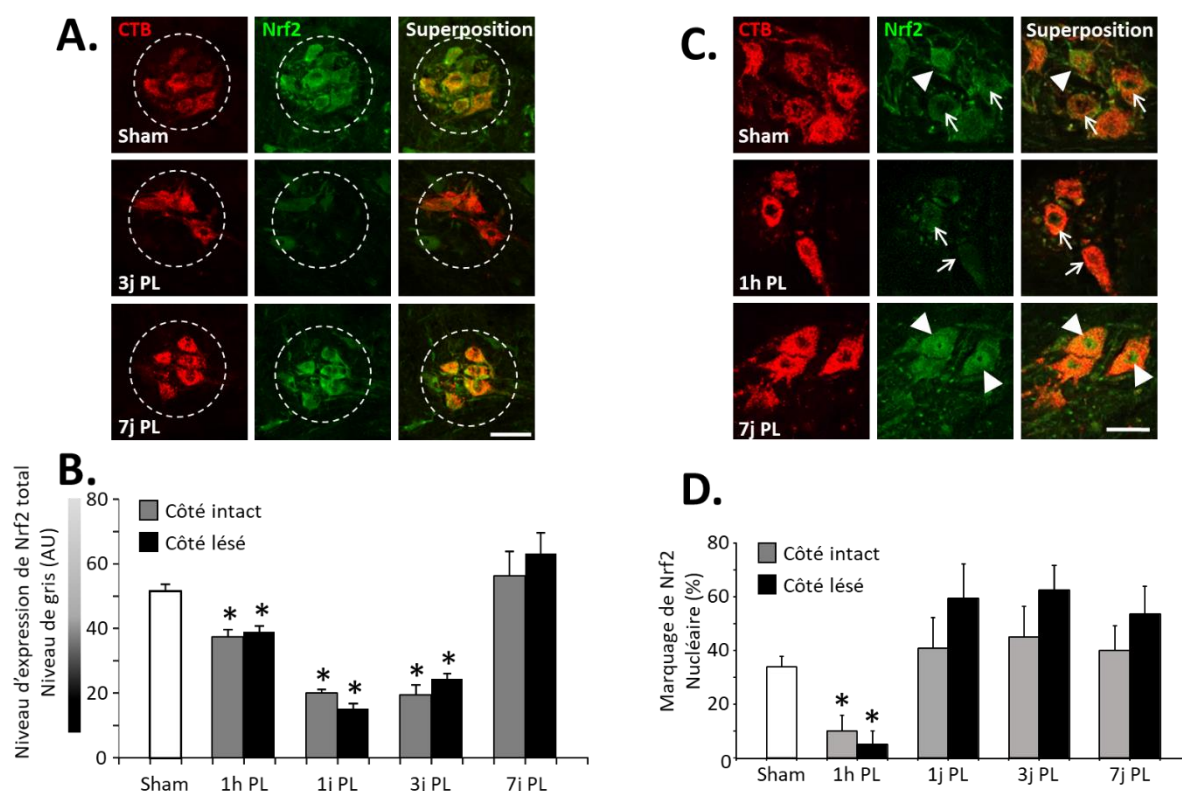


Figure 39 : Expression de Nrf2 dans les motoneurones phréniques déafférentés

Images représentatives montrant en vert le marquage de Nrf2 total (A) ou nucléaire (C), chez les animaux Sham, à 3j post-lésion (PL) ou 1h PL, et 7j PL, dans les motoneurones phréniques déafférentés en rouge, au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière. Les images ont été prises au microscope confocal (X10). La barre blanche d'échelle représente 50µm. La délimitation en pointillés blancs met en évidence les motoneurones phréniques. B) Histogrammes représentant l'expression de marquage en niveau de gris de Nrf2 total. D) Histogrammes représentant l'expression de marquage en niveau de gris de Nrf2 nucléaire. * $p < 0,05$, comparé au groupe Sham, ANOVA à un facteur suivie d'un Fisher LSD ($p < 0,05$).

Ces résultats sont à la fois inattendus et intéressants, car toutes les études précédentes ont montré que Nrf2 est augmenté dans les heures et jours après trauma spinal (Mao et al., 2010; Wang et al., 2012; Pomeshchik et al., 2014). Les résultats présentés peuvent s'expliquer d'une part par la différence de modèle utilisé par rapport à ces différentes études, qui elles utilisent des modèles de contusion (Wang et al., 2012) ou de compression (Mao et al., 2010; Pomeshchik et al., 2014). De plus, ces études ont évalué l'expression de Nrf2 dans toute la moelle épinière après trauma au niveau thoracique, alors que son expression est ici observée spécifiquement dans les motoneurones phréniques après trauma spinal au niveau cervical.

Ainsi, une hémisection spinale en C2 entraîne une diminution précoce et transitoire de l'expression de Nrf2 totale et nucléaire dans les motoneurones phréniques indépendamment de leur déafférentation. Ceci est possiblement dû ici aussi au phénomène de choc spinal, qui entrainerait une

sidération neuronale provoquant une modification brutale de l'homéostasie des motoneurones phrénique, et expliquerait donc la diminution rapide et transitoire de l'expression de Nrf2. Le retour rapide à un niveau basal d'expression de Nrf2 dans le noyau peut se traduire par une translocation de ce dernier au noyau pour assurer ses fonctions de facteur de transcription, pour la transcription de molécules antioxydantes. Ces données sont donc à corrélérer avec la réduction prolongée de Nrf2 totale, qui serait un reflet de la réduction de Nrf2 cytoplasmique, à la fois en raison du choc spinal initial, mais aussi à la translocation de Nrf2 au noyau dans les heures et jours suivant la lésion spinale.

1.3.5. Expression de l'AMPK phosphorylée dans les motoneurones phréniques

J'ai donc poursuivi cette étude par l'évaluation de l'expression de l'AMPK phosphorylée totale (Figure 40A) et nucléaire (Figure 40C) dans les motoneurones phréniques, reflet de l'activité métabolique de ces neurones après trauma spinal. En effet, celle-ci peut être amenée à varier selon l'état homéostatique de la cellule. Dans le cadre de mon modèle d'étude, la lésion axonale d'un neurone central provoque une dérégulation homéostatique de celui-ci. Ainsi, dans les heures suivant la lésion, il y a relargage des vésicules contenant les neurotransmetteurs au niveau de la terminaison synaptique et donc autour des motoneurones qui se retrouvent déafférentés. Ce relargage massif de neurotransmetteurs dans la fente synaptique provoque une suractivation des récepteurs présents sur le neurone postsynaptique cible.

L'excitotoxicité au glutamate peut être causée par différents évènements, dont les axotomies du système nerveux central lors de lésions de la moelle épinière (Hulsebosch, 2002). Donc, dans le cas d'un neurone présynaptique glutamatergique, l'axotomie provoque libération massive de glutamate qui va aller se fixer sur ses récepteurs AMPA, KAÏNATE et NMDA. Ces récepteurs ionotropiques sont tous trois perméables aux cations monovalents (sodium et potassium), ainsi qu'au calcium pour les NMDA et pour certains récepteurs AMPA (selon la composition en sous unités). Une suractivation de ces récepteurs ionotropiques conduit à une forte entrée de calcium dans le neurone postsynaptique, ayant pour conséquence, entre autres, un stress oxydant (Jia et al., 2015).

Plus précisément, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire induit une augmentation de son entrée dans les mitochondries, stimulant ainsi la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela conduit *in fine* à l'augmentation de la production d'espèces dérivées de ROS par la mitochondrie et à leur accumulation dans le corps cellulaire (Gorlach et al., 2015).

Les ROS sont des radicaux libres faisant partie des molécules oxydantes responsables du stress oxydant ayant pour conséquences de provoquer des dommages cellulaires. En effet, ce stress oxydant résulte d'un dysfonctionnement de la balance entre les molécules oxydantes et antioxydantes présentes dans la cellule (Deramautd et al., 2013). Afin de faire face à ce stress cellulaire, il y a alors

augmentation de la production d'antioxydants dans la cellule. Cette augmentation passerait par la modulation de l'AMPK (Shah et al., 2016).

Dans le cas présent, une diminution significative de l'intensité du marquage de l'AMPK phosphorylée totale (Figure 40B) et nucléaire (Figure 40D) est observée à 1h post-lésion par rapport au animaux Sham. A partir de 1j post-lésion, son niveau d'expression est revenu à un niveau relativement similaire à celui des animaux Sham pour l'AMPK phosphorylée totale. En ce qui concerne l'AMPK phosphorylée nucléaire, un retour graduel est plutôt observé.

Comme indiqué précédemment, la lésion initiale induit un choc spinal (Ditunno et al., 2004), qui pourrait donc ici aussi expliquer la diminution de l'expression de l'AMPK phosphorylée à 1h post-lésion.

De plus, la surface occupée par les cellules participant à la réaction inflammatoire, notamment la microglie, augmente autour des motoneurones phréniques suite à une lésion spinale cervicale (C2) à partir de 1j post-lésion, (Windelborn and Mitchell, 2012). De même, une augmentation du nombre d'astrocytes est observée à partir de 3j post-lésion (Windelborn and Mitchell, 2012). La microglie faisant parti du système immunitaire, et les astrocytes ayant un rôle dans le support et la protection des neurones à l'excitotoxicité au glutamate (Li et al., 2014), leur augmentation autour des motoneurones phréniques peut laisser supposer que ces cellules auraient pour rôle d'aider les motoneurones à retrouver un état homéostasique normal en repompant et en dégradant l'excédent de glutamate du milieu extracellulaire. Ainsi, il pourrait y avoir un lien entre l'inflammation présente autour des motoneurones phréniques caractérisée par la présence de cellules gliales et immunitaires, et l'augmentation de l'expression de l'AMPK phosphorylée observée dans cette étude.

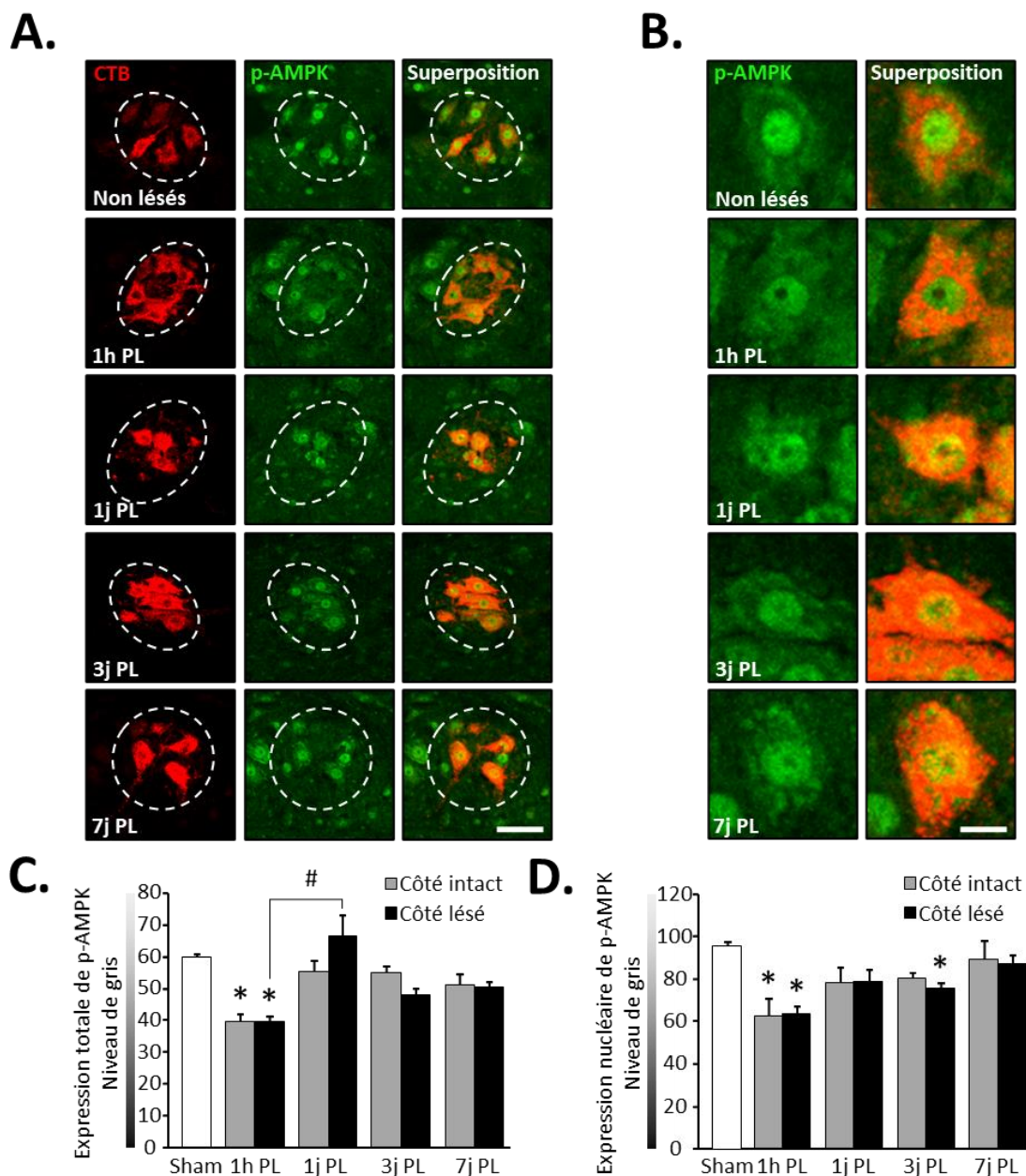


Figure 40 : Expression de l'intensité du marquage p-AMPK dans les motoneurones phréniques

A) Images d'immunohistochimie montrant le marquage des motoneurones phréniques en rouge, et le marquage de l'AMPK phosphorylée en vert. La superposition des deux marquages met en évidence la présence de p-AMPK dans les motoneurones phréniques. Les images ont été prises au microscope confocal (X20). La délimitation en pointillés blancs met en évidence la région où sont localisés les motoneurones phréniques. Echelle = 100µm. B) Grossissement par x4 de motoneurones phréniques montrés en A. Echelle = 25µm. C) Histogramme représentant l'intensité du marquage p-AMPK total dans les motoneurones phréniques en fonction des différents groupes d'animaux. D) Histogramme représentant l'intensité du marquage p-AMPK nucléaire dans les motoneurones phréniques en fonction des différents groupes d'animaux. # : p<0,05 par rapport aux 1h P.L. * : p<0,05 par rapport aux animaux Sham. Les différences ont été mises en évidence par une ANOVA suivi d'un test de Bonferroni.

1.3.6. Discussion

Ces résultats montrent donc qu'une hémisection spinale cervicale en C2 engendre une augmentation de l'inflammation autour des motoneurones phréniques en raison de la démyélinisation et de la dégénérescence axonale induites par la lésion. Cette inflammation est caractérisée par une infiltration de macrophages CD68 positifs ainsi que par l'activation de cellules CD11B positives parmi lesquelles comptent les cellules microgliales. Une augmentation du stress oxydatif dans les motoneurones phréniques, caractérisée par une augmentation de l'expression de iNOS et de la NADPH-oxydase, ainsi que la mise en place de processus anti-oxydants, caractérisée par une diminution transitoire de l'expression totale et nucléaire de Nrf2, sont aussi observées.

Mon étude sur l'AMPK s'inscrit donc dans la continuité de celle commencée par mon équipe d'accueil et a pour objectif de faire le lien entre lésion spinale, inflammation, et la variation de l'expression de la protéine Nrf2 dans les motoneurones phréniques.

Il a déjà été démontré que l'AMPK serait capable de phosphoryler Nrf2, entraînant l'augmentation de son accumulation dans le noyau, ce qui suggère une interaction directe entre l'AMPK phosphorylée et Nrf2 (Joo et al., 2016). De plus, dans le cadre d'une excitotoxicité au glutamate provoquée par une injection cérébrale de glutamate, l'activation de l'AMPK engendrerait une diminution de l'expression totale de Nrf2, sans information sur l'expression de Nrf2 nucléaire (Shah et al., 2016). Ces informations, suggèrent donc que l'hémisection spinale cervicale provoque une déafférentation des motoneurones phréniques, accompagnée d'une excitotoxicité au glutamate au niveau des motoneurones en raison de l'axotomie des neurones lésés. Il s'en suivrait une entrée massive de calcium, suivie par une augmentation du stress oxydatif (production de ROS par iNOS et la NADPH-oxydase entre autres), ainsi qu'une augmentation de l'activation de l'AMPK par phosphorylation. L'AMPK phosphorylée phosphorylerait à son tour Nrf2, facilitant ainsi son accumulation nucléaire (Joo et al., 2016). Elle provoquerait par ailleurs, une diminution de l'expression totale de Nrf2 dans les motoneurones phréniques (Shah et al., 2016). L'augmentation de l'activité des enzymes produisant des ROS peut néanmoins aussi s'expliquer en partie par le fait que les motoneurones déafférentés perdent leur afférences excitatrices, mais aussi inhibitrices, ce qui induit une dérégulation de l'homéostasie cellulaire et participe donc au stress cellulaire observé.

En ce qui concerne les motoneurones contralatéraux, ils doivent quant à eux compenser pour la perte d'activité des motoneurones déafférentés immédiatement après la lésion spinale. Leur activité cellulaire doit donc s'adapter, et leur homéostasie s'en trouve aussi modifiée, induisant l'expression de ces ROS caractérisée par une augmentation de l'expression de iNOS et de la NADPH-oxydase. Il s'en suit alors les mêmes phénomènes que dans les motoneurones déafférentés pour l'expression de l'AMPK phosphorylée et Nrf2.

De plus, une ischémie transitoire se met en place dans les heures suivant la lésion (Watson and Yeung, 2011). Cela a pour conséquence une réduction de l'apport en oxygène et en glucose dans les cellules normalement vascularisées. Cette réduction de l'apport en glucose dans les motoneurones phréniques pourrait donc engendrer une diminution de la production d'ATP et ainsi contribuer au retour à une expression basale de l'AMPK phosphorylée dans les motoneurones phréniques déafférentés ou non.

Pour conclure, mes résultats concernant l'AMPK phosphorylée totale sont en corrélation avec les résultats obtenus pour la modulation de l'expression de Nrf2 suite à un trauma spinal, et avec les données issues de la littérature. Ainsi, l'augmentation de l'expression de l'AMPK phosphorylée totale participerait à l'augmentation de l'expression nucléaire de Nrf2 à 1h post-lésion spinale, permettant une amplification de la réponse antioxydante (Figure 41).

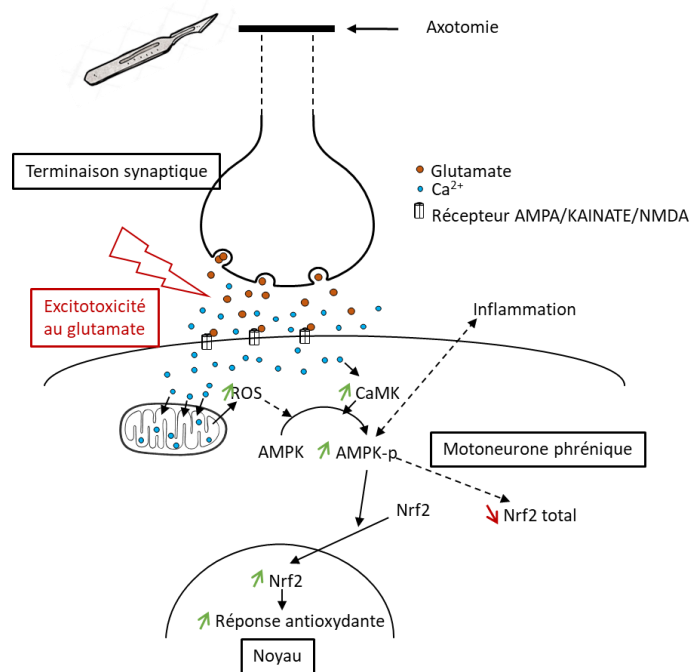


Figure 41 : Schéma récapitulatif de l'effet d'une axotomie suite à une lésion spinale sur la modulation de l'AMPK phosphorylée.

L'axotomie engendrée par la lésion spinale provoque un relargage massif de glutamate dans la fente synaptique, provoquant une excitotoxicité au glutamate. Le glutamate se fixe sur ses récepteurs postsynaptiques qui sont ionotropiques. Il y a alors entrée massive de calcium dans le motoneurone phrénique. La concentration élevée en calcium intracellulaire provoque une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc une augmentation de la production de ROS par les mitochondries. Les ROS vont provoquer un stress cellulaire qui va être détecté par l'AMPK. Il y a alors activation de l'AMPK par phosphorylation. Ce phénomène est amplifié par la CaMK dont l'activité est directement liée à la concentration en calcium intracellulaire. La p-AMPK induit une augmentation de la translocation de Nrf2 dans le noyau, permettant une augmentation de la réponse antioxydante. Flèche pleine : effet direct. Flèche en pointillé : effet indirect, passant par d'autres intermédiaires.

2. Effet neuromodulateur de la stimulation transcrânienne répétée chez le rat après trauma spinal cervical

2.1. Modulation de l'excitabilité du réseau phrénique par l'application d'un protocole aigu de stimulation magnétique transcrânienne répétée chez le rat sain

Publication: High frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation promotes long lasting phrenic motoneuron excitability via GABAergic networks. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 292 (2021) 103704

La stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS) est une thérapie non-invasive utilisée couramment en clinique. L'efficacité de la rTMS a été démontrée dans le traitement des troubles psychiatriques et de la douleur neuropathique via une neuromodulation des circuits neuronaux affectés. Cependant, les mécanismes et les circuits neuronaux spécifiques impliqués dans les effets fonctionnels induits par la rTMS restent peu documentés.

Cette étude a eu pour but d'essayer de préciser les mécanismes par lesquels la rTMS agit sur les circuits neuronaux existants. Le circuit phrénique a été utilisé comme modèle d'étude, celui-ci étant relativement bien documenté. Nous avons ici émis l'hypothèse selon laquelle la rTMS peut être utilisée pour augmenter l'excitabilité des motoneurons phréniques chez des rats Sprague Dawley anesthésiés. Plusieurs protocoles de rTMS aiguë ont été utilisés. Le protocole de rTMS à 10 Hz s'est révélé être celui permettant l'induction d'une augmentation robuste et durable de l'excitabilité des motoneurons phréniques. Cette variation d'excitabilité a été évaluée fonctionnellement par l'analyse des potentiels évoqués moteurs du diaphragme. Une analyse plus approfondie nous a permis de discriminer des sous-groupes « répondeurs » et « non-répondeurs » parmi les animaux traités par rTMS à 10 Hz. De plus, nos résultats suggèrent que l'augmentation d'excitabilité phrénique induite par la rTMS à 10 Hz passerait par une levée de l'inhibition GABAergique sur le système phrénique.

Ces données démontrent qu'un unique protocole de rTMS à haute fréquence permet d'augmenter l'excitabilité des motoneurons phréniques. Cette preuve de principe nous laisse donc penser que le potentiel thérapeutique neuromodulateur de la rTMS pourrait être utilisé pour favoriser la récupération fonctionnelle dans des pathologies neurales ou suite à un trauma du système nerveux central.



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol

High frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation promotes long lasting phrenic motoneuron excitability *via* GABAergic networks

Pauline Michel-Flutot^a, Lyandysha V. Zholudeva^b, Margo L. Randelman^c,
Therese B. Deramaut^a, Arnaud Mansart^d, Jean-Claude Alvarez^d, Kun-Ze Lee^e,
Michel Petitjean^{f,g,h}, Marcel Bonay^a, Michael A. Lane^c, Stéphane Vinit^{a,*}

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

^b Gladstone Institutes, San Francisco, CA, USA

^c Marion Murray Spinal Cord Research Center, Department of Neurobiology and Anatomy Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA

^d Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et Inflammation (2I), 78000, Versailles, France

^e Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan

^f Université Paris-Saclay CIAMS, 91405, Orsay, France

^g CIAMS, Université d'Orléans, 45067, Orléans, France

^h Service d'Explorations Fonctionnelles bi-site, Hôpital Antoine Bèclère, 92140, Clamart, France

ARTICLE INFO

Edited by M. Dutschmann

Keywords:

rTMS

Preclinical model

Motoneuron excitability

GABAergic modulation

ABSTRACT

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a promising, innovative, and non-invasive therapy used clinically. Efficacy of rTMS has been demonstrated to ameliorate psychiatric disorders and neuropathic pain through neuromodulation of affected neural circuits. However, little is known about the mechanisms and the specific neural circuits *via* which rTMS facilitates these functional effects. The aim of this study was to begin revealing the mechanisms by which rTMS may tap into existing neural circuits, by using a well characterized spinal motor circuit – the phrenic circuit. Here we hypothesized that rTMS can be used to enhance phrenic motoneuron excitability in anesthetized Sprague Dawley rats. Multiple acute rTMS protocols were used revealing 10 Hz rTMS protocol induced a robust, long-lasting increase in phrenic motoneuron excitability, functionally evaluated by diaphragm motor evoked potentials (59.1 ± 21.1 % of increase compared to baseline 60 min after 10 Hz protocol against 6.0 ± 5.8 % ($p = 0.007$) for Time Control, -5.8 ± 7.4 % ($p < 0.001$) for 3 Hz, and 5.2 ± 12.5 % ($p = 0.008$) for 30 Hz protocols). A deeper analyze allowed to discriminate “responder” and “non-responder” subgroups among 10 Hz rTMS treated animals. Intravenous injections of GABA_A and GABA_B receptor agonists prior to 10 Hz rTMS treatment, abolished the enhanced phrenic motoneuron excitability, suggesting GABAergic input plays a mechanistic role in rTMS-induced phrenic excitability. These data demonstrate that a single high frequency rTMS protocol at 10 Hz increases phrenic motoneuron excitability, mediated by a local GABAergic “disinhibition”. By understanding how rTMS can be used to affect neural circuits non-invasively we can begin to harness the therapeutic potential of this neuromodulatory strategy to promote recovery after disease or injury to the central nervous system.

1. Introduction

One of the major challenges in the medical community is to develop reliable, non-invasive, and painless therapeutics for treating neurological disorders. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) is a promising therapeutic already implemented in the clinic to treat many disorders including depression (Jassova et al., 2019; Martin et al., 2017; McClintock et al., 2018), stroke (Sebastianelli et al., 2017) or

post-traumatic stress disorder (Kozel, 2018; Yan et al., 2017). High frequency rTMS, delivered below the motor threshold has also been shown to induce long lasting neuromodulatory behavioral effects (Ziemann et al., 2008). Apart from using high frequency rTMS as a therapeutic, a single pulse of TMS delivered above the motor threshold on the primary cortical areas has been used to evaluate muscle function by recording specific motor evoked potentials (MEP) in humans (Petrosyan et al., 2017), including diaphragmatic MEP (MEP_{dia}) during stimulation

* Corresponding author.

E-mail address: stephane.vinit@uvsq.fr (S. Vinit).

<https://doi.org/10.1016/j.resphysiol.2021.103704>

Received 17 December 2020; Received in revised form 17 May 2021; Accepted 25 May 2021

Available online 28 May 2021

1569-9048/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

of diaphragm motor cortex (Davey et al., 1996; Khedr and Trakhan, 2001; Lissens, 1994; Maskill et al., 1991; Mehiri et al., 2006; Sharshar et al., 2003). Despite these beneficial effects, little is known about how rTMS or single pulse TMS results in these neurological outcomes.

We have previously used a preclinical model of respiratory neurobiology to explore the effects of TMS on the phrenic motor circuit (Vinit et al., 2016). The phrenic motoneuron pool located within the spinal cord (cervical segments C3-C6) is innervated by supraspinal connections from cortical and brainstem neurons in human (Gandevia and Rothwell, 1987; Maskill et al., 1991), cat (Lipski et al., 1986) and rat (Alexandrov et al., 2007). The spinal phrenic network (moto- and interneurons) receives excitatory and inhibitory input from supraspinal and spinal interneurons, which can directly modulate phrenic motor output and diaphragm activity (Lane et al., 2008; Tian et al., 1998; Zholudeva et al., 2018). The neurorespiratory circuit is well known for being sensitive to neuromodulation, which can be elicited by a variety of factors including injury, hypoxia, hypercapnia or even stress (Mitchell and Johnson, 2003; Richard et al., 2013). Using a human-adapted figure-of-eight coil in naive and cervical spinal cord-injured Sprague Dawley rats, we demonstrated that a single pulse of TMS through the skull results in neuronal depolarization within cortical and subcortical areas (Vinit et al., 2016, 2014). The elicited action potential volleys propagate through corticospinal pathways to several muscles, including the diaphragm.

The neuromodulating effects of rTMS depends on stimulation frequency, number of pulses and intensity. Traditionally, low-frequency rTMS protocols (≤ 5 Hz) induce a reduction in excitability (long-term depression-like effect) (Trippe et al., 2009) whereas high-frequency protocols (≥ 10 Hz) lead to an increase in neuronal excitability (long-term potentiation-like effect) (Hoogendam et al., 2010; Tang et al., 2017), the latter being of high interest for enhancing neuroplasticity. However, only a few studies have tried to decipher the molecular effect of high frequency rTMS protocols. In fact, 10 Hz rTMS has proven to attenuate inhibitory neuron activity and decrease inhibitory synaptic strength. This effect was accompanied by a destabilization of gephyrin clusters (scaffolding protein that bind to ionotropic γ -aminobutyric acid (GABA) receptor) *in vitro* and this observation was validated *in vivo* in anesthetized mice (Lenz et al., 2016). Taken together, molecular studies on rTMS show that a 10 Hz rTMS modifies the excitation/inhibition balance which leads to a “local disinhibition”, and increased excitability (Lenz and Vlachos, 2016). Interestingly, theta burst stimulation (TBS) protocols also induce a decrease of activity markers in excitatory and inhibitory neurons whereas synaptic activity markers increased following repeated stimulation (Volz et al., 2013), and this magnetic stimulating protocol can modulate the activity of some classes of inhibitory cells in rats (Benali et al., 2011).

The present work tests several rTMS protocols *in vivo* in naive Sprague Dawley rats in their potential for increasing phrenic motoneuron excitability and investigates the role of GABAergic networks within this neuromodulatory pathway. Increasing the neurorespiratory excitability with an adequate rTMS protocol could be used as a therapeutic to improve ventilation in breathing disorders such as respiratory deficits caused by cervical spinal cord injury.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

Experiments reported in this manuscript were performed at two institutions, adhering to their respective policies. Adult female, Sprague-Dawley rats (Envigo; $n = 6$, 250–280 g) were used for neuroanatomical tracing, adhering to policies laid out by the National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Drexel University (USA). Animals were housed in groups of three, with access to food and water *ad libitum* on a 12-h light/dark cycle. Adult

Sprague-Dawley male rats (Janvier, France; $n = 55$, 350–450 g) were used for transcranial magnetic stimulation experiments, approved by the Ethics Committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and complied with the French and European laws (EU Directive 2010/63/EU) regarding animal experimentation (Apafis #2017111516297308_v3). The animals were dual 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.

2.2. Transcranial magnetic stimulation (TMS)

TMS was performed using the magnetic stimulator MAGPRO R30 (Magventure, Farum, Denmark) connected to a figure-of-eight coil (Cool-B65) delivering a unique biphasic pulse with an intensity of the stimulus expressed as a percentage of maximum output of the stimulator (% MO). The MO was set at 90 %, and the center of the coil was placed at 6 mm caudal to Bregma, above the animal’s skull. This position and the MO have been shown to always elicit a specific diaphragmatic Motor Evoked Potential (MEP_{dia}) from supraspinal stimulation, as we previously published (Vinit et al., 2014). In total, each animal received no more than 100 single pulses of TMS with an interpulse duration above 15 s to avoid low frequency repetitive TMS-like effects. This protocol was used to elicit specific MEP_{dia} in order to evaluate the excitability of the phrenic motor circuit.

2.3. Acute repetitive TMS (rTMS) protocols

rTMS protocols were also applied in anesthetized animals, at -6 mm caudal to Bregma. They consisted of 9 trains of 100 biphasic pulses (900 stimulations per protocol) at 3 different frequencies [low frequency (3 Hz), high frequency (10 Hz) and very high frequency (30 Hz)]. Each train was separated by 30 s intervals delivered at 50 % of MO [below the motor threshold, as we previously published (Vinit et al., 2014)]. Control animals received a sham rTMS protocol (e.g. no stimulation), with total duration the same as rTMS treated animals.

2.4. GABA agonist administration

To investigate the role of the GABAergic system in plasticity elicited by rTMS, two GABA receptor agonists were used in this study: 0.05 mg of Clonazepam (Rivotril), a GABA_A receptor agonist delivered at 1 mg/ml as a single intravenous injection, and 0.3 mg of Baclofen (BACLOFENE AGUETTANT), a GABA_B receptor agonist delivered at 2 mg/ml as a single intravenous injection. Blood samples (1 mL) were drawn 5 min after agonist injection, but prior to rTMS, and at the end of each experiment (60 min after rTMS) to evaluate plasma concentration of agonists throughout the experiment. Blood samples in heparin tubes were centrifuged for 5 min at 0.8 x g (room temperature). The plasma was collected (around 400 μ L per sample) and stored at -80 °C for further analysis of drug dose.

Baclofen and Clonazepam were quantified in rat plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS TSQ Endura, ThermoFischer Scientific, Les Ulis, France) derived from a method previously published (Imbert et al., 2015) using baclofen-D4 and alprazolam-D5 as internal standard (IS), respectively. Briefly, 10 μ L of IS and 100 μ L of a mixture of methanol/H₂O (70/30, v/v) was added to 50 μ L of plasma. After agitation and centrifugation, supernatant was directly injected in the chromatogram. Data were collected in selected reaction monitoring mode using the transition m/z 214.1 \rightarrow m/z 151.1 and m/z 218.1 \rightarrow m/z 154.1 for baclofen and its IS, and m/z 316.1 \rightarrow m/z 270.1 and m/z 314.5 \rightarrow m/z 286.2 for clonazepam and its IS. Intra and inter-day precisions of the method were below 12.7 % and accuracy between 95 % and 107 %. Limits of quantification were 20 ng/ml and 5 ng/ml for baclofen and clonazepam, respectively.

2.5. Electrophysiological recordings

55 animals were used for electrophysiological recordings. They were randomly divided into 8 groups: Sham rTMS (n = 6), 3 Hz rTMS (n = 5), 10 Hz rTMS (n = 22), 30 Hz rTMS (n = 6), Sham rTMS + Clonazepam (n = 3), Sham rTMS + Baclofen (n = 3), 10 Hz rTMS + Clonazepam (n = 4) and 10 Hz rTMS + Baclofen (n = 6). Electrophysiological recordings of diaphragm activity were used to functionally evaluate the effects of rTMS on the phrenic motor circuit. Briefly, anesthesia was induced using isoflurane (5% in 21 % O₂ balanced) in an anesthesia chamber and maintained through a nose cone (2.5 % in 100 % air balanced). A 25 G catheter was placed into the tail vein and the animals were tracheotomized and pump ventilated (Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). The ventilation rate (frequency > 72 breaths per minute, tidal volume: 2.5 ml/2.5 mL) was adjusted to reduce the end-tidal CO₂ value below the animals' central apneic threshold throughout the experiment to avoid recording spontaneous diaphragm contractions. During the recordings, animals were placed on a heating pad to maintain a constant body temperature (37.5 ± 0.5 °C) and their rectal temperature was continuously monitored throughout the experiment. Arterial pressure was measured through a catheter inserted into the right femoral artery. Arterial and tracheal pressures were monitored continuously with transducers connected to a bridge amplifier (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). Isoflurane anesthesia was then slowly converted to urethane anesthesia (1.8 g/kg, i.v.; Sigma-Aldrich). The depth of anesthesia was confirmed by the absence of response to toe pinch. A laparotomy was performed, and the liver was gently moved caudally to access the diaphragm. Gauze soaked with warm phosphate-buffered saline was placed on the liver to prevent dehydration. The head of the animal was placed on a non-magnetic custom-made stereotaxic apparatus which allowed its positioning from the center of the figure-of-eight coil to -6 mm from Bregma, at an angle of 0°, as previously described (Vinit et al., 2014). Two custom-made hooked bipolar electrodes were placed on each mid-costal part of the diaphragm and left in place for the entire duration of the experiment. MEPdia induced by a single pulse of TMS was recorded (summation of 5–10 TMS pulses between 2 heart beats, max 10 trials at 90 % of MO). Then rTMS (3, 10 or 30 Hz at 50 % MO) protocol or Sham rTMS (i.e. same duration without stimulation) was applied and MEPdia was recorded at 1, 10, 20, 40 and 60 min post-rTMS (with a summation of 10 pulses of TMS at 90 % MO). Recipients of GABA agonists received MEPdia recording before and 5 min after the injection (just prior to rTMS protocol). These electromyographic signals were amplified (gain, 1k; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100 Hz to 10 kHz). The signals were then digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 100 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 8 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand).

2.6. Neuroanatomical tracing

A retrograde, transynaptic viral tracing technique (pseudorabies virus, PRV) was used to label the phrenic motor circuit in naïve, Sprague Dawley rats as previously described (Lane et al., 2008). Briefly, animals were anesthetized with isoflurane (4% induction, 2% maintenance in 100 % O₂), ventral side shaved and sterilized with alternating wipes of ethanol and betadine prior to a laparotomy to expose the diaphragm. PRV was then topically applied to the left hemi-diaphragm (50 µL). Overlying muscle was sutured, skin was closed with wound clips and analgesic (Buprenorphine, 0.025 mg/kg s.q.) and Lactated Ringers (5 mL, s.q.) were given post operatively. Animals were sacrificed 72 h after PRV tracing by an overdose of Beuthanasia-D Solution, and transcardially perfused with ice-cold physiological saline (0.9 % NaCl in water) followed by ice-cold paraformaldehyde (PFA, 4% w/v in 0.1 M PBS, pH 7.4). The brain and spinal cord were dissected and post-fixed in 4% PFA until further processing. The PRV recombinant used in this

study (PRV614, 1 × 10⁸ pfu) was provided by Dr. David Bloom (University of Florida). Primary antibodies (polyclonal rabbit) to PRV were generously donated by Dr. Lyn Enquist (Princeton University).

2.7. Immunohistochemistry

Spinal cord tissue spanning caudal brainstem to beginning of thoracic spinal cord (T1) was blocked and cryoprotected (15 % then 30 % sucrose w/v in PBS, overnight), and sectioned (horizontal, on-slide 30 µm). Sections were rehydrated in 0.1 M PBS for 15 min and blocked against endogenous peroxidase activity (30 % methanol, 0.6 % hydrogen peroxide in 0.1 M PBS) for 1 h at room temperature. Sections were then washed for 15 min in 0.1 M PBS and blocked against non-specific protein labeling (10 % normal donkey serum in 0.1 M PBS with 0.02 % Triton-X) for 1 h at room temperature. Primary antibodies (Table 1) were applied to tissue in blocking solution overnight at room temperature. The following day, tissues were washed for 15 min (3 × 5 min of 0.1 M PBS) prior to application of secondary antibodies (Table 1) in blocking solution for 2 h at room temperature. Stained sections were then washed for 15 min (3 × 5 min of 0.1 M PBS), allowed to dry, and cover-slipped with fluorescence mounting medium (Fluoromount-G, SouthernBiotech). Sections were imaged using a Zeiss AxioImager microscope with Apotome 2 and digital camera (Zeiss AxioCam MRm) attached to a Dell PC.

2.8. Data processing and statistical analyses

Diaphragm electromyography traces for each side (at least 5 MEPdia) were averaged and superimposed using LabChart Pro software (AD Instruments) prior to, 1, 10, 20, 40 and 60 min post-rTMS treatment. The baseline-to-peak amplitude of the first wave of each superimposed MEPdia was calculated. The mean arterial pressure (MAP) for each time point was also evaluated. Two-way ANOVA (Fisher LSD Method for multiple comparisons) was used to compare MEPdia throughout the experiment and between different rTMS protocols. To compare GABA agonist recipients, a Student's paired *t*-test or a Wilcoxon *t*-test was used to compare MEPdia amplitude and MAP before and after delivery of agonists to determine statistical differences between animals, over duration of the experiment.

An exponential regression was used on the MEPdia data collected from animals stimulated with 10 Hz rTMS to evaluate the percent of animals that responded to the rTMS treatment compared to Sham rTMS. Regression coefficient R² was calculated. These groups have been designed by comparing the 10 Hz treated animals' individual percentage of variation MEPdia values with the Mean percentage of variation MEPdia of the Sham rTMS group ± a given Standard Deviation (SD) at 60 min post-rTMS. Calculation of the given SD that can be considered as the threshold from "non-responder" to "responder" used Chebyshev's

Table 1
List of Primary and Secondary Antibodies.

Primary Antibodies				
Antigen	Host	Concentration	Manufacturer	Cat Number
GABA A Receptor alpha 1	Rabbit	1:750	Abcam	ab33299
GABA B Receptor 2	Rabbit	1:750	Abcam	ab75838
PRV	Goat	1:10000	courtesy of Lynn Enquist, Princeton University	
Secondary Antibodies				
Rabbit - AF488	Donkey	1:400	ThermoFischer Scientific	A-21206
Goat - AF594	Donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch	705-585-003

Theorem applied to the Sham rTMS population. According to this theorem, at least 75 % of the Sham rTMS group values are between the mean \pm 2SD. In the present study, all the Sham rTMS values lay between Mean \pm 2SD, giving the guarantee that 10 Hz group values, which are above this threshold of Sham rTMS Mean \pm 2SD, do not overlap with Sham rTMS group values. Thus, 10 Hz treated rats presenting values above this threshold are considered as “responder” to this treatment, whereas others below the threshold are considered as “non-responders”. For evaluating the significant effect of rTMS treatment on MEPdia percentage variation at 60 min compared to baseline, a Kruskal-Wallis One-way ANOVA (Dunn’s Method) was performed.

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. rTMS results in increased excitability of diaphragm muscle

A single pulse of TMS delivered above the motor threshold (90 % of MO) ~6 mm above the Bregma always induces a MEPdia that can be recorded by electrodes implanted into the diaphragm for each animal

(Fig. 1A, B). All values taken before rTMS treatment were normalized to the baseline. Then the percentage of variation for each group at each time post-rTMS was evaluated. No significant differences in MEPdia amplitude were detected between Sham rTMS, 3 Hz, 10 Hz and 30 Hz groups at 1 min, 10 min, 20 min and 40 min post-rTMS. However, the 10 Hz treated group presented a significant increase in MEPdia amplitude compared to Sham rTMS, 3 Hz and 30 Hz groups at 60 min post-stimulation (Fig. 1C). There were no differences in MEPdia amplitude during the 60 min post-rTMS in any of the other groups (Sham rTMS, 3 Hz and 30 Hz). Interestingly, the 10 Hz group presented a significant increase in MEPdia amplitude at 40 min compared to 1 min post-rTMS ($p = 0.014$), and at 60 min compared to 1 ($p < 0.001$), 10 ($p = 0.003$) and 20 ($p = 0.025$) min post-rTMS (Fig. 1C).

3.2. Responders and non-responders to 10 Hz rTMS

To evaluate the heterogeneity in phrenic excitability elicited by 10 Hz rTMS, raw MEPdia amplitudes 60 min post-sham and 10 Hz rTMS were plotted and compared to baseline (Fig. 2A). These data revealed a significant increase in MEPdia 60 min post-10 Hz rTMS, compared to baseline, but the increase was not observed in all 10 Hz rTMS animals. A regression analysis was then conducted on individual 10 Hz rTMS data

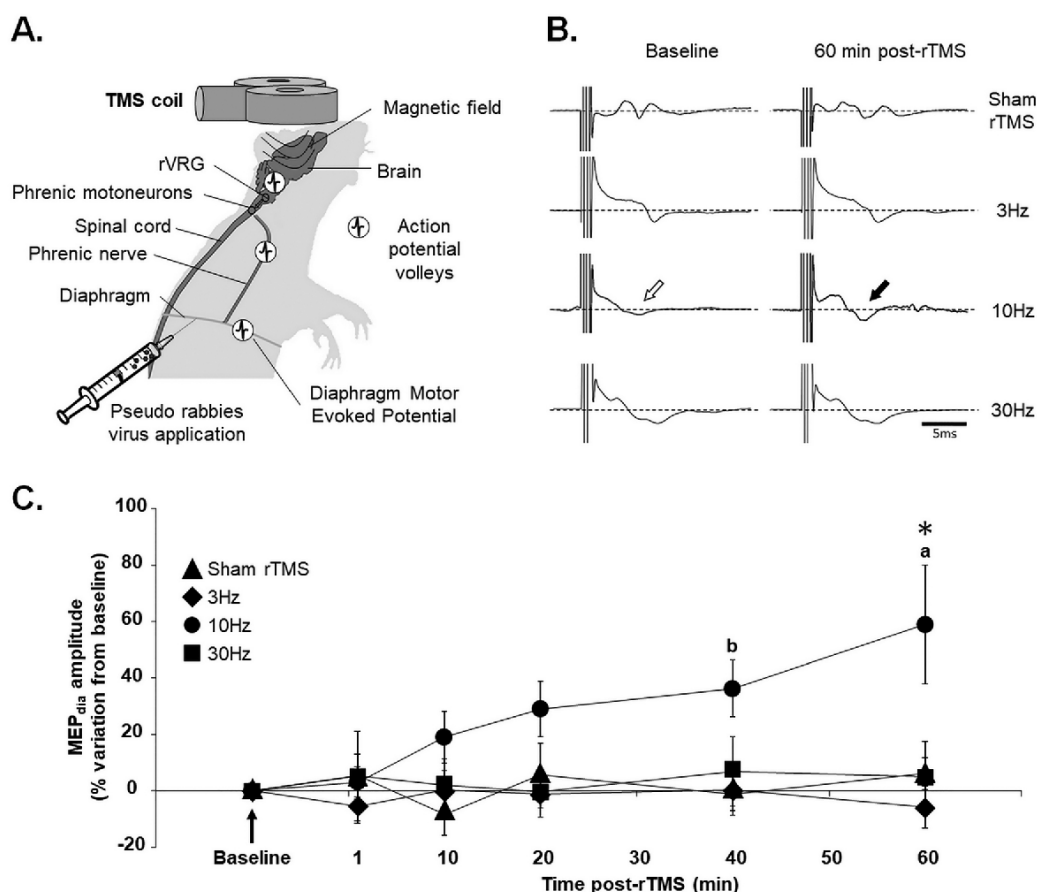


Fig. 1. Effect of different rTMS protocols on phrenic motoneuron excitability.

(A) Schematic of magnetic coil used for Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) positioned over the rat’s head. The proposed descending pathways that are stimulated are represented with action potential volleys. Pseudorabies virus is applied to the diaphragm for retrograde labeling of phrenic motor network. (B) Representative diaphragmatic motor evoked potentials (MEPdia) recordings before and 60 min after 3 Hz, 10 Hz and 30 Hz rTMS or Sham rTMS. The white arrow shows the MEPdia at baseline, the black arrow indicates the increase in MEPdia response, corresponding to an increase in phrenic motoneuron excitability. (C) Time course showing the evolution of the percentage of MEPdia compared to baseline values following Sham, 3 Hz, 10 Hz or 30 Hz rTMS treatment. * $p < 0.01$ compared to Sham rTMS, 3 Hz and 30 Hz groups; a $p < 0.05$ compared to 1, 10 and 20 min post-rTMS; b $p < 0.05$ compared to 1 min post-rTMS (Two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test).

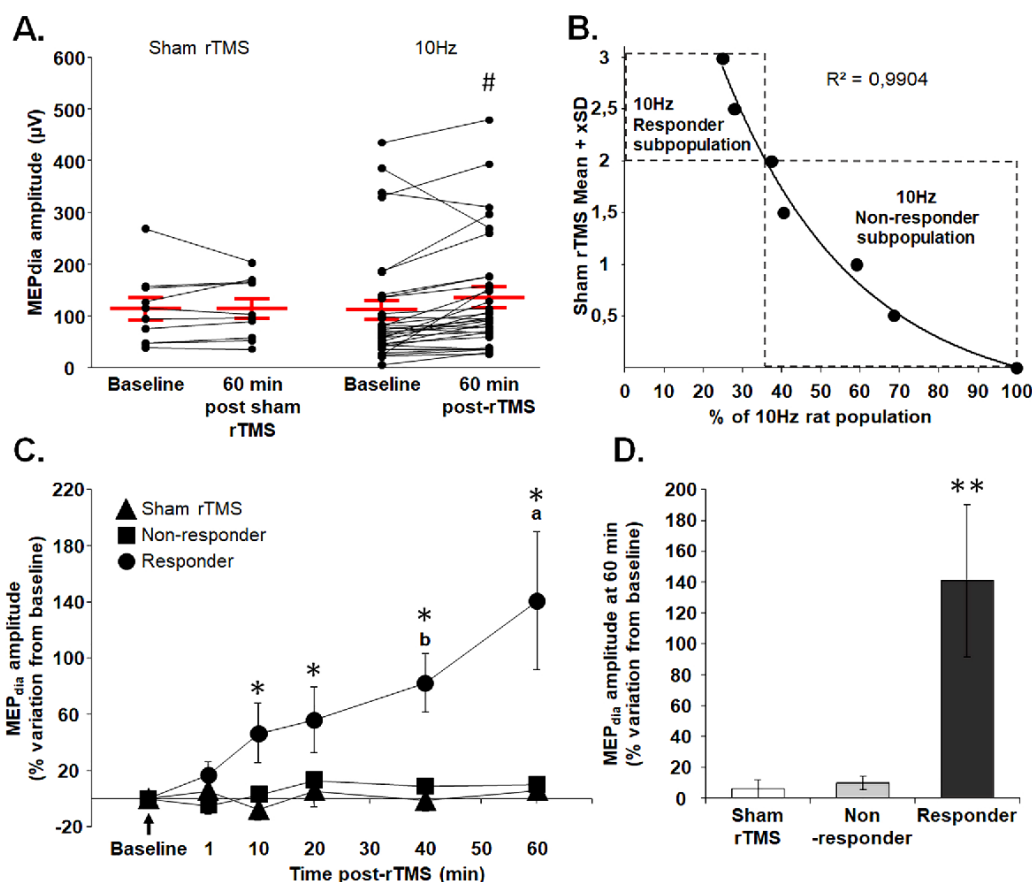


Fig. 2. Meta-analysis of 10 Hz rTMS treated animals resulted in statistical separation of “responder” and “non-responder” subpopulations. (A) Diaphragm motor evoked potential (MEP_{dia}) amplitude before and 60 min following Sham and 10 Hz rTMS treatment groups. (B) Exponential regression of 10 Hz rTMS treated group statistically separated into 2 subpopulations (“Responder” and “Non-responder”) based on the Mean + Standard Deviation (SD) values of the Sham rTMS group. Each dot represents the percent of animals considered as “Responder” for Mean + given SD. The threshold for discriminating the two populations was set at Sham rTMS Mean + 2SD. (C) Time-course of percent change in MEP_{dia} amplitude following indicated protocols compared to baseline, with 10 Hz rTMS separated into Responder and Non-responder groups. (D) Percent change in MEP_{dia} amplitude at 60 min post-rTMS for Sham, Non-responder and Responder 10 Hz rTMS groups. # $p < 0.001$ compared to baseline (Wilcoxon t -test); * $p < 0.05$ compared to Sham rTMS and Non-responder groups; a $p < 0.01$ compared to 1, 10, 20 and 40 min post-rTMS; b $p < 0.005$ compared to 1 min post-rTMS (Two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test); ** $p < 0.05$ compared to Sham rTMS and Non-responder groups (Kruskal-Wallis One-way ANOVA (Dunn’s Method)).

points, revealing a statistical separation of animals with rTMS-mediated increase in MEP_{dia} at least by 2 standard deviations (e.g. at least 40.68 % higher than Sham rTMS). This analysis resulted in separation of “Responders,” which comprised 37.5 % of the 10 Hz rTMS group, and “Non-responders,” representing 62.5 % of the group (Fig. 2B).

The raw MEP_{dia} amplitudes for Sham rTMS, “Responder” and “Non-responder” of 10 Hz rTMS were then plotted with time. There was no significant difference between Sham rTMS, Non-responder and Responder groups at 1 min post-rTMS. Starting at 10 min rTMS, however, MEP_{dia} of the “Responders” group significantly increased and maintained elevated up to 60 min post-rTMS compared to Sham rTMS and “Non-responders” (Fig. 2C, D). No difference was observed between the Sham rTMS group and Non-responder group at all time points.

3.3. GABAergic networks play a role in diaphragmatic excitability induced by rTMS

Two GABAergic agonists were used to test the hypothesis that GABAergic networks play a role in enhanced diaphragm excitability induced by 10 Hz rTMS. Clonazepam (GABA_A agonist) or Baclofen (GABA_B agonist), were intravenously injected prior to sham or 10 Hz

rTMS protocol (Fig. 3A). Drug concentration in blood plasma were measured over time to ensure physiological relevance (according to the manufacturer). There was no statistical difference in drug concentration between sham or 10 Hz rTMS groups, so the data were pooled together and compared over time. Concentrations of clonazepam (Fig. 3B) and Baclofen (Fig. 3C) significantly decreased 60 min following rTMS or sham rTMS compared to plasma levels immediately post injection. While we observed an overall decrease with time, these molecules remained in blood plasma at effective concentrations at the end of the experiment.

In order to evaluate the neuromodulatory effect of each GABAergic agonist on rTMS treatment and exclude a direct physiological effect on the motoneuron excitability, MEP_{dia} were recorded before and 5 min after i.v. injection. There was no difference in raw MEP_{dia} amplitude within each group before and after GABA agonist injection (Fig. 4A and B). There was, however, a significant increase in mean arterial pressure (MAP) 5 min post-injection in both groups compared to the pre-injection values (Fig. 4C and D). We observed no significant difference in MAP in either group 60 min post-drug injection compared to values measured 5 min post-injection (Fig. 4C and D).

We then tested the hypothesis that GABAergic networks play a role in

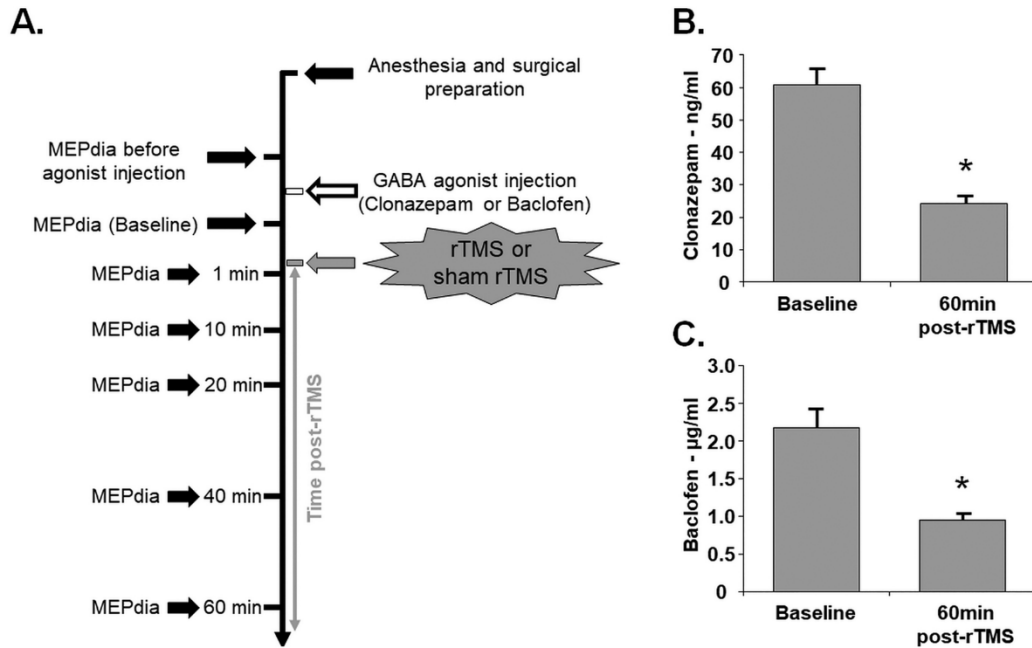


Fig. 3. Experimental timeline and GABA agonists dosage. (A) GABAergic agonists were delivered prior to Sham or rTMS treatment. The phrenic motoneuronal excitability was assessed 7 times (MEPdia). (B) Plasma concentration of GABA_A agonist (Clonazepam) and (C) GABA_B agonist (Baclofen) immediately after drug injection (Baseline) and 60 min post-rTMS. Paired *t*-test, * *p* < 0.001 compared to baseline.

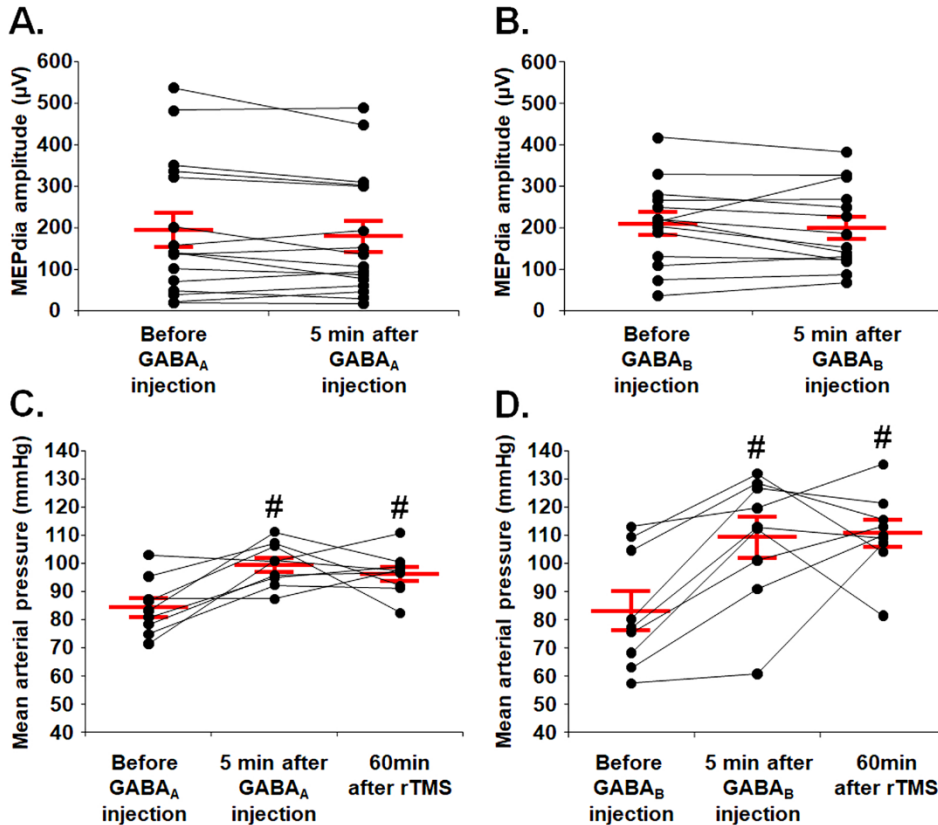


Fig. 4. Phrenic motoneuron excitability and mean arterial pressure following delivery of GABA agonist. (A) Phrenic motoneuron excitability evaluated by MEPdia amplitude before and 5 min following GABA_A agonist injection (Clonazepam). (B) Phrenic motoneuron excitability evaluated by MEPdia amplitude before and 5 min following GABA_B agonist injection (Baclofen). (C) Mean arterial pressure before, 5 min and 60 min after 10 Hz or sham rTMS protocol with Clonazepam injection. (D) Mean arterial pressure before, 5 min and 60 min after 10 Hz or sham rTMS protocol with Baclofen injection. Paired *t*-test, # *p* < 0.01 compared to before GABA agonist injection.

rTMS-mediated phrenic motoneuron excitability. GABA agonists were administered before the rTMS or sham rTMS protocol (Fig. 3A) and MEP_{dia} was recorded immediately post-drug administration and compared to 1, 10, 20, 40 and 60 min post-sham or 10 Hz rTMS (Fig. 5A). Administration of GABA agonists did not significantly affect MEP_{dia} amplitude in any of the groups up to 20 min post sham or rTMS. At 40 and 60 min post-drug injection, however, MEP_{dia} of all conditions were significantly diminished compared to 10 Hz rTMS (Fig. 5B). This suggests that GABA agonist dampens phrenic motoneuron excitability elicited by 10 Hz rTMS.

Moreover, time post-treatment (or sham rTMS) was also evaluated. No difference in MEP_{dia} amplitude was observed over time with treatment (rTMS or sham rTMS) for Sham rTMS + Clonazepam, Sham rTMS + Baclofen, 10 Hz + Clonazepam and 10 Hz + Baclofen groups. However, 10 Hz group showed a significant increase in MEP_{dia} amplitude at 40 min compared to 1 min post-rTMS ($p = 0.014$) and at 60 min compared to 1 ($p < 0.001$), 10 ($p = 0.003$) and 20 ($p = 0.027$) min post-rTMS (Fig. 5B).

To qualitatively validate GABAergic influence on the phrenic network, we used the neuroanatomical tracer, pseudorabies virus (PRV), to identify phrenic motoneurons (Fig. 6A) and interneurons (Fig. 6B and E) located throughout the cervical spinal cord (C3–6).

Immunohistochemistry of GABA_A and GABA_B receptors (Fig. 6C and F, respectively) on PRV traced spinal sections demonstrated the expression of these receptors on the phrenic motor network (Fig. 6D and G). An example of these receptors closely adjacent to phrenic interneurons is demonstrated in orthogonal projections (insets in Fig. 6D and G).

4. Discussion

Repetitive TMS has been used to treat a wide range of neurological disorders, demonstrating effectiveness in enhancing neural plasticity, but the underlying mechanisms *via* which rTMS enhances this plasticity are largely unknown. The present study is the first to demonstrate that 1) a robust long-lasting increase in phrenic motoneuron excitability induced by a single acute high frequency treatment of rTMS can be elicited and sustained in a rat model of respiratory neurobiology, and 2) GABAergic neurons within the phrenic network can modulate this therapeutic effect.

Neural stimulation, and especially high frequency electrical stimulation, has been shown to induce long-term potentiation (LTP) *in vivo*, corresponding to a robust increase in neuronal excitability which can last for hours (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Lomo, 1973). Recently, 10 Hz rTMS protocol was investigated in an animal model *in*

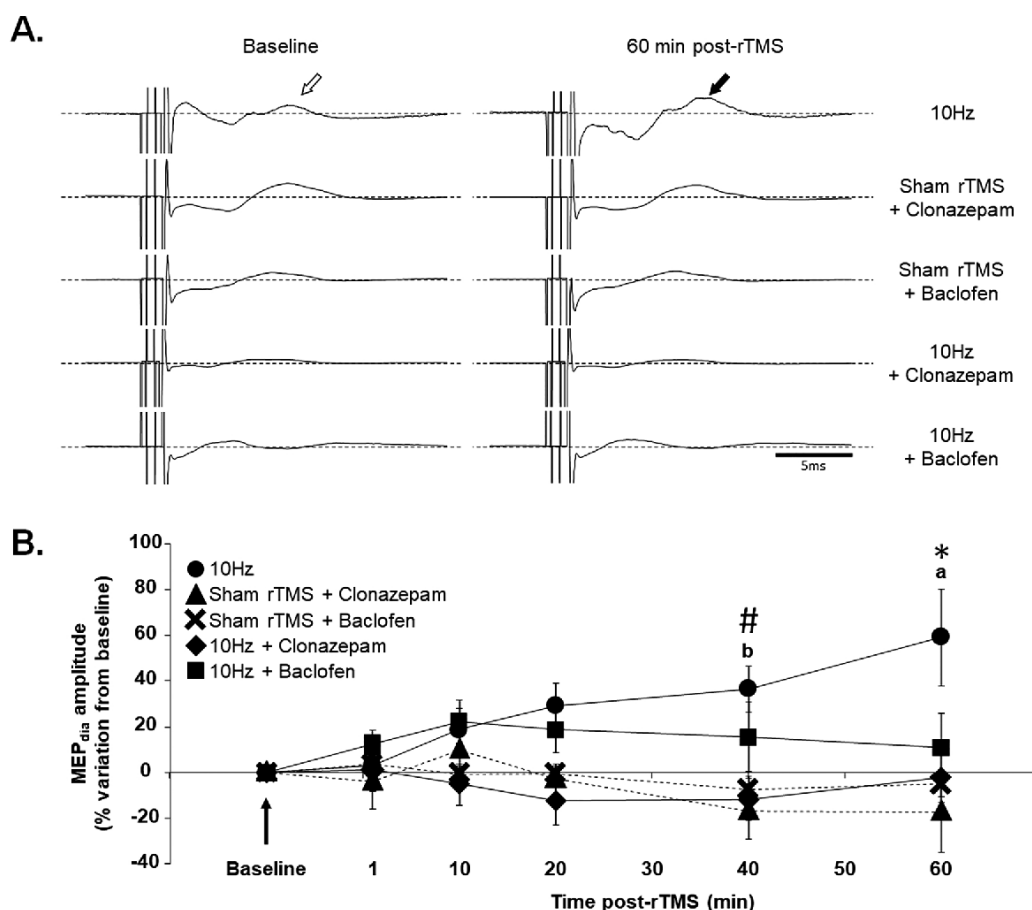


Fig. 5. 10 Hz rTMS protocol and phrenic motoneuronal excitability with GABA agonists. (A) Representative MEP_{dia} traces prior to and 60 min post-10 Hz rTMS, Sham rTMS + GABA_A agonist (Clonazepam), Sham rTMS + GABA_B agonist (Baclofen), 10 Hz rTMS + Clonazepam and 10 Hz rTMS + Baclofen protocols. The white arrow shows the MEP_{dia} at baseline, the black arrows show the MEP_{dia} increase following 10 Hz rTMS protocol. (B) Time-course of percent change in MEP_{dia} amplitude following indicated protocols compared to baseline. # $p < 0.05$ compared to Sham rTMS + GABA_A agonist and 10 Hz rTMS + GABA_A agonist groups; * $p < 0.009$ compared to Sham rTMS + GABA_A agonist, Sham rTMS + GABA_B agonist, 10 Hz rTMS + GABA_A agonist and 10 Hz + GABA_B agonist; a $p < 0.05$ compared to 1, 10 and 20 min post-rTMS; b $p < 0.05$ compared to 1 min post-rTMS (Two-way ANOVA, Fisher LSD post-hoc test).

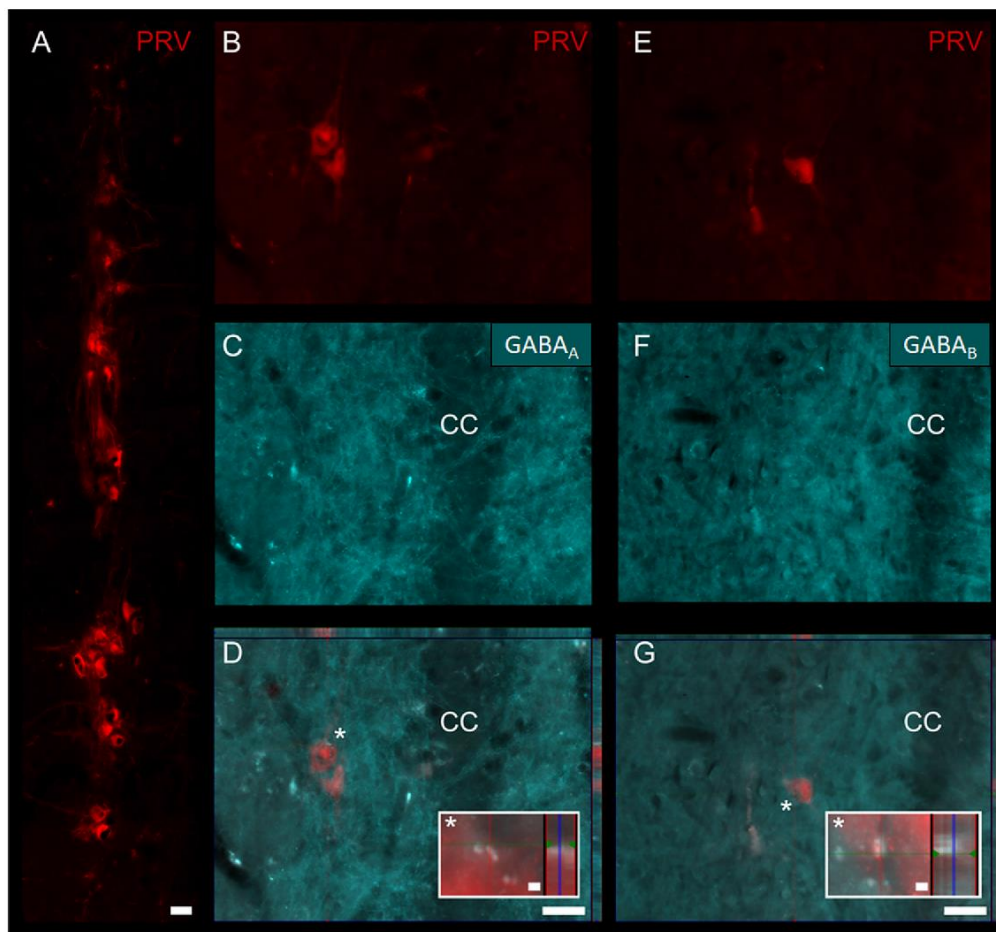


Fig. 6. Anatomical localization of GABA_A and GABA_B on phrenic motor network identified using transsynaptic pseudorabies virus (PRV). When applied onto the diaphragm, PRV infects phrenic motoneurons (A) (located in the cervical spinal cord level 3–5 in the rat). PRV is then retrogradely transported and trans-synaptically labels phrenic interneurons (B, E). Immunohistochemistry for GABA_A (C) and GABA_B (F) receptors used to demonstrate examples of phrenic GABAergic receptor expression (D, G). Orthogonal projections of overlays are demonstrated in D and G. White asterisk (*) in D and G denote high-magnification (40x) insets. CC: central canal. Scale bars: 50 μm in A, D, G; 2 μm in insets.

vivo and *in vitro* with the induction of a LTP-like effect in the hippocampus (Lenz et al., 2015; Lenz and Vlachos, 2016; Vlachos et al., 2012). Similarly, in the present study, 10 Hz rTMS treatment induces a robust long-lasting increase in phrenic motoneuron excitability, compared to 3 and 30 Hz protocols which failed to elicit similar effects. Low frequency protocols (<10 Hz) with rTMS are known to reduce cortical excitability and decrease induced MEP (Ziemann et al., 2008). Another explanation could reside in the protocol duration or repetition of this protocol. In fact, the 10 Hz protocol takes longer in time compared to the 30 Hz protocol and shorter than the 3 Hz protocol. The current protocol has been applied once acutely, and more protocol applications (*i.e.* chronically) at different frequencies could lead to similar effect on the phrenic excitability.

The center of the coil was deliberately positioned at -6 mm from Bregma on the animal's skull as described previously, since this stimulating position has proven its efficacy to elicit specific diaphragmatic motor evoked potentials in rats (Vinit et al., 2016, 2014). Within this study, rTMS protocols were delivered in the same coil position center at the rat's Bregma. One improvement in future studies could be a direct application of the rTMS protocol above the phrenic motoneuron pool, *i.e.* in spinal cord at cervical levels C3-C6 in order to enhance treatment efficacy. The intensity of the protocol (50 % of maximal output of the TMS machine) was deliberately chosen since this intensity does not elicit

a diaphragm contraction in our specific experimental design (Vinit et al., 2014). Protocols of subthreshold rTMS are often used in the clinic to neuromodulate cortical structures without inducing action potential volleys, and these have been proven to be effective in humans to improve neurological disorders (Martin et al., 2017). Interestingly, a protocol of repetitive intermittent hypoxia in healthy humans induce a robust increase in corticospinal excitability assessed by MEP in a finger muscle following a single pulse of TMS (Christiansen et al., 2018). In addition, a recent study demonstrated that an acute protocol of high frequency rTMS induce an increase in synaptic plasticity associated proteins (Phosphorylation of S6), known to be involved in neuronal excitability increase, including MAPK/ERK, PI3 kinase and mTOR (Fujiki et al., 2020; Gobert et al., 2008). These subsequent proteins are known to participate in the increase of phrenic motor neuron excitability following intermittent hypoxia (Dougherty et al., 2015; Hoffman et al., 2012).

Another interesting observation was found among the animals treated with 10 Hz rTMS. Individual analyses of the MEP_{dia} changes of the neural excitability bring to light the existence of rats with high response, moderate response or no response to the 10 Hz rTMS treatment. This heterogeneity in terms of efficiency rTMS treatment in the MEP muscular responses in the human population is well documented (Benadhira et al., 2017; Fitzgerald et al., 2016; van de Ruit and Grey,

2019). In human population however, the efficacy of rTMS protocol is generally determined in a qualitative way to determine a patient's remission (Yip et al., 2017). In the present study, the animals are deeply anesthetized during the procedure and the data obtained are quantitative. The protocol by itself makes qualitative evaluation impossible and separation of the animals by the effectiveness of rTMS treatment on phrenic motoneuronal excitability is impossible. In order to further analyze the efficiency of the 10 Hz rTMS treatment, the Chebyshev's theorem was applied to our sham rTMS population to categorize the "responder" and "non-responder" subpopulations in our treated animals. Therefore, 37.5 % of 10 Hz treated rats were considered as responders and 62.5 % as non-responders with a high restriction factor. Consequently, the non-responder subgroup presents a similar profile to that of Sham rTMS group, and the responder group shows a robust increase in phrenic motoneuronal excitability with rTMS. This meta-analysis of the data obtained in this study allows us to consider that our 10 Hz rTMS can have a different outcome as a homogenous population. One explanation could be a difference in the biological processes involved in the increase of phrenic motoneuron excitability. High frequency rTMS is also known to induce an increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in patients who respond to rTMS (Dall'Agnol et al., 2014; Yukimasa et al., 2006) and was also observed in rat central nervous system (Shang et al., 2016). BDNF is known to be involved in respiratory plasticity of phrenic motoneurons, such as the phrenic long-term facilitation following intermittent hypoxia in the rat (Baker-Herman et al., 2004). Conversely, several studies in humans have demonstrated that response to high frequency rTMS depends on a BDNF genotype: patients displaying the Val66Met polymorphism seem to be less sensitive to neuromodulation induced by rTMS (Cheeran et al., 2008). This however cannot be ruled out of our animal population and further studies will be needed to confirm this hypothesis. Other parameters can also be considered in this population heterogeneity. One possibility could be the anesthesia. Under urethane, the animals present different sleep-like brain states similar to rapid eye movement (REM) and non-REM sleep (Zhurakovskaya et al., 2016). Long-term facilitation, which is an increase in phrenic motoneuronal excitability following intermittent hypoxia, is greater during non-REM sleep and abolished during REM sleep (Terada and Mitchell, 2011). The sleep-like state of our animals during the 10 Hz rTMS protocol was not monitored, and even a slight change in sleep-state could affect the subsequent respiratory plasticity.

Another hypothesis supporting the increase in neuronal excitability in the responders group with 10 Hz rTMS treatment is the induction of a "local disinhibition" of the neuronal pathways (Lenz and Vlachos, 2016). One candidate involved in the inhibitory processes is GABA. In this study, GABA_A (Clonazepam) and GABA_B (Baclofen) agonists were chosen for their clinical relevance. These two compounds are already used in patients to reduce the neuronal excitability in several pathologies such as panic disorders or epilepsy for Clonazepam (Nardi et al., 2013; Pinder et al., 1976), or muscle spasticity for Baclofen (Chang et al., 2013). In addition, a suppression of LTP-like plasticity in motor cortex (paired associative stimulation and Baclofen oral administration) has been observed in clinical study (McDonnell et al., 2007).

The results in this study indicate a significant decrease in GABA agonists concentrations in the plasma samples of our animals at 60 min after sham or 10 Hz rTMS compared to 5 min post-injection (before sham or 10 Hz rTMS). At the dose injected into the animals, no change in phrenic motoneuronal excitability was observed in the min following injection and up to 60 min. The observed increase in MAP right after the injection is a volume compensation of the cardiovascular system. The agonists by themselves at the dose injected has a marginal effect on the cardiovascular system. Interestingly, there is a robust increase in phrenic motoneuronal excitability with the 10 Hz rTMS treatment that is abolished with either the pre-injection of Clonazepam or Baclofen. The neuromodulatory effect of 10 Hz rTMS treatment could play a role in the neuronal control of respiration through GABAergic connections. Indeed,

GABA_A and GABA_B receptors are located on pre-phrenic interneurons. These interneurons are known to be involved in the neural control of phrenic motoneurons (Lane et al., 2008; Zaki Ghali et al., 2019), although we cannot rule out that others spinal pathways could be involved in this excitability (DiMarco and Kowalski, 2013). Nevertheless, the activation of GABAergic receptors with agonists blocks rTMS-mediated phrenic excitability, supporting "local disinhibition" theory induced by high frequency rTMS, as previously described (Benali et al., 2011; Lenz et al., 2016; Lenz and Vlachos, 2016; Levkovitz et al., 1999). In addition, 10 Hz rTMS treatment induced a reduction in the $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptors in mouse central nervous system (Zhang et al., 2019), supporting the role of this inhibitory system in neuronal modulation. Conversely, GABA_A (Gabazine) and GABA_B (Saclofen) antagonists were used *in vitro* (Kerr et al., 1989; Uchida et al., 1996) and *in vivo* (Blandizzi et al., 1992; Gleason et al., 2009; Voisin et al., 1996; Wang et al., 2016) to induce a GABAergic disinhibition of the neural system.

5. Conclusion

In conclusion, this 10 Hz rTMS protocol has proven its efficiency to induce a significant increase in phrenic motoneuronal excitability. These results could lead to a potential application in order to try to enhance respiratory function in a preclinical rat model impacting the respiratory function, such as after a partial cervical injury or cervical contusion.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

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 (SV, AM), the National Institutes of Health, NINDS, R01 NS104291 (MAL) and Ministry of Science and Technology109-2636-B-110-001 (KZL). The supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Alexandrov, V.G., Ivanova, T.G., Alexandrova, N.P., 2007. Prefrontal control of respiration. *J. Physiol. Pharmacol.* 58 (Suppl 5), 17–23.
- Baker-Herman, T.L., Fuller, D.D., Bavis, R.W., Zabka, A.G., Golder, F.J., Doperalski, N.J., Johnson, R.A., Watters, J.J., Mitchell, G.S., 2004. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat. Neurosci.* 7, 48–55.
- Benadhira, R., Thomas, F., Bouaziz, N., Braha, S., Andrianisaina, P.S., Isaac, C., Moulter, V., Januel, D., 2017. A randomized, sham-controlled study of maintenance rTMS for treatment-resistant depression (TRD). *Psychiatry Res.* 258, 226–233.
- Benali, A., Trippe, J., Weiler, E., Mix, A., Petrasch-Parwez, E., Girzalsky, W., Eysel, U.T., Erdmann, R., Funke, K., 2011. Theta-burst transcranial magnetic stimulation alters cortical inhibition. *J. Neurosci.* 31, 1193–1203.
- Blandizzi, C., Bernardini, M.C., Natale, G., Martinotti, E., Del Tacca, M., 1992. Peripheral 2-hydroxy-saclofen-sensitive GABA_B receptors mediate both vagal-dependent and vagal-independent acid secretory responses in rats. *J. Auton. Pharmacol.* 12, 149–156.
- Bliss, T.V., Gardner-Medwin, A.R., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 357–374.
- Bliss, T.V.P., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356.
- Chang, E., Ghosh, M., Yanni, D., Lee, S., Alexandru, D., Mozaffar, T., 2013. A review of spasticity treatments: pharmacological and interventional approaches. *Crit. Rev. Phys. Rehabil. Med.* 25, 11–22.
- Cheeran, B., Talelli, P., Mori, F., Koch, G., Suppa, A., Edwards, M., Houlden, H., Bhatia, K., Greenwood, R., Rothwell, J.C., 2008. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J. Physiol.* 586, 5717–5725.

- Christiansen, L., Urbin, M.A., Mitchell, G.S., Perez, M.A., 2018. Acute intermittent hypoxia enhances corticospinal synaptic plasticity in humans. *eLife* 7, e34304.
- Dall'Agnol, L., Medeiros, L.F., Torres, L.L.S., Deitos, A., Brietzke, A., Laste, G., de Souza, A., Vieira, J.L., Fregni, F., Caumo, W., 2014. Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the corticospinal inhibition and the brain-derived neurotrophic factor in chronic myofascial pain syndrome: an explanatory double-blinded, randomized, sham-controlled trial. *J. Pain* 15, 845–855.
- Davey, N.J., Murphy, K., Maskill, D.W., Guz, A., Ellaway, P.H., 1996. Site of facilitation of diaphragm EMG to corticospinal stimulation during inspiration. *Respir. Physiol.* 106, 127–135.
- DiMarco, A.F., Kowalski, K.E., 2013. Activation of inspiratory muscles via spinal cord stimulation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189, 438–449.
- Dougherty, B.J., Fields, D.P., Mitchell, G.S., 2015. Mammalian target of rapamycin is required for phrenic long-term facilitation following severe but not moderate acute intermittent hypoxia. *J. Neurophysiol.* 114, 1784–1791.
- Fitzgerald, P.B., Hoy, K.E., Anderson, R.J., Daskalakis, Z.J., 2016. A study of the pattern of response to rTMS treatment in depression. *Depress. Anxiety* 33, 746–753.
- Fujiki, M., Yee, K.M., Steward, O., 2020. Non-invasive high frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (hfTMS) robustly activates molecular pathways implicated in neuronal growth and synaptic plasticity in select populations of neurons. *Front. Neurosci.* 14.
- Gandevia, S.C., Rothwell, J.C., 1987. Activation of the human diaphragm from the motor cortex. *J. Physiol.* 384, 109–118.
- Gleason, N.R., Gallos, G., Zhang, Y., Emala, C.W., 2009. The GABAA agonist muscimol attenuates induced airway constriction in guinea pigs in vivo. *J. Appl. Physiol.* 106, 1257–1263.
- Gobert, D., Topolnik, L., Azzì, M., Huang, L., Badeaux, F., Desgroseillers, L., Sossin, W.S., Lacaille, J.C., 2008. Forskolin induction of late-LTP and up-regulation of 5' TOP mRNAs translation via mTOR, ERK, and PI3K in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurochem.* 106, 1160–1174.
- Hoffman, M.S., Nichols, N.L., Macfarlane, P.M., Mitchell, G.S., 2012. Phrenic long-term facilitation after acute intermittent hypoxia requires spinal ERK activation but not TrkB synthesis. *J. Appl. Physiol.* 113, 1184–1193.
- Hoogendam, J.M., Ramakers, G.M., Di Lazzaro, V., 2010. Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimul.* 3, 95–118.
- Imbert, B., Alvarez, J.-C., Simon, N., 2015. Anticraving effect of bupropion in alcohol-dependent patients. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 1602–1608.
- Jassova, K., Albrecht, J., Ceresnakova, S., Papezova, H., Anders, M., 2019. Repetitive transcranial magnetic stimulation significantly influences the eating behavior in depressive patients. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15, 2579–2586.
- Kerr, D.I., Ong, J., Johnston, G.A., Abbenante, J., Prager, R.H., 1989. Antagonism at GABAB receptors by safen and related sulphonic analogues of bupropion and GABA. *Neurosci. Lett.* 107, 239–244.
- Khedr, E.M., Trakhan, M.N., 2001. Localization of diaphragm motor cortical representation and determination of corticodiaphragmatic latencies by using magnetic stimulation in normal adult human subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 85, 560–566.
- Kozel, F.A., 2018. Clinical repetitive transcranial magnetic stimulation for posttraumatic stress disorder, generalized anxiety disorder, and bipolar disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* 41, 433–446.
- 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. *J. Comp. Neurol.* 511, 692–709.
- Lenz, M., Vlachos, A., 2016. Releasing the cortical brake by non-invasive electromagnetic stimulation? rTMS induces LTD of GABAergic neurotransmission. *Front. Neural Circuits* 10, 96.
- Lenz, M., Platschek, S., Priesemann, V., Becker, D., Willems, L.M., Ziemann, U., Deller, T., Müller-Dahlhaus, F., Jedlicka, P., Vlachos, A., 2015. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct. Funct.* 220, 3323–3337.
- Lenz, M., Galanis, C., Müller-Dahlhaus, F., Opitz, A., Wierenga, C.J., Szabo, G., Ziemann, U., Deller, T., Funke, K., Vlachos, A., 2016. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat. Commun.* 7, 10020.
- Levkovitz, Y., Marx, J., Grisaru, N., Segal, M., 1999. Long-term effects of transcranial magnetic stimulation on hippocampal reactivity to afferent stimulation. *J. Neurosci.* 19, 3198–3203.
- 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.
- Lissens, M.A., 1994. Motor evoked potentials of the human diaphragm elicited through magnetic transcranial brain stimulation. *J. Neurol. Sci.* 124, 204–207.
- Martin, D.M., McClintock, S.M., Forster, J.J., Lo, T.Y., Loo, C.K., 2017. Cognitive enhancing effects of rTMS administered to the prefrontal cortex in patients with depression: a systematic review and meta-analysis of individual task effects. *Depress. Anxiety* 34, 1029–1039.
- Maskill, D., Murphy, K., Mier, A., Owen, M., Guz, A., 1991. Motor cortical representation of the diaphragm in man. *J. Physiol.* 443, 105–121.
- McClintock, S.M., Reti, I.M., Carpenter, L.L., McDonald, W.M., Dubin, M., Taylor, S.F., Cook, I.A., O'Reardon, J., Husain, M.M., Wall, C., Krystal, A.D., Sampson, S.M., Morales, O., Nelson, B.G., Latoussakis, V., George, M.S., Lisanby, S.H., 2018. Consensus recommendations for the clinical application of repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in the treatment of depression. *J. Clin. Psychiatry* 79.
- McDonnell, M.N., Orekhov, Y., Ziemann, U., 2007. Suppression of LTP-like plasticity in human motor cortex by the GABAB receptor agonist baclofen. *Exp. Brain Res.* 180, 181–186.
- Mehiri, S., Straus, C., Arnulf, I., Attali, V., Zelter, M., Derenne, J.P., Similowski, T., 2006. Responses of the diaphragm to transcranial magnetic stimulation during wake and sleep in humans. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 406–418.
- Mitchell, G.S., Johnson, S.M., 2003. Invited Review: neuroplasticity in respiratory motor control. *J. Appl. Physiol.* 94, 358–374.
- Nardi, A.E., Machado, S., Almada, L.F., Paes, F., Silva, A.C., Marques, R.J., Amrein, R., Freire, R.C., Martin-Santos, R., Cosci, F., Hallak, J.E., Crippa, J.A., Arias-Carrion, O., 2013. Clonazepam for the treatment of panic disorder. *Curr. Drug Targets* 14, 353–364.
- Petrosyan, H.A., Alessi, V., Sisto, S.A., Kaufman, M., Arvanian, V.L., 2017. Transcranial magnetic stimulation (TMS) responses elicited in hindlimb muscles as an assessment of synaptic plasticity in spino-muscular circuitry after chronic spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* 642, 37–42.
- Pinder, R.M., Brogden, R.N., Speight, T.M., Avery, G.S., 1976. Clonazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs* 12, 321–361.
- Richard, K., Pierre, A.G., Roumiana, G., 2013. Sex, stress and their influence on respiratory regulation. *Curr. Pharm. Des.* 19, 4471–4484.
- Sebastianelli, L., Versace, V., Martignago, S., Brigo, F., Trinka, E., Saltuari, L., Nardone, R., 2017. Low-frequency rTMS of the unaffected hemisphere in stroke patients: a systematic review. *Acta Neurol. Scand.* 136, 585–605.
- Shang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, H., Liu, Z., Yin, T., Zhang, T., 2016. Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 134 (Pt B), 369–378.
- Sharshar, T., Ross, E., Hopkinson, N.S., Dayer, M., Nickol, A., Lofaso, F., Moxham, J., Similowski, T., Polkey, M.I., 2003. Effect of voluntary facilitation on the diaphragmatic response to transcranial magnetic stimulation. *J. Appl. Physiol.* 95, 26–34.
- Tang, A., Thickbroom, G., Rodger, J., 2017. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the brain: mechanisms from animal and experimental models. *Neuroscientist* 23, 82–94.
- Terada, J., Mitchell, G.S., 2011. Diaphragm long-term facilitation following acute intermittent hypoxia during wakefulness and sleep. *J. Appl. Physiol.* 110, 1299–1310.
- Tian, G.F., Peever, J.H., Duffin, J., 1998. Bötzing-er complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. *Exp. Brain Res.* 122, 149–156.
- Trippe, J., Mix, A., Aydin-Abidin, S., Funke, K., Benali, A., 2009. Theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex. *Exp. Brain Res.* 199, 411–421.
- Uchida, I., Cestari, I.N., Yang, J., 1996. The differential antagonism by bicuculline and SR95531 of pentobarbitone-induced currents in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 307, 89–96.
- van de Ruit, M., Grey, M.J., 2019. False positives associated with responder/non-responder analyses based on motor evoked potentials. *Brain Stimul.* 12, 314–318.
- Vinit, S., Keomani, E., Deramaut, T.B., Spruance, V.M., Bezdudnaya, T., Lane, M.A., Bonay, M., Petitjean, M., 2014. Interdisciplinary approaches of transcranial magnetic stimulation applied to a respiratory neuronal circuitry model. *PLoS One* 9, e113251.
- Vinit, S., Keomani, E., Deramaut, T.B., Bonay, M., Petitjean, M., 2016. Reorganization of respiratory descending pathways following cervical spinal partial section investigated by transcranial magnetic stimulation in the rat. *PLoS One* 11, e0148180.
- Vlachos, A., Müller-Dahlhaus, F., Rosskopf, J., Lenz, M., Ziemann, U., Deller, T., 2012. Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci.* 32, 17514–17523.
- Voisin, D.L., Herbison, A.E., Chapman, C., Poulain, D.A., 1996. Effects of central GABAB receptor modulation upon the milk ejection reflex in the rat. *Neuroendocrinology* 63, 368–376.
- Volz, L.J., Benali, A., Mix, A., Neubacher, U., Funke, K., 2013. Dose-dependence of changes in cortical protein expression induced with repeated transcranial magnetic theta-burst stimulation in the rat. *Brain Stimul.* 6, 598–606.
- Wang, Y., Yu, T., Yuan, C., Yuan, J., Luo, Z., Pan, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Yu, B., 2016. Effects of propofol on the dopamine, metabolites and GABAA receptors in media prefrontal cortex in freely moving rats. *Am. J. Transl. Res.* 8, 2301–2308.
- Yan, T., Xie, Q., Zheng, Z., Zou, K., Wang, L., 2017. Different frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for posttraumatic stress disorder (PTSD): a systematic review and meta-analysis. *J. Psychiatr. Res.* 89, 125–135.
- Yip, A.G., George, M.S., Tendler, A., Roth, Y., Zangen, A., Carpenter, L.L., 2017. 61% of unmedicated treatment resistant depression patients who did not respond to acute TMS treatment responded after four weeks of twice weekly deep TMS in the Brainway pivotal trial. *Brain Stimul.* 10, 847–849.
- Yukimasa, T., Yoshimura, R., Tamagawa, A., Uozumi, T., Shinkai, K., Ueda, N., Tsuji, S., Nakamura, J., 2006. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves refractory depression by influencing catecholamine and brain-derived neurotrophic factors. *Pharmacopsychiatry* 39, 52–59.
- Zaki Ghali, M.G., Britz, G., Lee, K.-Z., 2019. Pre-phrenic interneurons: characterization and role in phrenic pattern formation and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 265, 24–31.
- Zhang, C., Lu, R., Wang, L., Yun, W., Zhou, X., 2019. Restraint devices for repetitive transcranial magnetic stimulation in mice and rats. *Brain Behav.* 9, e01305.

P. Michel-Flutot et al.

Respiratory Physiology & Neurobiology 292 (2021) 103704

Zholudeva, L.V., Qiang, L., Marchenko, V., Dougherty, K.J., Sakiyama-Elbert, S.E., Lane, M.A., 2018. The neuroplastic and therapeutic potential of spinal interneurons in the injured spinal cord. *Trends Neurosci.* 41, 625–639.

Zhurakovskaya, E., Paasonen, J., Shatillo, A., Lipponen, A., Salo, R., Aliev, R., Tanila, H., Grohn, O., 2016. Global functional connectivity differences between sleep-like states in urethane anesthetized rats measured by fMRI. *PLoS One* 11, e0155343.

Ziemann, U., Paulus, W., Nitsche, M.A., Pascual-Leone, A., Byblow, W.D., Berardelli, A., Siebner, H.R., Gassen, J., Cohen, L.G., Rothwell, J.C., 2008. Consensus: motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimul.* 1, 164–182.

2.2. Effets d'un protocole chronique de rTMS à haute fréquence sur la récupération fonctionnelle diaphragmatique après trauma spinal cervical

Publication: Effects of chronic high frequency rTMS protocol on diaphragmatic function recovery following C2 spinal cord hemisection in rat. (en préparation).

Nous avons précédemment montré que qu'un protocole aigu de rTMS délivré à 10 Hz chez le rat sain anesthésié induisait une augmentation durable de l'excitabilité du réseau phrénique via l'enregistrement des PEM diaphragmatiques avant et après application du protocole. Cette première étude a donc révélé le potentiel thérapeutique de la rTMS pour la neuromodulation du réseau neurorespiratoire en aigu.

Cette étude a ainsi eu pour but d'évaluer l'effet de l'application chronique de ce protocole de rTMS à 10 Hz chez des rats vigiles hémilésés en C2 à différents temps post-lésionnel. Notre hypothèse a été que ce protocole devrait induire une amélioration de l'activité de l'hémidiaphragme paralysé, et que cette récupération devrait être due à des phénomènes de plasticité synaptique accrus et/ou une réduction des processus inflammatoires délétères au niveau des neurones respiratoires lésés du rVRG, de la moelle épinière lésée C1-C3, et au niveau des motoneurones phréniques déafférentés en C3-C6. Ce protocole a ainsi été appliqué durant sept jours, un mois ou deux mois, à partir de sept jours post-lésion.

Nos résultats montrent qu'appliqué de façon chronique chez l'animal vigile et hémilésé en C2, notre protocole de rTMS (9 trains de 100 stimulation délivrés à 10 Hz, les trains de stimulation étant séparés de 30 secondes) permet d'accélérer la récupération spontanée de la capacité de l'hémidiaphragme intact à compenser la perte d'activité du côté paralysé. En ce qui concerne l'hémidiaphragme paralysé, bien que le traitement chronique par rTMS ne permette pas d'améliorer sa fonction EMG en eupnée, il lui permet d'augmenter son activité lors d'un challenge respiratoire, probablement par un renforcement des voies croisées phréniques. Ces effets fonctionnels sont permis d'une part par la réduction de la présence de cellules immunitaires dans la moelle épinière C1-C3, mais aussi par des phénomènes neuroplastiques au niveau des voies descendantes respiratoires, favorisés par cette réduction d'inflammation. La réduction d'expression de CREB dans les motoneurones phréniques chez les animaux traités par rTMS peut en partie s'expliquer par le fait que l'hémidiaphragme intact augmente son activité chez les animaux traités. Le protocole ne semble cependant pas ou plus avoir d'effet au niveau des neurones respiratoires du rVRG aux temps étudiés.

En conclusion, notre protocole chronique de rTMS, bien qu'apparemment bénéfique, n'induit qu'un nombre limité d'effets fonctionnels diaphragmatiques. L'application de ce même protocole au niveau du tronc cérébral, et/ou associé à d'autres thérapeutiques, pourrait induire une potentialisation de la récupération de l'activité diaphragmatique perdue après trauma spinal cervical.

Title: Effects of chronic high frequency rTMS protocol on respiratory neuroplasticity following C2 spinal cord hemisection in rat

Authors and Affiliation:

Pauline Michel-Flutot¹, Isley Jesus¹, Valentin Vanhee¹, Camille Bourcier^{1,2}, Laila Emam², Abderrahim Ouguerroudj¹, Kun-Ze Lee³, Michael A. Lane⁴, Arnaud Mansart², Marcel Bonay¹, Stéphane Vinit^{1,*}.

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000 Versailles, France

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

³Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan

⁴Marion Murray Spinal Cord Research Center, Department of Neurobiology and Anatomy Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA, USA

*Corresponding author:

Stéphane Vinit, PhD, HDR

E-mail : stephane.vinit@uvsq.fr

Phone: +33170429427

Abstract

High spinal cord injuries (SCI) lead to permanent diaphragmatic paralysis. The search for therapeutics to induce functional motor recovery is essential. One promising non-invasive therapeutic which could allow to harness plasticity in spared descending respiratory fibers is repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). Application of chronic high frequency (10Hz) rTMS above the cortical areas have been done in C2 hemisected rats for 7-days, 1-month or 2-months. An increase of intact hemidiaphragm (EMG) activity and excitability (diaphragm motor evoked potentials) have been observed after 1-month of rTMS application. Interestingly, despite of no real functional effects of our rTMS treatment on the injured hemidiaphragm activity during eupnea, 2-months of rTMS treatment strengthen the existing crossed phrenic pathways, allowing the injured hemidiaphragm to increase its activity during respiratory challenge (*i.e.* asphyxia). These phenomena could be explained by a strengthening of respiratory descending fibers in the ventrolateral funiculi (increase of GAP-43 positive fibers), sustained by a reduction of inflammation in the C1-C3 spinal cord (reduction of CD68 and Iba1 labeling), and an acceleration of intracellular plasticity processes in phrenic motoneurons after chronic rTMS treatment. These results suggest that chronic high frequency rTMS could ameliorate the respiratory function and elicit neuronal plasticity with a reduction of the deleterious post-traumatic inflammatory processes into the spinal cord following high cervical SCI. Nevertheless, this therapeutic should be adapted and/or combined to other therapeutics in order to further ameliorate the beneficial outcomes.

Keywords

Phrenic motor network; Motoneuron excitability; Sprague Dawley rats; Diaphragm

Introduction

High spinal cord injuries (SCI) induce long-lasting neuromotor deficits, such as respiratory insufficiency (Winslow and Rozovsky, 2003). The patients living with such injury often rely on ventilatory assistance to survive, even if few patients can be weaned off with time. One of the most used preclinical models to study the respiratory system neuroplasticity and neuroinflammation following high SCI is the C2 hemisection (C2HS) in the rat. The C2HS induces the deafferentation of ipsilateral phrenic motoneurons that connect the diaphragm, the main inspiratory muscle, resulting in diaphragm hemiplegia (Porter, 1895; Nantwi et al., 1999; Golder et al., 2001; Vinit et al., 2006; Lane et al., 2009; Vinit and Kastner, 2009; Alilain et al., 2011; Keomani et al., 2014; Lee et al., 2014). The contralateral side remains intact, allowing the animal to survive.

This model presents a limited spontaneous recovery of the injured hemidiaphragm activity which leads to a partial reactivation of phrenic and diaphragm activities. This reactivation is sustained by normally silent respiratory pathways crossing the midline at the C3-C6 spinal cord levels and called the crossed phrenic pathways (CPP) (Goshgarian, 2003; Fuller et al., 2006; Goshgarian, 2009; Ghali, 2017). However, this marginal spontaneous plasticity is too weak to contribute in functional animal ventilation following C2HS (Dougherty et al., 2012). Strengthening the CPP pathways and providing “new” intraspinal connections to the deafferented motoneurons is a potential target for developing novel therapeutics in order to further improve the respiratory function following high SCI.

One therapeutic aiming to stimulate neural activity is the epidural stimulation. It consists of placing electrodes directly on the spinal cord to stimulate specific areas (Edgerton and Harkema, 2011; Bonizzato et al., 2021). Indeed, cervical repetitive epidural stimulation has been used to elicit neuroplasticity toward deafferented phrenic motoneurons in awake C2HS rats, and this procedure upregulated spinal neurotrophic factor gene expression, *i.e.*, VEGF and BDNF in the

C3-C5 ventral spinal cord (Dale et al., 2019). High frequency epidural stimulation was also used at the level of the phrenic motor nucleus (C4 segment) in C1 transected animals to induce short-term facilitation of phrenic motor circuit (Bezudnaya et al., 2018). Even though epidural stimulation is a promising technic, it remains heavily invasive. A non-invasive alternative method to stimulate neural activity is the transcranial magnetic stimulation (TMS), consisting of applying a high output magnetic field above the neuronal areas.

Indeed, TMS applied as a single pulse or in a repetitive way (rTMS) is a non-invasive and painless therapeutic already used in the clinic to diagnose and treat many disorders (Martin et al., 2017; Yan et al., 2017; Kozel, 2018; McClintock et al., 2018; Jassova et al., 2019), as well as a potential therapeutic in preclinical models of cognitive impairment (Wang et al., 2013; Ma et al., 2019). This technic operates through its neuromodulatory effects on neuronal circuitry (Kobayashi and Pascual-Leone, 2003; Ziemann et al., 2008). The use of rTMS to improve outcomes following incomplete SCI has gained in importance in the past years, but was mainly focused on the locomotor recovery for which functional improvements were observed (Poirrier et al., 2004; Krishnan et al., 2019; Marufa et al., 2021), or even on the sensorimotor restoration (Ellaway et al., 2014; Petrosyan et al., 2017; Krishnan et al., 2019), in preclinical models of SCI. An alternative, repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTSMS) which focus on directly stimulating the spinal cord instead of the brain, also showed encouraging outcomes on locomotor function when delivered alone at high frequency (Leydeker et al., 2013; Chalfouh et al., 2020) or in combination with the administration of neurotrophin 3 (adeno-associated virus 10-neurotrophin 3) (Petrosyan et al., 2015) in models of thoracic SCI.

However, restoration of respiratory function following high SCI emerge as top priority over other motor functions for patients who rely on ventilatory assistance, regarding to, for instance, the improvement of their quality of life. Recently, it was shown that acute high frequency rTMS protocol delivered in anesthetized naive rats induces a long-lasting increase in phrenic system

excitability (Michel-Flutot et al., 2021). This effect was observed via diaphragm motor evoked potentials (MEP_{dia}) recording, in response to single TMS pulses delivered above the animals' motor threshold. MEP_{dia} recording technic was shown to be reliable and reproducible to assess phrenic system excitability (Vinit et al., 2014; Vinit et al., 2016).

However, little is known about the cellular and molecular mechanisms which sustain the neuromodulating effect of acute or chronic rTMS. Few *in vivo* and *in vitro* studies were conducted to try to discover potential cellular mechanisms involved in the neuromodulatory effect of rTMS (Benali et al., 2011; Gersner et al., 2011; Vlachos et al., 2012; Volz et al., 2013). For instance, the excitatory neurotransmission through NMDA and AMPA (GluR1 subunit) receptors increased activity (Hunanyan et al., 2012; Vlachos et al., 2012; Petrosyan et al., 2015), and inhibitory neurotransmission through GABAergic system neuromodulation (Trippe et al., 2009; Lenz et al., 2016) were shown to be involved in the rTMS neuromodulating effect. For example, rTMS protocols can induce a modulation of somatic activity markers expression such as c-fos. Following low frequency repetitive magnetic stimulation (rMS), an increase in c-fos nuclear expression have been observed in neurons of rat organotypic cortex brain slices (Hausmann et al., 2001) whereas following theta burst stimulation applied via rTMS, this expression is decreased in neurons nucleus (Volz et al., 2013). In addition, rMS protocol on SH-SY5Y neuroblastoma cells induced an increase in cAMP and phospho-CREB expression (Hellmann et al., 2012). *In vivo*, protocols using high frequency rSTMS also demonstrate a reduction in the expression of molecules involved in apoptosis and neuronal death whilst the expression of molecules involved in axonal growth and neuronal proliferation is upregulated. These results were accompanied by a reduced axonal demyelination (Chalfouh et al., 2020). A deeper understanding of rTMS-regulated molecular signaling pathways following SCI could therefore help to harness the potential beneficial effects of rTMS as a therapeutic.

The putative rTMS effects on neuroinflammation are also of great interest. Few studies used rTMS on glial cells, but its effects are diverse and depend on the protocol used and the model studied (Cullen and Young, 2016). Chronic low frequency rTMS used on naive rats did not induce any variation in astrocyte and microglia density, showing that this protocol is safe regarding glial cells homeostasis in normal/control condition (Liebetanz et al., 2003). However, chronic high frequency rTMS increased astrocytic and microglia density in a preclinical model of ischemia in gerbils (hippocampus) (Rauš et al., 2013) whereas a decrease in density in a preclinical model of T9 dorsal SCI (compression) have been observed (Kim et al., 2013). In addition, some studies also showed a beneficial effect on the neuroinflammation, through a decrease of the release of TNF α (proinflammatory cytokine) in substantia nigra in Parkinson's disease (Yang et al., 2010; Aftanas et al., 2018).

To date, no study investigated the effect of high frequency rTMS on the impaired respiratory function following cervical SCI, specifically at the phrenic circuit level. The present work aimed to improve respiratory function in a preclinical model of C2HS Sprague-Dawley rat by using chronic 10Hz rTMS treatment and its potential beneficial effects on the respiratory network at functional, cellular and molecular levels.

Material and Methods

Ethics statement

Adult Sprague–Dawley male rats (Janvier, France; n=41, 350-450g) were used for this study. Experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and complied with the French and European laws (EU Directive 2010/63/EU) regarding animal experimentation (Apafis #2017111516297308_v3). Animals were dual housed in individually ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation A78-322-3, France) on a 12-hour light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*.

Chronic C2 hemisection

Prior to anesthesia, animals were premedicated subcutaneously with buprenorphine (Buprécare, 0.03 mg/kg), trimethoprim and sulfadoxin (Borgal 24%, 30 mg/kg), medetomidine (Médétor, 0.1 mg/kg) and carprofen (Rymadyl, 5 mg/kg). 10 minutes after injection, animals were anesthetized with isoflurane (5% in 100% O₂) in a closed chamber. Rats were then intubated and ventilated with a rodent ventilator (model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), and anesthesia was maintained throughout the surgical procedure with isoflurane (2.5% in 100% O₂). For phrenic motoneurons retrograde labeling, intrapleural injections of cholera toxin B fragment was performed bilaterally (15µL/side) using a custom needle (6 mm, 23 gauge, semi-blunt to avoid puncturing of the lung) and a 50µL Hamilton syringe according to previous work (Mantilla et al., 2009). After skin and muscles were retracted, laminectomy and durotomy were performed at the C2 level. The spinal cord was then sectioned unilaterally (left side) with micro-scissors. To ensure the section of potentially remaining fibers, a micro-scalpel was used right after micro-scissors, as described previously (Keomani et al., 2014). For respiratory brainstem neurons retrograde labelling, a sterilized piece of cotton was impregnated with 2µL

of 7% hydroxystilbamidine. Muscles and skin were then sutured close. To reverse medetomidine's effect, atipamezole (Revertor, 0.5 mg/kg) was intramuscularly injected. Isoflurane anesthesia was then turned off and endotracheal tube removed when animals showed sign of waking up. Sham animals received the same surgery without C2 spinal cord hemisection. Rats were monitored during the recovery period.

Repetitive TMS (rTMS) protocol

rTMS protocol was performed using the magnetic stimulator MAGPRO R30 (Magventure, Farum, Denmark) connected to a figure-of-eight coil (Cool-B65) delivering a unique biphasic pulse with an intensity of the stimulus expressed as a percentage of maximum output of the stimulator (% MO). The protocol (9 trains of 100 biphasic pulses, separated by 30 second intervals between trains delivered at 50% of MO, 900 stimulations per protocol) was applied in awake restrained animals at -6mm caudal to Bregma. This protocol induced long-lasting increase of phrenic excitability in anesthetized intact rats (Michel-Flutot et al., 2021). Control animals received a sham rTMS protocol (*e.g.*, no stimulation but with the same restrain time in the custom designed restrain device, Supplementary 1), with total duration the same as rTMS treated animals. This rTMS protocol was applied during 7-days (once a day), 1-month or 2-months (once a day, 5 days per week) (Supplementary 1).

Electrophysiological recordings

Animals were randomly divided into 6 groups: 7 days Sham rTMS (n = 8), 7 days 10Hz rTMS (n = 9), 1-month Sham rTMS (n = 6), 1-month 10Hz rTMS (n = 6), 2-months Sham rTMS (n = 6), 2-months 10 rTMS (n = 6). Electrophysiological recordings of diaphragm activity and excitability were used to functionally evaluate the effects of rTMS treatment on the phrenic motor circuit. Briefly, anesthesia was induced using isoflurane (5% in 21% O₂ balanced) in an

anesthesia chamber and maintained through a nose cone (2.5% in 100% air balanced). Animals were tracheotomized and pump ventilated (Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). The ventilation rate (frequency > 72 breaths per minute, tidal volume: 2.5 ml) was adjusted to reduce the end-tidal CO₂ value below the animals' central apneic threshold throughout the experiment to avoid recording spontaneous diaphragm contractions. During the recordings, animals were placed on a heating pad to maintain a constant body temperature (37.5 ± 0.5 °C) and their rectal temperature was continuously monitored throughout the experiment. Arterial pressure was measured through a catheter inserted into the right femoral artery. Arterial and tracheal pressures were monitored continuously with transducers connected to a bridge amplifier (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The depth of anesthesia was confirmed by the absence of response to toe pinch. A laparotomy was performed, and the liver was gently moved caudally to access the diaphragm. Gauze soaked with warm phosphate-buffered saline was placed on the liver to prevent dehydration. 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 muscle during spontaneous poikilocapnic normoxic or transient mild asphyxia breathing (by occlusion of the animal nose for 15 s after disconnection of tracheal tube from ventilator). 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).

The head of the animal was then placed on a non-magnetic custom-made stereotaxic apparatus which allowed its positioning from the center of the figure-of-eight coil to -6 mm from Bregma, at an angle of 0°, as previously described (Vinit et al., 2014; Michel-Flutot et al., 2021). Two

custom-made hooked bipolar electrodes were inserted on each mid-costal part of the diaphragm and left in place for the entire duration of the experiment. MEPdia induced by a single pulse of TMS was recorded (summation of 5 to 10 TMS pulses between 2 heart beats, max 10 trials at 90% of MO). These electromyographic signals were amplified (gain, 1k; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100Hz to 10kHz). The signals were then digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 100 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 8 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand).

Tissue Processing

At the end of the experiment, animals were euthanized by intracardiac injection of pentobarbital (EXAGON, Axience). An intracardiac perfusion of heparinized 0.9% NaCl (10 mL) for tissue harvesting was then realized, followed by Antigenfix solution (DIAPATH). After perfusion, the C1-C3 and C3-C6 spinal cord and the brainstem were carefully dissected and stored at 4° in the same fixative for 24h. After post-fixation, tissues were cryoprotected for 48h in 30% sucrose (in 0.9% NaCl), and then stored at -80°. Frozen longitudinal (C1-C3 spinal cord) and transverse (C3-C6 spinal cord and brainstem) sections (30 µm) were cut using a Thermo Fisher cryostat. C1-3, C3-C6 and brainstem sections were stored in a cryoprotectant solution (Sucrose 30%, ethylene glycol 30% and PVP40 1% in PBS 1X) at -22°C. A part of the C1-C3 longitudinal sections were used for reconstitution of the extent of C2 injury (cresyl violet staining).

Histological reconstitution of the extent of C2 injury

The extent of injury was assessed after cresyl violet staining on C1-C3 longitudinal sections. 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 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) (Supplementary 2).

Immunofluorescence

For immunofluorescence experiments, free floating transverse sections of the C3-C6 spinal cord and brainstem were washed and placed in a blocking solution (NDS 5% in PBS 1X) for 30 minutes and then incubated with the corresponding antibody in a blocking solution (NDS 5%) overnight on an orbital stirrer at 4°C. After several washes, sections were incubated in the corresponding secondary antibody for 2 h at RT, then washed again. The primary antibodies were directed against Cholera Toxin, B-Subunit (CTB, Calbiochem, 1/1000, goat polyclonal), CREB (Sigma, 1/2000, rabbit polyclonal), GAP-43 (Sigma, 1/2000, mouse monoclonal), Nitric Oxide Synthase II (iNOS, Millipore-Merck, 1/3000, rabbit polyclonal), CD68 (Millipore-Merck, 1/300, mouse monoclonal), Iba1 (Abcam, 1/400, goat polyclonal), phospho-c-Jun (Ser63) II (Cell Signaling, 1/200, rabbit polyclonal), and GFAP (Millipore-Merck, 1/4000, rabbit polyclonal). The secondary antibodies were linked to the fluorochromes Alexa Fluor 488, 594 (Molecular Probes, 1/2000) or 647 (Invitrogen, 1/2000). Biotinylated Wisteria Floribunda lectin (WFA, Vector laboratories, 1/2000) with Alexa Fluor 488 Avidin (Molecular Probes, 1/1000) were used to labeled Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG). Images of the different sections were captured with a Hamamatsu ORCA-R² camera mounted on an Olympus IX83 P2ZF microscope, or a 3dhistech panoramic slide scanner. Images were analyzed using ImageJ 1.53n software (NIH, USA).

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). Diaphragm MEP traces for each side (at least 5 MEPdia) were averaged and superimposed using LabChart Pro software (AD Instruments). The baseline-to-peak amplitude of the first wave of each superimposed MEPdia was calculated.

One-way ANOVA was performed between the different groups for the extent of injury evaluation. Comparisons between intact and injured sides for diaphragmatic EMG and MEP and between eupnea and asphyxia for diaphragmatic EMG were done by Student paired t-test. Two-way ANOVA (Fisher LSD Method for multiple comparisons) was used to compare MEPdia throughout the experiment and between different rTMS protocols. t-test were used to compare values of the same side (intact or injured) between the different protocols (between 7-days, 1-month and 2-months Sham rTMS or between 7-days, 1-month and 2-months 10Hz rTMS) and to compare Sham and 10Hz rTMS groups values for the same time-point (at 7-days, 1-month and 2-months). Paired t-test were used to compare values of intact and injured side of the same animal.

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

Results

Effect on diaphragm activity during eupnea

Diaphragm activity were assessed by recording EMGdia amplitude for both intact and injured sides (Figure 1A). Following the C2 injury, a reduction in EMGdia amplitude was observed 15 days post-injury (P.I.) for the injured side (7-days Sham rTMS = $0.06 \pm 0.08 \mu\text{V.s.s}$) compared to intact side ($0.54 \pm 0.20 \mu\text{V.s.s}$, $p < 0.001$). This reduced diaphragm activity persisted for the injured side in Sham rTMS treated animals at 36 days P.I. ($0.00 \pm 0.00 \mu\text{V.s.s}$) and 64 days P.I. ($0.03 \pm 0.04 \mu\text{V.s.s}$) ($p > 0.05$). The 10Hz rTMS protocols did not induced significant variation of injured side's EMGdia amplitude in 7-days rTMS ($0.01 \pm 0.02 \mu\text{V.s.s}$), 1-month rTMS ($0.01 \pm 0.03 \mu\text{V.s.s}$) and 2-months rTMS ($0.03 \pm 0.03 \mu\text{V.s.s}$) animals ($p > 0.05$). For the intact side, no variation was observed between Sham rTMS group ($0.54 \pm 0.20 \mu\text{V.s.s}$) and 10Hz rTMS group ($0.51 \pm 0.21 \mu\text{V.s.s}$) following 7-days of treatment ($p = 0.772$). However, following 1-month rTMS protocol, 10Hz treated animals ($0.63 \pm 0.15 \mu\text{V.s.s}$) presented a significantly higher EMGdia amplitude compared to Sham treated animals ($0.45 \pm 0.10 \mu\text{V.s.s}$, $p = 0.011$). After 2-months of rTMS treatment, this difference between Sham treated animals ($0.67 \pm 0.14 \mu\text{V.s.s}$) and 10Hz treated animals ($0.64 \pm 0.12 \mu\text{V.s.s}$) disappeared ($p = 0.656$) due to an increase in EMGdia amplitude between 1-month ($0.45 \pm 0.10 \mu\text{V.s.s}$) vs 2-months ($0.67 \pm 0.14 \mu\text{V.s.s}$) of Sham rTMS treatment ($p = 0.039$) (Figure 1B).

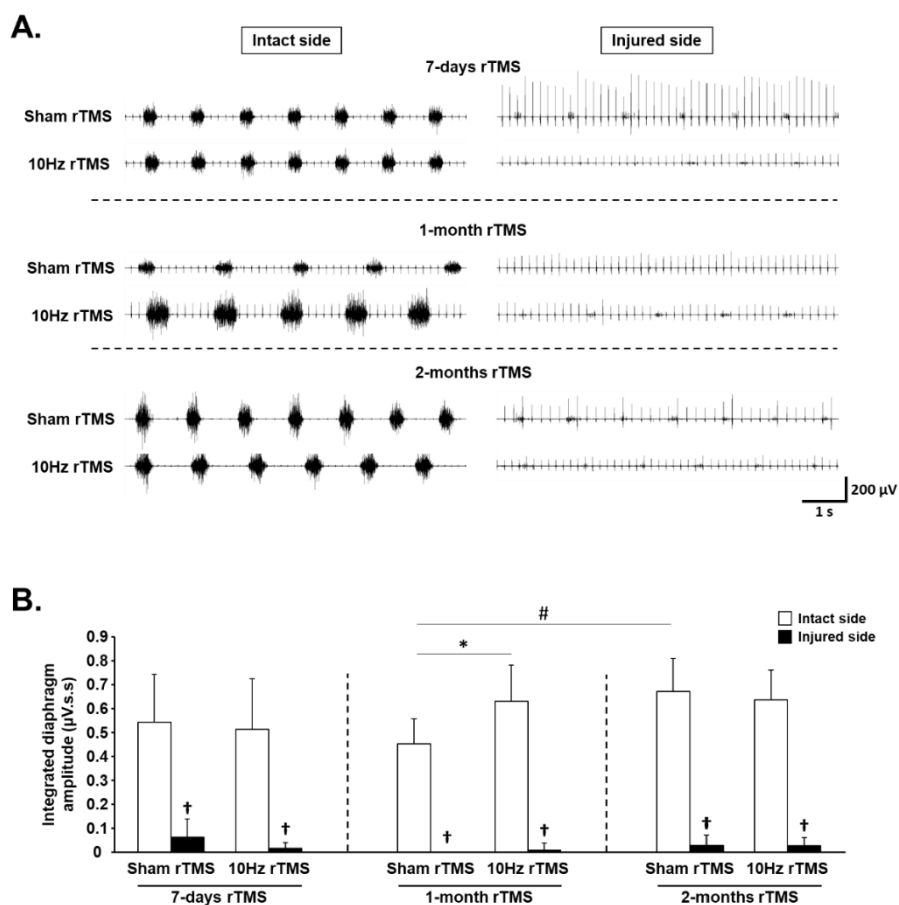


Figure 1: Diaphragm activity in C2 hemisected rats following chronic Sham and 10Hz rTMS

A. Representative traces of raw diaphragm EMG of C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **B.** Integrated diaphragm amplitude for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. † $p < 0.001$, compared to intact side. * $p = 0.011$, intact side of Sham rTMS group vs intact side of 10Hz rTMS group following 1-month treatment. # $p = 0.039$, intact side of Sham rTMS group following 1-month treatment vs corresponding group following 2-months treatment.

Effect on diaphragm activity response to respiratory challenge

Diaphragm activity in response to respiratory challenge (i.e., mild asphyxia) were evaluated. During mild asphyxia, no variation of EMGdia amplitude were observed compared to eupnea for the intact side of 7-days Sham ($0.29 \pm 0.16 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.34 \pm 0.15 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.087$) (Figure 2A), 7-days 10Hz ($0.45 \pm 0.21 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.49 \pm 0.23 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.456$) (Figure 2B) and 1-month 10Hz rTMS ($0.53 \pm 0.21 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.41 \pm 0.14 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.134$) (Figure 2D) groups, and for the injured side of 7-days Sham ($0.06 \pm 0.06 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.08 \pm 0.08 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.688$) (Figure 2A), 7-days 10Hz ($0.10 \pm 0.18 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.10 \pm 0.05 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.297$) (Figure 2B), 1-month Sham ($0.02 \pm 0.05 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.03 \pm 0.07 \mu\text{V.s.s}$; $p = 1.000$) (Figure 2C), 1-month 10Hz ($0.00 \pm 0.00 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.02 \pm 0.05 \mu\text{V.s.s}$; $p = 1.000$) (Figure 2D) and 2-months Sham ($0.01 \pm 0.02 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.02 \pm 0.04 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.500$) (Figure 2E) rTMS groups.

A significant decrease during mild asphyxia compared to eupnea was observed for the intact side of 1-month Sham ($0.45 \pm 0.10 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.33 \pm 0.06 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.022$) (Figure 2C), 2-months Sham ($0.58 \pm 0.12 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.40 \pm 0.11 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.001$) (Figure 2E) and 2-months 10Hz ($0.56 \pm 0.09 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.37 \pm 0.13 \mu\text{V.s.s}$; $p < 0.001$) (Figure 2F) rTMS groups, and only the 2-months 10Hz rTMS group presented a significant increase for the injured side compared to eupnea ($0.02 \pm 0.03 \mu\text{V.s.s}$ vs $0.05 \pm 0.05 \mu\text{V.s.s}$; $p = 0.029$) (Figure 2F).

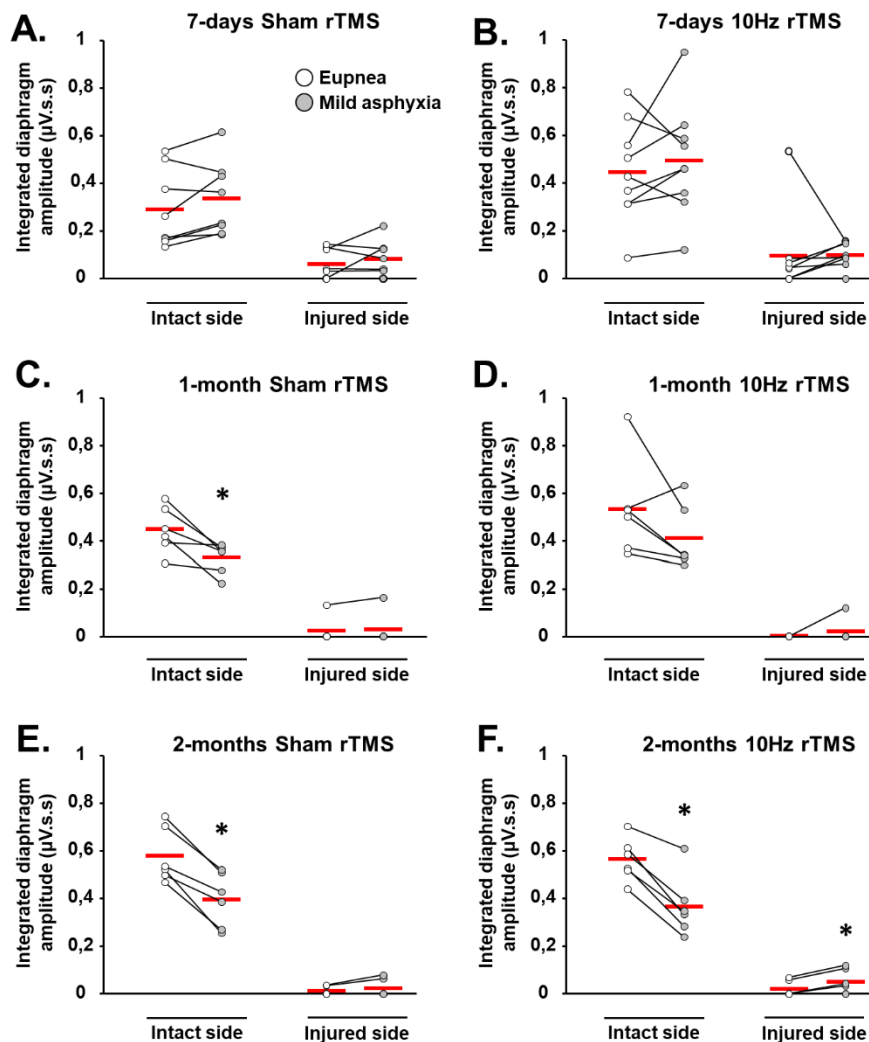


Figure 2: Diaphragm activity in C2 hemisectioned rats following chronic Sham and 10Hz rTMS during respiratory challenge

Integrated diaphragm amplitude for 7-days Sham (A) and 10Hz (B) rTMS, 1-month Sham (C), and 10Hz (D) rTMS groups in eupnea and while mild asphyxia. * p<0.05 mild asphyxia compared to eupnea (Paired t-test).

Effect on phrenic system excitability

MEP_{dia} amplitude were also measured in response to a single pulse of TMS to evaluate phrenic excitability following rTMS protocols (Figure 3A). No difference was observed between 7-days Sham rTMS and 7-days 10Hz rTMS groups for intact (0.93 ± 0.90 mV vs 0.99 ± 0.90 mV; $p = 0.895$) and injured sides (0.92 ± 0.70 mV vs 0.55 ± 0.37 mV; $p = 0.208$), similar to between 2-months Sham and 2-months 10Hz rTMS groups for intact (0.69 ± 0.12 mV vs 0.64 ± 0.46 mV; $p = 0.771$) and injured sides (0.81 ± 0.24 mV vs 0.76 ± 0.48 mV; $p = 0.822$). No difference was also observed between intact and injured sides for 7-days protocols (7-days Sham intact vs injured sides: $p = 0.970$; 7-days 10Hz rTMS intact vs injured sides: $p = 0.114$) and 2-months protocols (2-months Sham intact vs injured sides: $p = 0.344$; 2-months 10Hz rTMS intact vs injured sides: $p = 0.078$). The 1-month 10Hz rTMS did not induce a variation in MEP_{dia} amplitude compared to 1-month Sham rTMS for the intact side (0.55 ± 0.26 mV vs 0.32 ± 0.12 mV respectively; $p = 0.078$) and for the injured side (0.66 ± 0.30 mV vs 0.61 ± 0.28 mV respectively; $p = 0.743$). No difference was observed between intact and injured sides for 1-month 10Hz rTMS treated animals ($p = 0.205$), but for 1-month Sham rTMS treated animals, the intact side present a significantly lower MEP_{dia} amplitude compared to injured side ($p = 0.028$). After 2-months of Sham rTMS, MEP_{dia} amplitude of the intact side (0.69 ± 0.12 mV) significantly increased compared to 1-month Sham rTMS (0.32 ± 0.12 mV; $p < 0.001$) (Figure 3B).

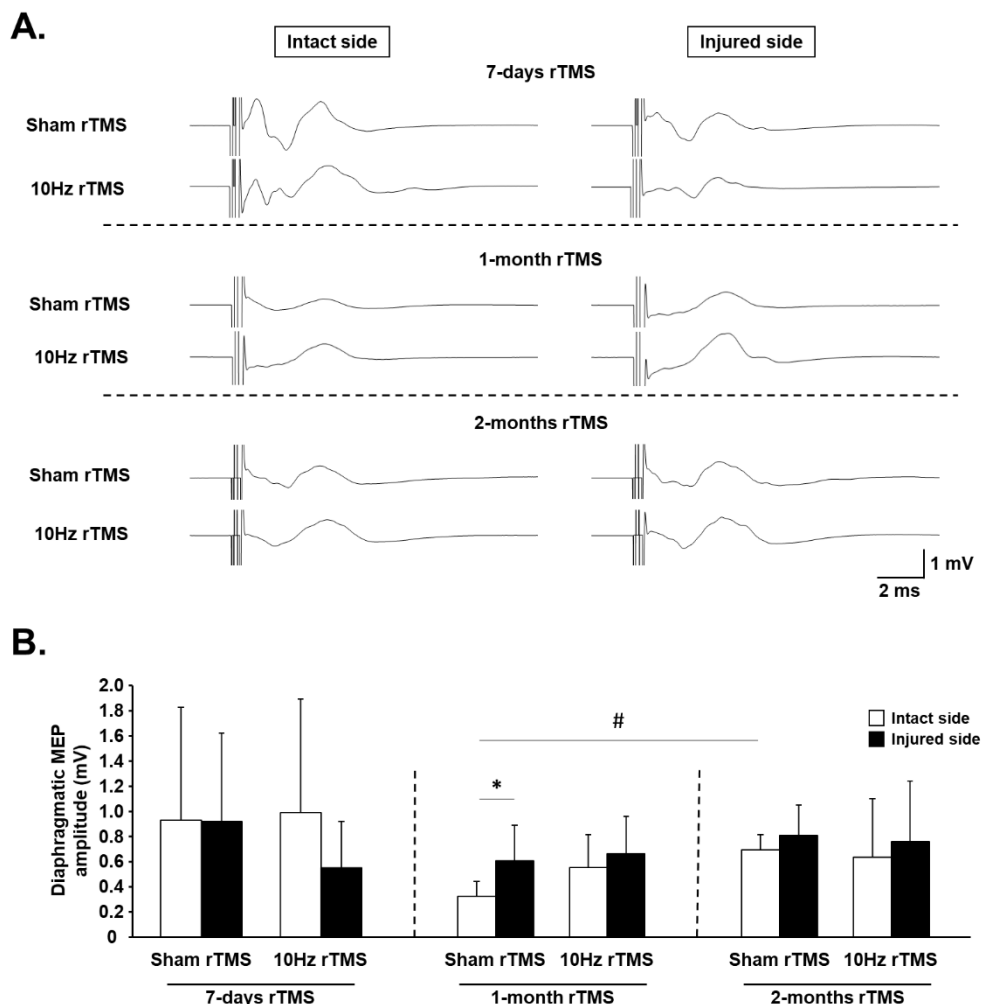


Figure 3: Diaphragm excitability in C2 hemisected rats following chronic Sham and 10Hz rTMS

A. Representative traces of raw diaphragm MEP of C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **B.** MEP amplitude for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. * $p = 0.028$, intact side vs injured side of Sham rTMS group following 1-month treatment. # $p < 0.001$, intact side of Sham rTMS group following 1-month treatment vs corresponding group following 2-months treatment.

Effect on the expression of activity markers in C3-C6 spinal cord

The expression of CREB, a plasticity marker, was then evaluated in the C3-C6 spinal cord where the phrenic motoneurons are located (Figure 4A).

CREB is a transcription factor involved in synaptic plasticity whose expression was evaluated in phrenic motoneurons (Figure 4A). The percentage of phrenic motoneurons expressing CREB is significantly reduced for the intact side after 1-month of rTMS in Sham treated animals (17.00 ± 32.71) and in 10Hz treated animals (2.38 ± 5.83) compared to 7-days treated animals (69.33 ± 29.22 , $p = 0.012$; and 54.25 ± 30.35 , $p = 0.007$ respectively). For the injured side, a reduced expression is also observed in 1-month of 10Hz rTMS group animals (0.00 ± 0.00) compared to 7-days treated group (51.75 ± 29.49 ; $p = 0.004$) (Figure 4B).

Interestingly, the expression of iNOS, which produces nitric oxide, a reactive oxygen species, did not display any variation in expression in phrenic motoneurons in C3-C6 spinal cord regardless of their deafferentation or rTMS treatment (Supplementary 3). Moreover, identified rVRG injured respiratory neurons that innervate phrenic motoneurons did not present any variation in p-c-Jun and CREB expression between 1 and 2-months of Sham or 10Hz rTMS treatment (Supplementary 4 and 5 respectively), and any variation in CSPG expression (Supplementary 6) could be observed in rVRG area.

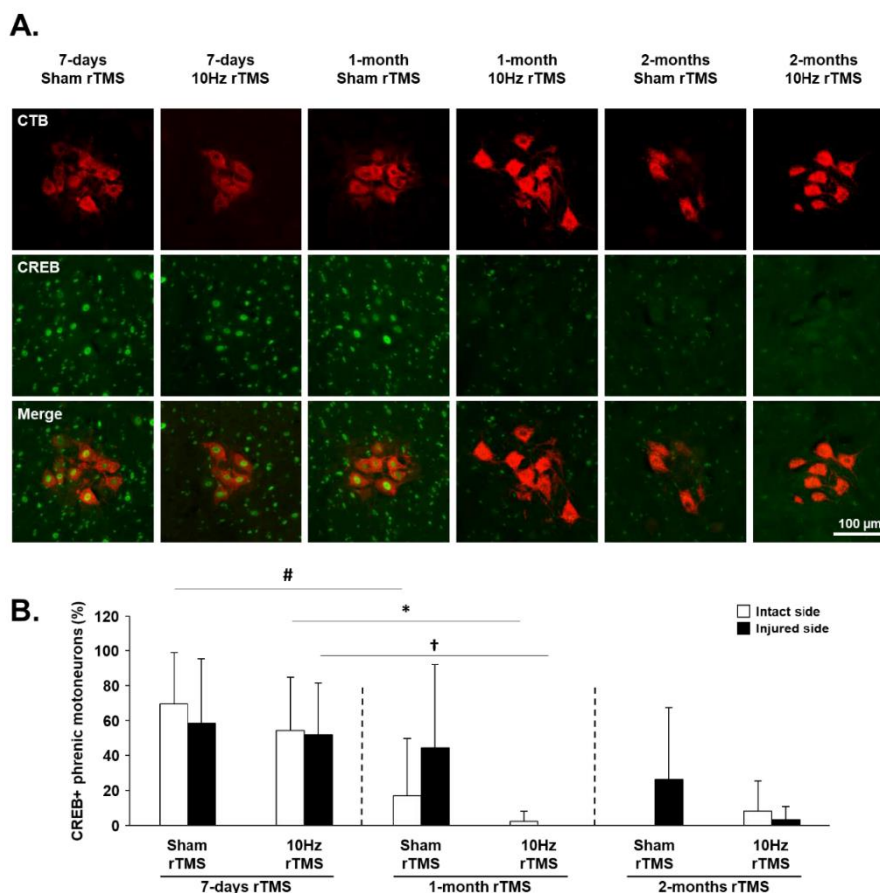


Figure 4: CREB expression in phrenic motoneurons following C2 hemisection

A. Representative images showing expression of CREB in deafferented phrenic motoneurons labeled with CTB in C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **B.** Quantification of the percentage of CREB expressing phrenic motoneurons for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. There is no difference between the intact and the injured sides for the different groups (Paired t-test for intact vs injured side, $p > 0.05$). # 7-days Sham rTMS intact side compared to 1-month Sham rTMS intact side, $p = 0.012$. * 7-days 10Hz rTMS intact side compared to 1-month 10Hz rTMS intact side, $p = 0.007$. † 7-days 10Hz rTMS injured side compared to 1-month 10Hz rTMS injured side, $p = 0.004$.

Effect on the expression of inflammatory marker in C1-C3 spinal cord

The activation and the presence of inflammatory cells were then evaluated in the injured C1-C3 spinal cord following 1-month and 2-months of rTMS treatment (Figure 5A). For the injured side, the surface occupied by Iba1 labeling was reduced in 1-month 10Hz rTMS treated animals (10.72 ± 5.73 %) compared to 1-month Sham rTMS treated animals (23.74 ± 8.45 %; $p < 0.05$) between $-345 \mu\text{m}$ and $+345 \mu\text{m}$ from lesion epicenter, as well as between $-690 \mu\text{m}$ and $-345 \mu\text{m}$ from lesion epicenter (1-month 10Hz rTMS treated animals: 13.72 ± 9.42 % vs 1-month Sham rTMS: 24.46 ± 6.31 %; $p < 0.05$) (Figure 5B). No difference was observed between groups for CD68 labeling on this side (Figure 5D). For the intact side, there is no difference between groups for Iba1 labeling (Figure 5C). However, the surface occupied by CD68 positive cells is reduced in 2-months 10Hz rTMS (0.02 ± 0.03 %) compared to 2-months non-treated animals (0.33 ± 0.39 %; $p < 0.05$) between $-345 \mu\text{m}$ and $+345 \mu\text{m}$ from lesion epicenter (Figure 5E).

The surface occupied by astrocytes labeled with GFAP, and by CSPG labeled with WFA, were also studied in the C1-C3 injured spinal cord (Figure 6A). There was no difference in GFAP expression for the intact and the injured sides (Figure 6B and C). WFA labeling was reduced in 2-months 10Hz rTMS (9.04 ± 3.42 %) compared to 1-month 10Hz rTMS treated animals (17.14 ± 9.54 %; $p < 0.05$) for injured side (Figure 6D). No difference was observed in CSPG expression for the intact side (Figure 6E).

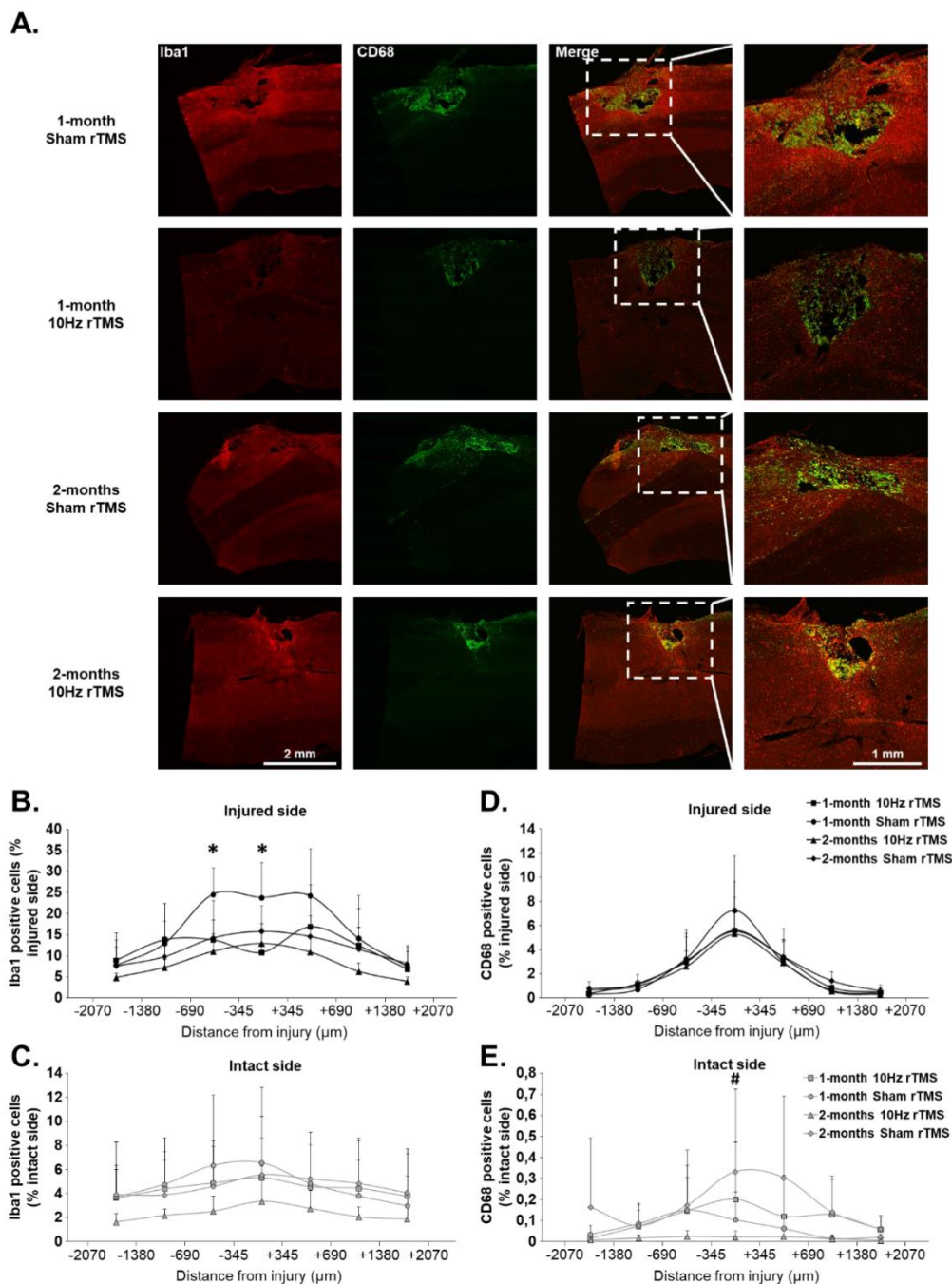


Figure 5: Iba1 and CD68 expression in the C1-C3 spinal cord following C2 hemisection

A. Representative images showing expression of Iba1 and CD68 at the site of the lesion in C2 hemisectioned rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment.

Quantification of Iba1 expression intact side (B) or injured side (C) of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisectioned animals following 1-month or 2 months treatment. Quantification of CD68 expression intact side (D) or injured side (E) of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisectioned animals following 1-month or 2 months treatment. * 1-month 10Hz rTMS vs 1-month Sham Hz rTMS, Two-way-ANOVA, $p < 0.05$. # 2-month 10Hz rTMS vs 2-month Sham Hz rTMS, Two-way-ANOVA, $p < 0.05$.

Effect on GAP-43 expression, a structural marker in the ventrolateral funiculi of the C3-C6 spinal cord

GAP-43 is expressed in axonal growth cones. GAP-43 expression was evaluated in the ventrolateral funiculi of the C3-C6 spinal cord (Figure 7A, B and C). The surface occupied by GAP-43 is reduced 15 days (7-days treated), 36 days (1-month treated) and 64 days P.I. (2-months treated) for the injured side compared to intact side for all 10Hz rTMS and Sham rTMS groups ($p < 0.001$). No variation was observed over time for the intact side and the injured side, and 10Hz rTMS treatment did not induce any effect on GAP-43 expression. However, a slight increase tendency in GAP-43 expression on the intact side at 1-month 10Hz rTMS compared to 1-month non-treated animals (Figure 7B).

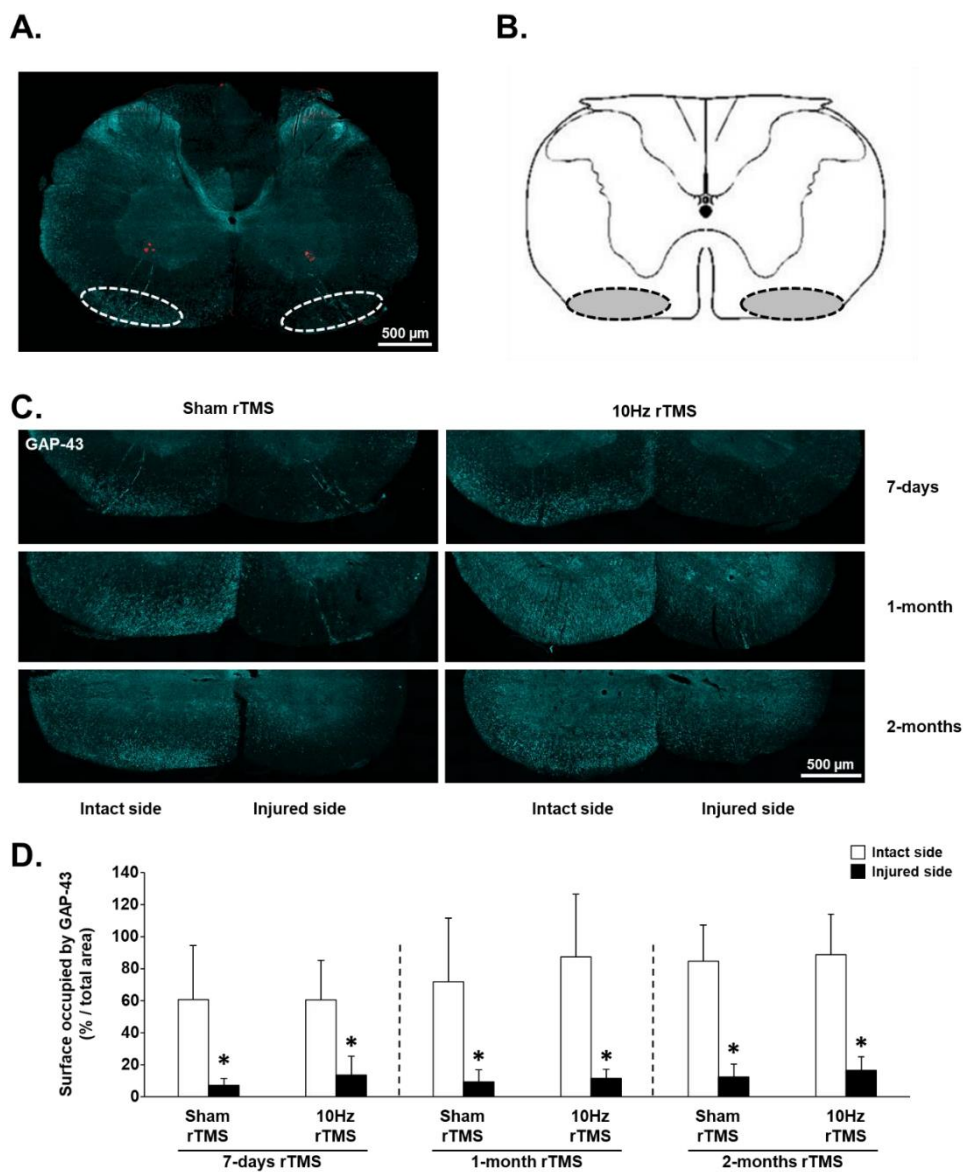


Figure 7: GAP-43 expression in C3-C6 ventrolateral funiculi following C2 hemisection

A. Representative image showing location of phrenic motoneurons in red and the location of the ventrolateral funiculi (white dashed line). **B.** Schematic representation of a transversal section of the spinal cord showing the ventrolateral funiculi (black dashed line). **C.** Representative images showing expression of GAP-43 expression in C3-C6 ventrolateral funiculi in C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **D.** Quantitative analysis of the GAP-43 immunolabeled area in the ventrolateral funiculi for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. There is no difference between intact side groups, and between injured groups (T-test, $p > 0.05$). * compared to intact side, $p < 0.01$.

Discussion

The present study is the first to investigate the therapeutic effect of a chronic rTMS protocol in order to improve respiratory function following cervical spinal cord injury in a preclinical model. Indeed, our protocol was initially designed to stimulate neurons connected to the neurorespiratory network, our previous work already demonstrated that a single delivery of 10Hz rTMS protocol acutely in anesthetized rat induce an increase in phrenic network excitability (Michel-Flutot et al., 2021). This 10Hz magnetic stimulation is recognized for its LTP-like effect (Lenz et al., 2015; Lenz et al., 2016). We therefore hypothesized that the chronic delivery of this protocol could induce beneficial effects on respiratory recovery after cervical spinal cord injury.

Unfortunately, the analysis of EMG_{dia} recordings showed the application of chronic 10Hz rTMS had no effect on diaphragm activity on the injured side, regardless of the duration of rTMS treatment. Conversely, an increase of diaphragm activity on the intact side after 1-month of treatment in C2HS animals is observed compared to non-treated animals. This increase cannot be observed after 7 days of rTMS treatment. Interestingly, non-treated animals reach an EMG_{dia} amplitude similar to those of treated animals at 9 weeks post-injury. These results suggest that chronic 10Hz rTMS could strengthen residual descending respiratory fibers to a certain extent, reflecting the existence of a “ceiling effect” beyond which recovery cannot be further improved solely with rTMS. This would allow the intact hemidiaphragm to better compensate for the loss of paralyzed hemidiaphragm. These results are in part consistent with MEP_{dia} results. Indeed, rats treated with 10Hz rTMS do not present significant difference in MEP amplitude recordings over time, whereas non treated rats present a reduced amplitude for the intact side compared to the injured side following 1-month of treatment, and values similar to those of rTMS treated rats by 2-months of treatment. These results suggest that non-deafferented phrenic motoneurons excitability is reduced in non-treated animals, and our 10Hz

rTMS protocol allows to maintain basal excitability in these motoneurons. Moreover, at 2-months post-rTMS treatment, an increased response to asphyxia is observed on the injured side, whereas no response is observed in non-treated animals. This reflects a strengthening of the existing CPP, which is consistent with another study showing that the CPP can be elicited spontaneously in rat at 3-months post-C2 hemisection in rat, but not at 7-days post-lesion (Vinit and Kastner, 2009). These phenomena could be sustained in part by a strengthening of descending respiratory fibers on the intact side. Indeed, even if not significant, a slight increase is observed in GAP-43 expression in the C3-C6 ventrolateral funiculi for 1-month 10Hz treated animals compared to 7-days 10Hz rTMS treated and 1-month-non treated animals, and is also observed at 2-months 10Hz and Sham rTMS treated animals. These results observed in the ventrolateral funiculi could be a structural reflection of what happened in all descending fibers, respiratory fibers included. The reduction of CREB expression in phrenic motoneurons is also more rapidly observed in 10Hz treated animals compared to Sham treated animals, supporting the idea that potential plasticity processes induced by CREB signaling pathway occurred in phrenic motoneurons early in response to the 10Hz treatment. Moreover, the reduction in CD68 positive cells in intact side of the C1-C3 spinal cord could reflect a reduction in inflammation induced by the 10Hz rTMS treatment, leading to a strengthening of descending neuronal fibers. However, we did not observe variation of CREB or p-c-Jun expression in injured rVRG neurons, these molecules being involved in synaptic plasticity and axonal regeneration (Mahar and Cavalli, 2018). This potential strengthening of descending respiratory fibers may be successive to CREB and/or p-c-Jun activity, meaning we exceeded their activity window in this present study. These could also explain why the injured side seems to be able to recruit more phrenic motoneurons during asphyxia following 2-months of chronic 10Hz rTMS. Indeed, this observation could be an indication of a strengthening of the crossed phrenic pathways induced by the 10Hz rTMS treatment. Moreover, we observed a reduction in the surface occupied by

microglia, but not by CD68 positive cells, astrocytes or even by CSPG around the lesion site. These results are consistent with another study in which 14 -days of 10Hz rTSMS was applied at the lesion site in mice following thoracic spinal cord injury. They indeed observed a locomotor recovery along with an increase in the surface occupied by GFAP positive cells, and a reduction in Iba1 positive cells. Their study also showed that their rTSMS protocol induces an increase in activation state of molecules involved in neuronal plasticity (Chalfouh et al., 2020).

In this study, we choose to specifically stimulate at the cortical level to target neuronal networks connected to the neurorespiratory network located in the brainstem. The other studies which tried to use repetitive magnetic stimulation to induce functional recovery used thoracic model of spinal cord injury, and focused the application of the magnetic field at the site of injury. Indeed, studies in mice showed that 10Hz or even 10Hz chronic rTSMS induce locomotor improvement following thoracic injury (Leydeker et al., 2013; Chalfouh et al., 2020), but lower frequency (0.2 Hz) of rTSMS in rat did not (Petrosyan et al., 2015). However, in this latest protocol, when combined with exercise protocol and the delivery of neurotrophin-3, an improvement of locomotor function is observed (Petrosyan et al., 2015). These data as well our results suggest that either 10Hz rTMS protocol alone cannot induce a functional diaphragmatic recovery in rat by itself, and need to be combined with another approach/therapeutic (*i.e.* exercise (Jesus et al., 2021)) to be fully efficient on the post-traumatic recovery.

To conclude, our rTMS protocol improved and accelerate the capacity of the intact hemidiaphragm to compensate for the paralyzed hemidiaphragm. Despite the absence of functional recovery observed on the deafferented hemidiaphragm, high frequency rTMS strengthened the existing CPP, which means our animals are able to better adapt their

respiratory capacity. Our protocol could however gain to be combined to another neuromodulating/rehabilitation strategy in order to obtain a better outcome.

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 (SV, AM), the National Institutes of Health, NINDS, R01 NS104291 (MAL) 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.

Author contributions:

Pauline Michel-Flutot: Conceptualization, Methodology, Investigation, Project administration, Formal analysis, Visualization, Writing - Original Draft. **Isley Jesus:** Investigation. **Valentin Vanhee:** Investigation. **Camille Bourcier:** Investigation. **Laila Emam:** Investigation. **Abderrahim Ouguerroudj:** Investigation. **Kun-Ze Lee:** Writing - Review & Editing. **Michael A. Lane:** Writing - Review & Editing. **Marcel Bonay:** Writing - Review & Editing. **Arnaud Mansart:** Investigation, Writing - Review & Editing. **Stéphane Vinit:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - Review & Editing.

Data Accessibility

All the data can be available upon request.

References:

- Aftanas LI, Gevorgyan MM, Zhanaeva SY, Dzemidovich SS, Kulikova KI, Al'perina EL, Danilenko KV, Idova GV (2018) Therapeutic Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) on Neuroinflammation and Neuroplasticity in Patients with Parkinson's Disease: a Placebo-Controlled Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 165:195-199.
- Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J (2011) Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* 475:196-200.
- Benali A, Trippe J, Weiler E, Mix A, Petrasch-Parwez E, Girzalsky W, Eysel UT, Erdmann R, Funke K (2011) Theta-burst transcranial magnetic stimulation alters cortical inhibition. *J Neurosci* 31:1193-1203.
- Bezduznaya T, Lane MA, Marchenko V (2018) Paced breathing and phrenic nerve responses evoked by epidural stimulation following complete high cervical spinal cord injury in rats. *J Appl Physiol* (1985) 125:687-696.
- Bonizzato M, James ND, Pidpruzhnykova G, Pavlova N, Shkorbatova P, Baud L, Martinez-Gonzalez C, Squair JW, DiGiovanna J, Barraud Q, Micera S, Courtine G (2021) Multi-pronged neuromodulation intervention engages the residual motor circuitry to facilitate walking in a rat model of spinal cord injury. *Nat Commun* 12:1925.
- Chalfouh C, Guillou C, Hardouin J, Delarue Q, Li X, Duclos C, Schapman D, Marie JP, Cosette P, Guéroul N (2020) The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect. *Neurotherapeutics*.
- Cullen CL, Young KM (2016) How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Frontiers in Neural Circuits* 10.
- Dale EA, Sunshine MD, Kelly MN, Mitchell GS, Fuller DD, Reier PJ (2019) Chronic, closed-loop, cervical epidural stimulation elicits plasticity in diaphragm motor output and upregulates spinal neurotrophic factor gene expression. *The FASEB Journal* 33:843.810-843.810.
- Dougherty BJ, Lee KZ, Lane MA, Reier PJ, Fuller DD (2012) Contribution of the spontaneous crossed-phrenic phenomenon to inspiratory tidal volume in spontaneously breathing rats. *J Appl Physiol* (1985) 112:96-105.
- Edgerton VR, Harkema S (2011) Epidural stimulation of the spinal cord in spinal cord injury: current status and future challenges. *Expert review of neurotherapeutics* 11:1351-1353.
- Ellaway PH, Vásquez N, Craggs M (2014) Induction of central nervous system plasticity by repetitive transcranial magnetic stimulation to promote sensorimotor recovery in incomplete spinal cord injury. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 8.
- Fuller DD, Golder FJ, Olson EB, Jr., Mitchell GS (2006) Recovery of phrenic activity and ventilation after cervical spinal hemisection in rats. *J Appl Physiol* (1985) 100:800-806.
- Gersner R, Kravetz E, Feil J, Pell G, Zangen A (2011) Long-term effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on markers for neuroplasticity: differential outcomes in anesthetized and awake animals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:7521-7526.
- Ghali MGZ (2017) The crossed phrenic phenomenon. *Neural Regen Res* 12:845-864.
- Golder FJ, Reier PJ, Bolser DC (2001) Altered respiratory motor drive after spinal cord injury: Supraspinal and bilateral effects of a unilateral lesion. *J Neurosci* 21:8680-8689.
- Goshgarian HG (2003) Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol* 94:795-810.
- Goshgarian HG (2009) The crossed phrenic phenomenon and recovery of function following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:85-93.
- Hausmann A, Marksteiner J, Hinterhuber H, Humpel C (2001) Magnetic stimulation induces neuronal c-fos via tetrodotoxin-sensitive sodium channels in organotypic cortex brain slices of the rat. *Neuroscience Letters* 310:105-108.

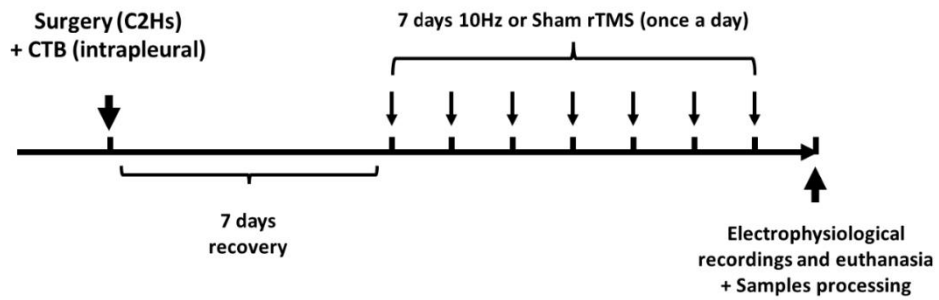
- Hellmann J, Jüttner R, Roth C, Bajbouj M, Kirste I, Heuser I, Gertz K, Endres M, Kronenberg G (2012) Repetitive magnetic stimulation of human-derived neuron-like cells activates cAMP-CREB pathway. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262:87-91.
- Hunanyan AS, Petrosyan HA, Alessi V, Arvanian VL (2012) Repetitive spinal electromagnetic stimulation opens a window of synaptic plasticity in damaged spinal cord: role of NMDA receptors. *J Neurophysiol* 107:3027-3039.
- Jassova K, Albrecht J, Ceresnakova S, Papezova H, Anders M (2019) Repetitive transcranial magnetic stimulation significantly influences the eating behavior in depressive patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15:2579-2586.
- Jesus I, Michel-Flutot P, Deramaudt TB, Paucard A, Vanhee V, Vinit S, Bonay M (2021) Effects of aerobic exercise training on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury. *Scientific reports* 11:112.
- Keomani E, Deramaudt TB, 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* 87:e51235.
- Kim JY, Choi GS, Cho YW, Cho H, Hwang SJ, Ahn SH (2013) Attenuation of spinal cord injury-induced astroglial and microglial activation by repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *J Korean Med Sci* 28:295-299.
- Kobayashi M, Pascual-Leone A (2003) Transcranial magnetic stimulation in neurology. *The Lancet Neurology* 2:145-156.
- Kozel FA (2018) Clinical Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Posttraumatic Stress Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Bipolar Disorder. *Psychiatr Clin North Am* 41:433-446.
- Krishnan VS, Shin SS, Belegu V, Celnik P, Reimers M, Smith KR, Pelled G (2019) Multimodal Evaluation of TMS - Induced Somatosensory Plasticity and Behavioral Recovery in Rats With Contusion Spinal Cord Injury. *Front Neurosci* 13:387.
- Lane MA, Lee K-Z, Fuller DD, Reier PJ (2009) Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:123-132.
- Lee KZ, Huang YJ, Tsai IL (2014) Respiratory motor outputs following unilateral midcervical spinal cord injury in the adult rat. *J Appl Physiol* 116:395-405.
- Lenz M, Platschek S, Priesemann V, Becker D, Willems LM, Ziemann U, Deller T, Muller-Dahlhaus F, Jedlicka P, Vlachos A (2015) Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct Funct* 220:3323-3337.
- Lenz M, Galanis C, Muller-Dahlhaus F, Opitz A, Wierenga CJ, Szabo G, Ziemann U, Deller T, Funke K, Vlachos A (2016) Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat Commun* 7:10020.
- Leydeker M, Delva S, Tserlyuk I, Yau J, Wagdy M, Hawash A, Bendaoud S, Mohamed S, Wieraszko A, Ahmed Z (2013) The effects of 15 Hz trans-spinal magnetic stimulation on locomotor control in mice with chronic contusive spinal cord injury. *Electromagn Biol Med* 32:155-164.
- Liebetanz D, Fauser S, Michaelis T, Czéh B, Watanabe T, Paulus W, Frahm J, Fuchs E (2003) Safety aspects of chronic low-frequency transcranial magnetic stimulation based on localized proton magnetic resonance spectroscopy and histology of the rat brain. *J Psychiatr Res* 37:277-286.
- Ma Q, Geng Y, Wang HL, Han B, Wang YY, Li XL, Wang L, Wang MW (2019) High Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Alleviates Cognitive Impairment and Modulates Hippocampal Synaptic Structural Plasticity in Aged Mice. *Front Aging Neurosci* 11:235.
- Mahar M, Cavalli V (2018) Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nature reviews Neuroscience* 19:323-337.
- Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC (2009) Retrograde labeling of phrenic motoneurons by intrapleural injection. *J Neurosci Methods* 182:244-249.

- Martin DM, McClintock SM, Forster JJ, Lo TY, Loo CK (2017) Cognitive enhancing effects of rTMS administered to the prefrontal cortex in patients with depression: A systematic review and meta-analysis of individual task effects. *Depress Anxiety* 34:1029-1039.
- Marufa SA, Hsieh TH, Liou JC, Chen HY, Peng CW (2021) Neuromodulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neural plasticity and motor functions in rats with an incomplete spinal cord injury: A preliminary study. *PLoS one* 16:e0252965.
- McClintock SM, Reti IM, Carpenter LL, McDonald WM, Dubin M, Taylor SF, Cook IA, O'Reardon J, Husain MM, Wall C, Krystal AD, Sampson SM, Morales O, Nelson BG, Latoussakis V, George MS, Lisanby SH (2018) Consensus Recommendations for the Clinical Application of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in the Treatment of Depression. *J Clin Psychiatry* 79.
- Michel-Flutot P, Zholudeva LV, Randelman ML, Deramautd TB, Mansart A, Alvarez J-C, Lee K-Z, Petitjean M, Bonay M, Lane MA, Vinit S (2021) High frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation promotes long lasting phrenic motoneuron excitability via GABAergic networks. *Respiratory physiology & neurobiology*:103704.
- Nantwi KD, El-Bohy AA, Schrimsher GW, Reier PJ, Goshgarian HG (1999) Spontaneous Functional Recovery in a Paralyzed Hemidiaphragm Following Upper Cervical Spinal Cord Injury in Adult Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 13:225-234.
- Petrosyan HA, Alessi V, Hunanyan AS, Sisto SA, Arvanian VL (2015) Spinal electro-magnetic stimulation combined with transgene delivery of neurotrophin NT-3 and exercise: novel combination therapy for spinal contusion injury. *J Neurophysiol* 114:2923-2940.
- Petrosyan HA, Alessi V, Sisto SA, Kaufman M, Arvanian VL (2017) Transcranial magnetic stimulation (TMS) responses elicited in hindlimb muscles as an assessment of synaptic plasticity in spino-muscular circuitry after chronic spinal cord injury. *Neuroscience Letters* 642:37-42.
- Poirrier AL, Nyssen Y, Scholtes F, Multon S, Rinkin C, Weber G, Bouhy D, Brook G, Franzen R, Schoenen J (2004) Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Improves Open Field Locomotor Recovery after Low but Not High Thoracic Spinal Cord Compression-Injury in Adult Rats. *Journal of Neuroscience Research* 75:253-261.
- Porter WT (1895) The Path of the Respiratory Impulse from the Bulb to the Phrenic Nuclei. *J Physiol* 17:455-485.
- Rauš S, Selaković V, Manojlović-Stojanoski M, Radenović L, Prolić Z, Janać B (2013) Response of hippocampal neurons and glial cells to alternating magnetic field in gerbils submitted to global cerebral ischemia. *Neurotox Res* 23:79-91.
- Trippe J, Mix A, Aydin-Abidin S, Funke K, Benali A (2009) theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex. *Exp Brain Res* 199:411-421.
- Vinit S, Kastner A (2009) Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respir Physiol Neurobiol* 169:115-122.
- Vinit S, Gauthier P, Stamegna JC, Kastner A (2006) High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J Neurotrauma* 23:1137-1146.
- Vinit S, Keomani E, Deramautd TB, Bonay M, Petitjean M (2016) Reorganization of Respiratory Descending Pathways following Cervical Spinal Partial Section Investigated by Transcranial Magnetic Stimulation in the Rat. *PLoS one* 11:e0148180.
- Vinit S, Keomani E, Deramautd TB, Spruance VM, Bezdudnaya T, Lane MA, Bonay M, Petitjean M (2014) Interdisciplinary approaches of transcranial magnetic stimulation applied to a respiratory neuronal circuitry model. *PLoS one* 9:e113251.
- Vlachos A, Muller-Dahlhaus F, Rosskopp J, Lenz M, Ziemann U, Deller T (2012) Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 32:17514-17523.
- Volz LJ, Benali A, Mix A, Neubacher U, Funke K (2013) Dose-dependence of changes in cortical protein expression induced with repeated transcranial magnetic theta-burst stimulation in the rat. *Brain Stimul* 6:598-606.

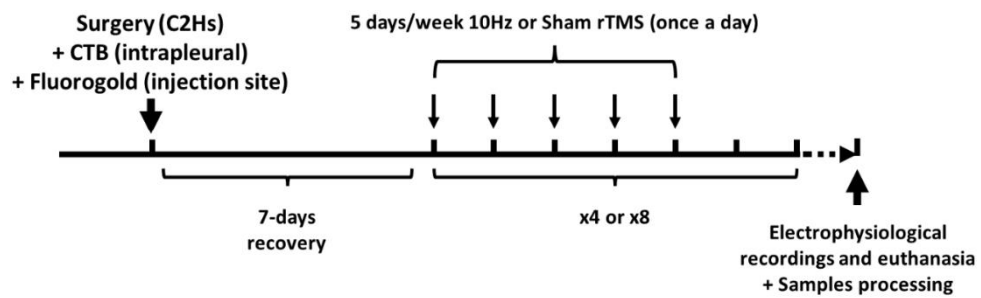
- Wang H, Geng Y, Han B, Qiang J, Li X, Sun M, Wang Q, Wang M (2013) Repetitive transcranial magnetic stimulation applications normalized prefrontal dysfunctions and cognitive-related metabolic profiling in aged mice. *PloS one* 8:e81482.
- Winslow C, Rozovsky J (2003) Effect of spinal cord injury on the respiratory system. *Am J Phys Med Rehabil* 82:803-814.
- Yan T, Xie Q, Zheng Z, Zou K, Wang L (2017) Different frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for posttraumatic stress disorder (PTSD): A systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res* 89:125-135.
- Yang X, Song L, Liu Z (2010) The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on a model rat of Parkinson's disease. *Neuroreport* 21:268-272.
- Ziemann U, Paulus W, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Byblow WD, Berardelli A, Siebner HR, Classen J, Cohen LG, Rothwell JC (2008) Consensus: Motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimul* 1:164-182.

Supplementary Figures

A.



B.



C.

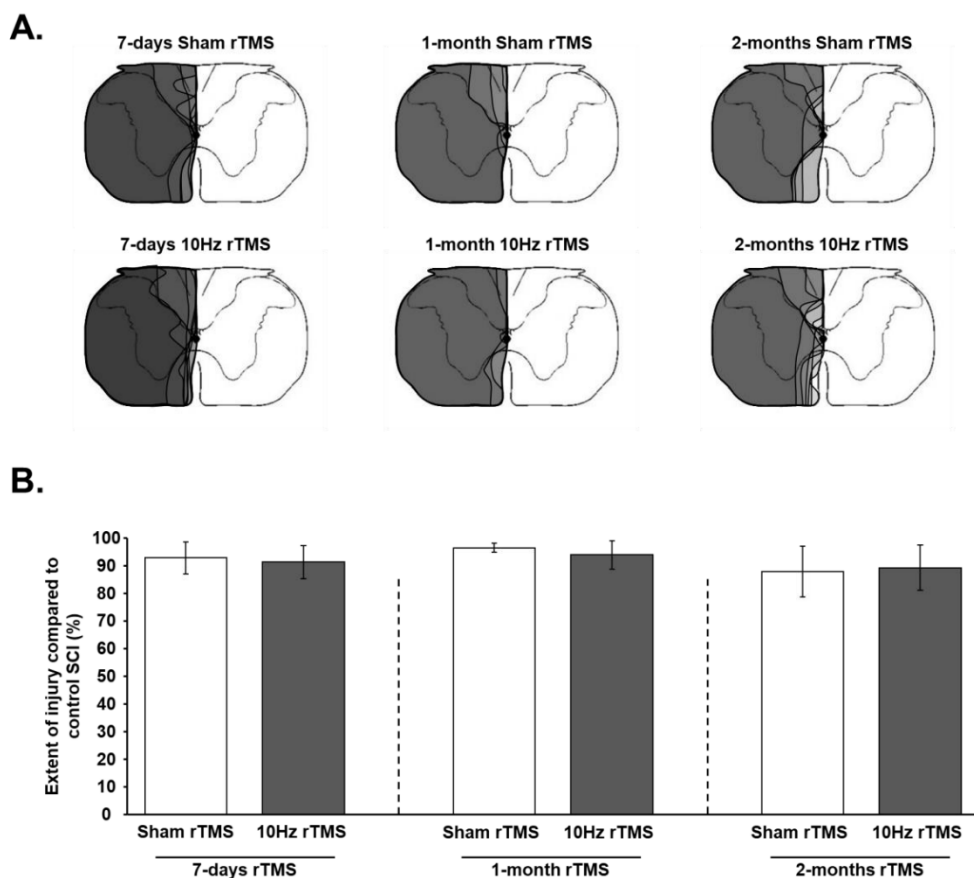


D.



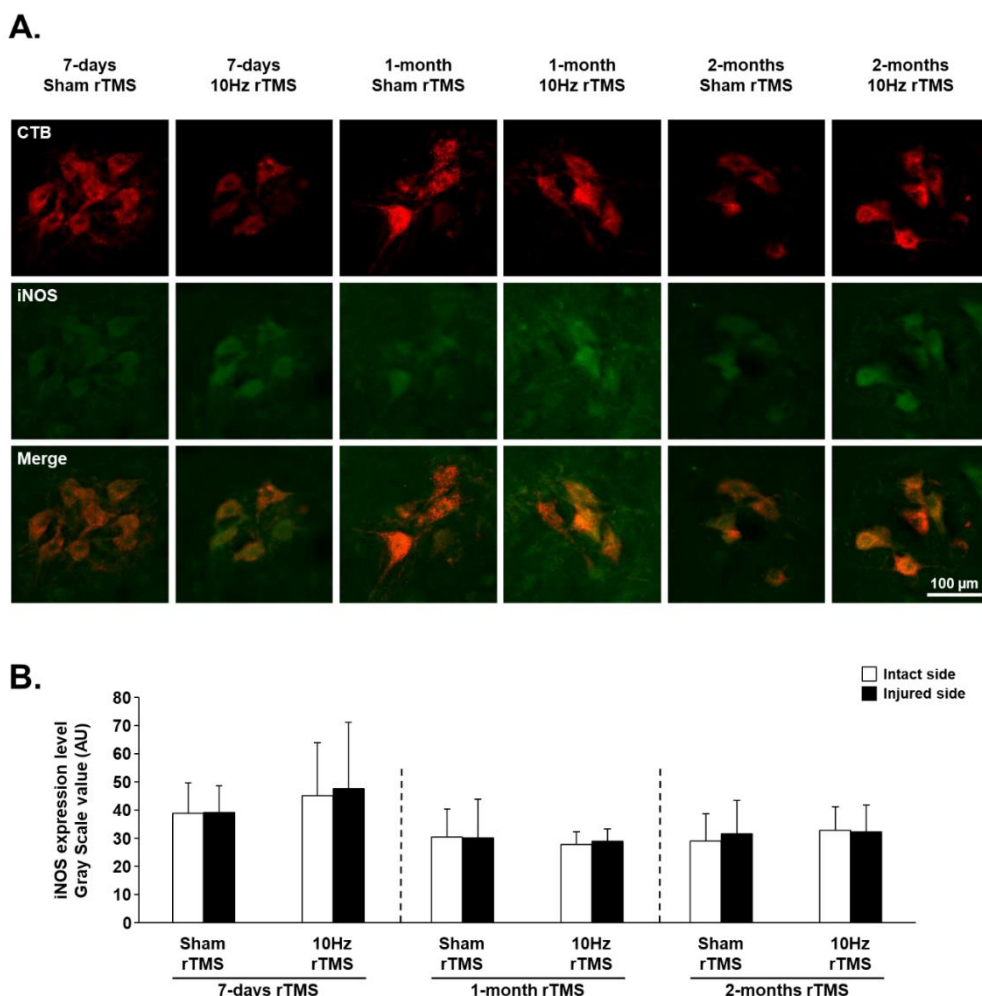
Supplementary 1: 10Hz or Sham rTMS protocols following C2 spinal cord hemisection

A. rTMS protocols for 7-days treated groups. B. rTMS protocols for 1-month and 2-months treated groups. C. Picture of rat receiving Sham rTMS protocol. D. Picture of rat receiving 10Hz rTMS protocol



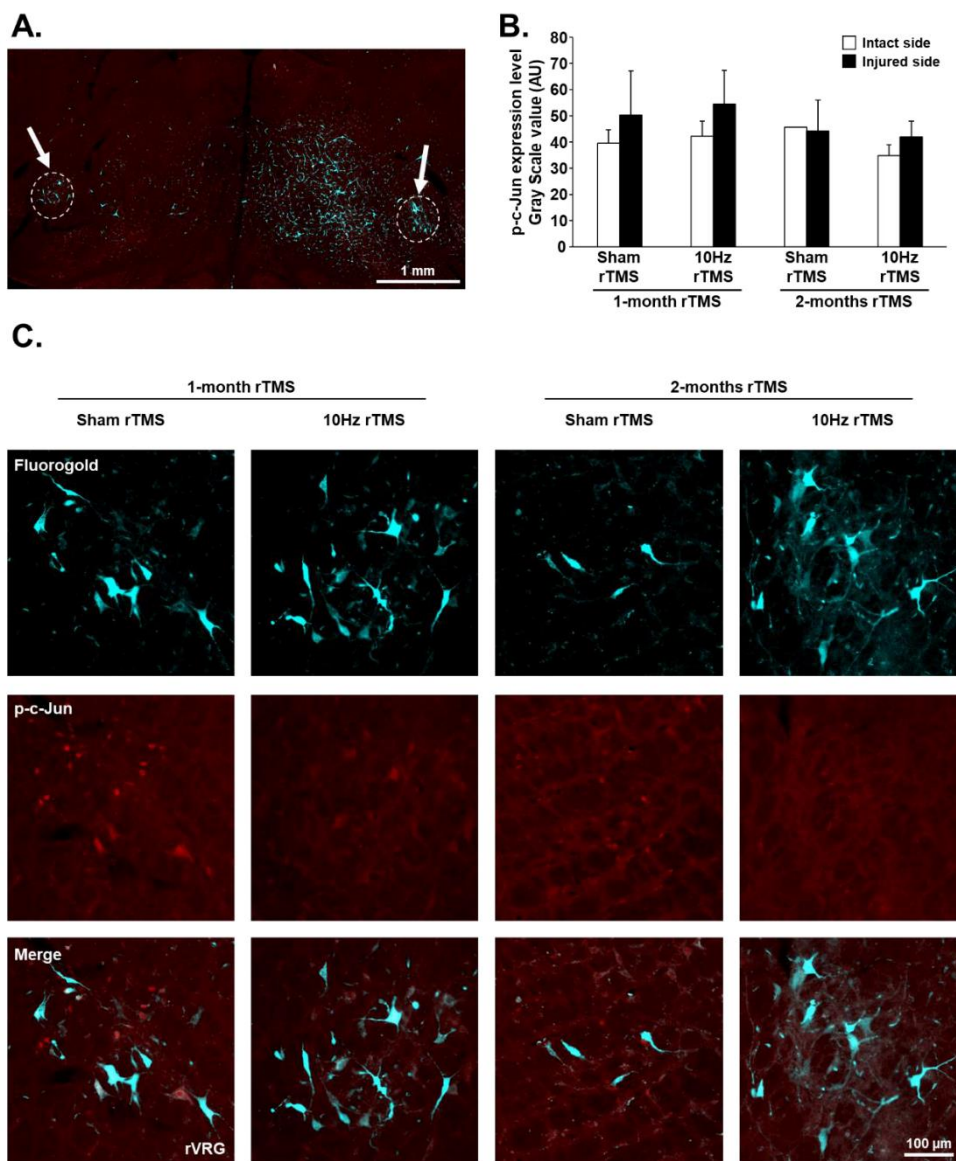
Supplementary 2: Extent of injury following a C2 spinal cord hemisection

A. Representative extend of injury in each animal at 15 days post-injury (P.I.) for 7-days Sham and 10Hz rTMS groups, 36 days P.I. for 1-month Sham and 10Hz rTMS groups and 64 days P.I. for 2-month Sham and 10Hz rTMS groups. **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, $p=0,235$).



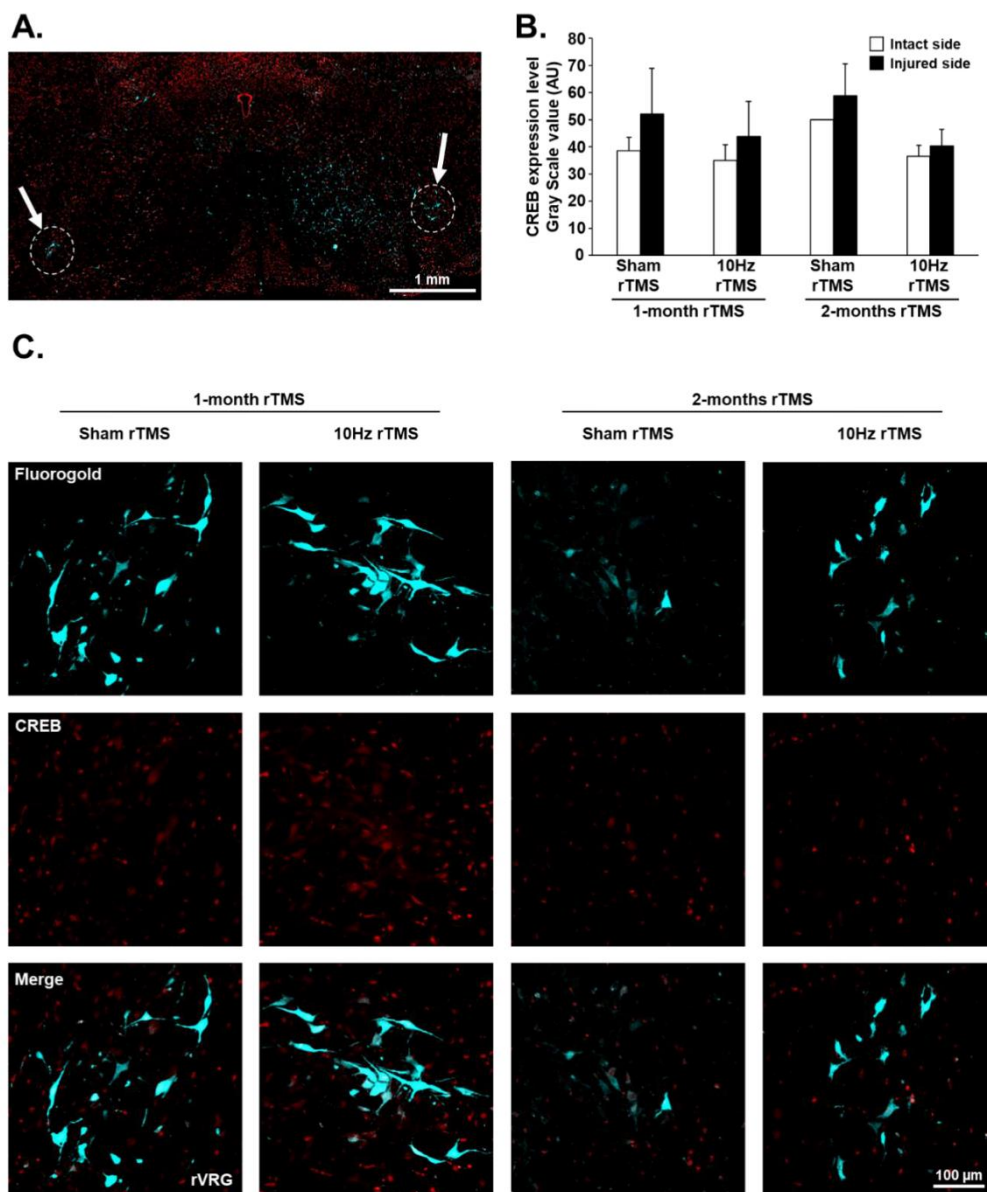
Supplementary 4 : iNOS expression in phrenic motoneurons following C2 hemisection

A. Representative images showing expression of iNOS in intact side phrenic motoneurons labeled with CTB in C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **B.** Quantification of iNOS expression in phrenic motoneurons for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. There is no difference between the intact and the injured sides for the different groups (Paired t-test for intact vs injured side, $p > 0.05$). There is no difference between intact side groups, and between injured groups (T-test, $p > 0.05$).



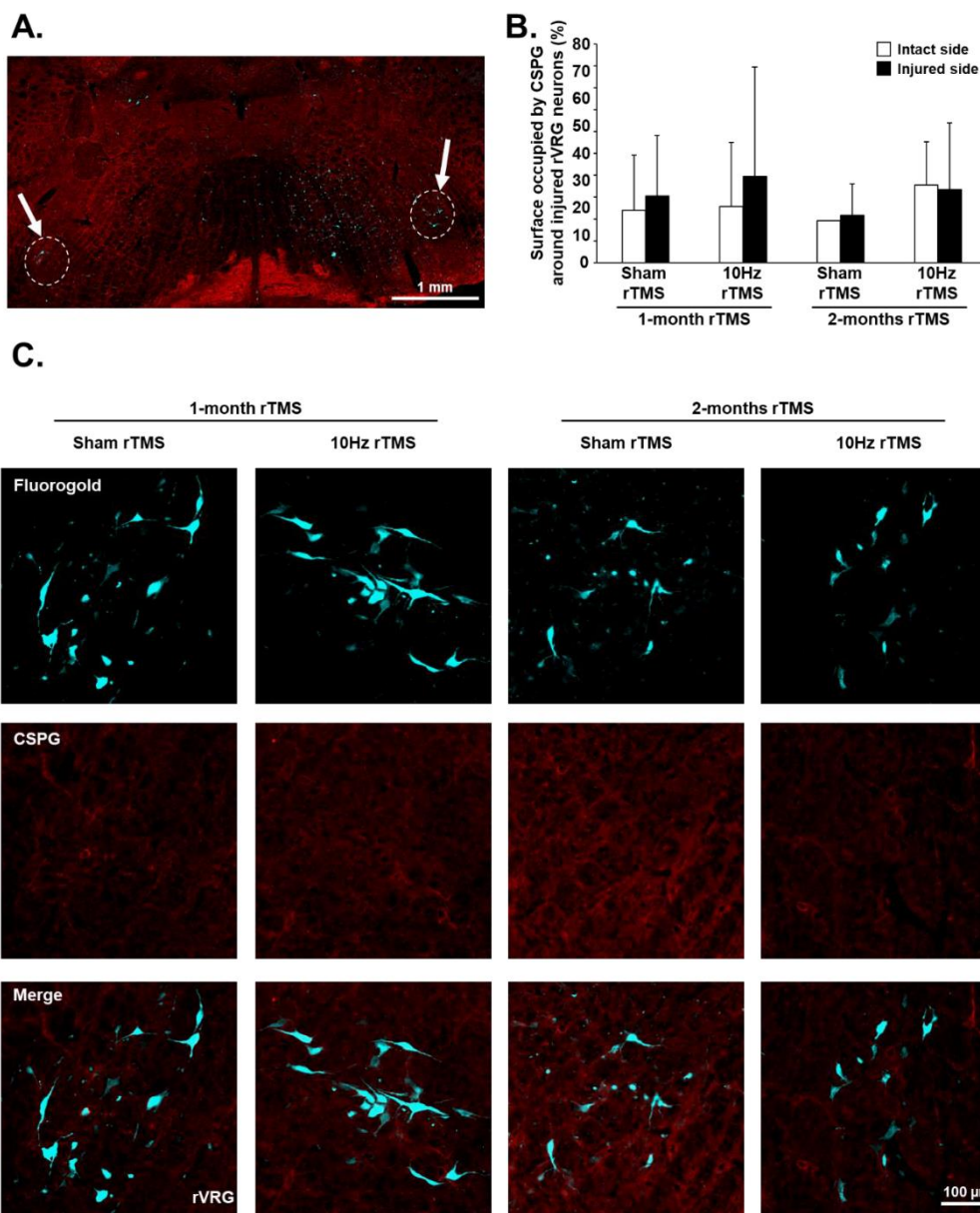
Supplementary 4: p-c-Jun expression in injured rVRG neurons.

A. Representative images showing rVRG in the brainstem. rVRG neurons are labeled with Fluorogold. **B.** Quantification of p-c-Jun expression in injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. **C.** representative images of p-c-Jun expression in injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. There is no difference between the different groups (t-test when possible, $p > 0.05$).



Supplementary 5: CREB expression in injured rVRG neurons.

A. Representative images showing rVRG in the brainstem. rVRG neurons are labeled with Fluorogold. **B.** Quantification of CREB expression in injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. **C.** representative images of CREB expression in injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. There is no difference between the different groups (t-test when possible, $p > 0.05$).



Supplementary 6: CSPG expression in in the area around injured rVRG neurons.

A. Representative images showing rVRG in the brainstem. rVRG neurons are labeled with Fluorogold. **B.** Quantification of CSPG expression in the area around injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. **C.** representative images of CSPG expression in the area around inured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. There is no difference between the different groups (t-test when possible, $p > 0.05$).

2.3. Projet annexe dans un modèle de lésion du système nerveux périphérique : Evaluation des potentiels évoqués moteurs par stimulation magnétique trans-spinale après lésion du nerf tibial chez le rat

Publication: Evaluation of motor evoked potentials induced by trans-spinal magnetic stimulation following tibial nerve crush in rat. En préparations.

Les lésions des nerfs périphériques induisent des dysfonctionnements physiologiques et fonctionnels durables en raison de la dénervation des systèmes spinaux moteurs, sensoriels et autonomes qu'elles induisent. Les modèles précliniques permettent d'étudier les processus induits par ces lésions nerveuses, la capacité du système nerveux périphérique à récupérer spontanément, et permettent de tester de nouveaux outils de diagnostic.

Dans cette étude réalisée chez le rat nous avons démontré la faisabilité de l'utilisation de la stimulation magnétique, technique non invasive, dans l'évaluation de l'intégrité et de la conductance du signal nerveux. Nous avons d'abord 1) comparé l'utilisation de deux anesthésiques pour l'évaluation des potentiels évoqués moteurs (PEM) induits par stimulation magnétique trans-spinale (TSMS) dans les muscles gastrocnémien et brachioradialis ; nous avons 2) suivi l'évolution des PEM du muscle gastrocnémien en appliquant des stimulations couplées afin d'évaluer l'activité de la jonction neuromusculaire, et nous avons également 3) évalué l'intégrité du nerf tibial après son écrasement, par enregistrement des PEM du muscle gastrocnémien.

Nos résultats montrent que l'anesthésie à l'isoflurane est préférable à l'uréthane afin de préserver une excitabilité neuronale maximale et adaptée à l'enregistrement des PEM chez le rat. Après écrasement du nerf tibial, une réduction significative de l'amplitude du PEM gastrocnémien a été observée du côté lésé, principalement en raison des dommages axonaux de l'écrasement initial. Fait intéressant, aucune récupération spontanée de l'amplitude du PEM dans le muscle gastrocnémien n'a été observée jusqu'à 7 jours post-trauma. Ces observations ont été confirmées histologiquement avec une réduction drastique des fibres myélinisées résiduelles dans le nerf tibial écrasé.

Ainsi, ces données démontrent que la TSMS peut être utilisée de manière fiable et reproductible afin d'évaluer la conduction nerveuse de manière non invasive chez le rat. Cette méthode pourrait donc être facilement appliquée chez l'Homme pour évaluer la conductance nerveuse en clinique.

Title: Evaluation of motor evoked potentials induced by trans-spinal magnetic stimulation following tibial nerve crush in rat

Running title: MEP induced by TSMS after tibial nerve injury

Authors and Affiliation:

Pauline Michel-Flutot¹, Isley Jesus¹, Arnaud Mansart², Marcel Bonay¹, Kun-Ze Lee^{3,4}, Karine Auré⁵, Stéphane Vinit^{1,*}.

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm U1179, END-ICAP, 78000 Versailles, France

²Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm U1173, Infection et Inflammation (2I), 78000 Versailles, France

³Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan

⁴Department of Biomedical Science and Environmental Biology, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan

⁵Department of Neurophysiology, Foch Hospital, Suresnes, France

*Corresponding author:

Stéphane Vinit, PhD, HDR

E-mail: stephane.vinit@uvsq.fr

Phone: +33170429427

Fundings

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

Acknowledgements

This work has benefited from the facilities of CYMAGES and histology (UFR SVS, UVSQ, Université Paris-Saclay, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France).

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Abstract

Peripheral nerve injuries induce long-lasting physiological and severe functional dysfunctions due to motor, sensory and autonomic denervation. Preclinical models allow to study the process of nerve damage, peripheral nervous system capacity to spontaneously recover, or even allow to test diagnosis tools to assess these damages and subsequent recovery. In this present study done in Sprague-Dawley rats 1) we first compared the use of two different anesthetics (isoflurane and urethane) for the evaluation of motor evoked potentials (MEP) induced by trans-spinal magnetic stimulation (TSMS) in gastrocnemius and brachioradialis muscles; 2) we monitored the evolution of gastrocnemius MEP by applying paired-pulse stimulations in order to evaluate the neuromuscular junction activity, and 3) we also evaluated before and following left tibialis nerve crush (up to 7 days post-injury under isoflurane anesthesia) the MEP amplitude. The results showed that muscle MEP under isoflurane anesthesia had a higher amplitude compared to urethane anesthesia in rat, demonstrating a higher motoneuronal excitability under isoflurane anesthesia evaluated by TSMS. Following tibial nerve crush, a significant reduction in gastrocnemius MEP amplitude was observed on the injured side, mainly due to the axonal damage from the initial crush. Interestingly, no spontaneous recovery of MEP amplitude in gastrocnemius muscle was observed up to 7 days post-crush. Even a nerve section did not induce any variation in residual MEP amplitude, suggesting that the initial crush effectively severed axonal fibers. These observations were confirmed histologically with a drastic reduction of the myelinated fibers remained in the crushed tibial nerve. Thus, these data demonstrates that TSMS can be reliably and repeatedly used to evaluate the peripheral nerve function in a non-invasive way in rats. This method could therefore readily be applied to evaluate nerve conductance in clinic.

Introduction

Peripheral nerve injury is a frequent occurrence in human. It induces long-lasting physiological and severe anatomical impairment due to motor, sensory and autonomic denervation. These trauma have diverse origins, e.g., traumatic or iatrogenic for instance (Cornwall and Radomisli, 2000; Antoniadis et al., 2014), and results in diverse types of injuries, *i.e.*, stretch-related, laceration, or compression (Burnett and Zager, 2004). Compression or crush of a peripheral nerve induces morphological alterations, characterized by demyelination, axonal degeneration, nerve fiber loss, or endoneural edema (Lundborg, 2000; Kurtoglu et al., 2005). However, the membrane of the Schwann cells remains intact and allow axonal regeneration over time following nerve injury (Lundborg, 2000; Alvites et al., 2018).

In order to investigate the pathophysiology of peripheral nerve injury, pre-clinical models of sciatic nerve injury (SN) (Beer et al., 2001; Savastano et al., 2014; Geuna, 2015) or tibial nerve injury (TN) (Elsohemy et al., 2009; Bhatt et al., 2017) are often studied in rodents. Different methodologies are used to evaluate nerve function in these models. Functional evaluations mainly depict the walking track analysis to evaluate Sciatic or Tibial Functional Index, providing information about locomotor recovery following injury (Bain et al., 1989; Brown et al., 1989; Monte-Raso et al., 2008). Other methods known as more sensitive in term of locomotor function evaluation were recently developed, such as Ankle motion analysis (de Ruiter et al., 2007), or the 3D kinematic (Wang et al., 2018; Wang et al., 2020). The well-known Basso, Beattie, and Bresnahan scale (BBB score) used to evaluate locomotion following spinal cord injury can also be used to evaluate recovery following SN injury (Dinh et al., 2009). Structural and morphological analyses are realized using ultrasound (Zhu et al., 2020) or magnetic resonance (Li et al., 2008) and allow *in vivo* evaluation, whereas post-mortem histology (Scipio et al., 2008; Alvites et al., 2018) provide cellular and molecular data which correlate with *in vivo* experiments (Li et al., 2008; Carriel et al., 2014). Axonal innervation to the muscles can be evaluated by electromyography (EMG), as well as nerve (NEP) and motor (MEP) evoked potentials induced by direct nerve electrical stimulation (David et al., 1969; English et al., 2007; Mathews et al., 2014). For example, somatosensory evoked potentials are used to evaluate cortical plasticity after injury (Delaere et al., 1996; Qu et al., 2016). Following SN stimulation, latency and amplitude of cortical somatosensory evoked potentials are recorded by electrodes implanted in the exposed cortex. However, hindlimb EMG are difficult to record in rodents because they imply voluntary muscle contraction while recording with an implanted electrode. In addition, somatosensory or MEP recordings induced by direct stimulation of the

SN or cortically/spinally implanted electrode-induced stimulation are deeply invasive and could interact with the neuronal architecture.

Interestingly, trans-cranial and trans-spinal magnetic stimulation (MS) applied above the central nervous structures (cortex or spinal cord) induce recordable MEP in innervated muscles (Hiwaki and Ueno, 1990; Linden et al., 1999; Vinit et al., 2014; Sykes et al., 2016; Tang et al., 2016; Vinit et al., 2016). This stimulation provides an easy, non-invasive, and painless tool for studying spinal and supraspinal pathways excitability and plasticity in intact and injured central and peripheral nervous system. Therefore, direct assessment of nerve integrity evaluated by motoneuronal and muscular excitability (NEP/MEP) can be measured repeatedly in a non-invasive way.

In this study, we proposed to evaluate TN connectivity and post-lesional neuroplasticity (up to 7 days) following TN crush, using trans-spinal MS and evaluation of gastrocnemius MEP in rats.

Material and Methods

Ethics statement

Adult Sprague–Dawley male rats (Janvier, France; n=25, 332-357g, 2-months old) were used for this study. The Ethics Committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines approved this study and all experiments complied with the French and European laws (EU Directive 2010/63/EU) regarding animal experimentation (Apafis #10144-2017051014461796_v7). The animals were dual 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-hour light/dark cycle.

Trans-spinal magnetic stimulation (MS)

Trans-spinal MS was performed using the magnetic stimulator MAGPRO R30 (Magventure, Farum, Denmark) connected to a figure-of-eight coil (Cool-B65) delivering a unique biphasic pulse with a stimulus intensity expressed as a percentage of maximum output of the stimulator (% MO). Each animal received about 15 single pulses of MS with an interpulse duration above 15s to avoid low frequency repetitive MS-like effects. This protocol was used to elicit specific gastrocnemius MEP in order to functionally assess the connectivity of the TN.

Electrophysiological recordings of gastrocnemius and brachioradialis MEP amplitude on naïve rats

10 naïve rats were used to evaluate the excitability of motoneurons associated with gastrocnemius muscle, under isoflurane or urethane anesthesia, in order to determine the more appropriate anesthetic for MEP recordings. Briefly, anesthesia was induced using isoflurane (5% in 100% O₂ balanced) in an anesthesia chamber and maintained through a nose cone (2.5% in air balanced). The depth of anesthesia was confirmed by the absence of response to toe pinch. A 25G catheter was placed into the tail vein and the animals were tracheotomized and pump ventilated (Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). During the recordings, animals were placed on a heating pad to maintain a constant body temperature (37.5 ± 0.5 °C) and their rectal temperature was continuously monitored throughout the experiment. Tracheal pressure was monitored continuously with transducers connected to a bridge amplifier (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The animal was placed on a non-magnetic custom-made stereotaxic apparatus placed on a figure-of-eight coil orientated at 0° as described previously (Vinit et al., 2014), with the center of the coil under the cervical level of

the animals (Figure 1A). This stimulatory position and orientation allow the stimulation of majority of descending locomotor pathways innervating forelimb and hindlimb motoneurons of the rats. Four custom-made microneedle electrodes were placed on the left hindlimb and forelimb, *i.e.*, one in the gastrocnemius and one in brachioradialis (with one in each toe as a reference electrode) for MEP recordings. A third electrode was placed subcutaneously as ground electrode. The electrodes were secured with surgical tape and left in place for the entire duration of the experiment. MEP induced by a single pulse of MS was recorded (summation of 5 MS pulses, from 40% to 100% of MO, *i.e.*, (5*7=35 pulses in total). Isoflurane anesthesia was then slowly converted to urethane anesthesia (1.8 g/kg, *i.v.*; Sigma-Aldrich). Brachioradialis and gastrocnemius MEP were once again recorded as described above.

Another 10 rats were used to evaluate the variation of right and left gastrocnemius MEP amplitude when paired-pulse stimulations are delivered at 90% MO at different frequencies (1Hz, 3Hz, 10Hz, 20Hz et 30Hz) under isoflurane anesthesia (2.5% in air balanced). A summation of at least 5 paired MS pulses were delivered, *i.e.*, separated by at least 10 s to avoid neuromodulatory effects of repetitive MS. Note that right and left gastrocnemius MEP were considered separately, and the number of values could vary (n = 16 to 20) due to unusable recordings.

These electromyographic signals were amplified (gain, 1k; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100Hz to 10kHz). The signals were then digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 100 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 8 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). Rats were then euthanized by an overdose of Pentobarbital (Exagon, 0.1 mL/kg, intracardiac injection).

Tibial nerve (TN) crush surgery

5 rats were used in this study to evaluate the TN integrity after TN crush. Anesthesia was induced in a close chamber (5% isoflurane in 100% O₂). Rats were then intubated and ventilated with a rodent ventilator (model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), and anesthesia was maintained throughout the surgical procedure with isoflurane (2.5% in air balanced). Rats were then placed on a non-magnetic custom-made stereotaxic apparatus which allowed to position the center of the figure-of-eight coil at the L2-L4 spinal cord segments, where are located the motor neurons innervating the gastrocnemius muscle (Mohan et al., 2015), at an angle of 0° (Figure 1B). The MO was set at 90%. Left and right gastrocnemius MEP were recorded prior to surgery as described in previous section. Rats were then placed in lateral

decubitus position to easily access to the left TN. The hair around the animal's hip was shaved and the skin was cleaned with alcohol 70% and betadine. Then, the skin was incised, and the gluteal muscles were retracted. A tissue retractor was placed to facilitate the exposure of the TN. The TN was then carefully dissected out with a micro hook and fine forceps. Then the TN was crushed with a micro-serrefine (FST#18055-04, Gram press: 125g) 3 times for 10 seconds. Muscles and skin were then sutured, and left and right gastrocnemius MEP were recorded (less than 5 minutes after injury). Isoflurane anesthesia was then turned off. When animals showed sign of waking up, endotracheal tube was removed, and the animal was placed into their cage for recovery

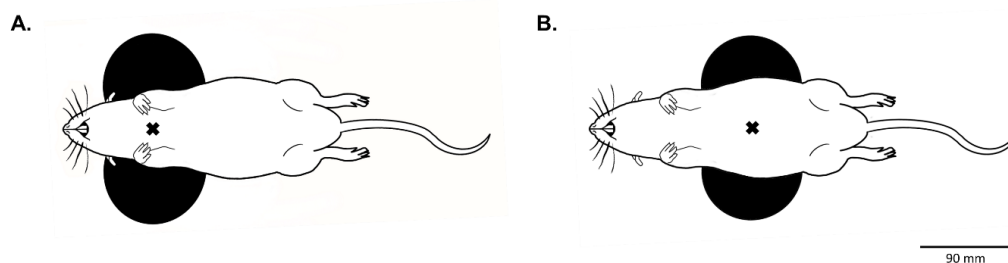


Figure 1: Representative image of a rat positioned on the magnetic coil

A. Position of rat on the figure of eight coil during gastrocnemius and brachioradialis MEP recordings under isoflurane and urethane anesthesia. B. Position of the rat on the figure of eight coil during gastrocnemius MEP recordings for paired-pulse stimulations and for evaluation of TN function before and after crush. The black cross indicate coil's hot spot according to the manufacturer.

Electrophysiological recordings following TN injury

Seven days following TN injury, animals were re-anesthetized, tracheotomized and maintained under isoflurane anesthesia (2.5% in air balanced). Then, the gastrocnemius MEP were recorded (90% MO) as described in the previous section. The crushed left TN was then cut distally in order to remove remaining spared crushed axons, and another MEP were recorded. The right intact TN was then also cut, and MEP were once more recorded. Rats were then euthanized by an overdose of Pentobarbital (Exagon, 0.1 mL/kg, intracardiac injection).

Immunohistochemistry

Tibial nerves were dissected out and immediately placed overnight in cold 4% paraformaldehyde, then cryoprotected for 48h in 30% sucrose (in 0.9% NaCl) and frozen. As previously described (Scipio et al., 2008), the samples were washed in phosphate buffer for a few minutes and then immersed for 2 h in 2% osmium tetroxide (Sigma, St.Louis, MO) in the same buffer solution. The nerves were then embedded in paraffin and dehydrated according to the standard protocol. Transverse sections (3 μ m thickness, Leica RM2265) were obtained and observed under a bright field microscope. These sections were photographed at 62X oil-immersion objective magnification (inverted microscope Olympus IX83 P2ZF). Image captures were obtained on entire cross-section area (CSA) from each tibial nerve. All images were analysed using tools analyses in Fiji (NIH Image du National Institutes of Health, USA). The total area occupied by myelin were calculated using Fiji (NIH Image du National Institutes of Health, USA). Note that the rostral part to injury for one animal were lost (n = 4 instead of n = 5).

Data processing and statistical analyses

Gastrocnemius MEP traces for each side (15 MS pulses) were averaged and superimposed using LabChart Pro software (AD Instruments) for each condition. The baseline-to-peak amplitude of the first wave of each superimposed MEP was calculated. Paired t-test were used to compare MEP obtained with the same MO in order to compare the anesthetics effect (isoflurane *vs.* urethane). One-way repeated measures ANOVA (Holm-Sidak method) was used to compare MEP of the same side for intact nerve, post left TN crush, post left TN cut and post right TN cut. One Way ANOVA with bonferonni post-hoc analysis was used to compare area occupied by myelin in TN crossed-sections caudal and rostral to injury, and to compare them to intact TN in the same animal. All the data were presented as mean \pm SD and statistics were considered significant when $p < 0.05$. SigmaPlot 12.5 software was used for all analyses.

Results

Effect of anesthetic on gastrocnemius and brachioradialis MEP amplitude

Gastrocnemius and brachioradialis MEP were recorded under isoflurane and urethane anesthesia in rats. Increasing MO were used to compare the effect of both anesthetics to determine the more appropriate for recording MEP (Figure 2A, 2B, 2C and 2D). MEP were observable only starting from 60% MO in both anesthesia and for both muscles. MEP amplitude were significantly higher under isoflurane compared to urethane anesthesia at 90% MO (0.86 ± 0.89 mV vs 0.53 ± 0.62 mV respectively, $p = 0.002$) and 100% MO (1.17 ± 1.08 mV vs 0.77 ± 0.77 mV respectively, $p = 0.029$) for the gastrocnemius muscle (Figure 2E), and at 70% MO (0.80 ± 0.91 vs 0.34 ± 0.54 mV, $p = 0.039$), 80% MO (1.35 ± 1.19 vs 0.64 ± 0.70 mV, $p = 0.008$), 90% MO (1.84 ± 1.37 vs 0.96 ± 1.05 mV, $p < 0.001$) and 100% MO (2.15 ± 1.43 vs 1.36 ± 1.29 mV, $p = 0.003$) for brachioradialis muscle (Figure 2F). Isoflurane anesthesia were consequently used for following experiments for gastrocnemius MEP recordings and the MO was set at 90% (minimal MO for which MEP amplitude under isoflurane anesthesia were significantly increased compared to urethane anesthesia). No difference in onset latency was observed between isoflurane and urethane anesthetics for each muscle. However as expected, the onset latency was significantly higher for gastrocnemius MEP than for brachioradialis MEP (Table 1).

Anesthetic used (90% maximum output)	Onset latency (ms)	
	Gastrocnemius	Brachioradialis
Isoflurane	3.08 ± 0.63	1.71 ± 0.31 *
Urethane	3.45 ± 0.92	1.71 ± 0.42 *

Table 1. Onset latency measured for gastrocnemius and brachioradialis motor evoked potentials at 90% of motor output. *, Brachioradialis vs Gastrocnemius, $p < 0.01$.

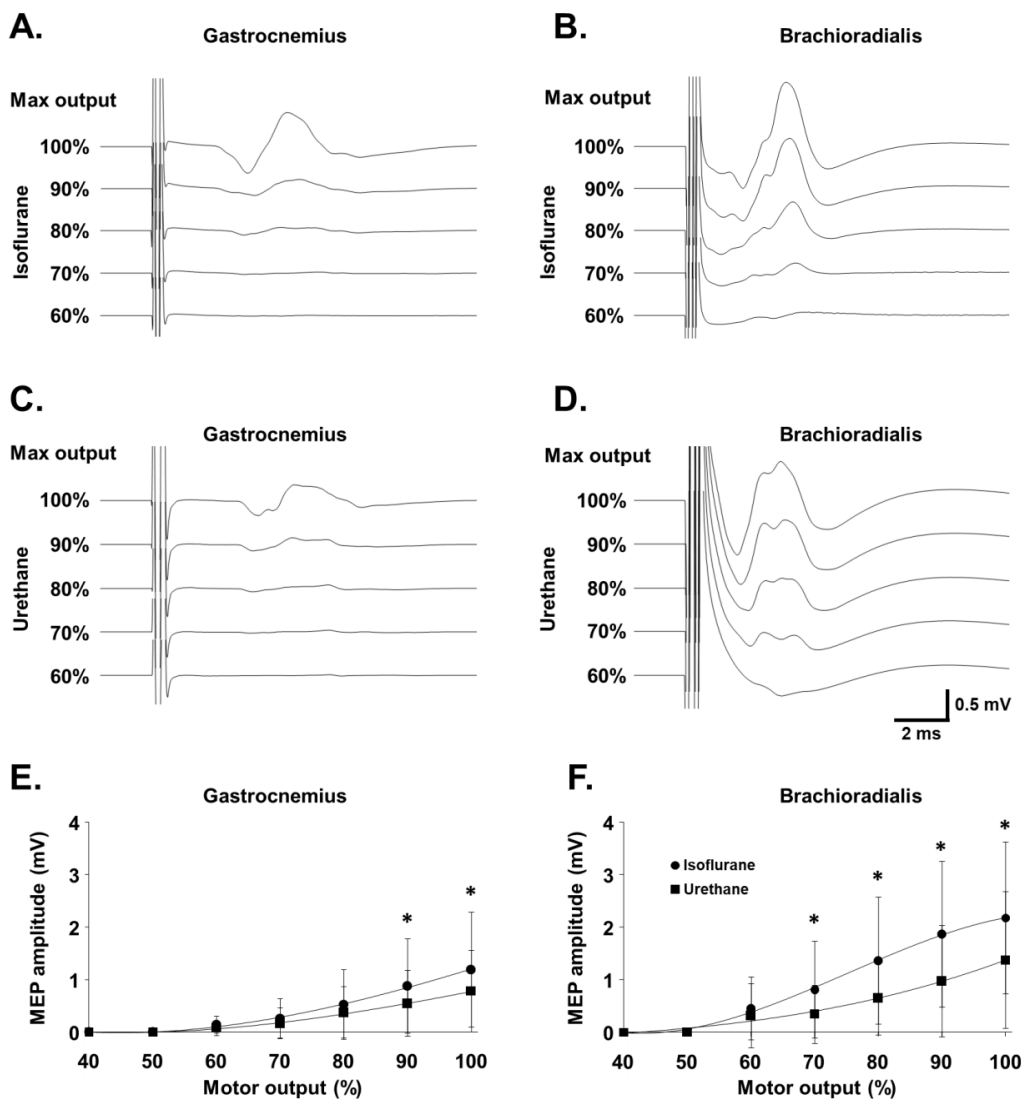


Figure 2: Amplitude of MEP in gastrocnemius and brachioradialis muscles under isoflurane or urethane anesthesia

Representative traces of gastrocnemius and brachioradialis motor evoked potentials (MEP) under isoflurane (A and B) or urethane (C and D) anesthesia for MO from 60% MO to 100% MO. Variation of motor evoked potentials (MEP) amplitude depending on motor output (%) and anesthetic (isoflurane vs urethane) in gastrocnemius (E) and brachioradialis (F) muscles. * isoflurane compared to urethane (paired t-test, $p < 0.05$).

Paired-pulse at different frequency on gastrocnemius MEP amplitude

To electrophysiologically demonstrate that the recorded signal was a muscular response induced by motoneurons activation successively to magnetic stimulation, gastrocnemius MEP were recorded for 2 successive pulses delivered at different frequencies (Figure 3A). No difference was observed in MEP amplitude between the 1st and the 2nd pulse for pulses delivered at 1Hz (3.80 ± 0.90 vs 3.78 ± 0.85 mV respectively, $p = 0.900$), 3Hz (3.75 ± 0.97 vs 3.68 ± 0.88 mV, $p = 0.117$) and 20Hz (3.47 ± 1.15 vs 3.27 ± 1.21 mV, $p = 0.237$). For 10Hz delivered pulses, the 2nd pulse was significantly higher than the 1st (3.48 ± 1.00 vs 3.80 ± 1.05 mV respectively, $p < 0.001$). For 30Hz delivered pulses, the 2nd pulse was significantly lower than the 1st (2.75 ± 1.33 vs 3.28 ± 0.99 mV respectively, $p = 0.001$) (Figure 3B).

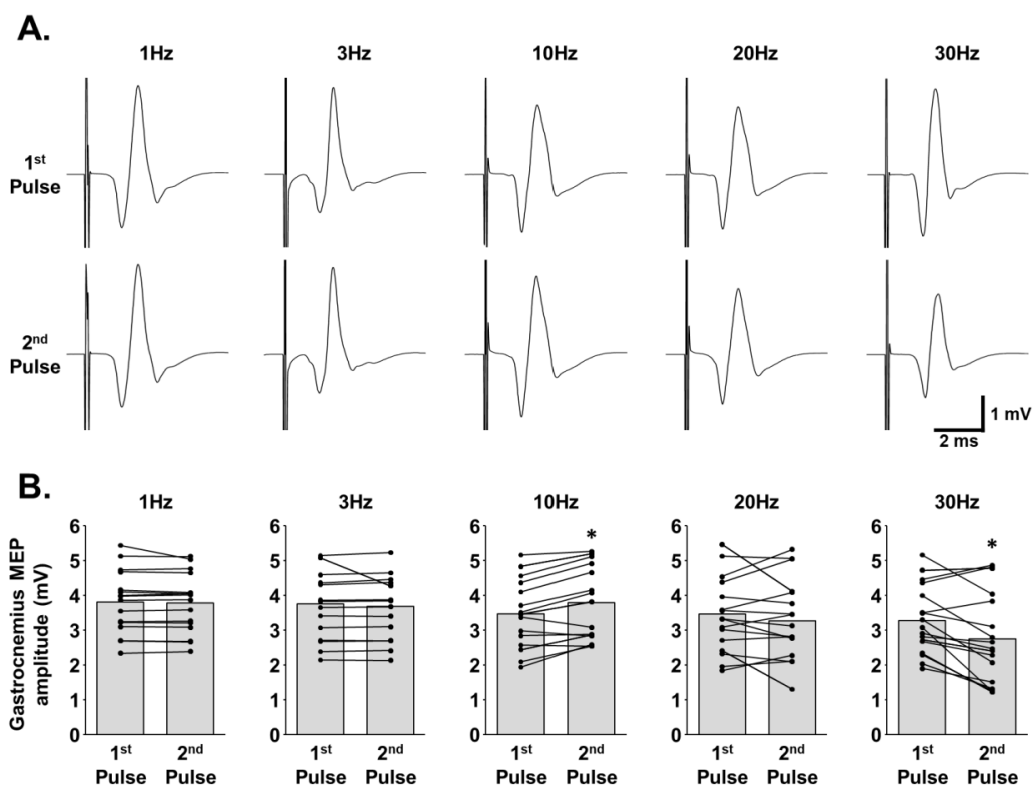


Figure 3: Neuromuscular response to magnetic stimulations delivered at different frequencies

A. Representative traces of gastrocnemius motor evoked potentials (MEP) for the first and the second pulses delivered at 1Hz, 3Hz, 10Hz, 20Hz and 30Hz (90% MO). B. Corresponding MEP quantification. * 1st pulse compared to 2nd pulse (paired t-test, $p \leq 0.001$).

Evolution of gastrocnemius MEP over time following tibial nerve crush and section

To electrophysiologically assess TN integrity, gastrocnemius MEP were recorded before and after sub-acute and acute left TN compression and left and right TN sections (Figure 4A). Left TN crush did not induce significant variation of MEP amplitude for the right gastrocnemius (before = 2.98 ± 0.83 vs after crush = 2.46 ± 0.36 mV, $p = 0.219$) even if a slight decrease can be observed. Seven days following left TN crush, a significant increase in MEP amplitude were observed for the right gastrocnemius compared to immediately after TN crush 7 days earlier (3.78 ± 0.31 mV, $p = 0.005$). MEP then remains stable after left TN section (3.60 ± 0.40 mV, $p = 0.567$ compared to 7 days after crush). A significant decrease of right gastrocnemius MEP were then observed after right TN section (0.72 ± 0.11 mV, $p < 0.001$ compared to post left TN section) (Figure 4B). For the left gastrocnemius MEP, left TN crush induced a significant decrease (0.48 ± 0.02 mV) compared to before crush (3.15 ± 0.61 mV, $p < 0.001$). MEP then remains unchanged 7 days after left TN crush (0.67 ± 0.14 mV, $p = 0.927$ compared to right after left TN crush), after left TN section (0.64 ± 0.09 mV, $p = 0.998$ compared to 7 days post left TN crush) and right TN section (0.61 ± 0.08 mV, $p = 0.997$ compared to after left TN section) (Figure 4B). No difference was observed in onset latency between intact right gastrocnemius and injured left gastrocnemius at all times before and after TN injury, and between all times before or after injury for each gastrocnemius (Table 2).

Time post TN crush	Onset latency (ms)	
	Right gastrocnemius	Left gastrocnemius
Before left TN crush	2.40 ± 0.29	2.42 ± 0.14
After left TN crush	2.45 ± 0.18	2.36 ± 0.06
7d after left TN crush	2.37 ± 0.34	2.17 ± 0.12
Post left TN section	2.29 ± 0.19	2.23 ± 0.16
Post right TN section	2.21 ± 0.20	2.29 ± 0.13

Table 2. Evolution of onset latency measured for right and left gastrocnemius following left tibial nerve (TN) crush and section. Two Way Repeated Measures ANOVA, $p > 0.05$.

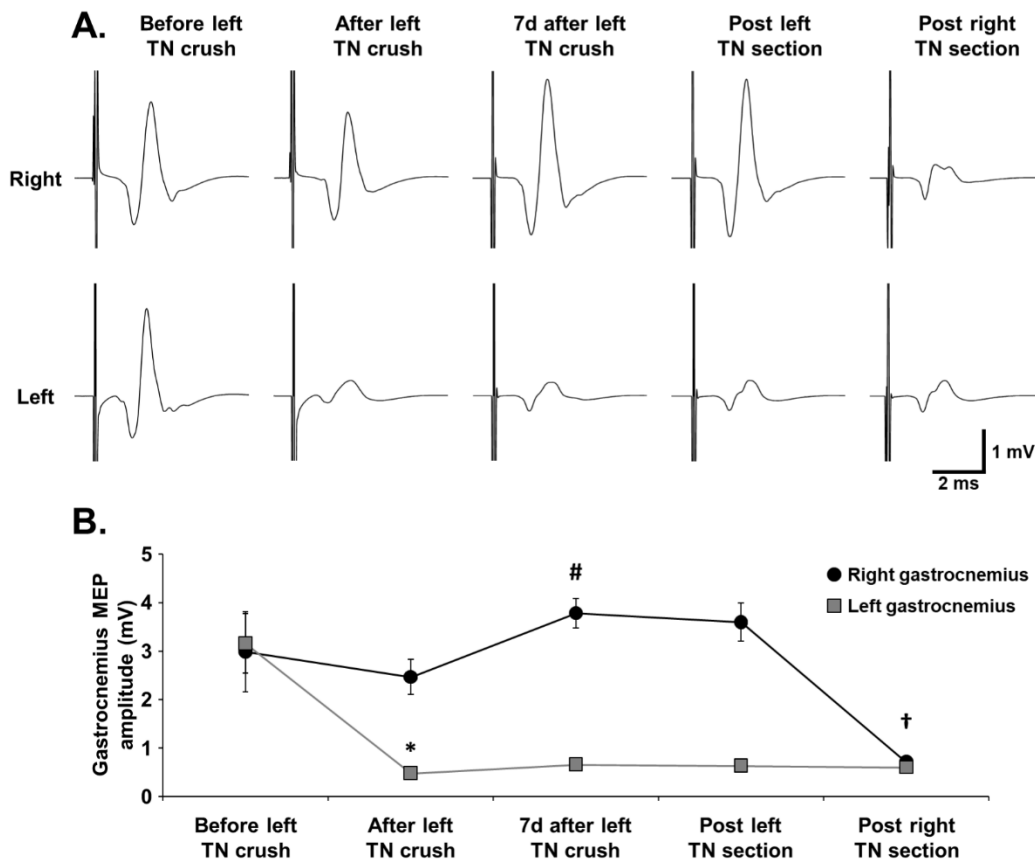


Figure 4: Evolution of gastrocnemius MEP following tibial nerve crush and section

A. Representative traces of gastrocnemius motor evoked potentials (MEP) of before and after left tibial nerve (TN) crush, 7 days post-crush and post left and right TN section in right and left gastrocnemius muscles. **B.** Gastrocnemius MEP quantification for the different time-points. * vs Before left TN crush group for left gastrocnemius (One Way Repeated Measures ANOVA, Holm-Sidak method, $p < 0.001$); # vs After left TN crush group for right gastrocnemius (One Way Repeated Measures ANOVA, Holm-Sidak method, $p = 0.005$). † vs Post left TN section group for right gastrocnemius (One Way Repeated Measures ANOVA, Holm-Sidak method, $p < 0.001$).

Histological assessment of TN integrity

To observe the morphological changes induced by the TN crush, intact TN (right) and crushed TN (left) cross-sections were analyzed. Qualitatively, the change in myelin morphology can be pointed between intact nerve where myelin sheath is well delineated, compared to injured nerve (Figure 5A and B). Study of the area occupied by myelin in crossed-sections showed the crush induced a significant reduction in myelinated axons rostral ($1056 \pm 561 \mu\text{m}^2$) and caudal ($986 \pm 599 \mu\text{m}^2$) to the crush in left TN compared to right intact nerve ($2321 \pm 616 \mu\text{m}^2$, $p = 0.014$ and $p = 0.027$ respectively). No difference was observed between the rostral and caudal part of the crush for the area occupied by myelin sheaths ($p > 0.05$) (Figure 5C).

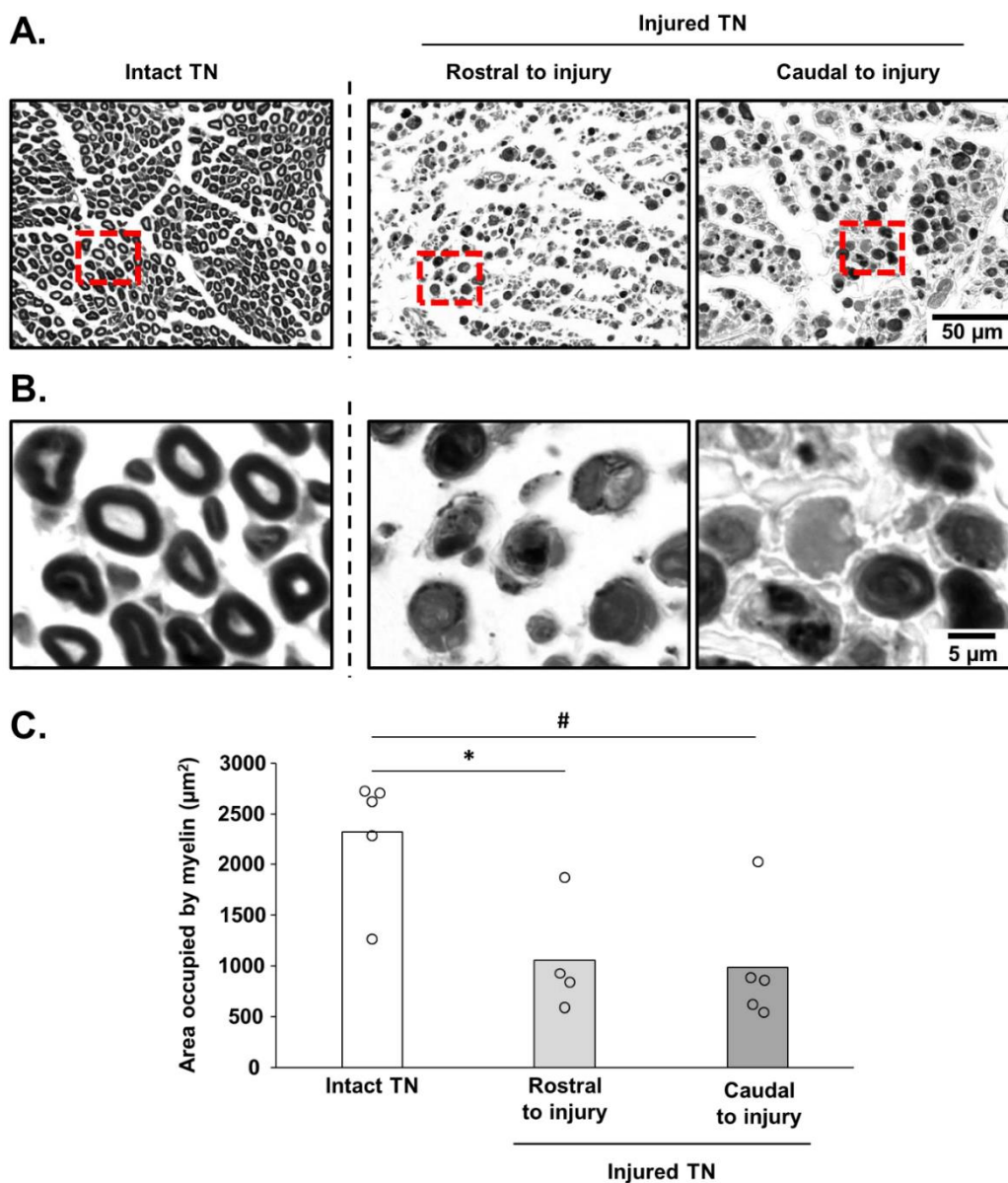


Figure 5: Histological confirmation of tibial nerve crush

A. Representative caption of tibial nerve (TN) cross-sections, 7 days post-crush for the intact (right) TN nerve and for the crushed TN, rostral and caudal to injury. B. Magnification of TN cross-sections showed in A. Red dot lines represent the magnified areas. C. Quantification of surface occupied by myelin in TN cross-sections. * vs Intact TN, $p = 0.014$; and # vs Intact TN, $p = 0.027$.

Discussion

The present study demonstrates the feasibility of assessing electrophysiologically, in a non-invasive and reproducible manner, the TN integrity following TN injury in a pre-clinical rat model.

The use of MEP recordings to evaluate supraspinal and spinal pathways excitability is widely used in clinics and in pre-clinical models. This method of evaluation has been described in awake animals for MEP limbs recording, but most studies record MEP in anesthetized animals. A large variety of anesthetics were used such as halothane (Luft et al., 2002), propofol, mix containing ketamine (Kamida et al., 1998; Vahabzadeh-Hagh et al., 2011), pentobarbital (Rotenberg et al., 2010; Vahabzadeh-Hagh et al., 2011), urethane (Vinit et al., 2014; Sykes et al., 2016; Vinit et al., 2016) and xylazine/zoletyl (Hsieh et al., 2015; Sykes et al., 2016). Although, anesthetics in general are known to reduce neuronal excitability (Richards, 2002). The different effects of anesthetics on MEP amplitude have been studied for diverse compounds. A comparison between urethane and xylazine/zoletil anesthesia showed no difference in MEP amplitude for baseline recordings. However, an increase in MEP amplitude were observed over the baseline recording period under xylazine/zoletil anesthesia (Sykes et al., 2016). Another comparison between pentobarbital and a mix of ketamine/atropine/xylazine revealed a reduced motor threshold under ketamine/atropine/xylazine compared to pentobarbital anesthesia (Vahabzadeh-Hagh et al., 2011). In the present study, we compared MEP amplitude in both hindlimb and forelimb at the same MO under urethane anesthesia or isoflurane, an easily reversible and broadly used volatile anesthetic. Under isoflurane anesthesia, MEP started to be statistically higher from 90% MO for the gastrocnemius and from 70% for the brachioradialis compared to urethane anesthesia, meaning that the muscular motor activity is lower under isoflurane than under urethane anesthesia. This can be explained by the wide spectrum of action of urethane on ion channels, *i.e.*, an enhancement of the inhibitory system and an inhibition of the excitatory system, while isoflurane would only enhance the inhibitory system (Hara and Harris, 2002). These results oriented our choice to use isoflurane anesthesia at 90% MO for further recording of MEP in gastrocnemius muscle. Moreover, urethane is to use only in terminal experiment because of its known toxic and carcinogen properties (Vogler, 2006). It therefore could not be used to record MEP at different time points post-injury on the same animal.

The fact that a MEP can be recorded from an electrode implanted in the muscle, implies a liberation of acetylcholine from the motoneuron's axon terminal in the neuromuscular junction,

and the consequent fixation of acetylcholine on its high affinity nicotinic receptors on the muscle (Engel, 2008). Acetylcholine is stocked in vesicles and release by exocytosis. A readily available pool is used following nerve stimulation, and this pool is then refilling with a stationary pool which is replenished with newly synthesized acetylcholine. This means the total amount of vesicles is limited for each membrane depolarization. Usually, paired-pulse TMS stimulation is used to test neuronal circuits involved in inhibition or facilitation (Lefaucheur, 2019). However, in this study, we directly stimulated the spinal cord where are located motoneurons that innervate gastrocnemius muscles. Thus, MEP we recorded are the consequence of direct motoneurons and/or nerve stimulation, allowing us to evaluate neuromuscular junction function. Facilitation could be observed in some experiments when the nerve is stimulated twice (paired-stimulations), the amplitude of the second evoked potential being higher than the first one and probably sustained by residual calcium ions in the axon's terminal (Hubbard, 1963; Van der Kloot and Molgó, 1994). We hypothesized this is what occurred with our 10Hz paired stimulation. This phenomenon seemed to be restrained to a certain interval of stimulation, given it disappeared at 20Hz paired stimulation. For 30Hz paired stimulation, the amplitude of the second MEP is lower than the first, meaning the released quanta of acetylcholine is reduced for the second evoked potential compared to the first one. This could reflect the fact that mobilization of vesicles from the available store to the releasable store take more time than the delay between the two MEP (Van der Kloot and Molgó, 1994). MS could therefore be used as a non-invasive tool to electrophysiologically assess acetylcholine vesicles release in the neuromuscular junction, and vesicles mobilization and replenishment in the axon's terminal.

Following hindlimb peripheral nerve injury, different methods can be used to assess the function and/or the integrity of the sciatic nerve (Alvites et al., 2018). In this study we showed that TN functionality can be assess electrophysiologically and in a non-invasive method in a repeated way, before and following TN crush in the same animal overtime. The left TN crush immediately induced a drastic decreased of MEP amplitude in left gastrocnemius acutely, with no recovery over time up to 7 days post injury. This crush totally abolished the TN function given that left TN section did not further reduced MEP amplitude of left gastrocnemius, which is consistent with the quasi absence of myelinated axons rostral and caudal to the TN crush. Indeed, the reduction in the area occupied by myelin in crossed-sections of crushed TN and changes in myelin morphology reflect the axonal degeneration following injury, retrograde degeneration for the rostral part and anterograde degeneration for the caudal part to injury. The absence of recovery by 7 days post injury is not surprising. Indeed, after sural or peroneal crush,

regeneration has been shown to be observable only by 10 days post-injury (Lozeron et al., 2004). The right gastrocnemius MEP amplitude presented a slight, even if not significant, decrease immediately after left TN crush, probably due to a sort of “shock” or neuronal sideration at the motoneurons level. This would be induced by the axotomy of left gastrocnemius’ motoneurons and could modify these motoneurons intrinsic excitability by sensory afferents. Indeed, the crush damage sensory neurons’ axons, which could induce the activation of interneurons that decussate to excite contralateral motor neurons, just as observed in the withdrawal response (Derderian and Tadi, 2021). Seven days later, a significant increase in MEP amplitude in comparison to immediately post-crush, probably due to a compensation in right motoneurons excitability for the loss of left hindlimb capacities (Eremeev et al., 2012). The right TN section then reduced right gastrocnemius MEP amplitude at the same values than left gastrocnemius MEP immediately and 7 days post-crush. The residual observed MEP after TN section may be due to the position of the animal on the figure-of-eight coil. Indeed, the coil used in this study is designed for human stimulation. Despite the fact that the size of the coil can specifically stimulate precise locations of the cortex and subcortical areas on rat (Vinit et al., 2014; Lee et al., 2021) and even mice (data not published yet), we cannot rule out that the stimulus applied to the spinal cord will propagate through other motor nerves (like the sciatic nerve for instance) connected to proximal muscles of the gastrocnemius, where the electrodes are implanted and can record small muscular twitches. We also did not check in this current study the spread of the magnetic field. The magnetic field induced by a single pulse of TMS could eventually reach the crushed/cut TN or the gastrocnemius muscle, even if the magnetic field is lower at the edges of the coil and should not induce a local depolarization (Vinit et al., 2014).

To conclude, the results presented here highlight several points about non-invasive MS and subsequent MEP recordings: 1) isoflurane is preferred over urethane for MEP recordings due to a better motoneuronal excitability under isoflurane anesthesia, 2) MS and corresponding MEP can be used to assess acetylcholine vesicles release in the neuromuscular junction of electrode-implanted muscle, which could be useful in neuromuscular junction disorders studies, and 3) these results also show the feasibility of evaluating hindlimb peripheral nerve integrity following crush or section via spinal MS in rat pre-clinical models, method that could readily be translated in human to evaluate nerve conductance following nerve injury.

Contribution Details:

Pauline Michel-Flutot: literature search, experimental studies, data acquisition, data analysis, statistical analysis, manuscript preparation, manuscript editing and manuscript review. **Isley Jesus:** experimental studies, data acquisition, data analysis, statistical analysis, manuscript preparation. **Arnaud Mansart:** manuscript editing and manuscript review. **Marcel Bonay:** manuscript review. **Kun-Ze Lee:** manuscript editing and manuscript review, literature search. **Karine Auré:** concept, design, definition of intellectual content, literature search, experimental studies, data acquisition, manuscript editing and manuscript review. **Stéphane Vinit:** concept, design, definition of intellectual content, literature search, experimental studies, data acquisition, manuscript editing and manuscript review.

References

- Alvites R, Rita Caseiro A, Santos Pedrosa S, Vieira Branquinho M, Ronchi G, Geuna S, Varejão ASP, Colette Maurício A (2018) Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Medicine* 5:1466404.
- Antoniadis G, Kretschmer T, Pedro MT, König RW, Heinen CP, Richter HP (2014) Iatrogenic nerve injuries: prevalence, diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 111:273-279.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83:129-138.
- Beer GM, Steurer J, Meyer VE (2001) Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg* 17:531-534.
- Bhatt NK, Khan TR, Mejias C, Paniello RC (2017) Nerve transection repair using laser-activated chitosan in a rat model. *Laryngoscope* 127:E253-e257.
- Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GM (1989) Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. *Microsurgery* 10:226-235.
- Burnett MG, Zager EL (2004) Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 16:E1.
- Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Cornelissen M (2014) Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen Res* 9:1657-1660.
- Cornwall R, Radomilj TE (2000) Nerve injury in traumatic dislocation of the hip. *Clin Orthop Relat Res*:84-91.
- David GK, Earl RH, Peter RM (1969) Evaluation of Nerve Injuries by Evoked Potentials and Electromyography. *J Neurosurg* 31:128-136.
- de Ruiter GC, Spinner RJ, Alaid AO, Koch AJ, Wang H, Malessy MJ, Currier BL, Yaszemski MJ, Kaufman KR, Windebank AJ (2007) Two-dimensional digital video ankle motion analysis for assessment of function in the rat sciatic nerve model. *J Peripher Nerv Syst* 12:216-222.
- Delaere O, Guerit JM, Van Wijck R (1996) Sciatic nerve regeneration in the rat after frozen muscle grafting. A comparative study using somatosensory evoked potentials. *J Hand Surg Br* 21:53-56.
- Derderian C, Tadi P (2021) Physiology, Withdrawal Response. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R (2009) Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery* 29:644-649.
- Elsohemy A, Butler R, Bain JR, Fahnstock M (2009) Sensory protection of rat muscle spindles following peripheral nerve injury and reinnervation. *Plast Reconstr Surg* 124:1860-1868.
- Engel AG (2008) The neuromuscular junction. *Handb Clin Neurol* 91:103-148.
- English AW, Chen Y, Carp JS, Wolpaw JR, Chen XY (2007) Recovery of electromyographic activity after transection and surgical repair of the rat sciatic nerve. *J Neurophysiol* 97:1127-1134.
- Eremeev A, Pleshchinskii I, Baltina T, Eremeev A (2012) The State of the Contralateral Gastrocnemius Muscle Motor Center in Rats with Unilateral Sciatic Nerve Injury. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 42.
- Geuna S (2015) The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods* 243:39-46.
- Hara K, Harris RA (2002) The Anesthetic Mechanism of Urethane: The Effects on Neurotransmitter-Gated Ion Channels. *Anesthesia & Analgesia* 94.
- Hiwaki O, Ueno S (1990) Selective Magnetic Stimulation Of The Spinal Cord. In: [1990] Proceedings of the Twelfth Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, pp 436-437.
- Hsieh TH, Huang YZ, Rotenberg A, Pascual-Leone A, Chiang YH, Wang JY, Chen JJ (2015) Functional Dopaminergic Neurons in Substantia Nigra are Required for Transcranial Magnetic Stimulation-Induced Motor Plasticity. *Cereb Cortex* 25:1806-1814.

- Hubbard JI (1963) REPETITIVE STIMULATION AT THE MAMMALIAN NEUROMUSCULAR JUNCTION, AND THE MOBILIZATION OF TRANSMITTER. *J Physiol* 169:641-662.
- Kamida T, Fujiki M, Hori S, Isono M (1998) Conduction pathways of motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation: a rodent study using a "figure-8" coil. *Muscle & nerve* 21:722-731.
- Kurtoglu Z, Ozturk AH, Bagdatoglu C, Polat G, Aktekin M, Uzmanse D, Camdeviren H, Bagdatoglu O, Sargon M (2005) Effects of trapidil after crush injury in peripheral nerve. *Acta Med Okayama* 59:37-44.
- Lee KZ, Liou LM, Vinit S (2021) Diaphragm Motor-Evoked Potential Induced by Cervical Magnetic Stimulation following Cervical Spinal Cord Contusion in the Rat. *Journal of neurotrauma* 38:2122-2140.
- Lefaucheur JP (2019) Transcranial magnetic stimulation. *Handb Clin Neurol* 160:559-580.
- Li X, Shen J, Chen J, Wang X, Liu Q, Liang B (2008) Magnetic resonance imaging evaluation of acute crush injury of rabbit sciatic nerve: correlation with histology. *Can Assoc Radiol J* 59:123-130.
- Linden RD, Zhang YP, Burke DA, Hunt MA, Harpring JE, Shields CB (1999) Magnetic motor evoked potential monitoring in the rat. *J Neurosurg* 91:205-210.
- Lozeron P, Krarup C, Schmalbruch H (2004) Regeneration of unmyelinated and myelinated sensory nerve fibres studied by a retrograde tracer method. *J Neurosci Methods* 138:225-232.
- Luft AR, Kaelin-Lang A, Hauser T-K, Buitrago MM, Thakor NV, Hanley DF, Cohen LG (2002) Modulation of rodent cortical motor excitability by somatosensory input. *Experimental Brain Research* 142:562-569.
- Lundborg G (2000) A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am* 25:391-414.
- Mathews KS, Wark HA, Normann RA (2014) Assessment of rat sciatic nerve function following acute implantation of high density Utah slanted electrode array (25 electrodes/mm²) based on neural recordings and evoked muscle activity. *Muscle & nerve* 50:417-424.
- Mohan R, Tosolini AP, Morris R (2015) Segmental distribution of the motor neuron columns that supply the rat hindlimb: A muscle/motor neuron tract-tracing analysis targeting the motor end plates. *Neuroscience* 307:98-108.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G (2008) Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *Journal of Neuroscience Methods* 170:255-261.
- Qu X, Yan J, Li X, Zhang P, Liu X (2016) Topography of Synchronization of Somatosensory Evoked Potentials Elicited by Stimulation of the Sciatic Nerve in Rat. *Front Comput Neurosci* 10:43.
- Richards CD (2002) Anaesthetic modulation of synaptic transmission in the mammalian CNS. *British Journal of Anaesthesia* 89:79-90.
- Rotenberg A, Muller PA, Vahabzadeh-Hagh AM, Navarro X, López-Vales R, Pascual-Leone A, Jensen F (2010) Lateralization of forelimb motor evoked potentials by transcranial magnetic stimulation in rats. *Clin Neurophysiol* 121:104-108.
- Savastano LE, Laurito SR, Fitt MR, Rasmussen JA, Gonzalez Polo V, Patterson SI (2014) Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *J Neurosci Methods* 227:166-180.
- Scipio FD, Raimondo S, Tos P, Geuna S (2008) A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microscopy Research and Technique* 71:497-502.
- Sykes M, Matheson NA, Brownjohn PW, Tang AD, Rodger J, Shemmell JB, Reynolds JN (2016) Differences in Motor Evoked Potentials Induced in Rats by Transcranial Magnetic Stimulation under Two Separate Anesthetics: Implications for Plasticity Studies. *Front Neural Circuits* 10:80.
- Tang AD, Lowe AS, Garrett AR, Woodward R, Bennett W, Canty AJ, Garry MI, Hinder MR, Summers JJ, Gersner R, Rotenberg A, Thickbroom G, Walton J, Rodger J (2016) Construction and Evaluation of Rodent-Specific rTMS Coils. *Front Neural Circuits* 10:47.

- Vahabzadeh-Hagh AM, Muller PA, Pascual-Leone A, Jensen FE, Rotenberg A (2011) Measures of cortical inhibition by paired-pulse transcranial magnetic stimulation in anesthetized rats. *J Neurophysiol* 105:615-624.
- Van der Kloot W, Molgó J (1994) Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 74:899-991.
- Vinit S, Keomani E, Deramaudt TB, Bonay M, Petitjean M (2016) Reorganization of Respiratory Descending Pathways following Cervical Spinal Partial Section Investigated by Transcranial Magnetic Stimulation in the Rat. *PLoS one* 11:e0148180.
- Vinit S, Keomani E, Deramaudt TB, Spruance VM, Bezdudnaya T, Lane MA, Bonay M, Petitjean M (2014) Interdisciplinary approaches of transcranial magnetic stimulation applied to a respiratory neuronal circuitry model. *PLoS one* 9:e113251.
- Vogler GA (2006) Chapter 19 - Anesthesia and Analgesia. In: *The Laboratory Rat (Second Edition)* (Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, eds), pp 627-664. Burlington: Academic Press.
- Wang T, Ito A, Tajino J, Kuroki H, Aoyama T (2020) 3D Kinematic Analysis for the Functional Evaluation in the Rat Model of Sciatic Nerve Crush Injury. *J Vis Exp*.
- Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, Zhang J, Kawai H, Kuroki H (2018) Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS one* 13:e0208985.
- Zhu Y, Jin Z, Luo Y, Wang Y, Peng N, Peng J, Wang Y, Yu B, Lu C, Zhang S (2020) Evaluation of the Crushed Sciatic Nerve and Denervated Muscle with Multimodality Ultrasound Techniques: An Animal Study. *Ultrasound Med Biol* 46:377-392.

3. Modulation de la glycolyse dans la neuroplasticité respiratoire et cardiovasculaire en réponse à un traumatisme cervical de la moelle épinière chez le rat

Le 2-DG est un analogue du glucose ayant pour caractéristique d'inhiber la glycolyse de façon compétitive. En effet, le 2-DG est moléculairement identique au glucose, hormis pour le groupement hydroxyle en position 2 qui est remplacé par un hydrogène dans le 2-DG. Le 2-DG entre ainsi en compétition avec le glucose pour l'entrée dans la cellule par les transporteurs GLUTs, ainsi que dans la réaction catabolisée par l'hexokinase. Le 2-DG est alors métabolisé en 2-deoxyglucose-6-phosphate qui va s'accumuler dans la cellule. Il y a donc réduction de la métabolisation du glucose au profit de celle du 2-DG de façon dose dépendante, et donc une diminution des produits de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates (Xi et al., 2014).

Des études ont déjà montré les effets du 2-DG sur différents systèmes. En effet, la réduction de l'apport cellulaire en glucose induite par le 2-DG réduit le nombre d'épisodes chez les patients épileptiques (Stafstrom et al., 2008). De plus, l'implication du métabolisme glycolytique (réduit via le 2-DG dans cette étude) dans les processus de plasticité neurorespiratoire induits par hypoxie intermittente a aussi été démontrée (MacFarlane et al., 2017). De même, un traitement au 2-DG permettrait de réduire certains processus neuroinflammatoires (Wang et al., 2014).

Ces études ainsi que les résultats obtenus précédemment sur l'inflammation suite à une lésion spinale cervicale haute nous laissent donc penser que le 2-DG pourrait être un outil thérapeutique dans le cadre des traumatismes spinaux afin de réduire les phénomènes neuroinflammatoires délétères et d'induire une compensation et récupération fonctionnelle respiratoire et cardiovasculaire.

Cette partie de mon travail doctoral a ainsi eu pour but l'utilisation du modèle d'hémisection spinale cervicale chez le rat traité pendant 7j avec un inhibiteur compétitif de la glycolyse, le 2-DG (200 mg/kg/j, injection sous-cutanée), afin de vérifier plusieurs hypothèses : 1) attester d'une récupération fonctionnelle chez les animaux traités, tant au niveau neurorespiratoire que cardiovasculaire, et enfin 2) vérifier que la réduction de l'apport cellulaire en glucose induit une diminution de la production de CSPG au niveau de la cicatrice gliale ainsi qu'au niveau des motoneurones phréniques déafférentés.

3.1. Vérification de l'étendue des lésions en C2 et des variables physiologiques

Avant toute analyse, l'homogénéité des poids et des températures des animaux a été vérifiée (Tableau 1) chez tous les animaux lésés, ainsi que l'étendue de l'hémisection en C2.

Tableau 1. Poids et température des animaux lors des EMG sous anesthésie à l'uréthane

	Poids (g)	Température (°C)
7j Shams (n = 4)	403 ± 56	37,1 ± 0,3
7jPL (n = 9)	386 ± 36	37,0 ± 0,2
7j Shams 2-DG (n = 4)	409 ± 79	37,3 ± 0,3
7jPL 2-DG (n = 4)	394 ± 57	37,4 ± 0,1

Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM. ANOVA à deux facteurs $p > 0,05$.

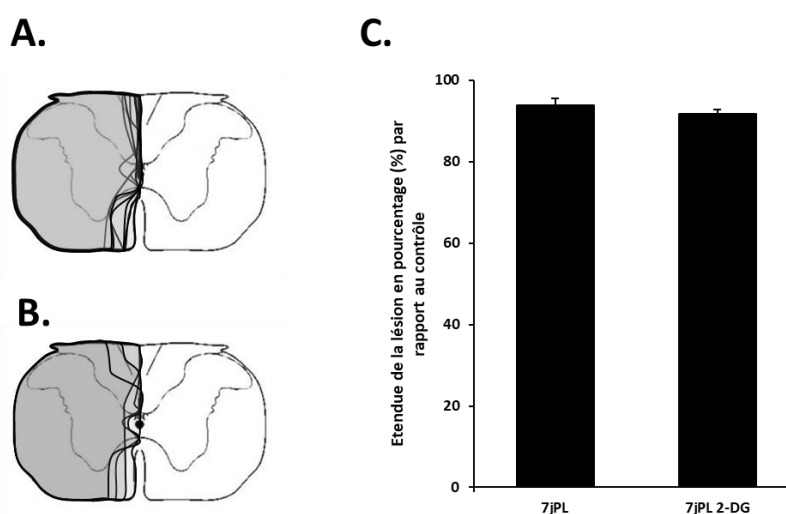


Figure 42 : Quantification de l'étendue des lésions spinales en C2

Schémas représentatifs des hémisections spinales cervicales (C2) pour les différents groupes étudiés : à 7j post-lésion (A) et à 7j post-lésion traité au 2-DG (B). C) Quantification de l'étendue des lésions spinales en pourcentage par rapport au contrôle (une héli-moelle sans hémisection spinale aura une étendue de lésion de 0%). T-test ($p > 0,05$).

Aucune différence n'a été observée entre tous les groupes d'animaux pour les différents paramètres enregistrés, ainsi que pour les étendues de lésion (Figure 42). Ces résultats valident donc l'homogénéité des groupes utilisés.

3.2. Effets ventilatoires

Une hémisection spinale en C2 induit une déafférentation des motoneurons phréniques présents sous la lésion, et donc une hémiplegie diaphragmatique. Afin de vérifier l'impact de la lésion spinale sur la ventilation des animaux ainsi que l'effet du traitement au 2-DG, le flux respiratoire a été enregistré par pléthysmographie chez les animaux vigile et en eupnée afin de mesurer et calculer différents paramètres ventilatoires.

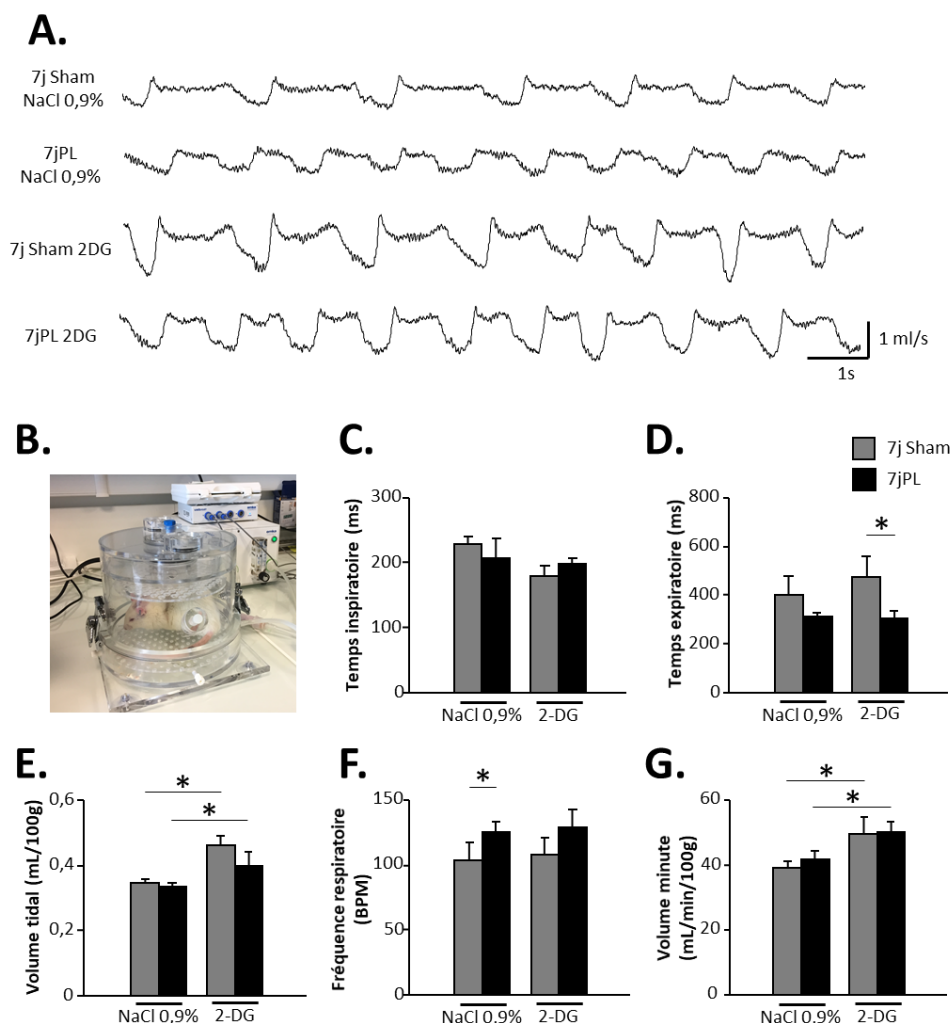


Figure 43 : Effets ventilatoires de l'hémisection en C2 et du traitement au 2-DG

A) Tracés pléthysmographiques représentatifs à 7j pour les différents groupes (7j Sham NaCl 0,9%, 7jPL NaCl 0,9%, 7j Sham 2-DG et 7jPL 2-DG). B) Photo d'un rat dans une cuve de pléthysmographie. La cuve est oxygénée à 2ml/s et les variations de pression induites par la respiration de l'animal sont perçues par un capteur relié à un amplificateur puis transmises à un ordinateur. C) Histogrammes représentant le temps inspiratoire moyen pour chaque groupe. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes (t-test, $p > 0,05$). D) Histogrammes représentant le temps expiratoire moyen pour chaque groupe. E) Histogrammes représentant le volume tidal moyen par 100g de rat pour chaque groupe. F) Histogrammes représentant la fréquence respiratoire moyenne pour chaque groupe. G) Histogrammes représentant le volume minute par 100g de rat pour chaque groupe. Les différences significatives ont été mises en évidence par une ANOVA à un facteur suivie d'une analyse post-hoc Fisher LSD, * $p < 0,05$.

Ces résultats montrent que l'hémisection en C2 induit une diminution du temps expiratoire et du volume courant, ainsi qu'une augmentation de la fréquence respiratoire chez les animaux à 7j post-lésion. Elle n'impacte cependant pas le temps inspiratoire ni le volume minute. Le traitement au 2-DG induit quant à lui une augmentation du volume courant, et par conséquent du volume minute (Figure 43).

3.3. Effets sur l'activité musculaire diaphragmatique

Le diaphragme étant le principal muscle inspiratoire, sa perte d'activité est le facteur responsable des déficits respiratoires suite à un trauma spinal cervical. Cette étude a donc été poursuivie par l'approche du système respiratoire via l'étude des EMG diaphragmatiques, illustrés par des tracés représentatifs en Figure 44A. Les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane (5% dans 100% d'oxygène), puis l'anesthésie a ensuite été maintenue à 2,5 % d'isoflurane dans de l'air. Les animaux ont été trachéotomisés, et leur artère fémorale droite a été canulée pour l'enregistrement de la pression artérielle. L'anesthésie à l'isoflurane a ensuite été remplacée par une anesthésie à l'uréthane (1,8 g/kg, i.v., veine de la queue). Une laparotomie a ensuite été effectuée afin de rendre accessible le diaphragme pour l'enregistrement des EMG diaphragmatiques.

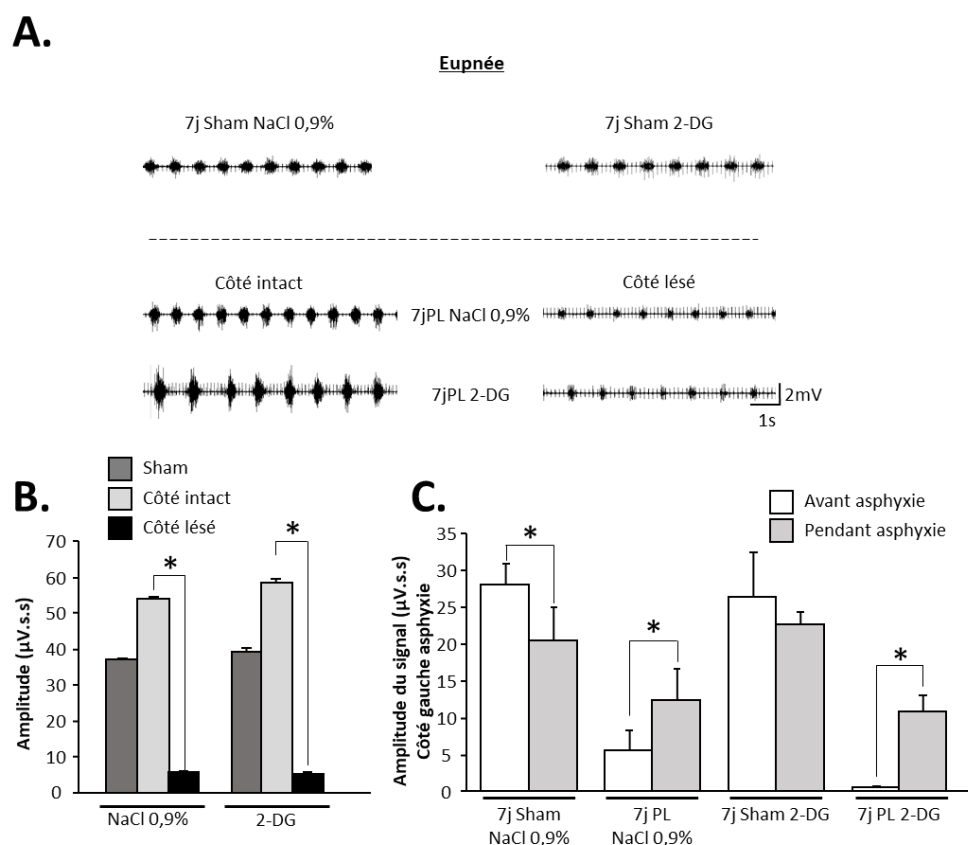


Figure 44 : Effets de l'hémisection spinale en C2 et du traitement au 2-DG sur l'activité respiratoire

A) Tracés d'électromyographie diaphragmatique représentatifs des différents groupes d'animaux. B) Histogrammes représentant la moyenne de l'amplitude du signal doublement intégré pour les différents groupes. * t-test pairés ($p < 0,05$). C) Histogrammes représentant la variation de l'amplitude du signal doublement intégré lors d'un challenge respiratoire (asphyxie) pour les différents groupes. * t-test pairés ($p < 0,05$).

L'amplitude du signal doublement intégré a été analysée. Les côtés droit et gauche des 7j Sham NaCl 0,9% et 7j Sham 2-DG ont été considérés comme faisant partie du même groupe. En effet aucune différence significative entre les deux côtés droit et gauche n'a été observée pour les animaux Sham. Une amplitude significativement plus faible est observée du côté lésé par rapport au côté intact chez les animaux lésés et traités au NaCl 0,9%, ce qui est typique du modèle. Le traitement au 2-DG ne modifie pas ce profil et n'a pas d'impact sur l'activité diaphragmatique des animaux Sham (Figure 44B).

Les animaux ont ensuite été soumis à un challenge respiratoire (asphyxie) pour étudier l'adaptation de l'activité diaphragmatique dans le cas des animaux Sham, et l'amplitude d'activation du CPP chez les animaux lésés. Chez les animaux Sham, le traitement au 2-DG permet une réduction de la perte d'amplitude durant l'asphyxie comparé à l'eupnée. Chez les animaux lésés, le traitement au 2-DG n'induit pas de modification du profil de réponse à l'asphyxie (Figure 44C).

Ces résultats indiquent donc que le traitement au 2-DG utilisé dans cette étude n'a aucun impact sur l'activité diaphragmatique, que ce soit chez les animaux Sham ou les animaux lésés.

3.4. Effets sur la pression artérielle

Pour poursuivre cette étude, mais d'un point de vue cardiovasculaire, nous avons observé la variation de paramètres hémodynamiques en réponse à la lésion spinale et au traitement au 2-DG en étudiant la variation de la pression artérielle moyenne (PA) et de la fréquence cardiaque chez nos groupes d'animaux. Les tracés typiques obtenus à différents temps pré et post-lésionnels pour la PA sont représentés sur la Figure 45A en rouge.

Aucune différence n'est observable pour la pression artérielle moyenne entre les animaux lésés et les animaux Sham, ce qui a été discuté dans l'article (partie résultats 1.2., *Effect of C2 spinal cord injury on respiratory and cardiovascular functions in rats*). Le traitement au 2-DG n'a quant à lui aucun effet chez les animaux lésés, mais de façon intéressante, induit une augmentation significative de la pression artérielle moyenne chez les animaux Sham par rapport aux animaux lésés traités au 2-DG, alors qu'aucune différence n'est observée entre les animaux Sham et lésés non-traités (NaCl 0,9%) (Figure 45B). En ce qui concerne la fréquence cardiaque, ni l'hémisection en C2 ni le traitement au 2-DG n'ont d'impact sur les valeurs enregistrées (Figure 45C).

A sept jours post-chirurgie, aucun effet cardiovasculaire n'est observable après hémisection en C2, tout du moins pour les paramètres de pression artérielle moyenne et de fréquence cardiaque analysés dans cette étude. En revanche, le traitement au 2-DG induirait une augmentation non physiologique de la pression artérielle chez les animaux Sham, c'est-à-dire chez des animaux initialement sains.

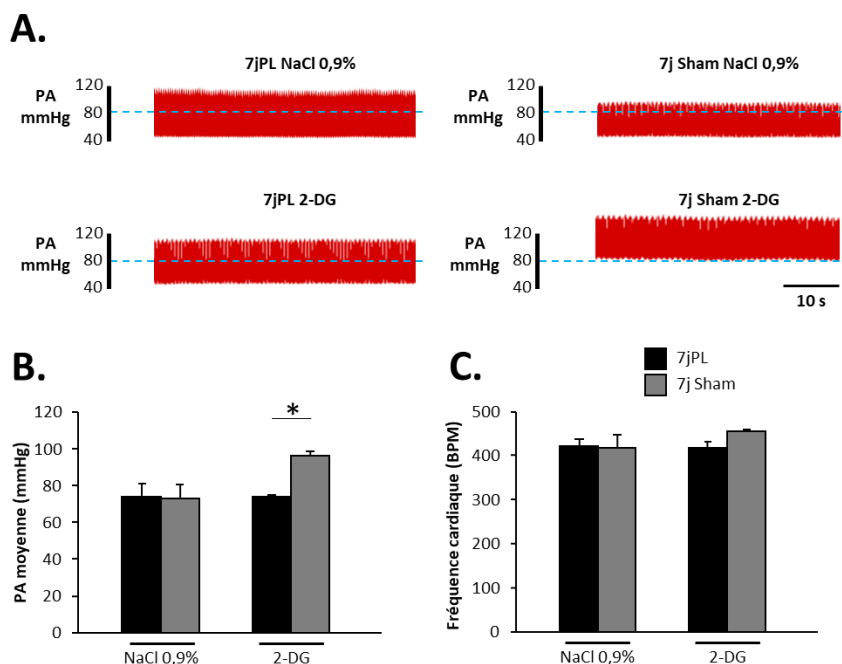


Figure 45 : Effet de l'hémisection en C2 et du traitement au 2-DG sur la pression artérielle moyenne.

A) Tracés représentatifs de la pression artérielle chez les animaux à 7j post-chirurgie. **B)** Histogrammes représentant la pression artérielle moyenne chez les différents groupes. * t-test ($p < 0,001$). **C)** Histogrammes représentant la fréquence cardiaque moyenne chez les différents groupes (t-test, $p > 0,05$).

Pour chaque animal, la moelle épinière C3-C6 a été ensuite été prélevée après euthanasie et perfusion intracardiaque (PBS 1X hépariné, puis PFA 4%). Les moelles épinières ont ensuite été post-fixées sur la nuit, cryoprotégées dans une solution de sucrose 30%, puis stockées à -80°C . Elles ont ensuite été coupées au cryostat ($30\ \mu\text{m}$ d'épaisseur), et ces coupes ont été immunomarquées.

3.5. Effets de l'hémisection spinale cervicale en C2 et du traitement au 2DG sur l'expression des CSPG dans la moelle épinière C3-C6

Les processus inflammatoires déclenchés par le trauma spinal sont donc majoritairement délétères. Or, cette inflammation est un processus hautement consommateur en énergie et requiert donc des changements métaboliques dans les cellules impliquées dans cette inflammation. Ces changements métaboliques induisent l'augmentation de la consommation de glucose, de la voie de la

glycolyse et de la voie des pentoses phosphates (O'Neill and Hardie, 2013). De plus, la surexpression de CSPG est induite par cette inflammation. Ainsi, la consommation de glucose est au centre de la mise en place de l'inflammation, et par conséquent de la production de CSPG. Nous avons donc émis l'hypothèse que notre traitement au 2-DG induirait une réduction de la neuroinflammation dans la moelle épinière C3-C6 au niveau des motoneurones phréniques déafférentés, ce qui se traduirait par une réduction de la production de CSPG dans cette zone.

Les CSPG ont ici été marqués par la *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA), une glycoprotéine (lectine) qui se fixe de façon sélective sur les structures se terminant par des résidus *N-acetylgalactosamine*. La surface occupée par le marquage WFA et l'intensité du marquage sont significativement plus importants chez les 7jPL NaCl 0,9% par rapport aux 7j Sham NaCl 0,9%, un phénomène connu après trauma spinal (Silver and Miller, 2004; Bradbury and Burnside, 2019). En revanche, le traitement au 2-DG n'induit aucune différence significative chez les animaux lésés par rapport aux rats injectés au NaCl 0,9%. De façon surprenante et inattendue, le traitement au 2-DG provoque une augmentation forte de l'expression des CSPG chez les animaux Sham (Figure 46).

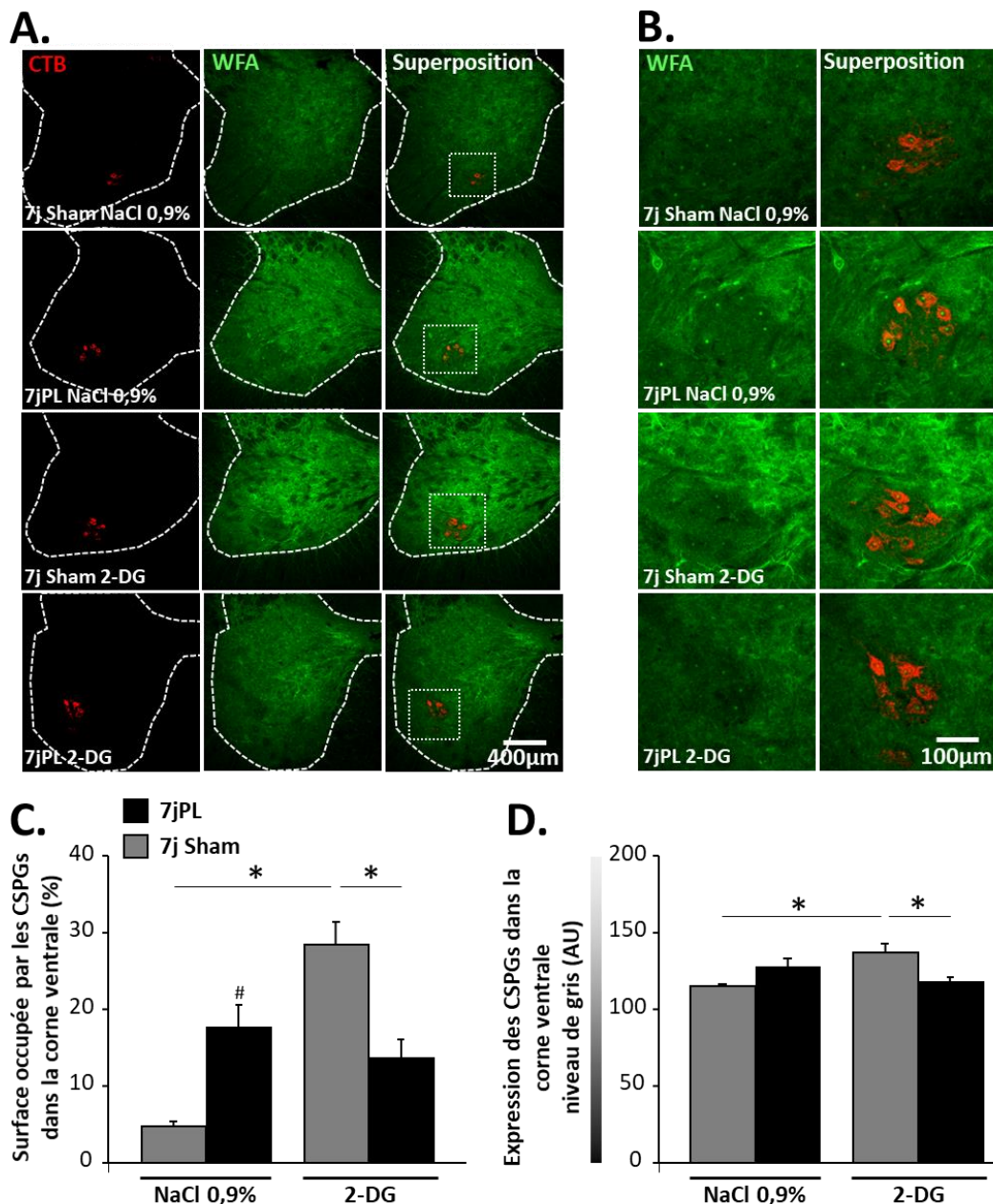


Figure 46 : Effets de l'hémisection en C2 et du traitement au 2-DG sur l'expression des CSPG dans la moelle épinière C3-C6.

A) Images d'immunofluorescence montrant le marquage des motoneurons phréniques en rouge, et le marquage des CSPG par le WFA en vert. La superposition des deux marquages met en évidence la présence de CSPG autour des motoneurons phréniques chez les groupes 7jPL et 7j Shams 2DG. Les images ont été prises au microscope confocal (X10). La délimitation en pointillés blancs met en évidence la corne ventrale de la moelle épinière. Les carrés en pointillés blancs délimitent la zone de grossissement pour les images montrées en B). B) Grossissement X4 des motoneurons phréniques montrés en A). C) Histogrammes représentant la surface occupée par les CSPG marqués au WFA dans la corne ventrale de la moelle épinière 7 jours après la chirurgie. D) Histogrammes représentant l'intensité du marquage WFA présent dans la corne ventrale de la moelle épinière (en niveau de gris). Les différences significatives ont été mises en évidence par un ANOVA à un facteur suivie d'un Fisher LSD ($p < 0,05$). # comparé aux 7j Sham NaCl 0,9% ($p = 0,029$).

3.6. Discussion

Le traitement au 2-DG n'a aucun impact visible chez les animaux lésés. En revanche, les animaux Sham présentent une augmentation de leur ventilation, de leur pression artérielle moyenne et de l'expression des CSPG dans la corne ventrale de la moelle épinière C3-C6.

La dérégulation dans l'homéostasie glycolytique induite par le 2-DG pourrait induire la mise en place d'un état inflammatoire conduisant à une augmentation des besoins en oxygène, nécessaire à d'autres processus métaboliques pouvant fournir du glucose ou en tout cas de l'énergie. En effet, il a déjà été montré que l'inflammation induisait des modifications dans la ventilation des animaux (Huxtable et al., 2011). Cependant, les résultats obtenus par ces auteurs montrent une augmentation de la fréquence respiratoire, ce qui est une réaction différente de l'augmentation du volume courant que nous observons dans notre étude. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'ils ont induit une inflammation par injection intrapéritonéale de LPS (bactérien), ce qui n'est pas le cas dans cette étude.

L'augmentation de la pression artérielle moyenne pourrait aussi s'expliquer par une inflammation généralisée due à une potentielle toxicité du 2-DG. En effet, plusieurs études ont montré que le 2-DG présenterait des effets cardiotoxiques (Minor et al., 2010; Terse et al., 2016). Une analyse plus poussée de la fonction cardiaque pourrait permettre d'éclaircir l'origine de cette modulation cardiovasculaire induite par le 2-DG. Ces résultats restent cependant à confirmer, le nombre d'animaux étant faible dans ce groupe (n = 3).

L'augmentation de l'expression des CSPG dans la corne ventrale de la moelle épinière observée chez les animaux Sham traités au 2-DG est aussi un indice de l'état inflammatoire chez nos animaux, la surexpression des CSPG étant l'une des conséquences de l'inflammation. Les CSPG étant connus pour inhiber la plasticité synaptique (Alilain et al., 2011; Irvine and Kwok, 2018), nous pouvons exclure tout phénomène plastique comme étant à l'origine de cette augmentation du volume courant, les résultats des EMG diaphragmatiques nous confortant dans cette idée étant donné l'absence d'augmentation de l'activité diaphragmatique chez les animaux traités au 2-DG. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette augmentation du volume courant chez nos animaux traités au 2-DG résulte du recrutement des muscles respiratoires accessoires en réponse à une augmentation des besoins en oxygène, induite par un état inflammatoire chez nos animaux. Bien sûr, cette hypothèse reste à vérifier, tout d'abord en vérifiant si les animaux traités au 2-DG ont par exemple un métabolisme modifié par pléthysmographie métabolique (mesure de l'O₂ consommé et du CO₂ produit). La présence d'un état général inflammatoire est aussi à valider par la vérification de l'activité/la présence de plusieurs de ses acteurs (iNOS, NADPH-oxydase, C/EBP δ , activation de la microglie et des astrocytes...) au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière.

4. Physiopathologie suite à une hémisection en C2 chez la souris

4.1. Suivi de l'activité diaphragmatique chez la souris après hémisection spinale en C2

Publication: Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 284 (2021) 103568

Les traumatismes médullaires cervicaux conduisent à une insuffisance respiratoire permanente. À ce jour, le modèle préclinique le plus documenté est celui d'hémisection spinale cervicale en C2 chez le rat. Cependant, les études moléculaires chez le rat sont limitées en raison de la faible disponibilité de souches génétiquement modifiées disponibles.

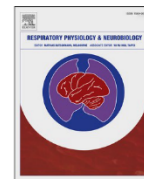
Le but de ce travail a été d'évaluer l'activité diaphragmatique au cours du temps (jusqu'à un mois post-lésion) suite à une hémisection latérale en C2 chez la souris C57BL/6 afin d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie chez le modèle préclinique de souris. Aucune récupération spontanée significative de l'activité diaphragmatique n'est observée jusqu'à 30 jours en eupnée. Cependant, lors d'un challenge respiratoire (asphyxie), une restauration partielle du diaphragme lésé est observée à 7 jours post-lésion, ce qui correspond au démasquage du CPP. Fait intéressant, l'enregistrement électromyographique du diaphragme entre 2 bouffées inspiratoires du côté lésé montre une augmentation d'amplitude entre 1 à 7 jours post-lésion, reflétant un changement dans l'excitabilité motoneuronale phrénique. Cette étude met en évidence la capacité plastique du système respiratoire suite à une hémisection spinale cervicale chez la souris.

Nos résultats démontrent donc que le modèle préclinique souris reproduit au moins en partie ce qui est décrit chez le rat, ce qui est non négligeable compte tenu du nombre important de souches génétiquement modifiées disponibles chez la souris pouvant être utilisées pour étudier les différents effets physiopathologiques des traumatismes spinaux.



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol

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

Pauline Michel-Flutot^a, Arnaud Mansart^b, Therese B. Deramautd^a, Isley Jesus^a, Kun-Ze Lee^c, Marcel Bonay^a, Stéphane Vinit^{a,*}

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

^b Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et Inflammation (2I), 78000, Versailles, France

^c Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung, Taiwan

ARTICLE INFO

Keywords:

Mice
C2 spinal cord injury
Diaphragm EMG
Phrenic motoneuron

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 1–7 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.

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 et al., 2020).

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

* Corresponding author.

E-mail address: stephane.vinit@uvsq.fr (S. Vinit).

<https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103568>

Received 25 June 2020; Received in revised form 21 October 2020; Accepted 25 October 2020

Available online 2 November 2020

1569-9048/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

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 % O₂) in a closed chamber. Anesthesia was maintained throughout the procedure (1.5–2 % isoflurane in 100 % O₂) 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 hemisectioned 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; Boral 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: 1 h post-injury (P.I.) (n = 6) and 1 h 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 % O₂ and maintained throughout the experiment (2.5 % in 21 % O₂ 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 48 h in 30 % sucrose (in 0.9 % NaCl) and frozen. Longitudinal sections (30 µm 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: 8 K; 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 100 Hz for

Table 1
Animals weight evolution post-surgery.

Group	Body weight (g)					
	Initial weight	1d	3d	7d	15d	30d
Sham	22.8 ± 0.5	21.1 ± 0.6	21.8 ± 0.9	22.2 ± 0.8	22.3 ± 1.5	25.3 ± 1.9
Injured	22.8 ± 0.6	21.9 ± 0.6	19.9 ± 0.7	21.5 ± 0.7	22.7 ± 1.4	23.3 ± 1.3

Sham groups comparison: One-way ANOVA p = 0.162.

Injured groups comparison: One-way ANOVA p = 0.054.

Sham groups vs Injured groups comparisons: t-test, p > 0.05.

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 ± 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 did not show any significant variation over time following sham surgery. After C2 SCI, no statistical difference between injured animals with time post-injury have been observed even if the animal's weight tends to be reduced up to 3d P.I. (initial weight = 22.8 ± 0.6 g vs 1d P.I. = 21.9 ± 0.6 g; 3d P.I. = 19.9 ± 0.7 g; 7d P.I. = 21.5 ± 0.7 g; 15d P.I. = 22.7 ± 1.4 g; 30d P.I. = 23.3 ± 1.3 g, One Way ANOVA, p = 0.054). No difference in sham animals weight compared to injured animals (initial weight = 22.8 ± 0.5 g vs injured animals initial weight, p = 0.834; 1d Sham = 21.1 ± 0.6 g vs 1d P.I., p = 0.372; 3d Sham = 21.8 ± 0.9 g vs 3d P.I., p = 0.092; 7d Sham 22.2 ± 0.8 g vs 7d P.I., p = 0.513; 15d Sham = 22.3 ± 1.5 g vs 3d P.I., p = 0.872; 30d Sham = 25.3 ± 1.9 g vs 3d P.I., p = 0.413) at corresponding time post-surgery were observed (Table 1).

3.2. Effect on diaphragm activity during eupnea

No significant difference in injury size between all groups (1 h P.I. =

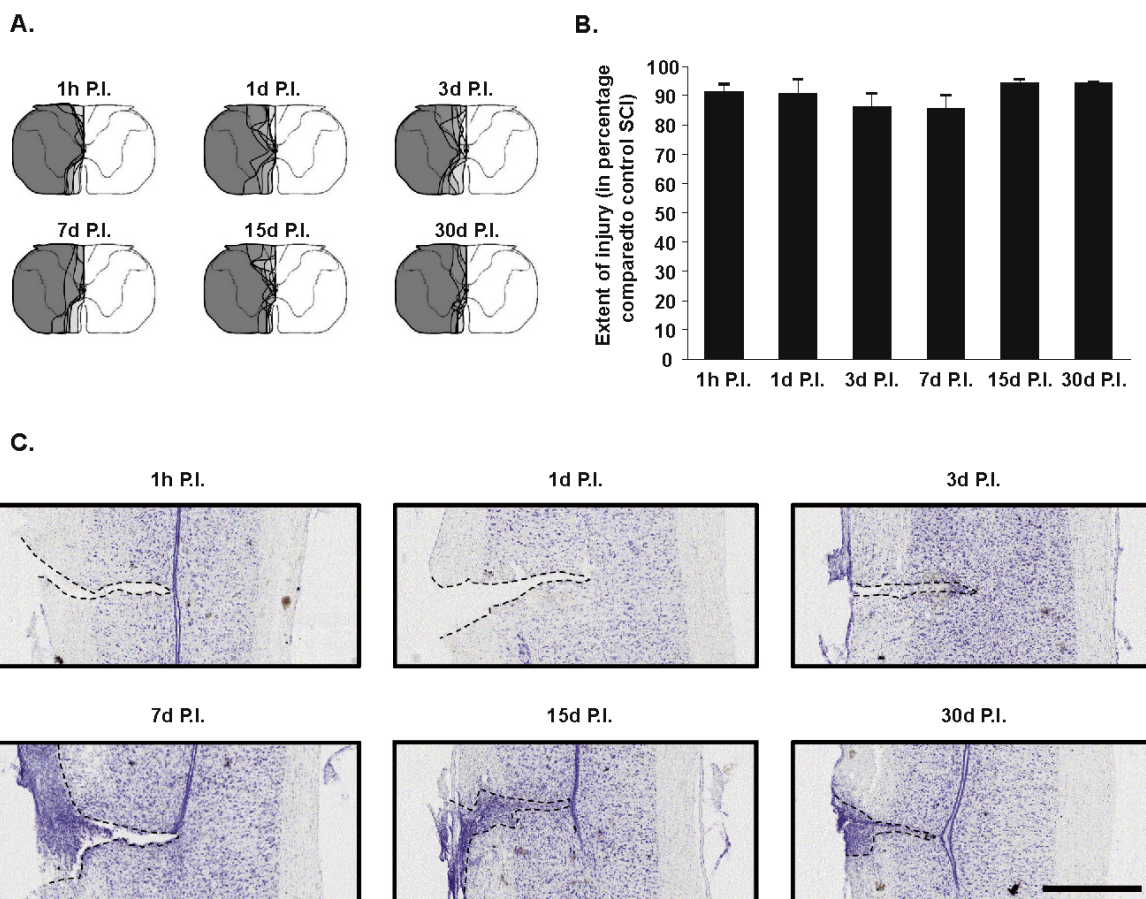


Fig. 1. Extent of injury following a C2 hemisection.

A. Representative extend of injury for each animal at 1 h 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 1 h P.I., 1d P.I., 3d P.I., 7d P.I., 15d P.I. and 30d P.I.. Scale bar: 800 μm.

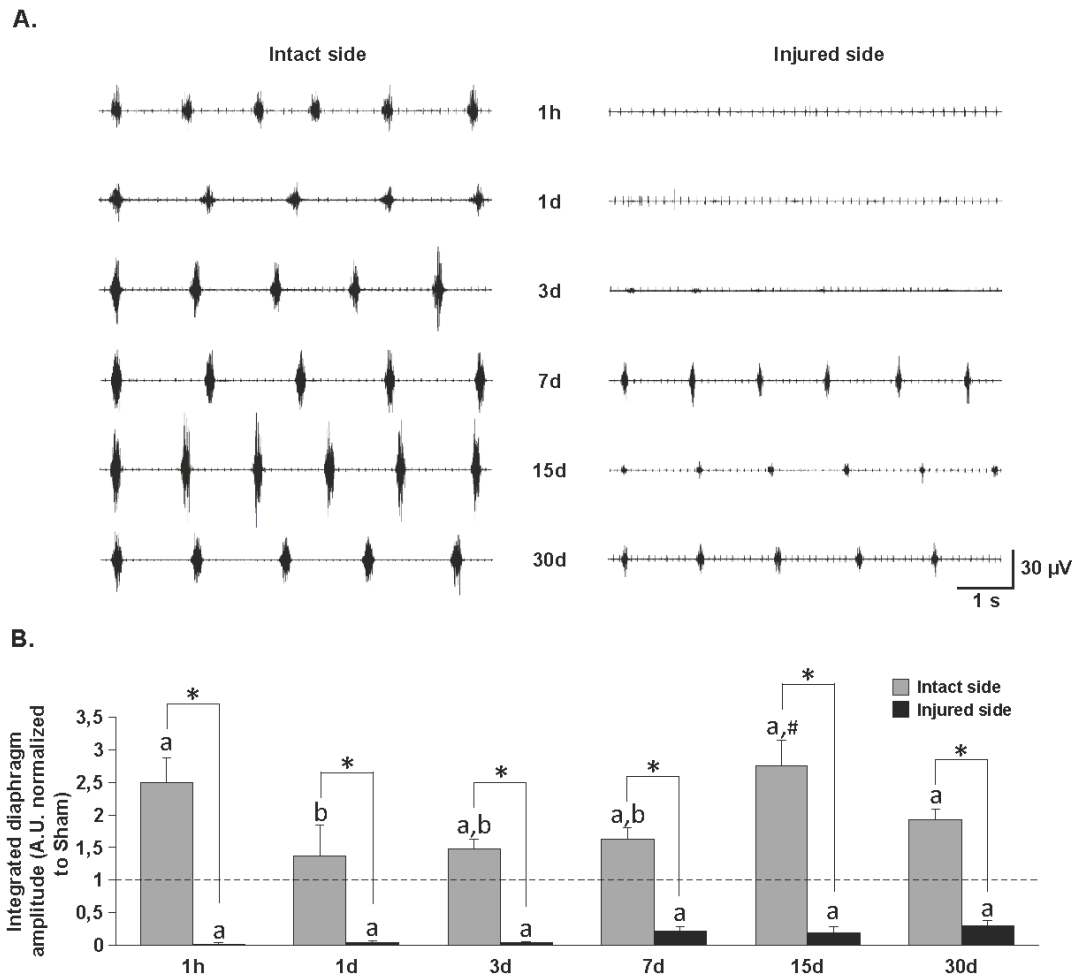


Fig. 2. Diaphragm activity following a C2 hemisection.

A. Representative traces of raw diaphragm EMG at 1 h 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 1 h 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 1 h intact side group; # $p < 0.05$ compared to 1d, 3d and 7d intact side groups; * $p < 0.05$ intact side compared to injured side.

91.4 ± 2.7 %; 1d P.I. = 90.6 ± 5.1 %; 3d P.I. = 86.1 ± 4.4 %; 7d P.I. = 85.5 ± 4.6 %; 15d P.I. = 94.3 ± 1.4 %; 30d P.I. = 94.4 ± 0.6 %; $p = 0.248$) was observed (Fig. 1A–C). Diaphragmatic EMGs showed a significant decrease in diaphragm activity 1 h after C2 injury (0.01 ± 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 ± 0.03 A.U.; 3d P.I. = 0.03 ± 0.02 A.U.; 7d P.I. = 0.22 ± 0.14 A.U.; 15d P.I. = 0.19 ± 0.09 A.U.; 30d P.I. = 0.30 ± 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 1 h P.I. (2.50 ± 0.38 A.U., $p < 0.001$), 3d P.I. (1.48 ± 0.15 A.U., $p = 0.006$), 7d P.I. (1.62 ± 0.18 A.U., $p = 0.002$), 15d P.I. (2.76 ± 0.39 A.U., $p = 0.001$), 30d P.I. (1.93 ± 0.16 A.U., $p = 0.002$) but not at 1d P.I. (1.37 ± 0.47 A.U., $p = 0.289$) compared to the corresponding sham groups (normalized to 1.00 A.U.) (Fig. 2A and B).

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: 1 h 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 1 h P.I., 1d P.I. and 3d P.I. ($p > 0.05$) were observed (Table 2; Fig. 3A–F).

3.4. Activity between respiratory bursts

Electrical recordings between EMG bursts and heart beats was analyzed (Fig. 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 ± 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 ± 0.97 A.U. vs 1 h P.I. = 0.69 ± 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 ± 0.99 A.U., $p = 0.048$). Then, the amplitude gradually decreased to pre-injury values at 7d P.I. (injured side: 2.49 ± 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 ± 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 ± 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: 1 h P.I. = 0.82 ± 0.15 A.U.; 3d P.I. = 1.17 ± 0.22 A.U.; 7d P.I. = 1.40 ± 0.27 A.U.; 15d P.I. = 1.09 ±

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

Group	Mean ± SEM	
	Eupnea (µV.s.s)	Mild asphyxia (µV.s.s)
Sham animals		
1 h Sham	0.68 ± 0.09	1.13* ± 0.17
1d Sham	0.75 ± 0.07	1.14* ± 0.15
3d Sham	1.11 ± 0.09	1.57* ± 0.17
7d Sham	0.96 ± 0.16	1.62* ± 0.22
15d Sham	0.46 ± 0.08	0.81* ± 0.14
30d Sham	0.51 ± 0.06	0.88* ± 0.07
Injured (Intact side)		
1 h P.I.	1.63 ± 0.28	1.43 ± 0.25
1d P.I.	1.12 ± 0.26	1.07 ± 0.17
3d P.I.	1.67 ± 0.35	1.53 ± 0.31
7d P.I.	1.53 ± 0.09	1.12 ± 0.24
15d P.I.	1.51 ± 0.28	1.32 ± 0.25
30d P.I.	1.56 ± 0.32	1.58 ± 0.39
Injured (Injured side)		
1 h P.I.	1.80 × 10 ⁰³ ± 1.97 × 10 ⁰³	2.70 × 10 ⁰³ ± 2.96 × 10 ⁰³
1d P.I.	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.03
3d P.I.	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.05
7d P.I.	0.24 ± 0.09	0.55* ± 0.12
15d P.I.	0.04 ± 0.02	0.40* ± 0.07
30d P.I.	0.11 ± 0.05	0.38* ± 0.10

* p < 0.05 mild asphyxia compared to eupnea (Paired t-test).

0.07 A.U.; 30d P.I. = 1.10 ± 0.07 A.U.; vs Sham normalized to 1 p > 0.05), except at 1d P.I. (0.82 ± 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) (Fig. 4B).

3.5. Power spectral density analysis

The PSD analysis of inter-burst recordings revealed an increase in low-end frequencies (from 100 to 1000 Hz) 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 1 h P.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; Fig. 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 1 h P.I., p ≤ 0.049; and vs 1d P.I., p > 0.05; Supplementary Table; Fig. 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; Fig. 5D). For 15d P.I. and 30d P.I., the profiles obtained were similar to 1 h 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 1 h 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 1 h P.I.: 100–200 Hz, p = 0.004; 200–300 Hz, p = 0.002; 300–400 Hz, p < 0.001; 1 d 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; Fig. 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; Fig. 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; Fig. 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 72 h 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 (Bezudnaya 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

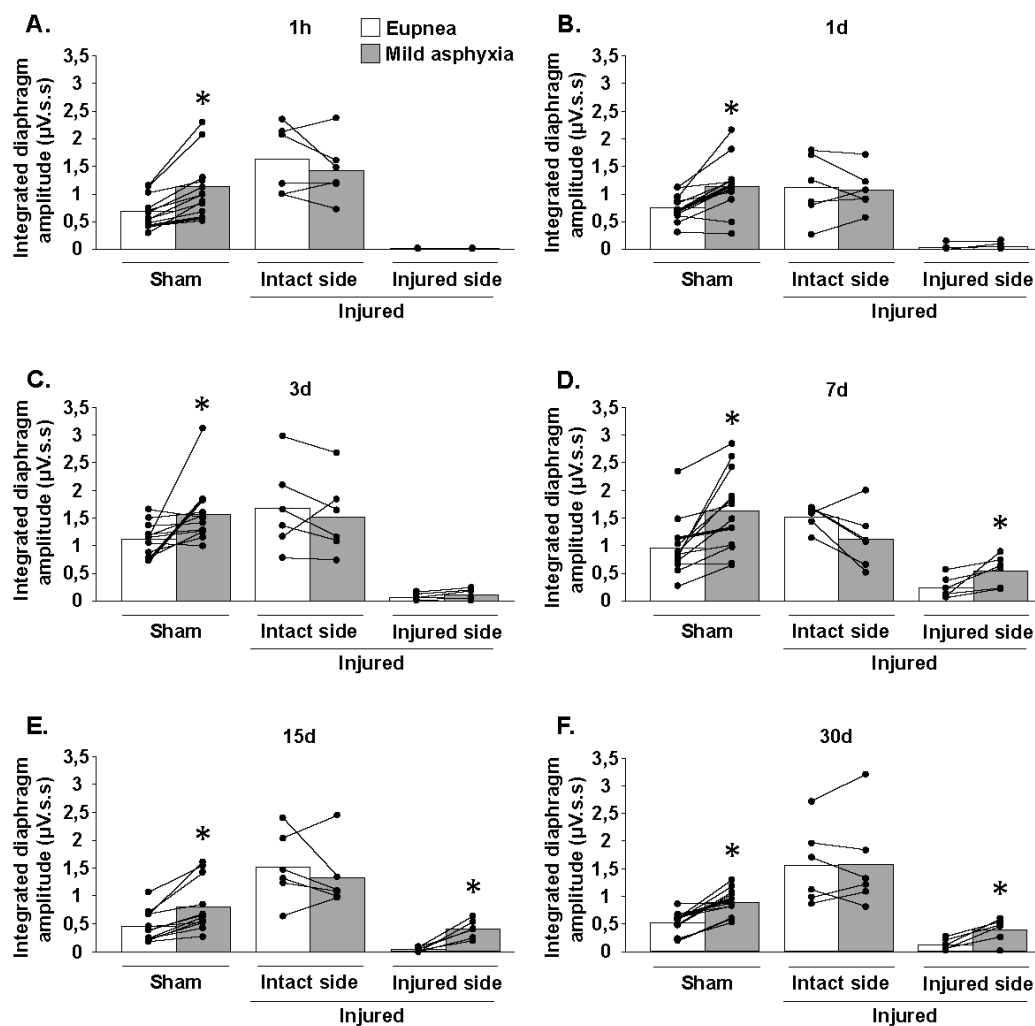


Fig. 3. Diaphragm activity at 7d P.I. and during respiratory challenge. Integrated diaphragm amplitude for 1 h P.I. (A), 1d P.I. (B), 3d P.I. (C), 7d P.I. (D), 15d P.I. (E) and 30d P.I. (F) groups (Sham and injured animals) in eupnea and during mild asphyxia. * $p < 0.05$ mild asphyxia compared to eupnea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

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

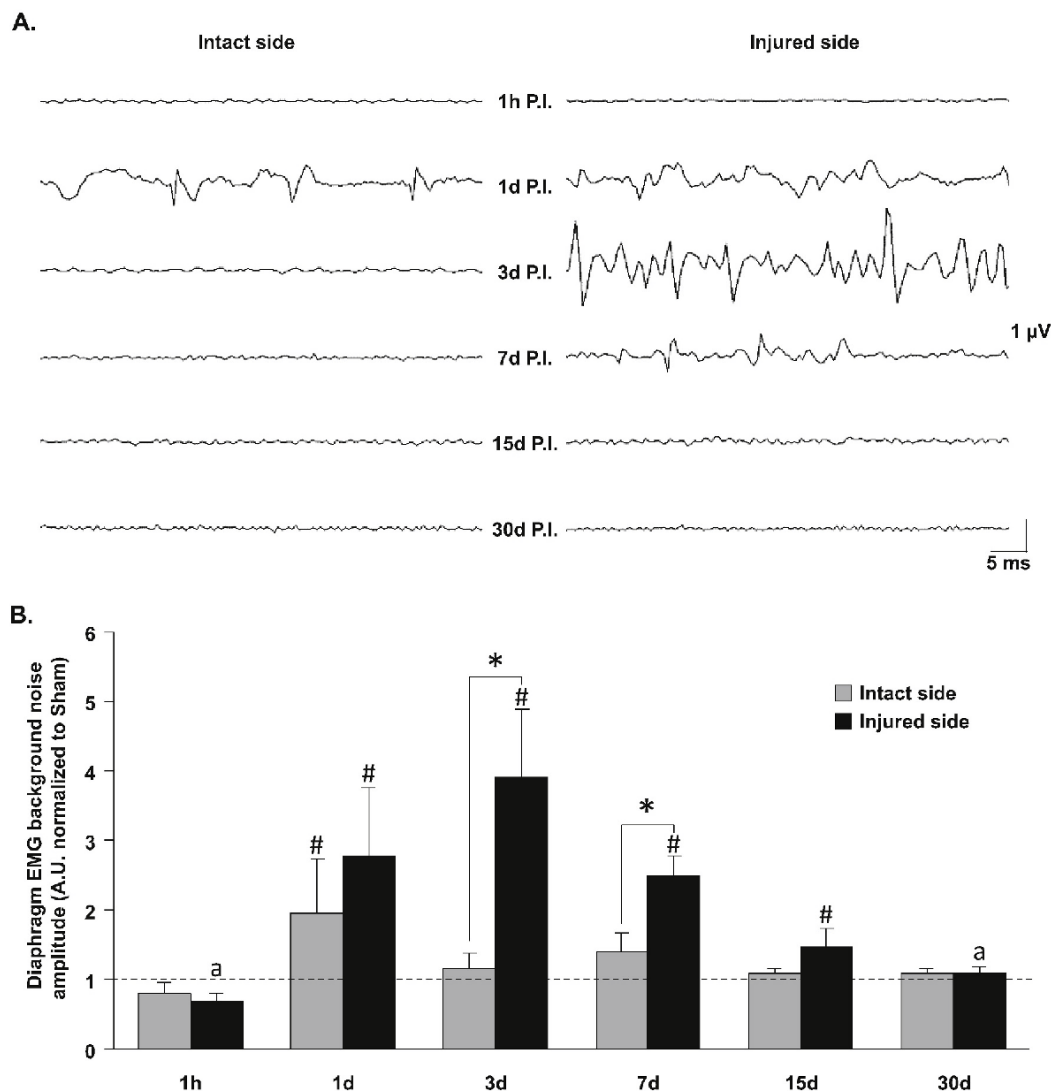


Fig. 4. Inter-burst diaphragm recordings during EMG.

A. Representative traces of raw inter-inspiratory bursts signals from diaphragm EMG at 1 h 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 1 h 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.

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, 2004; Li et al., 2004) and leads to serious motor dysfunction. Several mechanisms contribute

to spasticity in rat following SCL, including a down-regulation of potassium-chloride cotransporter at the motoneurons membrane (Bou-lenguez et al., 2010) and a spontaneous activation of motoneuronal 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} 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.

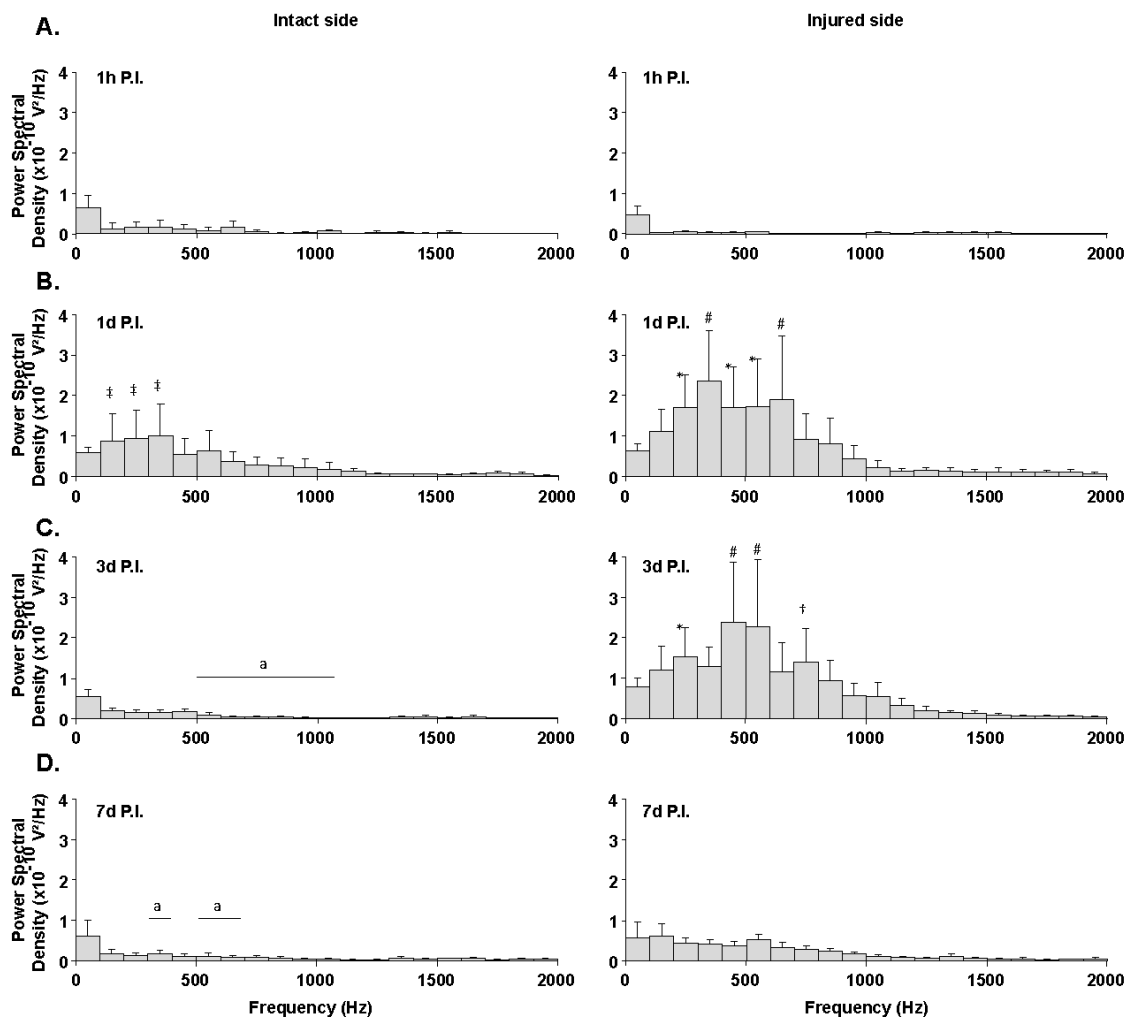


Fig. 5. Power spectral density (PSD) of EMG recording between two inspiratory bursts following C2 hemisection. PSD between two inspiratory bursts for intact and injured sides at 1 h (A), 1d (B), 3d and 7d (D) post-injury (P.I.). Data were gathered by boot of 100 Hz and computed by using a 35 ms window. # $p < 0.05$ compared to 1 h, 7d, and 15d and 30d P.I. (data not shown); * $p < 0.05$ compared to 1 h, and 15d and 30d P.I. (data not shown); † $p < 0.05$ compared to 1 h and 30d P.I. (data not shown); ‡ $p < 0.05$ compared to 1 h, 3d, 7d, and 15d and 30d P.I. (data not shown); a $p < 0.05$ compared to corresponding injured side.

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.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

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.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103568>.

References

Alexandrov, V.G., Ivanova, T.G., Alexandrova, N.P., 2007. Prefrontal control of respiration. *J. Physiol. Pharmacol.* 58 (Suppl 5), 17–23.
 Ailain, 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., Foad, K., Sanelli, L., Han, Y., Cheng, J., 1999. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 16, 69–84.
- Bennett, D.J., Sandli, 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. *Exp. Neurol.* 305, 56–65.
- Bouleguez, 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 preBötzing 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. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 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., Baekye, 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., Loewy, A.D., Speck, D.F., 1985. Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 5, 1993–2000.
- Feldman, J.L., Del Negro, C.A., Gray, P.A., 2013. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 423–452.
- Freund, H.J., 1983. Motor unit and muscle activity in voluntary motor control. *Physiol. Rev.* 63, 387–436.
- Fuller, D.D., Johnson, S.M., Olson Jr., E.B., Mitchell, G.S., 2003. Synaptic pathways to phrenic motoneurons are enhanced by chronic intermittent hypoxia after cervical spinal cord injury. *J. Neurosci.* 23, 2993–3000.
- 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. *Exp. Neurol.* 211, 97–106.
- Gandevia, S.C., Rothwell, J.C., 1987. Activation of the human diaphragm from the motor cortex. *J. Physiol.* 384, 109–118.
- Gødder, F.J., Mitchell, G.S., 2005. Spinal synaptic enhancement with acute intermittent hypoxia improves respiratory function after chronic cervical spinal cord injury. *J. Neurosci.* 25, 2925–2932.
- Gødder, 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. *J. Neurosci.* 21, 8680–8689.
- Gødder, 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. *J. Neurosci.* 23, 2494–2501.
- Goshgarian, H.G., 1981. The role of cervical afferent nerve fiber inhibition of the crossed phrenic phenomenon. *Exp. Neurol.* 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. *J. Appl. Physiol.* 94, 795–810.
- Gutierrez, D.V., Clark, M., Nwana, O., Alilain, W.J., 2013. Intermittent hypoxia training after C2 hemisection modifies the expression of PTEN and mTOR. *Exp. Neurol.* 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. *Exp. Neurol.* 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., Deramaut, 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.*, 51235.
- Lane, M.A., 2011. Spinal respiratory motoneurons and interneurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 179, 3–13.
- 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. *J. Comp. Neurol.* 511, 692–709.
- Lane, M.A., Lee, K.-Z., Fuller, D.D., Reier, P.J., 2009. Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 169, 123–132.
- 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., 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. *Exp. Neurol.* 249, 20–32.
- Lee, K.Z., Huang, Y.J., Tsai, L.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. *Proc. 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. *J. Neurosci.* 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. *Exp. Neurol.* 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. *Exp. Neurol.* 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. *Exp. Neurol.* 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-HT2B and 5-HT2C 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. *Neurorehabil. Neural Rep.* 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. *J. 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 Jr., T.E., 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. *Exp. Neurol.* 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. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 169, 94–101.
- Satkuendrarajah, 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. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 400–409.
- Sködd, C., Levi, R., Seiger, A., 1999. Spasticity after traumatic spinal cord injury: nature, severity, and location. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 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, *Acromys caliginus*. *J. Comp. Neurol.* 528, 1535–1547. <https://doi.org/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. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 151–159.
- Tepper, L.J., Baby, S., 2011. Anesthetics and control of breathing. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 177, 80–92.
- Tian, G.F., Peever, J.H., Duffin, J., 1998. Bötzing-complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. *Exp. Brain Res.* 122, 149–156.
- Vandeweerdt, J.-M., Hontoit, 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., Kastner, A., 2009. Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 169, 115–122.
- Vinit, S., Gauthier, P., Stamegna, J.C., Kastner, A., 2006. High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J. Neurotrauma* 23, 1137–1146.
- 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. *J. Neurotrauma* 36, 2991–3004.
- Windelborn, J.A., Mitchell, G.S., 2012. Glial activation in the spinal ventral horn caudal to cervical injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 180, 61–68.
- Winstow, 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. *Nat. Commun.* 8, 544–544.

P. Michel-Flutot et al.

Respiratory Physiology & Neurobiology 284 (2021) 103568

Wu, M., Vinit, S., Chen, C., Lee, K.Z., 2020. 5-HT7 receptor inhibition enhances respiratory recovery following daily acute intermittent hypoxia in rats with chronic mid-cervical spinal cord contusion. *Neurorehabil. Neural Repair* 34, 333–343.

Zanella, S., Doi, A., Garcia 3rd, A.J., 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. *J. Neurosci.* 34, 36–50.

Zholudeva, L.V., Kadiner, 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. *J. Neurotrauma* 34, 3058–3065.

4.2. Résultats préliminaires : Evaluation de la production de pièges extracellulaires par les cellules microgliales et les neutrophiles après hémisection en C2 chez la souris

Ce projet est réalisé en collaboration avec l'équipe LARENES et Simon Glatigny de l'équipe IRIS de l'unité INSERM 1173.

4.2.1. Introduction sur les pièges extracellulaires

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur le site lésionnel depuis la circulation sanguine via la signalisation CXCL1/2 après trauma spinal, où ils vont alors s'accumuler. Leur rôle exact n'est pas encore tout à fait compris actuellement (Zivkovic et al., 2021). Une fois sur place, ils vont alors à leur tour sécréter des cytokines qui participent au recrutement d'autres cellules de l'inflammation, et libérer des protéases et des enzymes oxydatives qui dégradent les tissus (Noble et al., 2002; Nguyen et al., 2007). Ils vont aussi phagocyter les débris de myéline, et participent donc au nettoyage de la zone blessée (Zivkovic et al., 2021). Ils participent donc à la réponse inflammatoire et aux dommages secondaires après trauma spinal. Les neutrophiles ont cependant aussi la capacité de produire des pièges extracellulaires (Zivkovic et al., 2021).

Les pièges extracellulaires produits par les neutrophiles (NETs pour « neutrophil extracellular traps ») sont des structures particulières secrétées par les neutrophiles activés, et qui ont été décrites pour la première fois *in vitro* en 2004. Plus précisément, elles ont été observées suite à l'activation de neutrophiles par de l'IL-8, du phorbol mystrate acetate ou des lipopolysaccharides. Ces structures se sont révélées être composées d'ADN nucléaire décondensé, d'histones, d'élastase et de diverses autres protéines granulaires telle que la myéloperoxydase (MPO) (Brinkmann et al., 2004). Les auteurs émirent alors l'hypothèse que le rôle de ces NETs serait de piéger les pathogènes et qu'elle serait donc nécessaire pour l'activité bactéricide des neutrophiles. Ce processus est alors décrit comme étant l'étape final d'une mort active nécessitant la production de ROS par la NADPH-oxydase, mais indépendante de la nécrose ou de l'apoptose (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007). Cette forme de production de NETs est actuellement connue sous le terme de formation de NETs suicidaire (Boeltz et al., 2019).

Une formation de NETs ne nécessitant pas la mort de la cellule a par la suite été mise en évidence *in vitro*. Ces NETs peuvent avoir une composition variée selon le mode de stimulation utilisé (Boeltz et al., 2019). Dans un premier temps, il a été montré que ces NETs pouvaient être composés majoritairement d'ADN mitochondrial associé à des protéines granulaires lorsque stimulés avec du « facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages » (Yousefi et al., 2009). Ce mécanisme passerait par une réorganisation du cytosquelette ATP-dépendante, et nécessiterait la production de ROS (Stojkov et al., 2017; Amini et al., 2018). Ces NETs peuvent aussi être composés

d'ADN nucléaire associé à des histones et à des protéines granulaires suite à leur activation par *Staphylococcus aureus*, ce mécanisme étant indépendant de la production de ROS (Pilszczek et al., 2010). Cette sécrétion de NETs non-lytique passerait par une déformation de l'enveloppe nucléaire, résultant en la formation de vésicules contenant de l'ADN qui serait ensuite mises en contact avec le milieu extracellulaire, induisant le relargage de leur contenu (Pilszczek et al., 2010).

Ainsi, les différentes études réalisées jusqu'à aujourd'hui montrent que selon le mode, la dose et la durée d'exposition des neutrophiles à ces stimulations visant à les activer, la latence de production des NETs, leur composition, ainsi que leur devenir pouvait varier (formation de NETs suicidaire ou formation de NETs avec survie de la cellule) (Agarwal et al., 2019; Boeltz et al., 2019). Les principaux composants des NETs connus *in vitro* et *in vivo* restent cependant à ce jour l'élastase de neutrophile, LL37, l'histone citrullinée H3, la Cathepsine G, la métalloprotéase MMP9, MPO, et l'ADN dépolymérisé (Albregues et al., 2018; Zhu et al., 2021).

Il a plus récemment été démontré que d'autres types cellulaires étaient capables de produire des pièges extracellulaires, dont les monocytes et les macrophages. Les macrophages sont des cellules phagocytaires professionnelles, soit issues de la différenciation des monocytes circulants et originaires de la moelle osseuse, soit établis dans les tissus et d'origine embryonnaire. Les pièges extracellulaires produits par les macrophages (METs pour « macrophage extracellular traps ») sont composés, en partie à l'image des NETs, d'histones, de MPO, de métalloprotéases, d'ADN, ou encore d'élastase, et possèderaient diverses voies de production (Doster et al., 2018). Les cellules microgliales étant un type de macrophage résident, leur capacité à produire des pièges extracellulaires a été observée uniquement dans deux études très récentes. La première a mis en évidence une production de pièges extracellulaires produits par les cellules microgliales (MiETs pour « microglia extracellular traps ») *ex vivo* au niveau cérébral sur coupe de parenchyme cérébral dans un modèle de méningite (injection de *Listeria*) chez la souris. Ces MiETs ont aussi pu être générées chez des cellules microgliales isolées de souris infectées à *Listeria*, ainsi que chez une lignée microgliale BV2 après incubation avec *Listeria*, de la ionomycine ou du phorbol mystrate acetate (Wang et al., 2019). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que les MiETs devaient probablement avoir un effet protecteur contre l'infection par *Listeria* via un effet bactéricide. La deuxième étude a quant à elle montré que des cellules microgliales BV2 et des cellules microgliales issues de tissu cérébral humain remises en culture, produisaient des MiETs suite à un traitement avec de la dopamine. La présence de ces structures composées d'ADN, de MPO et d'histone H1 a ainsi pu être observée *ex vivo* dans ces conditions (Agrawal et al., 2021).

4.2.2. But de l'étude

Jusqu'à présent, la formation de NETs dans le système nerveux central a pu être observée dans plusieurs pathologies, et leur présence pourrait contribuer aux dégâts sur la barrière hémato-

encéphalique, ainsi qu'aux dommages neuronaux dans plusieurs pathologies (Zivkovic et al., 2021). A titre d'exemple, la présence de NETs semble aggraver les dégâts neurologiques dans un modèle de traumatisme crânien chez la souris (Vaibhav et al., 2020). Des NETs ont aussi été retrouvés au niveau de thrombus de patients suite à un accident vasculaire cérébral (Novotny et al., 2020). Cependant, la présence de NETs au niveau de la moelle épinière après trauma spinal n'a jusqu'à présent jamais été observée (Zivkovic et al., 2021), et la production de MiETs dans le cadre d'une inflammation « stérile » n'a jamais été décrite à ce jour dans la littérature.

Le but de ce projet est donc d'évaluer la possible production de pièges extracellulaires par les neutrophiles et les cellules microgliales dans la moelle épinière lésée (C1-C3) par cytométrie en flux, 24h après une hémisection spinale latérale en C2 chez la souris Swiss. Trois groupes de souris ont jusqu'à présent été utilisées dans cette étude : un groupe contrôle (n = 6), un groupe sham à 1j post-chirurgie (n = 5) et un groupe hémilésé en C2 à 1j PL (n = 6). Pour chaque animal, la moelle épinière C1-C3 a été prélevée après euthanasie et perfusion intra-carotidienne (PBS-EDTA), puis les cellules ont été séparées par incubation dans de la collagénase à 37°C. Enfin, les cellules ont été incubées avec des anticorps dirigés contre les marqueurs choisis.

4.2.3. Identification des populations cellulaires d'intérêt

Les populations cellulaires d'intérêt ont d'abord été identifiées grâce à une stratégie de gating utilisée en routine au laboratoire : tri par taille (SSC-A/FCS-A), identification des cellules isolées (CCS-W/SSC-H), puis des cellules vivantes (SSC-A/Live/Dead). Les cellules vivantes sont Live/Dead négative, ce marqueur n'émettant de la fluorescence que lorsque la membrane des cellules est compromise (donc dans le cas des cellules morte ou engagées dans une voie de mort cellulaire). Les cellules microgliales sont ensuite sélectionnées comme étant CD45^{med}CD11b⁺ (med pour medium, c'est-à-dire une expression intermédiaire) (Martin et al., 2017b). Les neutrophiles sont quant à eux dans la population de cellules CD45⁺CD11b⁺. Ils sont ensuite sectionnés comme étant Ly6C^{med}Ly6G⁺ (Ribeiro-Gomes et al., 2012) (Figure 47).

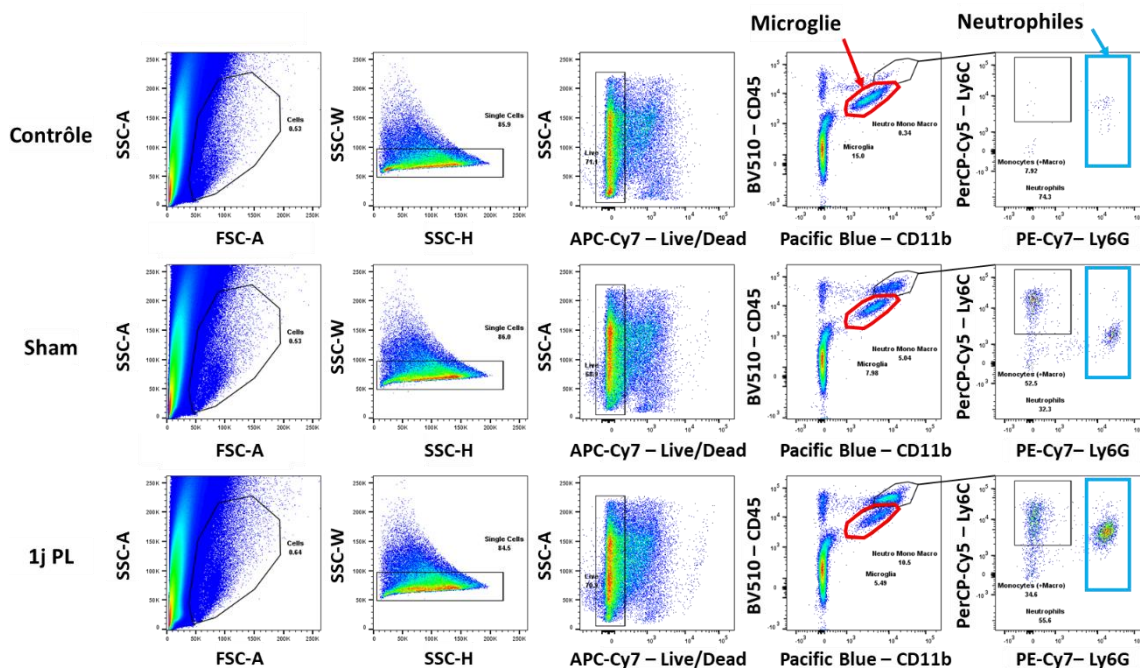


Figure 47 : Stratégie de gating utilisée pour la sélection des neutrophiles et des cellules microgliales

Illustration de la stratégie de gating utilisée pour sélectionner les neutrophiles CD45⁺CD11b⁺ et Ly6C^{int}Ly6G⁺ (cadre bleu) et les cellules microgliales CD45^{med}CD11b⁺ (contour rouge) vivants chez les souris contrôle, sham et à 1j post-lésion.

4.2.4. Evaluation de la présence de NETs et de MiETs dans la moelle épinière C1-C3 après hémisection en C2

Pour déterminer la possible production de pièges extracellulaires, la présence de différents marqueurs a été vérifiée chez les populations cellulaires d'intérêt : 1) SYTOX, un marqueur de l'ADN non-perméant permettant donc de marquer l'ADN extracellulaire chez les cellules vivantes ; 2) MPO, une enzyme halogénéodépendante impliquée dans la fonction bactéricide ; 3) H3 citrulliné, une histone impliquée dans l'organisation structurelle de l'ADN ayant été citrullinée par une enzyme, la peptidylarginine désiminase. Cette modification post-traductionnelle serait impliquée dans l'auto-immunité induite par l'inflammation dans diverses pathologies du système nerveux telle que la sclérose en plaque ; et 4) TFAM (pour Mitochondrial transcription factor A), un activateur de la transcription localisé au niveau de l'ADN mitochondrial.

4.2.4.1. Quantification des neutrophiles et des cellules microgliales au site de la lésion (C1-C3)

Dans un premier temps, la présence des cellules d'intérêt a été quantifiée chez les différents groupes d'animaux, c'est-à-dire le nombre, ainsi que le pourcentage de cellules d'intérêt parmi les cellules vivantes. En ce qui concerne les neutrophiles, leur nombre (Figure 48A), ainsi que leur pourcentage parmi les cellules vivantes (Figure 48B) montrent que suite à une durotomie (groupe sham), le nombre de neutrophiles augmente significativement dans la moelle épinière C1-C3 par rapport aux animaux Contrôle, induisant une augmentation de leur proportion dans la population de cellules vivantes totales. Cette augmentation est amplifiée suite à une hémisection en C2.

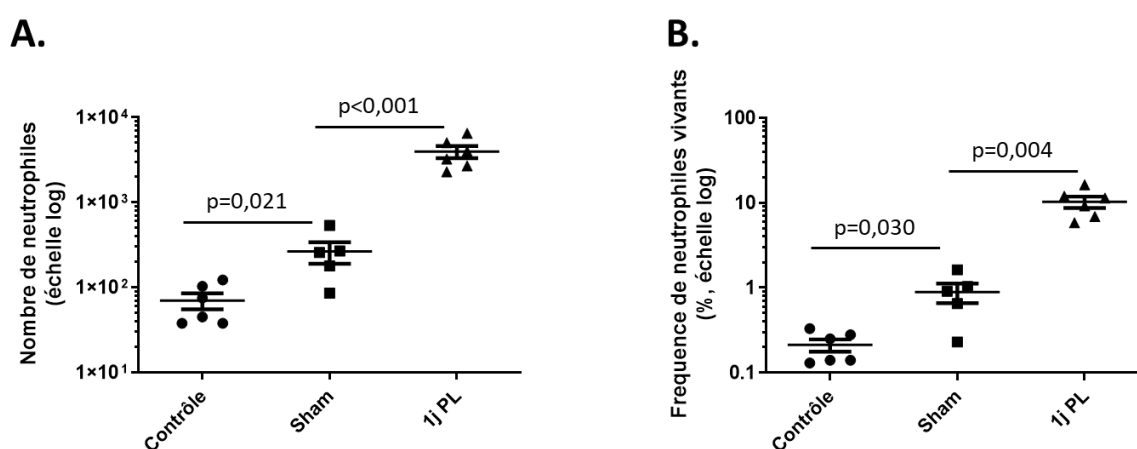


Figure 48 : nombre et fréquence de neutrophiles vivants présents dans la moelle épinière C1-C3

A. Nombre de neutrophiles vivants dans la moelle épinière C1-C3 des souris des groupes Contrôle, Sham et 1j post-lésion (PL). **B.** Pourcentage de neutrophiles parmi les cellules vivantes dans la moelle épinière C1-C3 des souris des groupes Contrôle, Sham et 1j PL. Des t-test ont été réalisés pour montrer les différences significatives.

En ce qui concerne les cellules microgliales, une tendance à la diminution, non significative, est observée pour le nombre de cellules vivantes présentes suite à une durotomie (groupe Sham) et à 1j PL (Figure 49A). La fréquence de cellules microgliales parmi la population totale de cellules vivantes suit quant à elle la même tendance entre groupe Contrôle et groupe Sham, mais devient significative entre les souris Sham et les souris à 1j PL (Figure 49B).

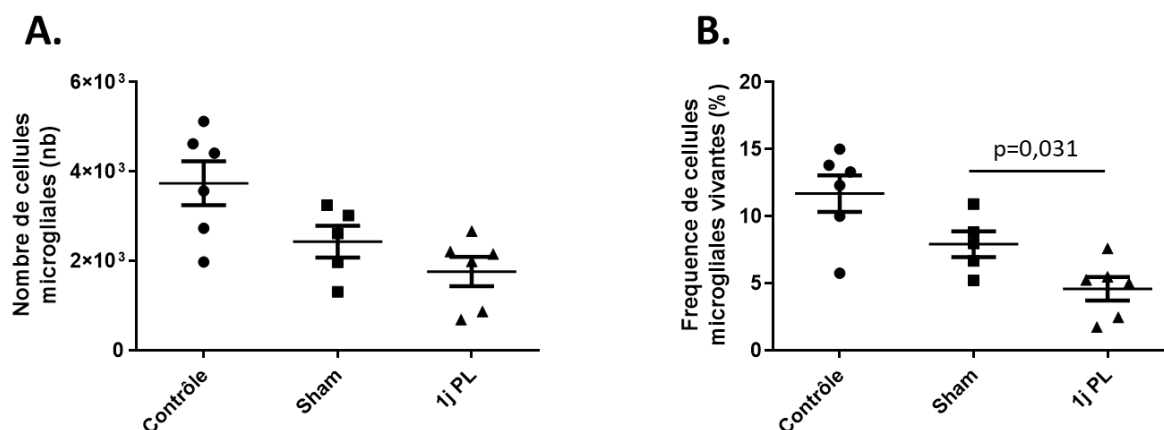


Figure 49 : nombre et fréquence de cellules microgliales vivantes présentes dans la moelle épinière C1-C3

A. Nombre de cellules microgliales vivantes dans la moelle épinière C1-C3 des souris des groupes Contrôle, Sham et 1j post-lésion (PL). B. Pourcentage de cellules microgliales parmi les cellules vivantes dans la moelle épinière C1-C3 des souris des groupes Contrôle, Sham et 1j PL. Des t-test ont été réalisés pour montrer les différences significatives.

4.2.4.2. Evolution de l'expression individuelle des marqueurs des pièges extracellulaires par mesure de l'intensité de fluorescence moyenne (MFI)

La mesure de la MFI a ensuite été comparée entre les différents groupes de souris pour les différents marqueurs des pièges extracellulaires utilisés. Cette mesure de la MFI est un reflet de l'expression du nombre de cellules exprimant le marqueur d'intérêt, ainsi que du niveau d'expression de ce marqueur chez les cellules étudiées.

Chez les neutrophiles, l'expression de TFAM est significativement plus élevée chez les animaux Sham que chez les animaux Contrôle. Aucune différence n'est en revanche observée entre le groupe Sham et le groupe des animaux lésés. L'expression de MPO a quant à elle tendance à augmenter entre les animaux Sham et les animaux à 1j PL. En ce qui concerne le SYTOX et le H3 citrulliné, une augmentation significative de leur expression est observée entre le groupe Sham ayant reçu une durotomie et le groupe lésé (Figure 50A et B).

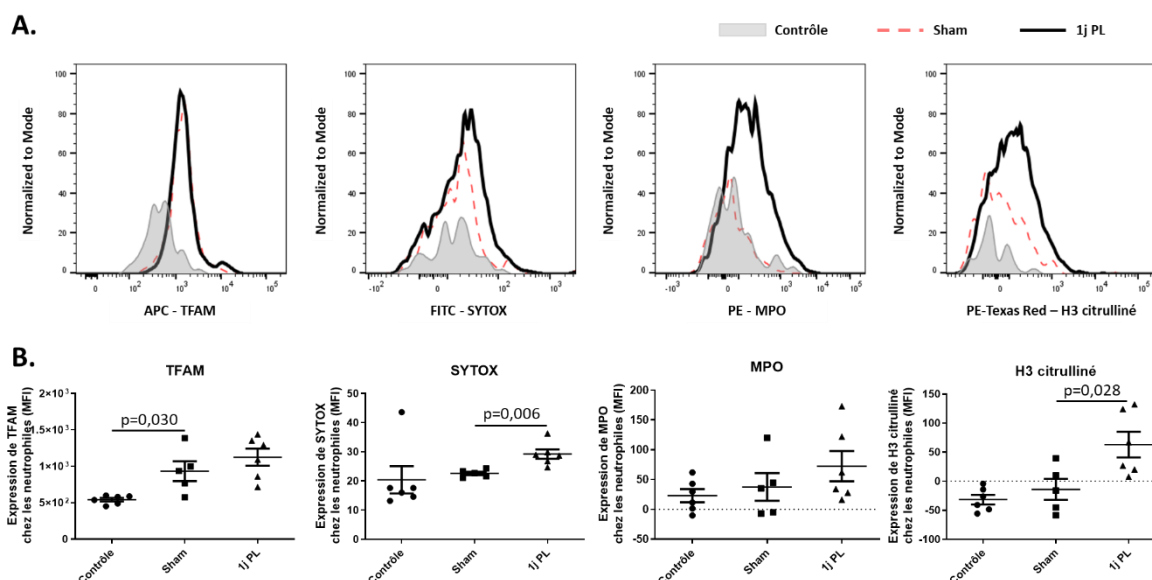


Figure 50 : Mesure de la MFI pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans la moelle épinière C1-C3 chez les neutrophiles

A. MFI représentatives pour les différents groupes d'animaux pour chaque marqueur des pièges extracellulaires utilisés (TFAM, SYTOX, MPO et H3 citrulliné) chez les neutrophiles. **B.** Graphiques montrant les MFI individuelles des animaux pour les différents marqueurs. Des t-test ont été réalisés pour montrer les différences significatives.

Chez les cellules microgliales, les mêmes résultats que pour les neutrophiles sont observés pour l'expression de TFAM et MPO pour les groupes Contrôle, Sham et 1j PL. En ce qui concerne SYTOX et H3 citrulliné, leur expression est significativement augmentée en cas de durotomie (Sham) par rapport au groupe Contrôle. Cette augmentation est encore augmentée 1j post-hémisection en C2 par rapport au groupe Sham (Figure 51A et B).

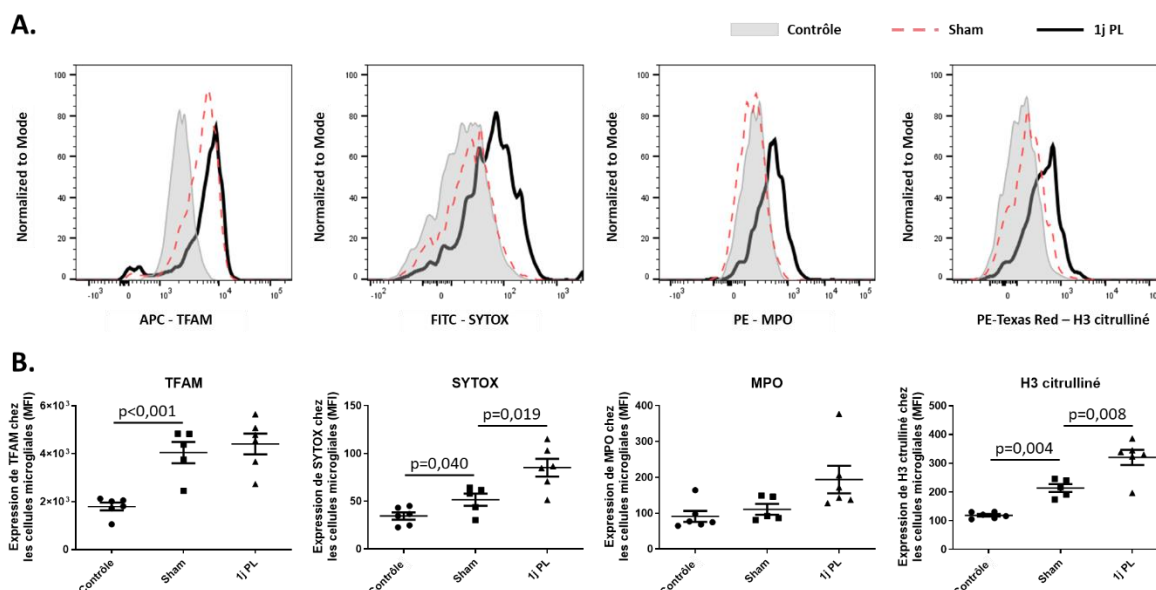


Figure 51 : Mesure de la MFI pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans la moelle épinière C1-C3 chez les cellules microgliales

A. MFI représentatives pour les différents groupes d'animaux pour chaque marqueur des pièges extracellulaires utilisés (TFAM, SYTOX, MPO et H3 citrulliné) chez les cellules microgliales. **B.** Graphiques montrant les MFI individuelles des animaux pour les différents marqueurs. Des t-test ont été réalisés pour montrer les différences significatives.

4.2.4.3. Evaluation du co-marquage des marqueurs des pièges extracellulaires chez les neutrophiles et les cellules microgliales dans la moelle épinière C1-C3

Le co-marquage des différents marqueurs des pièges extracellulaires au sein d'une même cellule a aussi été évaluée, la mesure de la MFI ne donnant d'information que pour un marqueur sur la population totale de cellules d'intérêt. Les cellules doublement marquées sont observables dans le quadrant en haut à droite pour chaque condition.

Chez les neutrophiles, les dot plots représentatifs montrent la variation de la co-expression de MPO/TFAM (Figure 52A) ou H3 citrulliné/SYTOX (Figure 52A) chez les différents groupes d'animaux. La quantification du nombre de cellules co-marquées par rapport à la population totale de neutrophiles vivants a ensuite été quantifiée pour MPO/TFAM (Figure 52C) et H3 citrulliné/SYTOX (Figure 52D). Les résultats montrent que suite à une durotomie, une augmentation de l'expression de MPO et TFAM, ou de H3 citrulliné et SYTOX sur la même cellule est observée par rapport aux animaux Contrôle. De même, l'hémisection en C2 induit une augmentation significative dans les deux cas par rapport aux animaux Sham. Ces résultats sont consolidés par l'observation de l'augmentation de l'expression des quatre

marqueurs au sein d'une même cellule pour les Sham comparé aux Contrôles et pour les 1j PL par rapport aux Sham (Figure 51E).

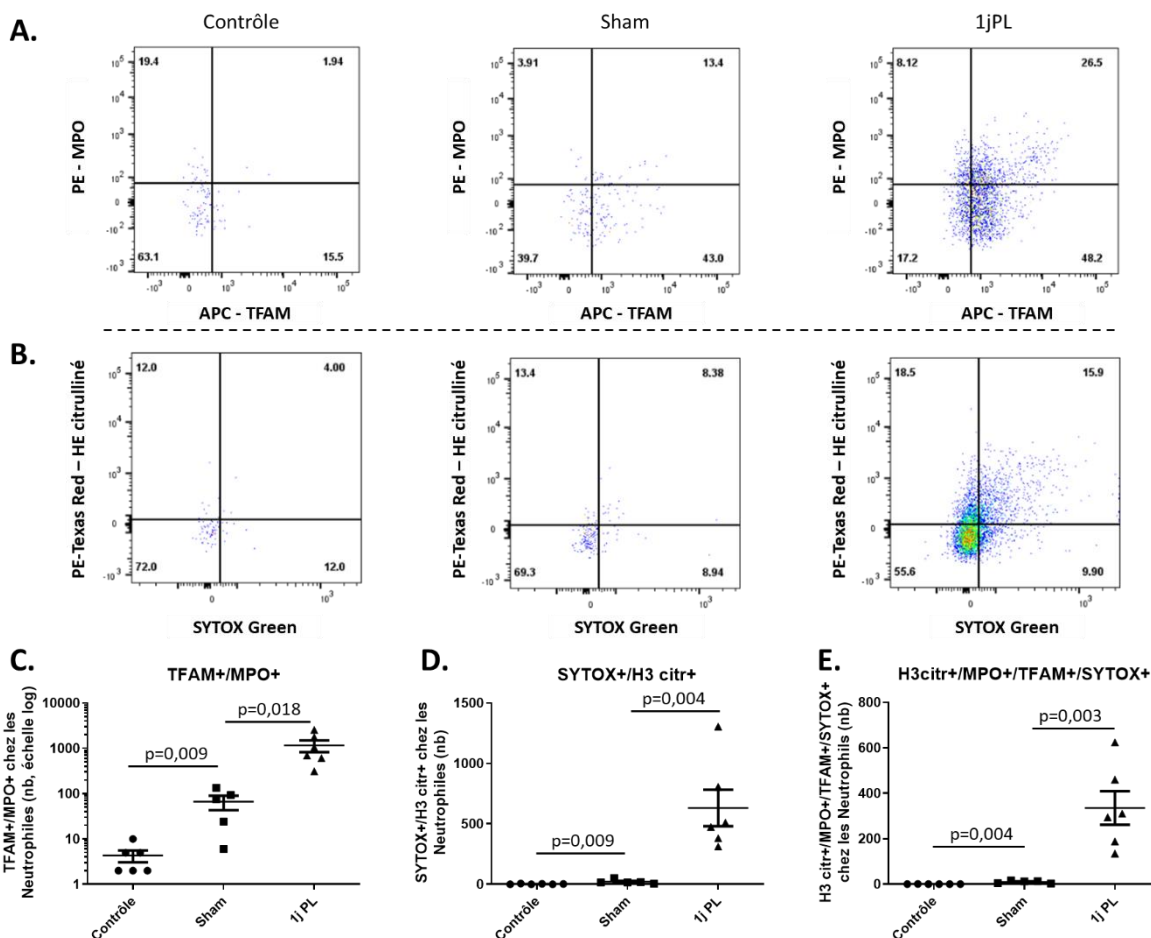


Figure 52 : Co-marquage pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans les neutrophiles individuels

Dot plots représentatifs du co-marquage pour MPO/TFAM (A) et pour H3 citrulliné/SYTOX (B) chez les neutrophiles, et les quantifications associées en C et D respectivement. E. Quantification du co-marquage pour les quatre marqueurs des pièges extracellulaires sur des neutrophiles pris individuellement. Des t-test ont été réalisés pour montrer les différences significatives.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les cellules microgliales pour la variation de la co-expression de MPO/TFAM (Figure 53A) ou H3 citrulliné/SYTOX (Figure 53A) chez les différents groupes d'animaux. Ces résultats ont de même été quantifiés, montrant une augmentation de l'expression des marqueurs pris deux à deux (MPO/TFAM ou H3 citrulliné/SYTOX) (Figure 53C et D), ainsi que pour les quatre marqueurs au sein d'une même cellule pour les Sham comparé aux Contrôles et pour les 1j PL par rapport aux Sham (Figure 53E).

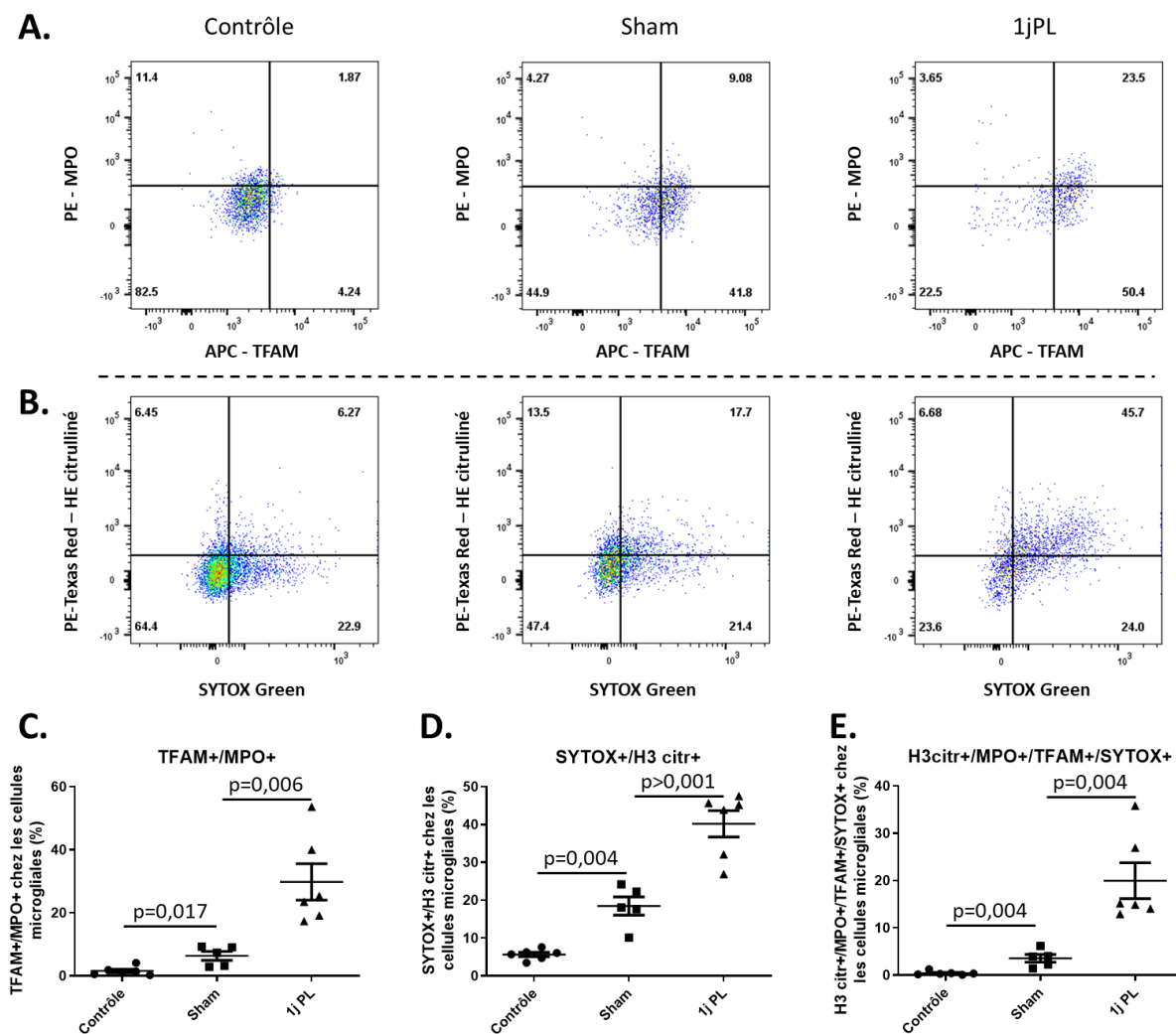


Figure 53 : Co-marquage pour les marqueurs des pièges extracellulaires dans les cellules microgliales individuelles

Dot plot représentatifs du co-marquage pour MPO/TFAM (A) et pour H3 citrulliné/SYTOX (B) chez les cellules microgliales, et les quantifications associées en C et D respectivement. E. Quantification du co-marquage pour les quatre marqueurs des pièges extracellulaires sur des cellules microgliales prises individuellement. Des t-test ont été réalisés pour montrer les différences significatives.

4.2.5. Discussion

L'augmentation du nombre et du pourcentage de neutrophiles présents dans la moelle épinière C1-C3 après durotomie, et encore plus après hémisection en C2, reflète le recrutement de ces cellules immunitaires, dans un cas en raison de la rupture de la barrière hématoencéphalique pour la durotomie, et dans un autre cas en raison de la lésion des tissus nerveux qui suit la durotomie pour l'hémisection en C2. En effet, les neutrophiles sont un type de leucocytes connu pour être les premières cellules de l'immunité à être présentes sur le site de la lésion après trauma spinal (Zivkovic

et al., 2021). Leur présence peut être détectée dans les heures suivant le trauma, et leur pic de présence se situerait autour de 24h post-lésion chez la souris (Donnelly and Popovich, 2008), ce qui correspond au temps post-lésionnel utilisé dans cette étude princeps. En ce qui concerne les cellules microgliales, la tendance à la diminution de leur nombre et la diminution observée dans la fréquence de cellules microgliales vivantes chez les souris lésées peut s'expliquer par une évolution de l'expression des marqueurs utilisés pour identifier ces cellules. En effet, la microglie au repos est CD45^{med}CD11b⁺. Cependant, son activation entraîne une augmentation de l'expression de CD45 et CD11b, rendant ces cellules en partie CD45^{high}CD11b⁺. Les cellules microgliales avec les marquages les plus forts se retrouvent alors dans la gate des cellules sélectionnées comme CD45^{high}CD11b⁺. Elles ne peuvent donc plus être différenciées des monocytes/macrophages inflammatoires aussi présents parmi les cellules sélectionnées par la gate CD45^{high}CD11b⁺. La mise au point et l'utilisation d'un marqueur spécifique des cellules microgliales tels que TMEM119 ou P2RY12 devrait permettre d'affiner leur identification dans ce projet (Hinze and Stolzing, 2011; Martin et al., 2017b; Bradbury and Burnside, 2019).

La mesure de la MFI indique qu'à 1j post-chirurgie, une durotomie induit une augmentation de l'expression de TFAM chez les neutrophiles infiltrés, et l'expression de TFAM, SYTOX et H3 citrulliné chez les cellules microgliales. Ces résultats signifient qu'en contexte de durotomie, donc de rupture de la barrière hématoencéphalique, les neutrophiles infiltrés relargueraient de l'ADN mitochondrial dans le milieu extracellulaire. En l'absence de l'augmentation d'expression d'autres marqueurs des pièges extracellulaires, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Un relargage d'ADN mitochondrial seul peut être le résultat d'une mitophagie des neutrophiles, ce processus servant à éliminer les composants mitochondriaux endommagés (Ashrafi and Schwarz, 2013). Cette hypothèse semble cependant peu probable en raison de la grande quantité de marquage TFAM détecté. Une autre hypothèse pourrait être que le marquage observé n'est pas assez spécifique. En effet, dans le panel d'anticorps utilisé, seul celui dirigé contre TFAM est non couplé. Des étapes supplémentaires de marquages sont donc réalisées, et techniquement, l'utilisation d'anticorps non couplés en cytométrie peut rendre difficile l'interprétation des résultats. L'utilisation d'un panel d'anticorps réduit ou d'un marqueur couplé pourrait aider à déterminer la validité de ces résultats, TFAM étant un marqueur bien connu des pièges extracellulaires (Amini et al., 2018). En ce qui concerne la microglie, la durotomie elle-même semble induire une production de MiETs caractérisée par une augmentation du marquage SYTOX et H3 citrulliné. Ces résultats sont cohérents avec le peu de données de la littérature. En effet, les lésions de la dure-mère sont l'une des principales complications en cas de chirurgie spinale, et dans un modèle de durotomie chez le rat, une neuroinflammation spinale est observée, avec une activation des cellules microgliales (Song et al., 2014). Or, la production de MiETs est successive à l'activation des cellules microgliales (Wang et al., 2019; Agrawal et al., 2021), ce qui expliquerait ce que nous observons

dans nos résultats. De plus, l'hémisection en C2 induit quant à elle une production de pièges extracellulaires par les neutrophiles et les cellules microgliales à 1j PL, caractérisée par une augmentation de l'intensité du marquage SYTOX et H3 citrulliné. Nous n'avons cependant pas observé d'augmentation significative de la production de MPO dans nos modèles de durotomie et d'hémisection en C2 à 1j PL. Ce marqueur a pourtant été observé pour des pièges extracellulaires produits par les neutrophiles, les monocytes/macrophages (Doster et al., 2018), et les cellules microgliales (Agrawal et al., 2021). Nos résultats pour la mesure de la MFI indiquent tout de même que des pièges extracellulaires ont été produits par les neutrophiles (Boeltz et al., 2019) et les cellules microgliales à 1j post-chirurgie (durotomie et hémisection en C2), la présence d'ADN extracellulaire associée à celle de H3 citrulliné étant utilisée par un certain nombre de d'études pour démontrer leur présence (Zhu et al., 2021). Cette absence d'augmentation de l'expression de MPO par l'analyse par MFI pourrait indiquer que le temps post-lésionnel étudié est soit trop long, et que le MPO aurait déjà été dégradé dans le milieu extracellulaire, soit trop court, c'est -à-dire qu'il commencerait seulement à être relargué dans le milieu extracellulaire avec l'ADN et l'histone H3 citrulliné. Le peu de marquage MPO pourrait aussi être dû au fait que leur présence dans les pièges extracellulaires est plus faible comparé aux autres marqueurs. En effet, le H3 citrulliné est directement présent sur l'ADN expulsé (principal composant des pièges extracellulaires) alors que le MPO vient s'y attacher dans les vésicules intracellulaires avant exocytose dans le milieu extracellulaire. L'absence d'augmentation observée pourrait aussi provenir d'un problème de protocole, c'est-à-dire d'un encombrement stérique au niveau du site de fixation des antigènes. TFAM étant non couplé et son antigène étant potentiellement proche de celui de MPO, l'anticorps anti-TFAM pourrait bloquer l'accès de l'antigène de MPO à son anticorps anti-MPO. Le marquage de TFAM est en effet réalisé avant le marquage des autres marqueurs avec les anticorps couplés, dont MPO fait partie.

L'analyse réalisée par observation de la co-expression au sein d'une même cellule des marqueurs des pièges extracellulaires, nous indique qu'après durotomie (groupe Sham), une augmentation de l'expression des NETs et des MiETs est observée par rapport aux animaux du groupe Contrôle. De même, après hémisection en C2 à 1j PL, une augmentation encore plus importante de cette expression est observée comparé aux animaux du groupe Sham. Pris dans leur ensemble, ces résultats semblent indiquer qu'une durotomie seule induit le recrutement et l'activation des neutrophiles sur le site de lésion de la dure-mère, ainsi qu'une activation des cellules microgliales à proximité, induisant une expression de NETs et de MiETs respectivement. Ce phénomène est amplifié lorsque la moelle épinière est directement touchée, dans notre cas après une hémisection latérale en C2 : le recrutement et l'activation des neutrophiles sur le site lésé est plus important, ainsi que l'activation des cellules microgliales. Cela conduit à une formation plus importante de NETs et de MiETs au niveau du site lésé à 1j PL.

Nos résultats montrent pour la première fois que chez des cellules vivantes extraites de la moelle épinière de souris dans des modèles de durotomie et de trauma spinal cervical en C2, les neutrophiles et la microglie produisent des pièges extracellulaires, dans des quantités variable selon le modèle étudié. Cette étude princeps reste néanmoins à compléter par une vérification de la présence et de la colocalisation des marqueurs des pièges extracellulaires *in situ* sur des tissus fixés de moelle épinière C1-C3 par immunofluorescence (co-marquage de l'ADN avec au moins le H3 citrulliné et/ou le MPO pour des cellules identifiées Iba1 pour la microglie et Ly6G pour les neutrophiles). De plus, une observation de la cinétique de l'expression de ces pièges extracellulaires sera par la suite nécessaire pour poursuivre cette étude afin de déterminer leur pic de présence pour les différents types cellulaires étudiés. Cette cinétique pourra ensuite être utilisée afin de potentiellement utiliser des inhibiteurs de ces pièges extracellulaires (inhibition de MPO, ou encore digestion de l'ADN par exemple) afin de comprendre quel pourrait-être leur rôle dans la physiopathologie des traumatismes spinaux.

4.3. Projet annexe : Effet d'un entraînement en aérobie forcé sur les muscles locomoteurs et respiratoire après hémisection spinale en C2 chez la souris

Publication: Effects of aerobic exercise training on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury. *Scientific Reports*, (2021) 11:112

En plus des déficits respiratoires, les traumatismes spinaux induisent des déficits locomoteurs. Le développement de thérapies visant à améliorer la fonction locomotrice est donc nécessaire.

J'ai participé à ce projet qui fait partie du travail doctoral d'un collègue doctorant de mon équipe d'accueil. Le but de cette étude a été d'évaluer l'impact d'un entraînement forcé de 6 semaines sur la plasticité musculaire locomotrice et respiratoire chez des souris C57BL/6. Pour estimer les fonctions locomotrices et respiratoires, des tests d'effort incrémentaux et une électromyographie diaphragmatique terminale ont été réalisés. La composition des fibres musculaires et la distribution des capillaires sanguins ont aussi été évalués à 51 jours post-hémisection en C2 dans les muscles du diaphragme, de l'extenseur des doigts, du tibial antérieur et du soléaire.

L'entraînement physique de six semaines a augmenté la capacité de course des souris lésées entraînées. La composition des types de fibres dans les muscles n'a pas été modifiée par notre protocole d'exercice. La vascularisation a quant à elle été augmentée dans tous les muscles des pattes chez les souris lésées et entraînées. Aucune augmentation d'amplitude dans l'électromyographie diaphragmatique n'a pu être observée du côté lésé. L'aire des sections transversales des myofibrilles de type IIa du diaphragme s'avère être réduite du côté contralatéral à la lésion, et la vascularisation y est augmentée chez les souris entraînées par rapport aux souris sédentaires.

Ces résultats suggèrent que ce protocole d'exercice induit une augmentation de la résistance à la fatigue, et contribue à la capacité de course chez les souris lésées entraînées. Ce protocole d'exercice pourrait ainsi s'avérer être une méthode non invasive prometteuse dans le maintien de la plasticité des muscles locomoteurs et respiratoires après trauma spinal cervical.



OPEN

Effects of aerobic exercise training on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury

Isley Jesus¹, Pauline Michel-Flutot¹, Therese B. Deramaudt¹, Alexia Paucard¹, Valentin Vanhee¹, Stéphane Vinit¹ & Marcel Bonay^{1,2}✉

Cervical spinal cord injury (SCI) 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 aim of this work was to demonstrate the feasibility of using a mouse model of partial cervical spinal hemisection at the second cervical metameric segment (C2) to investigate the impact of 6 weeks training on forced exercise wheel system on locomotor/respiratory plasticity muscles. To measure run capacity locomotor and respiratory functions, incremental exercise 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, extensor digitorum communis (EDC), tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscles. Six-week exercise training increased the running capacity of trained SCI mice. Fiber type composition in EDC, TA and SOL muscles was not modified by our protocol of exercise. The vascularization was increased in all muscle limbs in SCI trained group. No increase in diaphragmatic electromyography amplitude of the diaphragm muscle on the side of SCI was observed, while the contraction duration was significantly decreased in sedentary group compared to trained group. Cross-sectional area of type IIa myofiber in the contralateral diaphragm side of SCI was smaller in trained group. Fiber type distribution between contralateral and ipsilateral diaphragm in SCI sedentary group was affected, while no difference was observed in trained group. In addition, the vascularization of the diaphragm side contralateral to SCI was increased in trained group. All these results suggest an increase in fatigue resistance and a contribution to the running capacity in SCI trained group. Our exercise protocol could be a promising non-invasive strategy to sustain locomotor and respiratory muscle plasticity following SCI.

A spinal cord injury (SCI) results in permanent life-altering neuromotor functions due to the limited recovery capacity of the central nervous system. When the injury is located at the cervical level, sensory-motor functions below the site of lesion are lost and permanent respiratory insufficiency is induced^{1,2}. Rat models are widely used to study SCI³, while mouse models of cervical injury are only used to assess post-traumatic spontaneous locomotor and respiratory muscle recovery³⁻⁵. It is clear that molecular studies are required to better comprehend the mechanisms involved in cervical SCI. Since rat SCI models are limited by the poor availability of genetically modified specimens, mouse models, with an extensive number of genetically modified strains may be a preferable option to decipher the intricacy of molecular and cellular interactions^{6,7}. Generally, the recovery of the diaphragm after SCI is quite limited⁸⁻¹⁰. Our laboratory has recently shown that diaphragm recovery remained significantly reduced 30 days after injury in a mouse model of cervical SCI¹¹. In fact, the diaphragm is the major muscle responsible for breathing and also participates in non-ventilatory behaviors associated with airways clearance, such as coughing and sneezing¹²⁻¹⁴. Moreover, SCI injury impacts other components of the diaphragm motor unit, mainly at the level of the neuromuscular junction and the muscle fiber types and size⁹. 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 in rat model¹⁵. At 42 days, the size of type IIb/x myofibers is reduced, and hypertrophy is no longer evident in type I or IIa myofibers⁹. These previous findings suggest that rats with SCI present a tremendous capability of muscular remodeling following injury. In addition, impairment and paralysis of skeletal muscles that are innervated caudal to the lesion site are

¹Inserm, END-ICAP, Université Paris-Saclay, UVSQ, 78000 Versailles, France. ²Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles; Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Boulogne, France. ✉email: marcel.bonay@aphp.fr

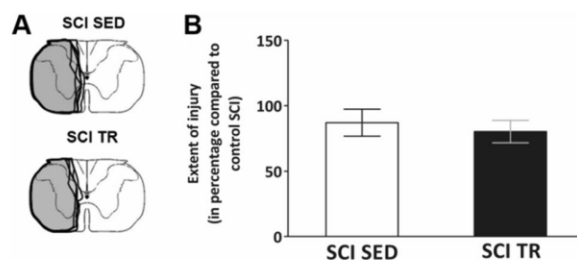


Figure 1. Extent of injury following a C2 hemisection. **(A)** Schematic representation of the extent of injury for each animal in SCI SED and SCI TR groups. **(B)** Graph shows the quantification of the extent of injury in percentage compared to a 100% hemisectioned spinal cord. The quantification has only been made in the ventral part where the phrenic motoneurons are located. Data are presented as mean ± SD (n = 6). There is no difference between the different groups (t-test, $p = 0.4127$).

accompanied by a shift from an oxidative to a highly glycolytic, and fatigable phenotype in both animals and humans^{15–17}. Furthermore, mitochondrial capacity of skeletal muscles is critically reduced after SCI and supply undergoes remodeling, typically in the form of capillary rarefaction in the muscle¹⁸. This rarefaction impairs the capacity to deliver oxygen and fuel to working muscles, contributing to reduced resistance to fatigue¹⁹.

The literature has well established that exercise enhances functional recovery following injury in rodents^{20–22}. Recently, Gorgey et al. showed that electrical stimulation-evoked resistance training (mimicking motor demands) combined with testosterone replacement therapy resulted in fiber hypertrophy and beneficial changes in markers of skeletal muscle health and function in persons with SCI²³. The stimulation of fore/hindlimb muscles by rehabilitation exercise is used as a strategy to enhance stepping ability and respiratory recovery post SCI in both animal models and clinical studies^{20,22,24}. These evidences reinforce the hypothesis that stimulation of limb muscles may be useful to improve respiratory rehabilitation post SCI. Nevertheless, little is known about the microvascular modulation and the effect of a non-invasive intervention (i.e. exercise training paradigm) on diaphragm morphology post-SCI. To date, there is no study on SCI mouse model that investigates the role of a long-term exercise training paradigm on locomotor and respiratory muscle plasticity. The most used behavior assessment qualitative tests are the Basso, Beattie and Bresnahan score (BBB score) for rodent, and the BMS (Basso Mouse Scale) for mice. These tests are generally performed to evaluate locomotor recovery^{25–27}. However, incremental exercise test is largely used in both healthy animals models and humans to evaluate running capacity, but has not yet been used to evaluate the performance exercise after spinal cord injury^{28–31}. Therefore, the purpose of this work was to demonstrate the feasibility of using a mouse model of partial cervical spinal hemisection at the second cervical metameric segment (C2) to investigate the impact of 6 weeks training on forced exercise wheel system on locomotor/respiratory plasticity muscles in our mouse model. We aimed: (1) to evaluate the animal running capacity (at different post-lesion 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) muscles morphology and microcirculation following 6 weeks of low intensity exercise training paradigm. Diaphragmatic electromyography was also recorded at the end of the training protocol to determine the recovery of the diaphragm activity.

Results

Maximal physical capacity. The size of the cervical SCI lesion was similar in the lateral part of both groups of injured animals (SCI sedentary (SED) and SCI trained (TR) groups) (Fig. 1A). Quantitatively, no significant difference in the size of injury between SCI SED and SCI TR groups was observed ($86.99 \pm 10.3\%$ and $80.23 \pm 8.5\%$, respectively, $p = 0.329$) (Fig. 1B).

After 6 weeks of training on the forced exercise wheels (Fig. 2A), running capacity, which was expressed as running time (s), was higher in all trained groups (Fig. 2B).

Morphometric analysis of locomotor muscle. To investigate whether forced exercise wheel training alters the muscle fiber composition in SCI mice, MyHC isoforms (MyHC_{Slow} = type I, MyHC_{2A} = type IIa and non-labeling = IIb/x) were detected by immunofluorescence staining (Fig. 3). Although soleus muscle alone presented a type I staining, the predominant types of myofibers in the ipsilateral forelimb (EDC) and hindlimb (TA and SOL) muscles of trained and sedentary animals were compared as well (Fig. 3). The morphometric results were described in Table 1 for SOL muscle, while those of EDC and TA muscles were added as supplemental data 1.

Vascularization analysis of locomotor muscle. To assess the capillary response to aerobic exercise, cryosections were immunostained to visualize CD31 (green) co-labeled with an anti-Laminin antibody (in red) in SOL (Fig. 4), while EDC and TA are found in supplementary Fig. 1. Capillary density (CD) and capillary-to-fiber ratio were analyzed and described in the Table 2 for SOL while EDC and TA are in supplementary Table 2. Our data showed that 6 weeks of exercise training increased the number of muscle capillaries in the hindlimb (TA and SOL) of mice from SCI group. Capillary density and capillary-to-fiber ratio in TA and SOL muscles

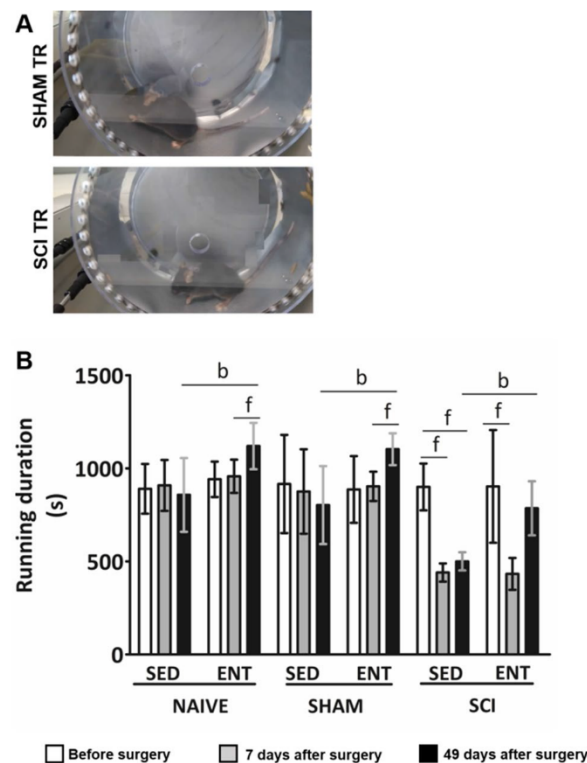


Figure 2. Maximal physical capacity expressed as running time (s). (A) Representative snapshot of a SHAM (upper) and SCI (lower) mouse running in forced exercise wheel. (B) Running capacity on forced exercise wheel at different time points (before SCI; 7 days after surgery and 49 days after surgery). Data are presented as mean \pm SD (n = 6). Significance: b $p < 0.05$ compared to sedentary, f $p < 0.05$ compared to before surgery or 7 days after surgery.

were increased in SCI TR group compared to those of SCI SED group. In addition, the capillary density in TA muscle was higher in SCI TR group than in NAIVE TR group. The same tendency was observed in the SOL muscle. In SCI SED group, the capillary density of TA muscle was significantly lower than that seen in NAIVE SED group.

SCI effect on diaphragm activity following exercise training. Representative traces of raw diaphragm electromyography at 51 days following SCI are shown in Fig. 5A (uninjured (NAIVE /SHAM, SED and TR) and injured animals (SCI, contralateral and ipsilateral DIA, SED and TR) in Fig. 5B).

A reduced diaphragm electromyography activity during spontaneous breathing and mild asphyxia on the ipsilateral side in SCI groups was observed when compared to the contralateral side. Diaphragm 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 (Fig. 6A,B) compared to the contralateral side of the SCI SED. 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 side. The contraction time was measured from the width of each EMG bursts respiration of animal. No significant difference was observed during spontaneous breathing. The width from each EMG bursts on the ipsilateral side was significantly decreased during spontaneous breathing (Fig. 6C) was observed in SCI SED group when compared to the contralateral side, while in the SCI TR group no difference was observed between the two diaphragm sides. Interestingly, a decrease in the duration of integrated average electromyography during mild asphyxia (Fig. 6D) was observed in the SCI TR group.

Morphometric analyses of respiratory muscle. To investigate the effect of our forced exercise wheel training protocol in respiratory muscle recovery following SCI, MyHC isoforms (MHC I, IIa and negative label IIb/x) were detected by immunofluorescence staining (Fig. 7).

The predominant fiber types in the contralateral and ipsilateral diaphragm muscle were analyzed (Fig. 8A–D). In cross-sectional area of type I myofiber staining (Fig. 8A), no significant increase was observed on the ipsilateral side of both SCI groups (SED and TR) compared to their respective contralateral side. Analysis of the cross-sectional area on the contralateral side of the SCI TR group showed a decrease in type IIa myofiber when

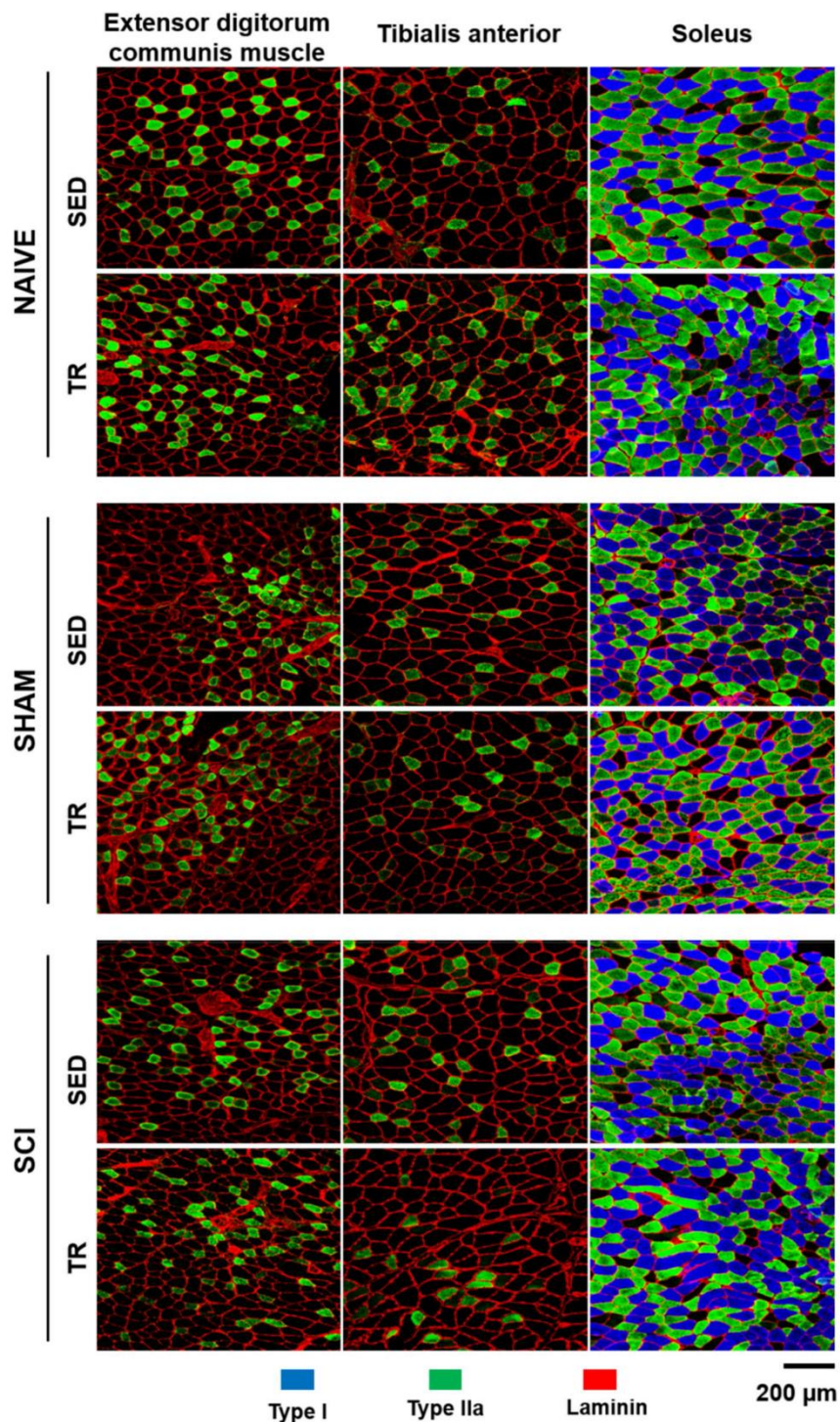


Figure 3. Representative images of fiber type composition in locomotor muscles and analysis of fiber type composition. Extensor digitorum communis (EDC), Tibialis anterior (TA) and Soleus (SOL) cryosections were immunostained to identify Myosin heavy chain (MyHC) isoforms: MyHCslow (type I in blue), 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 μm.

	NAIVE		
	SED	TR	<i>p</i> value
Area. μm^2			
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
%			
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
	SHAM		
	SED	TR	<i>p</i> value
Area. μm^2			
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
%			
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
	SCI		
	SED	TR	<i>p</i> value
Area. μm^2			
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
%			
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

Table 1. Soleus muscle fiber type area and distribution. Values are means \pm SD for NAIVE, SHAM and SCI (SED and TR).

compared to its ipsilateral side and to the contralateral side of SCI SED group (Fig. 8B). In the cross-sectional area stained for type IIb/x myofiber (Fig. 8C), no difference was observed between groups or between diaphragm sides. Relative distribution (Fig. 8D) was altered between the contralateral and the ipsilateral sides in SCI SED group, while no difference was observed in the SCI TR group.

Vascularization analysis of respiratory muscle. To assess the capillary response to exercise, capillary density and capillary-to-fiber ratio in diaphragm muscle were evaluated by immunofluorescence (Figs. 9A and supplemental Fig. 3 for NAIVE and SHAM groups). Six weeks of exercise training increased the capillary density and capillary-to-fiber ratio (Figs. 9B,C) on the contralateral side of SCI group. However, no significant difference in the capillary density was observed between the ipsilateral side of SED and TR SCI groups.

Discussion

Consistent with the possibility that exercise enhances locomotor recovery following SCI in mice, 6 weeks of exercise training on wheel running system effectively improved the running capacity in our mouse model. While our exercise protocol did not change the morphology of limb muscles, an increase in the microcirculation in the SCI TR group was observed. This current study showed for the first time that, even after 51 days, diaphragm recovery following SCI in mice is quite limited. Our running exercise training did not induce any effective recovery of the electromyography activity of impaired diaphragm in SCI mouse. The width of each EMG burst was reduced in SCI sedentary group during spontaneous breathing, while it remained similar in the SCI trained group and uninjured groups. During mild asphyxia, this reduction was only observed in TR SCI groups. Cross-sectional area of type I myofiber in the diaphragmatic muscle showed a slight increase on the ipsilateral diaphragm in both SED and TR SCI groups. Exercise training decreased type IIa myofiber on the contralateral side. Moreover, we observed that 6 weeks of aerobic exercise training increased vascularization in the intact diaphragm of SCI TR group compared to SCI SED group.

Cervical SCI commonly affects ipsilateral forelimb and rehabilitative training is usually provided for the recovery of locomotor skills^{32,33}. Usually, BBB score is widely used to test behavioral consequences of training efficacy in animal models of spinal cord injury^{26,27}. In a previously published study, a rat model of cervical contusion

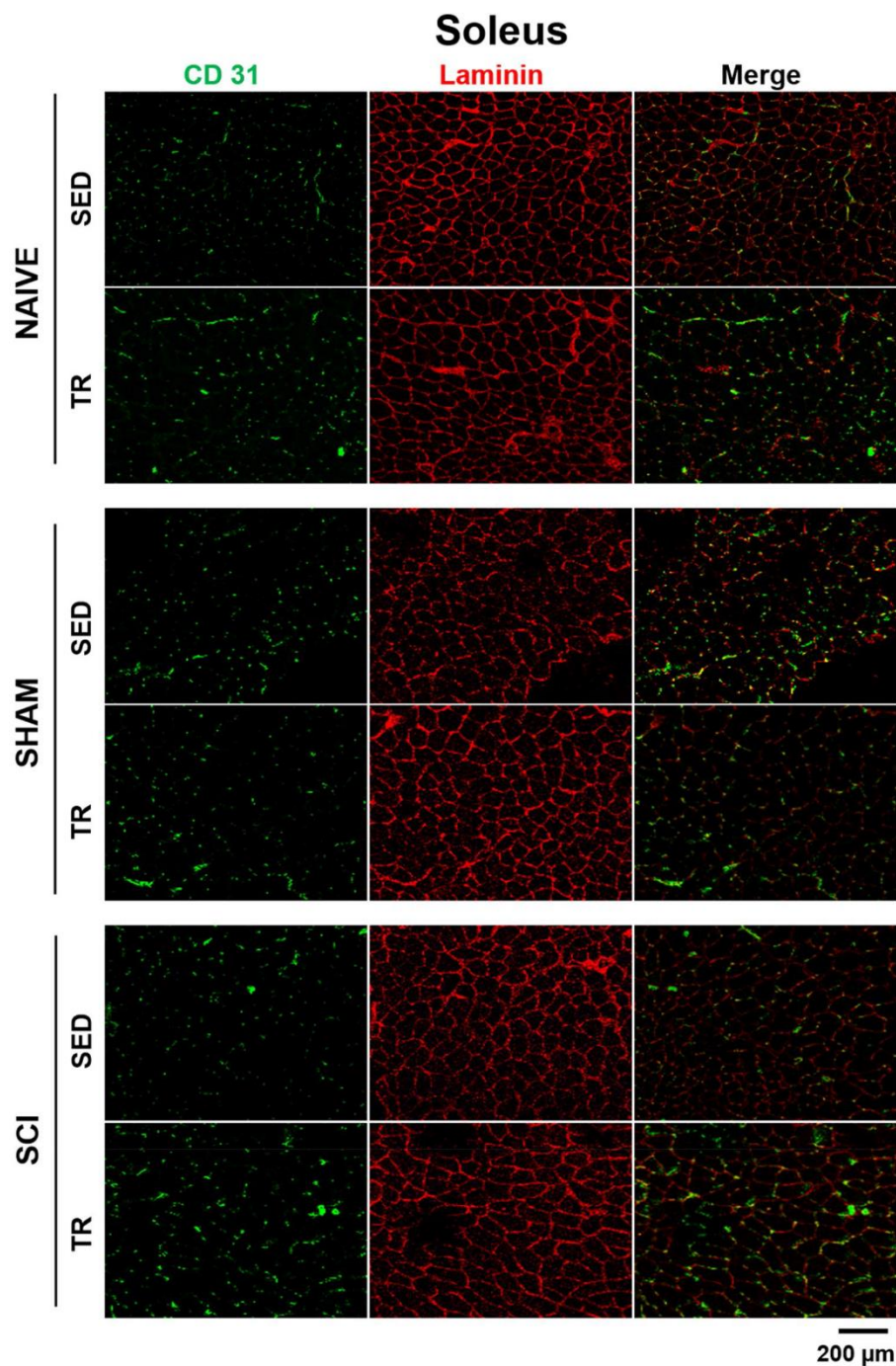


Figure 4. Representative images of CD31 expression and number of fibers in the skeletal muscles. Cryosections were immunostained to visualize CD31 (green) co-labeled with an anti-Laminin antibody (in red) in Soleus (SOL), while Extensor digitorum communis (EDC), Tibialis (TA) anterior are illustrated in supplemental Figs. 1 and 2, respectively. Scale bar = 200 μm.

performed an 8-week exercise training in a forced wheel system²². In this work, the speed was increased daily according to the abilities of each animal up to 14 m/min and the BBB scale was used to evaluate locomotor skill. We chose a semi-quantitative test as a strategy to assess running capacity by using an incremental test. Several studies have used incremental exercise capacity in both animal models and humans as a strategy to evaluate

	SED	TR	<i>p</i> value
NAIVE			
CD/mm ²	1473.1 ± 839.2	1319.2 ± 372.4	0.972
Capillaries/fiber	1.1 ± 0.4	1.6 ± 0.4	0.112
SHAM			
CD/mm ²	1113.8 ± 400.6	1777.2 ± 625.0	0.058
Capillaries/fiber	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.4	0.35
SCI			
CD/mm ²	1685.3 ± 481.0	2655.9 ± 649.6**	0.007
Capillaries/fiber	1.3 ± 0.4	2.3 ± 0.8**	0.003

Table 2. Soleus muscle capillarization. Values are means ± SD for NAIVE, SHAM and SCI (SED and TR). Training effect between SED and TR groups ***p* < 0.01.

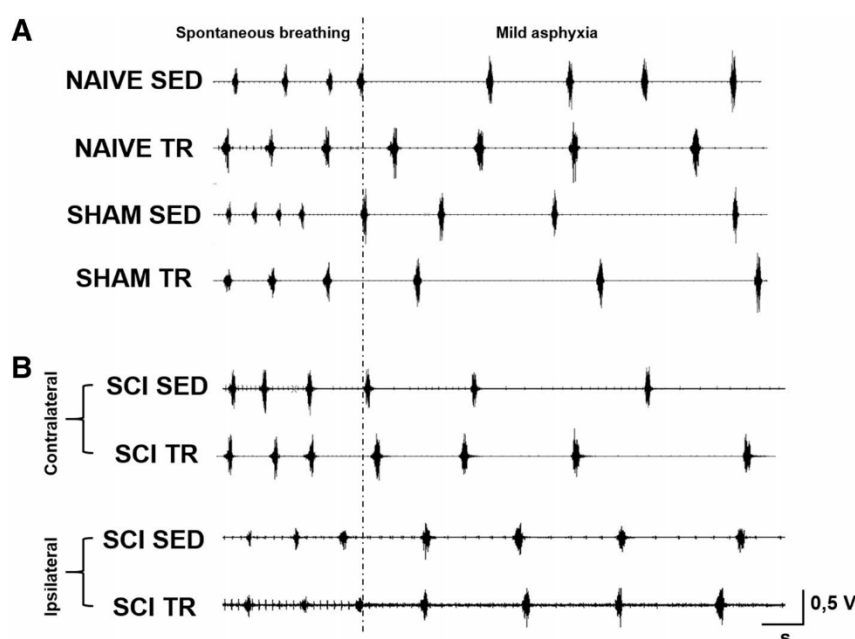


Figure 5. Diaphragm activity at 51 days following a C2 hemisection. (A) Representative traces of diaphragm raw electromyography for uninjured animals: NAIVE and SHAM groups (SED and TR) and (B) injured (contralateral diaphragm and ipsilateral diaphragm) animals: SCI groups (SED and TR).

performance after a prolonged exercise training^{28–31}. Since running capacity has not yet been used in mice following chronic SCI, we thought it relevant to test it in our work. One of our aims was to show that incremental exercise capacity test could be used in addition to other well established behavioral assessment methods to obtain more information on locomotor recovery following spinal cord injury. Therefore, seven days after cervical SCI, mice presented a running capacity significantly reduced. On the other hand, a 6-week exercise training (49 days post SCI) induced a running capacity recovery similar to the level observed pre-SCI.

In rodent models, SCI impacts dramatically the muscle morphology within the first weeks following injury^{34,35}. However, one week of training can efficiently lead to an increase in the regenerative process of slow-twitch muscle^{36,37}. Few studies have assessed the effects of long periods of locomotor training on muscle properties in a mouse model of cervical hemisection SCI. Battistuzzo et al. have performed a treadmill-training paradigm on thoracic hemisected mice, with the speed initially set 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 in SOL muscle at 10 weeks post-training¹⁶. In comparison to the prior training paradigm, we were surprised to observe no change in limbs muscle size. However, we do consider several parameters which could explain these negative results. Firstly, there is no published work linking the effect of training with forced exercise wheel system on muscle size, since treadmill is usually used in this type of study. This suggests that due to the difference in environment between forced exercise wheel system and treadmill, more elevated exercise intensities may be required with the forced exercise wheel system for changes in muscle size to be observed. Secondly, the lack of modification in fiber cross-sectional area of skeletal muscle may be due to the exercise intensity or the training duration applied in

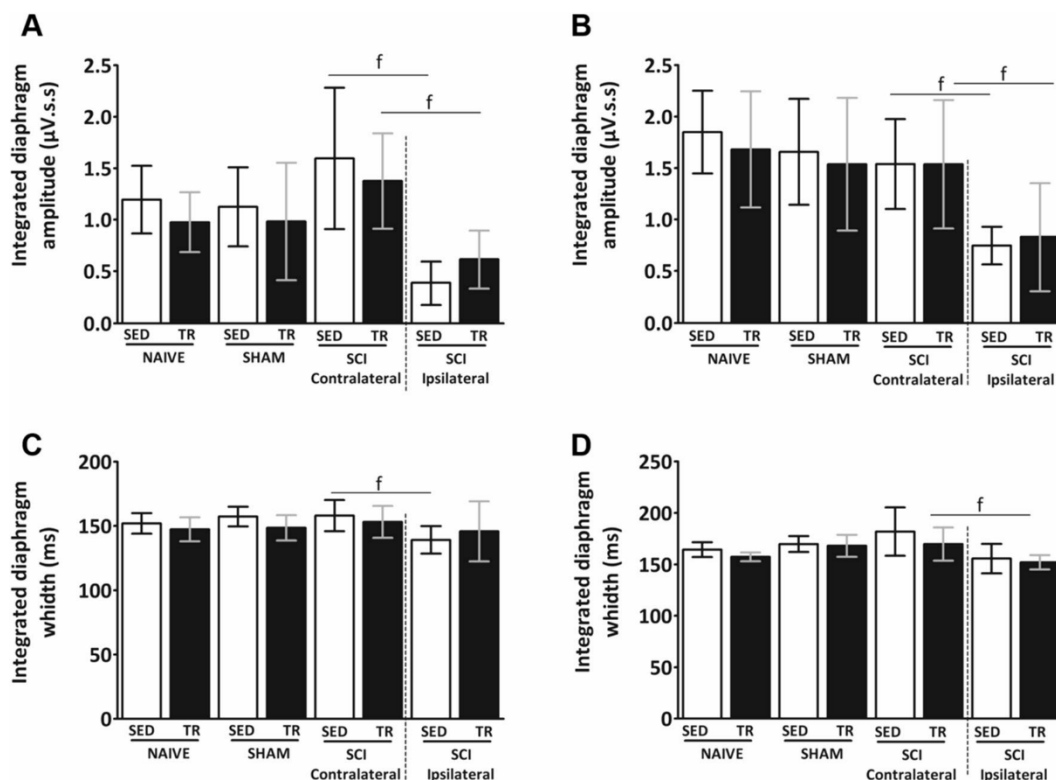


Figure 6. Diaphragm activity analysis at 51 days following a C2 hemisection. Graphs show integrated diaphragm amplitude during (A) spontaneous breathing and (B) mild asphyxia. Graphs represent the width from each EMG bursts of integrated diaphragm signal during (C) spontaneous breathing and (D) mild asphyxia. Data are presented as mean ± SD (n = 6). Significance: $f p < 0.05$ compared to ipsilateral side.

this study. Usually, in prolonged endurance exercise in rodents, the intensity of exercise is adjusted to maintain the training intensity³¹. However, in this present study the exercise adjustment was not done in order to prevent any bias in our procedure between the uninjured and injured animals.

Despite the ineffectiveness of our exercise training protocol to remodel the fiber cross-sectional area of the limb muscles, an increase in microcirculation in the SCI TR group was observed. Contrary to skeletal muscles, microvascular supply undergoes remodeling, typically in the form of capillary rarefaction after SCI¹⁹. The capacity to deliver oxygen and fuel to the working muscles is de facto impaired and contributes to reduce fatigue resistance^{18,38}. Moreover, a capillary rarefaction could contribute to the impairment of insulin sensitivity and glucose intolerance which may be further aggravated by systemic inflammation³⁹ and posttraumatic inflammatory response in SCI secondary pathogenesis^{40,41}.

Locomotor intervention is the most suitable procedure for the rehabilitation of person with SCI. Aerobic exercise training is well established in the literature and is described as beneficial towards improvement in aerobic capacity and increase in mitochondrial density as well as increase in citrate synthase^{42,43}. Prolonged endurance exercise training leads to an increase in skeletal muscle microcirculation³¹, and based on observation in rodents, it has been suggested that the rate of microvessel proliferation (angiogenesis) is faster in response to low intensity aerobic exercise training⁴⁴. This could be beneficial to provide a better structure in a diaphragm morphology following SCI. From this standpoint, we hypothesized that direct inputs to the respiratory from the mesencephalic locomotor region may provide an interaction between spinal locomotor network and brainstem respiratory centers^{16,20,21,45}. However, the mechanisms involved remain unclear²⁰. In this study, we investigated the modulation of diaphragm activity in SCI mouse model following a 6-week exercise training protocol. Electromyography activity was recorded at the end of the exercise training to determine its effect on the recovery of diaphragm activity in the SCI mouse. Post-injury plasticity is attributed to the “crossed 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^{46,47}. However, it has been suggested that this spontaneous post-injury plasticity process, named, “spontaneous crossed phrenic phenomenon”, could be different from the initial pathways described as the CPP and could involve axonal sprouting and rerouting, and the formation of new polysynaptic connections to phrenic motoneurons via cervical spinal interneurons^{48–51}. Nevertheless, the recovery of phrenic motor function remains limited and deficits in breathing persist for months post-injury^{8,51}. With regard to the impact of SCI on diaphragm 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 rat models of cervical SCI has previously demonstrated that 42 days post-injury, diaphragm

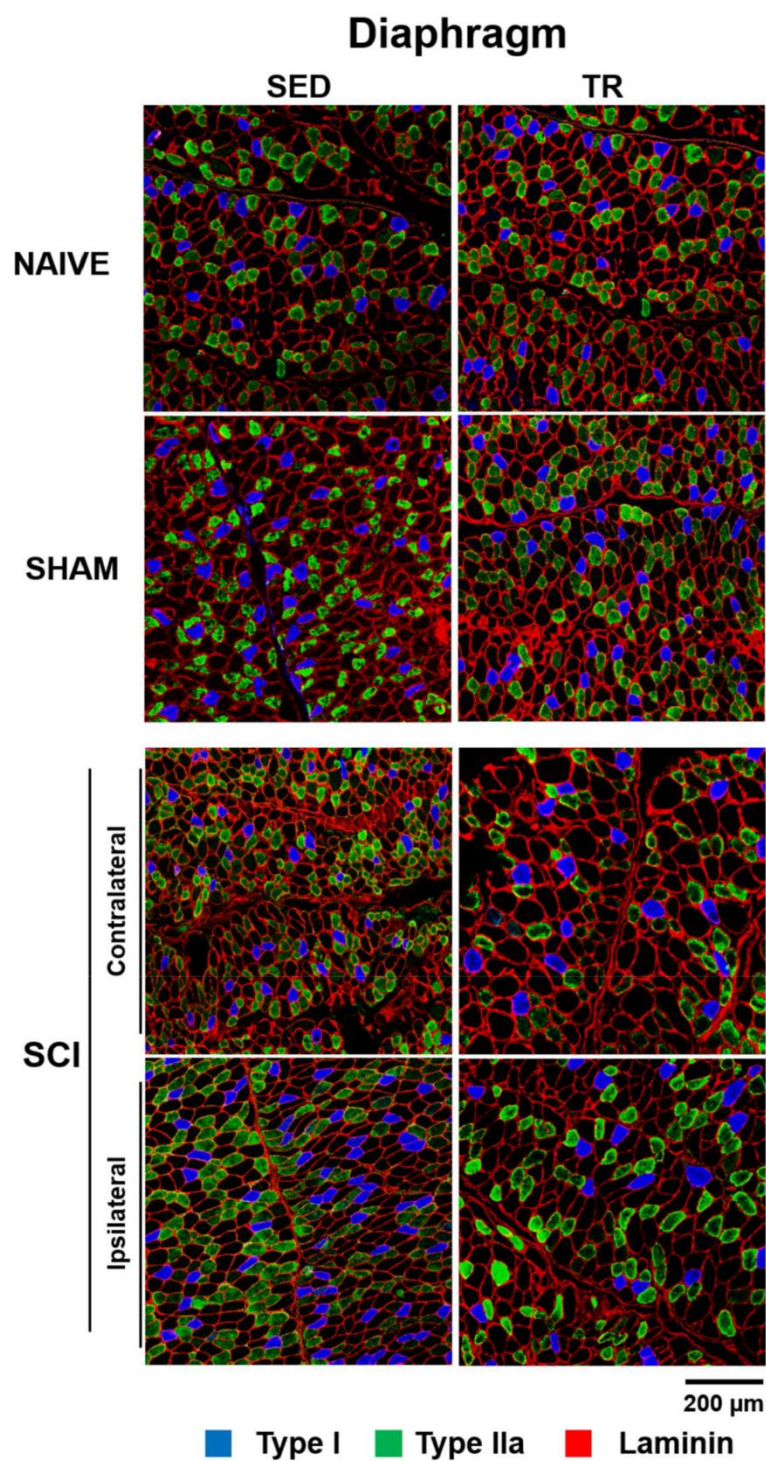


Figure 7. Representative images of fiber type composition in respiratory muscle. Diaphragmatic muscle cryosections were immunostained to visualize Myosin heavy chain (MyHC) isoforms: MyHCslow (type I in blue), MyHC2A (type IIa in green) co-labeled with an anti-laminin antibody to visualize myofiber boundaries (type IIb/x corresponding to unlabeled fibers). Scale bar = 200 μm.

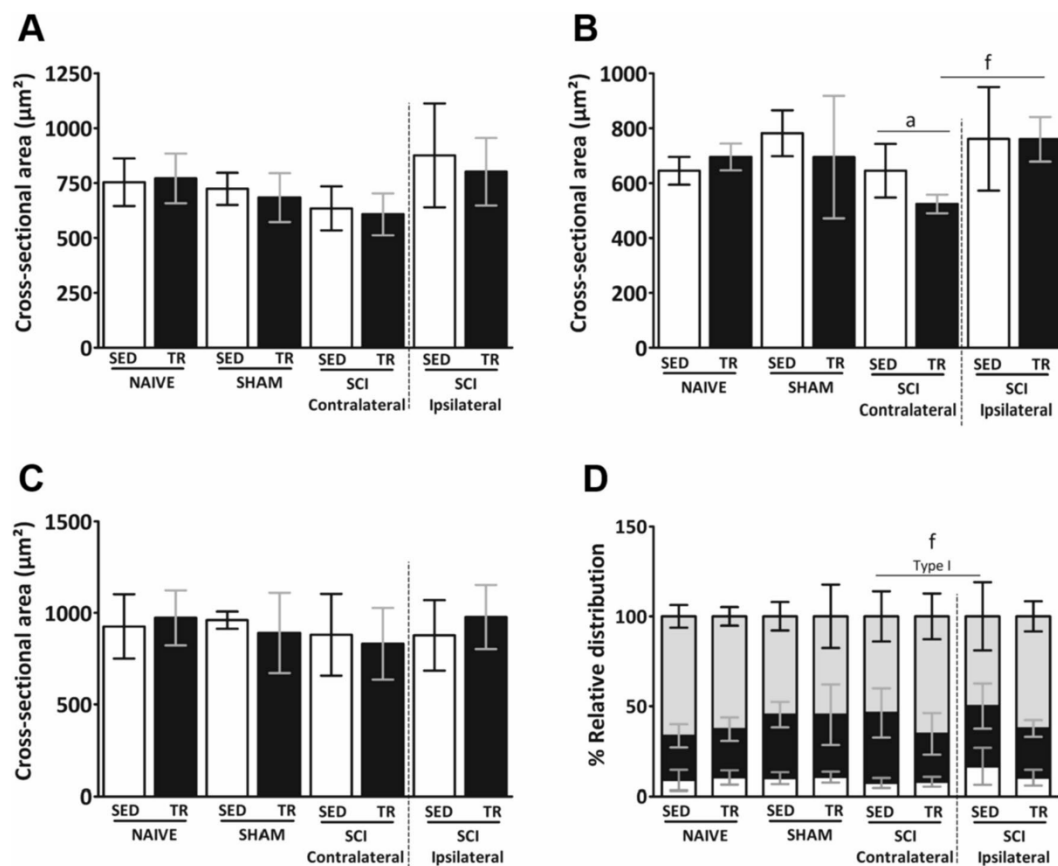


Figure 8. Analysis of fiber type composition in the respiratory muscle. (A–C) muscle fiber cross sectional area and (D) percentage of fiber type relative in diaphragmatic muscle. Data are presented as mean ± SD (n = 6). Significance: a $p < 0.05$ compared to TR group; f $p < 0.05$.

morphology exhibited a reduction in type IIb/x myofiber, and hypertrophy was no longer evident on type I or IIa myofibers⁹. 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 the induction of angiogenesis in the diaphragm 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^{52–54}. 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 diaphragm contraction duration analyzed by electromyography.

Based on these data, we showed that incremental test is a valuable method for evaluating the running capacity in mice with cervical spinal cord injury. Consequently, aerobic exercise training improves the microcirculation of locomotor muscles. In addition, our protocol showed a favorable role on diaphragm myofibers and vascularization after cervical spinal cord hemisection. We admit that 6 weeks of low exercise intensity are not enough to induce a recovery of the respiratory function after cervical spinal cord hemisection. Nevertheless, our data allow us to consider aerobic exercise training as a good non-invasive strategy to use in order to sustain locomotor and respiratory muscle plasticity following cervical SCI.

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.

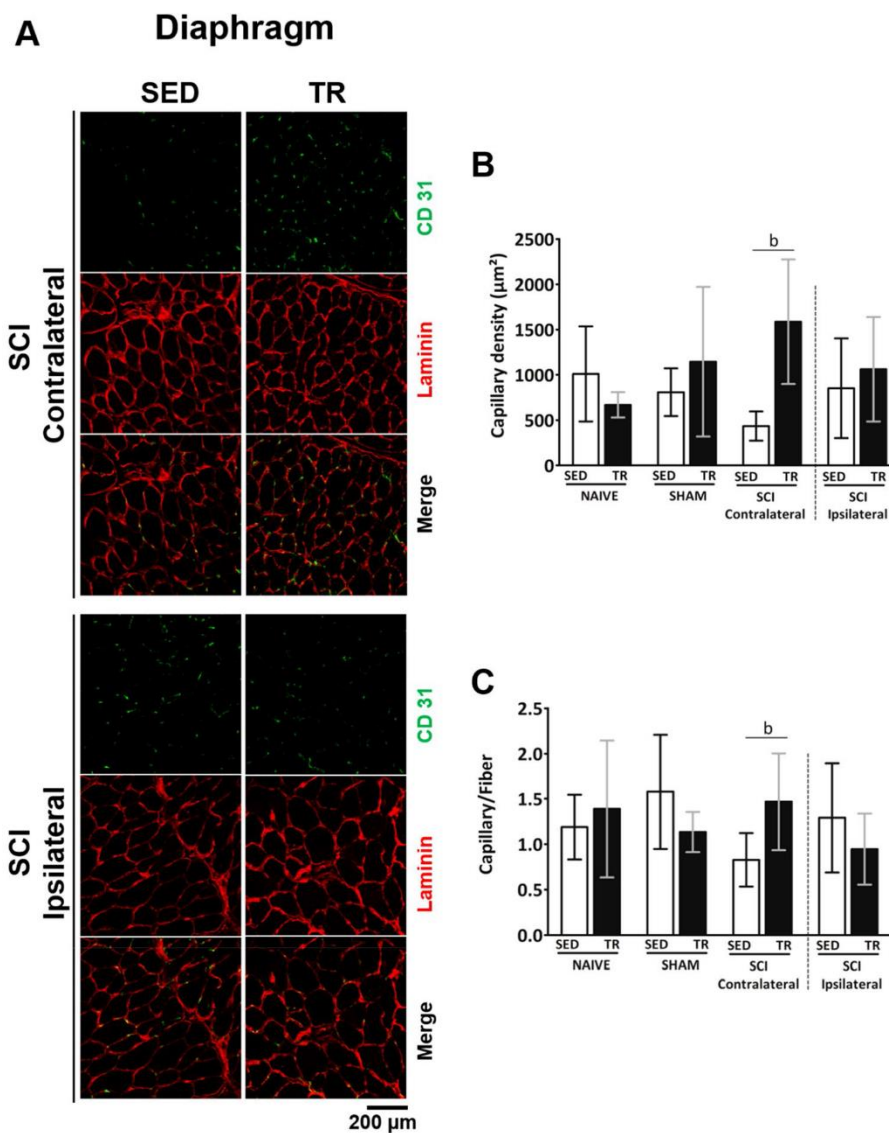


Figure 9. Analysis of endothelial cells on respiratory muscle. **(A)** Cryosections were immunostained to visualize CD31 (green) co-labeled with an anti-Laminin antibody (in red) in the diaphragm muscle. Scale bar = 200 μm. Comparison of CD31 expression and number of fibers in the diaphragm muscle represented by SED and TR SCI groups, while NAIVE and SHAM groups (SED and TR) are illustrated in supplemental Figs. 3. Scale bar = 200 μm. **(B)** Capillary density and **(C)** Ratio between capillary and fiber. Data are presented as mean ± SD (n = 6). Significance: b $p < 0.05$ compared to SED group.

Incremental exercise test protocol. A total of 36 animals were familiarized with 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 exercise test adapted to forced exercise wheel system (see Jesus et al.³¹) with increments of 2 m/min every 2 min, until exhaustion, defined as the moment when animals were unable to keep up the pace in the wheel or when animals voluntarily stopped running. A custom-made polystyrene barrier was developed to motivate the animal and keep it running. After a first incremental exercise test (before SCI surgery) the mice were randomly separated in 3 groups: NAIVE (i.e. without surgery; n = 12, 6 females and 6 males), SHAM (i.e. with surgery but without C2 hemisection; n = 12, 8 females and 4 males) and SCI (i.e. with C2 hemisection surgery; n = 12, 5 females and 7 males). Afterwards, each NAIVE, SHAM and SCI group was equally divided (n = 6 to each group) into sedentary (without training) or trained subgroups (SED or TR). No difference in incremental exercise test results was observed between sexes. A second incremental exercise test was performed 7 days after SCI/SHAM surgery to determine the intensity of the exercise protocol

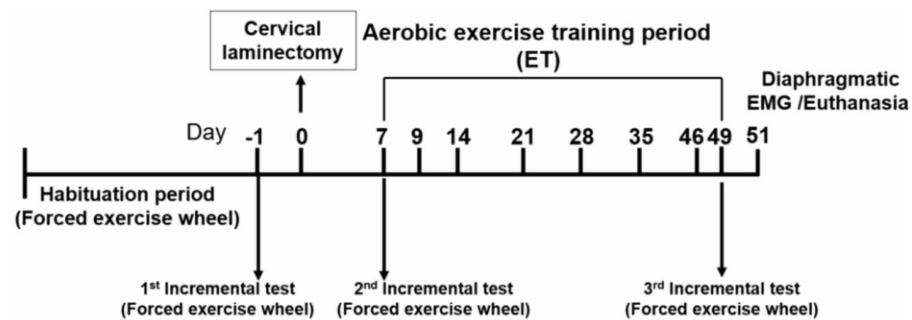


Figure 10. Experimental design throughout surgery and low intensity exercise training periods. After 1st incremental test on forced exercise wheel, animals were distributed into six experimental groups (3 sedentary and 3 trained of NAIVE, SHAM and SCI). SHAM and SCI groups underwent cervical laminectomy followed by a 1-week recovery. Next, all groups went through a 6-week aerobic exercise training on forced exercise wheel.

(60% from maximal achieved speed). At the end of the exercise protocol, sedentary and trained mice performed a third incremental test to evaluate the running performance at 49 days after the SCI/SHAM surgery (Fig. 10).

Chronic C2 hemisection. Animals were anesthetized with isoflurane (5% in 100% O₂) in a closed chamber. Anesthesia was maintained throughout the procedure (1.5–2% isoflurane in 100% O₂) 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 ventro-laterally hemisected caudal to the C2 dorsal roots by using microscissors followed by 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 in having a mouse run on a forced exercise wheel system, at 60% of the maximal speed measured during the second incremental test (7 days after SCI surgery), 1 h per day and 5 days a week. The exercise training intensity was adapted from a protocol previously described by Ferreira et al.³⁰. SED mice were kept in non-moving wheel for the entire duration of the exercise session.

Electrophysiological recordings. Two days after the third incremental test (49 days after SCI surgery), anesthesia was induced using 5% isoflurane in 100% O₂ and maintained throughout the experiment (2.5% in 21% O₂) through a nose cone. As previously described by Michel-Flutot et al.¹¹, 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)³⁵. 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 CO₂ and then intracardiac perfusion of heparinized 0.9% NaCl (10 mL) was performed 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 48 h 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. As previously described by Gill et al.¹⁵, 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)¹⁵. 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 × 1024 pixels 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 IIa, type IIx and/or IIb¹⁵. 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 Sects. (30 μm thickness) were obtained with a Leica cryostat and the extent of injury was assessed after cresyl violet staining as previously described¹¹. 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 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 analysis. For diaphragm electromyography recordings, the amplitude and duration of minimally 5 double integrated bursts during spontaneous breathing and mild asphyxia were calculated for each animal from both side of the diaphragm with LabChart 8.1.9 Pro software (AD Instruments) www.adinstruments.com 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 to compare: (1) the animal running capacity through incremental test at different time points (before SCI, 7 days after SCI and 49 days after SCI), (2) contralateral and ipsilateral diaphragmatic electromyograms on the same animal, and (3) immunofluorescence stains between tissues from the same animal. Two-way ANOVA (Bonferroni post hoc test) was used to compare training (SED and TR) and group (NAIVE, SHAM and SCI group). All data were presented as mean ± SD and statistics were considered significant when $p < 0.05$. SigmaPlot version 12.5, from Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.systatsoftware.com was used for all analyses.

Received: 31 August 2020; Accepted: 21 December 2020
Published online: 08 January 2021

References

- 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. *J. Spinal Cord Med.* **38**(2), 214–223 (2015).
- Winslow, C. & Rozovsky, J. Effect of spinal cord injury on the respiratory system. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **82**(10), 803–814 (2003).
- Sharif-Alhoseini, M. *et al.* Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord.* **55**(8), 714–721 (2017).
- Kommenov, D. *et al.* Intermittent hypoxia promotes recovery of respiratory motor function in spinal cord-injured mice depleted of serotonin in the central nervous system. *J. Appl. Physiol.* **121**(2), 545–557 (2016).
- Forgione, N., Chamankhah, M. & Fehlings, M. G. A mouse model of bilateral cervical contusion-compression spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **34**(6), 1227–1239 (2017).
- Mantilla, C. B., Greising, S. M., Stowe, J. M., Zhan, W.-Z. & Sieck, G. C. TrkB kinase activity is critical for recovery of respiratory function after cervical spinal cord hemisection. *Exp. Neurol.* **261**, 190–195 (2014).
- Satkunendrarajah, K., Karadimas, S. K., Laliberte, A. M., Montandon, G. & Fehlings, M. G. Cervical excitatory neurons sustain breathing after spinal cord injury. *Nature* **562**(7727), 419–422 (2018).
- Fuller, D. *et al.* Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Exp. Neurol.* **211**(1), 97–106 (2008).
- Mantilla, C. B., Greising, S. M., Zhan, W.-Z., Seven, Y. B. & Sieck, G. C. 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.* **114**(3), 380–386 (2013).
- Vinit, S., Darlot, E., Stamegna, J.-C., Gauthier, P. & Kastner, A. Effect of cervical spinal cord hemisection on the expression of axon growth markers. *Neurosci. Lett.* **462**(3), 276–280 (2009).
- Michel-Flutot, P. *et al.* Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **284**, 103568 (2020).
- Lin, V. W. & Bono, C. M. *Spinal Cord Medicine: Principles & Practice* (Demos Medical Publishing, New York, 2010).
- Mantilla, C. B. & Sieck, G. C. Phrenic motor unit recruitment during ventilatory and non-ventilatory behaviors. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **179**(1), 57–63 (2011).
- Bezudnaya, T., Hormigo, K. M., Marchenko, V. & Lane, M. A. Spontaneous respiratory plasticity following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats. *Exp. Neurol.* **305**, 56–65 (2018).
- Gill, L. *et al.* Rapid diaphragm atrophy following cervical spinal cord hemisection. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **192**, 66–73 (2014).
- Battistuzzo, C. R. *et al.* Effects of treadmill training on hindlimb muscles of spinal cord-injured mice. *Muscle Nerve.* **55**(2), 232–242 (2017).
- Castro, M. J., Apple, D. F. Jr., Hilleagass, E. A. & Dudley, G. A. 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.* **80**(4), 373–378 (1999).
- Gorgey, A. S. *et al.* Mitochondrial health and muscle plasticity after spinal cord injury. *Eur. J. Appl. Physiol.* **119**(2), 315–331 (2019).

19. Crameri, 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* **12**(5), 316–322 (2002).
20. de Paleville, D. T. *et al.* Locomotor step training with body weight support improves respiratory motor function in individuals with chronic spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **189**(3), 491–497 (2013).
21. Hormigo, K. M. *et al.* Enhancing neural activity to drive respiratory plasticity following cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **287**, 276–287 (2017).
22. Sandrow-Feinberg, H. R., Izzi, J., Shumsky, J. S., Zhukareva, V. & Houle, J. D. Forced exercise as a rehabilitation strategy after unilateral cervical spinal cord contusion injury. *J. Neurotrauma* **26**(5), 721–731 (2009).
23. Gorgey, A. S. *et al.* Sixteen weeks of testosterone with or without evoked resistance training on protein expression, fiber hypertrophy and mitochondrial health after spinal cord injury. *J. Appl. Physiol. (Bethesda, Md. 1985)* **128**(6), 1487–1496 (2020).
24. Loy, K. *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* **35**(24), 2904–2915 (2018).
25. Basso, D. M. *et al.* Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma* **23**(5), 635–659 (2006).
26. Basso, D. M., Beattie, M. S. & Bresnahan, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**(1), 1–21 (1995).
27. Yarrow, J. F. *et al.* Testosterone dose dependently prevents bone and muscle loss in rodents after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **31**(9), 834–845 (2014).
28. Mead, W. Maximal exercise testing—Bruce protocol. *J. Fam. Pract.* **9**(3), 479–490 (1979).
29. Grant, S. *et al.* Reproducibility of the blood lactate threshold, 4 mmol·l⁻¹ marker, heart rate and ratings of perceived exertion during incremental treadmill exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**(2), 159–166 (2002).
30. Ferreira, J. C. *et al.* Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**(8), 760–765 (2007).
31. Jesus, L., Herrera, N. A., Andreo, J. C., Santos, C. F. & Amaral, S. L. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by the balance between apoptotic and angiogenic proteins. *Steroids* **156**, 108573 (2020).
32. Anderson, K. D., Gunawan, A. & Steward, O. Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Exp. Neurol.* **194**(1), 161–174 (2005).
33. Weishaupt, N., Vavrek, R. & Fouad, K. Training following unilateral cervical spinal cord injury in rats affects the contralesional forelimb. *Neurosci. Lett.* **539**, 77–81 (2013).
34. Hutchinson, K. J., Linderman, J. K. & Basso, D. M. J. Skeletal muscle adaptations following spinal cord contusion injury in rat and the relationship to locomotor function: a time course study. *J. Neurotrauma* **18**(10), 1075–1089 (2001).
35. Huey, K. A., Roy, R. R., Baldwin, K. M. & Edgerton, V. R. Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. *Muscle Nerve* **24**(4), 517–526 (2001).
36. Jayaraman, A., Liu, M., Ye, F., Walter, G. A. & Vandenberg, K. Regenerative responses in slow- and fast-twitch muscles following moderate contusion spinal cord injury and locomotor training. *Eur. J. Appl. Physiol.* **113**(1), 191–200 (2013).
37. Stevens, J. E. *et al.* Changes in soleus muscle function and fiber morphology with one week of locomotor training in spinal cord contusion injured rats. *J. Neurotrauma* **23**(11), 1671–1681 (2006).
38. Bloor, C. M. J. A. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis* **8**(3), 263–271 (2005).
39. Wagenmakers, A. J., Strauss, J. A., Shepherd, S. O., Keske, M. A. & Cocks, M. Increased muscle blood supply and transendothelial nutrient and insulin transport induced by food intake and exercise: effect of obesity and ageing. *J. Physiol.* **594**(8), 2207–2222 (2016).
40. Sinescu, C. *et al.* Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. *J. Med. Life* **3**(3), 254 (2010).
41. Li, Y. *et al.* Pericytes impair capillary blood flow and motor function after chronic spinal cord injury. *Nat. Med.* **23**(6), 733 (2017).
42. Phielix, E., Meex, R., Moonen-Kornips, E., Hesselink, M. & Schrauwen, P. Exercise training increases mitochondrial content and ex vivo mitochondrial function similarly in patients with type 2 diabetes and in control individuals. *Diabetologia* **53**(8), 1714–1721 (2010).
43. Bruce, C., Kriketos, A., Cooney, G. & Hawley, J. Disassociation of muscle triglyceride content and insulin sensitivity after exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Diabetologia* **47**(1), 23–30 (2004).
44. Olfert, I. M., Baum, O., Hellsten, Y. & Egginton, S. Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **310**(3), H326–H336 (2016).
45. Shevtsova, N. A., Marchenko, V. & Bezdudnaya, T. Modulation of respiratory system by limb muscle afferents in intact and injured spinal cord. *Front. Neurosci.* **13**, 289 (2019).
46. Goshgarian, H. G. Invited review: the crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J. Appl. Physiol.* **94**(2), 795–810 (2003).
47. Minor, K. H., Akison, L. K., Goshgarian, H. G. & Seeds, N. W. Spinal cord injury-induced plasticity in the mouse—the crossed phrenic phenomenon. *Exp. Neurol.* **200**(2), 486–495 (2006).
48. Vinit, S. *et al.* Axotomized bulbospinal neurons express c-Jun after cervical spinal cord injury. *NeuroReport* **16**(14), 1535–1539 (2005).
49. Vinit, S. & Kastner, A. Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **169**(2), 115–122 (2009).
50. 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.* **236**(1), 88–102 (2012).
51. Lane, M. A., Lee, K.-Z., Fuller, D. D. & Reier, P. J. Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **169**(2), 123–132 (2009).
52. Waters, R. E., Rotevatn, S., Li, P., Annex, B. H. & Yan, Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**(5), C1342–C1348 (2004).
53. Egginton, S. Physiological factors influencing capillary growth. *Acta Physiol.* **202**(3), 225–239 (2011).
54. Wüst, R. C., Gibbins, S. L. & Degens, H. Fiber capillary supply related to fiber size and oxidative capacity in human and rat skeletal muscle. In *Oxygen Transport to Tissue XXX* (eds Liss, P. *et al.*) 75–80 (Springer, Boston, 2009).
55. Vinit, S., Gauthier, P., Stamegna, J.-C. & Kastner, A. High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J. Neurotrauma* **23**(7), 1137–1146 (2006).

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.

Author contributions

I.J. conceived, designed and performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. P.M., T.D., A.P. and V.V. performed the experiments and reviewed the manuscript. S.V. designed and performed the experiments, interpreted data and reviewed the manuscript. M.B. conceived, interpreted data and reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80478-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

DISCUSSION

1. Effets physiopathologiques d'une lésion spinale cervicale incomplète

1.1. Effets sur l'activité respiratoire

Les différentes études visant à évaluer la variation de l'activité diaphragmatique après hémisection spinale en C2 ont généralement été réalisées chez le rat. Ce modèle est donc relativement bien documenté et sert donc de support à l'application de diverses thérapeutiques, telles que l'injection de chondroïtinase ABC, l'application de protocoles d'hypoxies, les greffes de nerf périphérique, voire une association de ces protocoles (Alilain et al., 2011; Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014; Warren et al., 2018). Les études réalisées chez la souris hémilésée en C2 existent aussi, mais en plus faible nombre (Minor et al., 2006; Mantilla et al., 2014; Komnenov et al., 2016; Satkunendrarajah et al., 2018), raison pour laquelle la physiopathologie dans ce modèle, incluant la physiopathologie respiratoire, n'est pas encore bien décrite. Chez nos souris hémilésées en C2, l'hémiplégie diaphragmatique induite par la lésion reste inchangée jusqu'à au moins un mois post-lésion, ce qui est similaire à ce qui a été observé dans une autre étude à 72h post-lésion (Minor et al., 2006). Ces données sont donc comparables à ce qui a été observé chez le rat après hémisection en C2 (Goshgarian, 1981; Vinit et al., 2006; Warren et al., 2018). Un renforcement des connexions entre les voies respiratoires descendantes du côté intact et les motoneurones déafférentés peut être cependant distingué à partir de sept jours post-lésion. En effet, un CPP spontané devient observable sous asphyxie à ce temps post-lésionnel, et intervient en même temps que la réduction de l'amplitude du signal EMG enregistré du côté lésé entre les contractions du diaphragme. Cette augmentation de signal à partir de 1 jour post-lésion pourrait être due à une activité spontanée et désorganisée des motoneurones phréniques déafférentés, et disparaîtrait donc avec le renforcement de leurs connexions avec les voies croisées phréniques. L'existence du CPP a en effet déjà été mise en évidence chez la souris après hémisection en C2 par une lésion du nerf phrénique contralatéral (Minor et al., 2006). Nos résultats mettent donc en évidence qu'en ce qui concerne l'activité respiratoire, l'hémiplégie diaphragmatique semble permanente, à l'image de ce qui est observé chez le rat. Ce modèle peut donc être utilisé de façon fiable pour tester de nouvelles thérapeutiques visant à améliorer l'activité diaphragmatique, et donc la fonction respiratoire, après trauma spinal cervical, l'avantage de la souris sur ce point étant son métabolisme rapide qui pourrait permettre d'observer plus rapidement que chez le rat les effets des potentielles thérapeutiques utilisées.

Cette évaluation de l'activité musculaire respiratoire, en particulier diaphragmatique comme vu précédemment, est toujours passée jusqu'à maintenant par une chirurgie invasive afin de réaliser une EMG diaphragmatique chez les modèles précliniques. Celle-ci peut se faire via la pose d'un appareil de télémétrie (Navarrete-Opazo et al., 2015), ou encore en tant qu'expérimentation terminale suite à une laparotomie, à l'image de ce qui a été effectué dans ce travail doctoral pour plusieurs études chez

le rat et la souris (partie résultats 1.2., 2.2., 3.3., 4.1. et 4.3) (Jesus et al., 2021; Michel-Flutot et al., 2021a), ainsi que dans d'autres études (Vinit et al., 2006). Cette méthode est en effet déjà utilisée chez l'Homme avec succès dans divers pathologies (Faysoil et al., 2018). Nous avons donc essayé de déterminer si l'utilisation d'une technique d'évaluation non-invasive, telle que l'échographie, pouvait permettre d'observer et d'enregistrer l'activité diaphragmatique, ainsi que celles d'autres muscles respiratoires, tout d'abord chez des rats sains, afin de déterminer sa faisabilité. Les rats sont en effet plus petits que l'Homme, ce qui pourrait rendre difficile l'observation de l'activité et de la morphologie de ces muscles. Nous avons cependant pu montrer que l'échographie permet d'observer le déplacement du diaphragme lors de sa contraction, ce qui constitue un reflet de son activité. Nous avons de plus réussi à déterminer l'épaisseur et l'aire du diaphragme et du *rectus abdominis*, ce dernier étant impliqué dans l'expiration active (Faysoil et al., 2021). Cette méthode d'évaluation devrait ainsi permettre d'observer les changements dus à certaines pathologies induisant un changement dans la morphologie musculaire, telle que les modèles précliniques de myopathie chez des modèles précliniques de rat. Il reste maintenant à déterminer si cette technique peut aussi être utilisée chez des modèles de souris, celles-ci étant plus petite en taille que le rat. En effet, le nombre croissant de souches génétiquement modifiées chez la souris permet l'étude approfondie des mécanismes impliqués dans un grand nombre de pathologies.

Nous avons donc suite à cette étude voulu savoir si l'hémiplégie diaphragmatique induite par notre modèle était observable et quantifiable par échographie, et surtout si ces résultats étaient pertinents par rapport à ceux obtenus habituellement par électromyographie diaphragmatique. Nos résultats ont ainsi montré que chez des rats à sept jours post-lésion, le déplacement du diaphragme paralysé est nul, voire négatif par rapport au côté intact ou aux animaux sains. Ces résultats mettent en évidence une absence de contraction du diaphragme du côté lésé, et sont de plus corrélés à l'amplitude des EMG diaphragmatiques, montrant la fiabilité de l'échographie dans l'évaluation de la hémiplégie diaphragmatique. L'échographie pourrait ainsi s'avérer être un outil indispensable dans le futur pour avoir un suivi non-invasif de l'activité ou de l'anatomie des muscles respiratoires au cours du temps dans des modèles de trauma spinal cervical, ainsi que suite à l'administration de thérapies visant à améliorer la fonction de ces muscles. Elle pourrait ainsi constituer une alternative non-invasive, ou en tout cas complémentaire, à l'enregistrement des EMG diaphragmatiques habituellement réalisé.

1.2. Effets sur la fonction cardiovasculaire

L'évaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie chez notre modèle d'étude spécifique d'hémisection latérale en C2 chez le rat nous a permis de mettre en évidence une dysfonction systolique chez nos animaux à sept jours post-lésion par rapport aux animaux sains. Cela

suggère que les fibres sympathiques résiduelles épargnées ne sont pas suffisantes pour assurer une fraction d'éjection du ventricule gauche physiologique. De façon intéressante, chez des modèles de contusion thoracique, c'est-à-dire des modèles n'induisant normalement pas la perte totale des fibres sympathiques descendantes, à l'image de notre modèle d'hémisection en C2, cette observation n'est pas retrouvée, ou est alors accompagnée d'autres symptômes que nous n'avons pas observé dans ce travail doctoral (DeVeau et al., 2018; Squair et al., 2018b; Squair et al., 2018a). Sachant que chaque segment de la moelle épinière innervent le système cardiovasculaire de façon différente, cette différence de résultats peut être due d'une part au niveau de la lésion qui diffère entre les études, mais aussi de ce travail doctoral. D'autre part, la sévérité de la lésion, et donc la quantité de fibres sympathiques résiduelles, peut varier selon le modèle utilisé.

Sur le plan cardiovasculaire, une réduction de la pression artérielle est observée immédiatement après que la lésion ait été appliquée. En effet, la lésion provoque un choc neurogénique correspondant à l'arrêt des voies sympathiques descendantes, et donc à une modification de la balance sympathique/parasympathique (Partida et al., 2016). Ces résultats sont dans un premier temps similaires à ce qui a été montré dans d'autres types de traumatismes spinaux. Néanmoins, à partir de sept jours post-lésion, une pression artérielle physiologique est de nouveau observée dans notre modèle, alors qu'une pression artérielle réduite perdure dans les modèles de transection complète ou de contusion (Lujan et al., 2018; Lujan and DiCarlo, 2020). Cela signifie que les fibres sympathiques résiduelles permettent la mise en place d'une compensation afin de retrouver une pression artérielle physiologique. Cette compensation passerait par une augmentation de l'expression des récepteurs α_1 adrénergiques dans les vaisseaux sanguins, ce qui permettrait d'induire une plus forte constriction des vaisseaux en réponse à un même stimulus adrénergique (Lee et al., 2016). Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence ce phénomène par des techniques moléculaires, les anticorps présents dans le commerce n'étant pas suffisamment spécifiques.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que suite à une hémisection en C2, le choc neurogénique dû à la perte de la moitié des efférences sympathiques sous le segment métamérique C2 induit une réduction de la pression artérielle moyenne. Celle-ci est due à la réduction de l'innervation sympathique du cœur, qui pourrait être à l'origine de la dysfonction systolique observée à sept jours post-lésion. Cette dysfonction serait ainsi probablement présente dès l'application de l'hémisection. Cette hypothèse reste cependant à confirmer par échocardiographie. Le système vasculaire est cependant capable de s'adapter, peut-être en raison d'une augmentation de la sensibilité α_1 adrénergique des vaisseaux, permettant une meilleure vasoconstriction afin de récupérer une pression artérielle moyenne physiologique. Une approche plus physiologique utilisant l'administration d'un agoniste de ces récepteurs α_1 pourrait permettre d'observer une réponse

différente sur la pression artérielle enregistrée entre nos animaux sains et nos animaux lésés, et ainsi de vérifier notre hypothèse

1.3. Effets inflammatoires

Les résultats que nous avons obtenu concernant la mise en place d'une inflammation dans la moelle épinière suite à un trauma cervical partiel en C2 permettent d'une part, de préciser sa cinétique en C3-C6 dans et autour des motoneurones phréniques chez notre modèle de rat, et d'autre part d'apporter de nouvelles précisions sur le rôle des neutrophiles et des cellules microgliales chez notre modèle de souris.

Ainsi, après hémisection latérale en C2 chez le rat, nous avons montré que les motoneurones phréniques se mettent à exprimer des molécules inflammatoires telles que des molécules productrices de ROS en raison de la modification de leur activité et de leur homéostasie cellulaire, ainsi que la probable excitotoxicité au glutamate induite par l'axotomie des neurones les innervant initialement (Hulsebosch, 2002). La mise en place ces processus inflammatoires induit une augmentation de la demande énergétique cellulaire, et donc une modification du métabolisme cellulaire. De plus, l'ischémie qui suit le trauma spinal participe à ce phénomène (Watson and Yeung, 2011). L'activité de certaines molécules telle que l'AMPK devient alors nécessaire, celui-ci étant en premier lieu un senseur énergétique (Potter et al., 2010). Son rôle est alors de réduire les processus consommant de l'énergie, tout en augmentant les processus qui produisent de l'énergie, afin de protéger la cellule contre les stress cellulaires (Shah et al., 2016). Son expression initialement réduite, probablement en raison du choc spinal revient alors à un niveau d'expression basal. Cet AMPK aiderait de plus à la mise en place de la réponse antioxydante visant à récupérer une homéostasie cellulaire physiologique (Shah et al., 2016). Ces données pourraient expliquer en partie le retour à un niveau d'expression physiologique de Nrf2 total et de Nrf2 nucléaire après leur réduction d'expression, peut-être due ici aussi au choc spinal. La cellule récupère ainsi une expression d'AMPK phosphorylé total et de Nrf2 nucléaire à un jour post-lésion, montrant ainsi une réponse rapide afin de lutter contre les processus inflammatoires qui se mettent en place, soit à un jour post-lésion pour iNOS, et à sept jours post-lésion pour la NADPH-oxydase. Il serait intéressant de confirmer ces résultats sur la modification du métabolisme cellulaire en vérifiant l'expression des molécules mTOR ou S6 (qui est en aval de la voie mTOR). Leur expression est en effet sensée être réduite en cas d'augmentation de la demande métabolique, et l'AMPK est une des molécules induisant leur inhibition dans ce contexte (Garza-Lombó et al., 2018). L'AMPK et mTOR sont en effet les deux molécules clef de la régulation du métabolisme énergétique cellulaire, et leur expression peut être modulée par une réduction de l'apport en oxygène comme en cas d'ischémie, ou encore lors d'une excitotoxicité au glutamate induisant une grande entrée de calcium dans la cellule

(Garza-Lombó et al., 2018). Une cinétique à plus longue durée pourrait aussi apporter des informations sur la durée de l'état inflammatoire des motoneurones déafférentés et contralatéraux, notre étude s'arrêtant en effet à sept jours post-lésion.

Autour des motoneurones phréniques, la présence de macrophages dans la moelle épinière C3-C6 correspond à une arrivée de monocytes inflammatoires sur site, puis à leur différenciation en macrophages exprimant le marqueur CD68 à leur surface. Leur recrutement autour des motoneurones phréniques à partir de 7 jours post-lésion correspond à ce qui est décrit dans la littérature (Sroga et al., 2003; Donnelly and Popovich, 2008; Milich et al., 2019). Les cellules microgliales sont quant à elles activées à partir de trois jours post-lésion. Or, il a été montré que suite à un trauma spinal, ces cellules s'activeraient dans les minutes, voire les heures qui suivent la lésion, et atteindraient leur maximum d'activation entre trois et sept jours post-lésion (Sroga et al., 2003; Donnelly and Popovich, 2008). Ce léger décalage peut s'expliquer par l'éloignement des motoneurones phrénique par rapport au site lésionnel, les différentes études s'intéressant à la cinétique d'activation de la microglie ayant été réalisées principalement au niveau du site lésionnel. De façon intéressante, la microglie s'active plus rapidement autour des motoneurones déafférentés, et les macrophages y sont aussi recrutés plus rapidement par rapport à la zone où se trouvent les motoneurones non déafférentés. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'axotomie des neurones respiratoires induit une démyélinisation et une dégénérescence axonale, produisant des débris autour des motoneurones déafférentés, rendant prioritaire la présence de cellules immunitaires activées dans cette zone. Les motoneurones non déafférentés entrant aussi dans un état inflammatoire, probablement en raison du fait qu'ils doivent augmenter leur activité pour compenser la paralysie diaphragmatique du côté ipsilatéral à la lésion, mais aussi en raison de l'ischémie transitoire due à la lésion des vaisseaux sanguins. La présence de microglie activée et de macrophages dans cette zone à partir de sept jours post-lésion n'est donc pas surprenante.

Chez la souris, la présence de cellules microgliales apparemment activées, ainsi que de neutrophiles, a pu être observée au niveau du site lésionnel à un jour post-lésion. Il a été montré que ces cellules pouvaient dans certaines conditions sécréter des pièges extracellulaires, des structures composées d'ADN, d'histones et d'enzymes protéolytiques (Boeltz et al., 2019; Agrawal et al., 2021; Zivkovic et al., 2021). Ces structures serviraient physiologiquement à aider à la capture et la destruction des micro-organismes, et joueraient donc un rôle normalement bénéfique dans l'inflammation et l'auto-immunité entre autres (Boeltz et al., 2019). Jusqu'à présent, la présence de NETs n'avait jamais été mise en évidence dans des modèles de trauma spinaux, uniquement dans un modèle de traumatisme crânien (Vaibhav et al., 2020; Zivkovic et al., 2021). La première démonstration de l'existence des MIETs a été faite dans des conditions d'inflammation non-stérile, soit après infection à la *Listeria in vivo* chez des cellules microgliales extraites du cerveau de souris et d'Homme, *ex vivo* sur

coupes de cerveau de souris infectée à la *Listeria*, ainsi qu'*in vitro* chez des lignées microgliales (Wang et al., 2019). Par la suite, il a été démontré que le fait de stimuler *in vitro* des cellules microgliales murines ou humaines à la dopamine induisait une production de MiETs par ces microglies activées (Agrawal et al., 2021). Nos résultats montrent que les cellules microgliales et les neutrophiles vivants et présents dans la moelle épinière C1-C3 produisent des pièges extracellulaires composés au moins d'ADN et de H3 citrulliné à un jour après hémisection latérale en C2, que l'on pourrait assimiler à un modèle d'inflammation stérile. Nous devons dans un premier temps confirmer ces résultats par l'observation de ces structures par imagerie, puis dans un second temps, tenter de déterminer leur rôle exact dans notre modèle pathologique. Il semblerait cependant que les NETs aient un rôle néfaste dans les pathologies neurodégénératives ou dans les troubles du système nerveux central, en aggravant les dommages neuronaux (Zivkovic et al., 2021). Le rôle des MiETs pourrait être similaire, mais cela reste à confirmer. Il serait ainsi intéressant de réaliser une cinétique d'expression des pièges extracellulaires, d'une part par les cellules microgliales et les neutrophiles afin de compléter notre étude sur les MiETs et les NETs, et d'autre part, par les monocytes inflammatoires/macrophages présents sur le site de la lésion. Cette cinétique s'étendrait donc potentiellement de une heure post-lésion à environ sept jours post-lésion, la microglie s'activant dans les minutes suivant le trauma, et les macrophages étant présents et normalement différenciés sur site à partir de sept jours post-lésion (Donnelly and Popovich, 2008). De même, l'étude de l'expression des pièges extracellulaires en C3-C6 dans la zone des motoneurones phréniques, et surtout de leur potentiel rôle dans les processus inflammatoires ou de plasticité, pourrait mettre en lumière une nouvelle cible thérapeutique.

2. Effets de thérapeutiques visant à induire de la plasticité respiratoire suite à une lésion spinale incomplète chez le rat

2.1. Effet de l'application d'un protocole de rTMS à haute fréquence sur l'excitabilité du réseau neurorespiratoire

La stimulation magnétique répétée est connue pour moduler l'excitabilité des réseaux neuronaux touchés. Il est généralement admis que les protocoles délivrés à haute fréquence (> 10 Hz) induisent un effet LTP-like, alors que les protocoles délivrés à basse fréquence (< 5 Hz) induisent plutôt un effet LTD-like, ces effets passant par une modulation des systèmes glutamatergique et GABAergique (Trippe et al., 2009; Vlachos et al., 2012; Lenz et al., 2015; Lenz et al., 2016; Lenz and Vlachos, 2016; Tang et al., 2017). Nous avons ainsi dans un premier temps souhaité vérifier si l'application d'un protocole de rTMS à haute fréquence (10 Hz) pouvait induire une modulation de l'excitabilité du système neurorespiratoire chez le rat sain.

Nos résultats ont ainsi montré que l'application de d'un protocole de rTMS composés de 9 trains de 100 stimulation délivrés à 10 Hz (les trains de stimulations étant séparés de 30 secondes) induisait une augmentation de l'excitabilité du réseau phrénique via l'évaluation des PEM diaphragmatiques chez le rat anesthésié. Cette augmentation d'excitabilité est de plus maintenue jusqu'à au moins 1h post-traitement et passe par une levée d'inhibition GABAergique sur ce système phrénique (Michel-Flutot et al., 2021b). Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes montrant qu'un protocole aigu de stimulation magnétique trans-spinale répétée (rTMS) à 0,2 Hz délivré chez le rat lésé en thoracique induit une augmentation de l'amplitude des PEM des pattes arrières, et que cette augmentation est bloquée par l'injection intraspinale de bloqueurs des récepteurs NMDA (MK-801) (Hunanyan et al., 2012). Nos résultats, ainsi que les données de la littérature, indiquent donc que l'effet neuromodulateur de la stimulation magnétique répétée passe par une modulation à la fois du système glutamatergique, mais aussi GABAergique (Trippe et al., 2009; Benali et al., 2011; Hunanyan et al., 2012; Lenz et al., 2015; Lenz et al., 2016; Lenz and Vlachos, 2016). De façon intéressante, cette étude nous a amené à mettre en évidence des groupes d'animaux dits « répondeurs » et « non-répondeurs » parmi les animaux traités. Cette observation rejoint ce qui a été observé chez l'Homme, chez qui cette différence de réponse à la rTMS serait due à un polymorphisme dans le gène codant pour le BDNF. Cette mutation induit une réduction de la disponibilité du BDNF, ce qui impacte les systèmes glutamatergiques et GABAergiques (Yukimasa et al., 2006; Cheeran et al., 2008). Cette hypothèse pourrait être vérifiée chez nos animaux par un dosage sanguin du BDNF. En effet, les rats Sprague-Dawley utilisés n'étant pas issus d'une lignée pure, ceux-ci pourraient présenter ce type d'anomalie génétique.

Ayant validé l'effet de notre protocole de rTMS aigu à 10 Hz sur le système neurorespiratoire chez des rats sains, nous avons ensuite voulu tester ses potentiels effets bénéfiques sur l'activité diaphragmatique chez notre modèle rat d'hémisection spinale en C2. Nous avons donc émis l'hypothèse que notre protocole de rTMS à 10 Hz, délivré de façon chronique (une fois par jour durant sept jours, un mois ou deux mois et débutant sept jours après la date de chirurgie), pourrait induire une amélioration de l'activité de l'hémidiaphragme paralysé. Nos résultats indiquent que délivré de façon chronique chez des rats vigiles et hémilésés en C2, notre protocole de rTMS permet d'induire une amélioration de la capacité de l'hémidiaphragme intact à compenser pour la perte d'activité de l'hémidiaphragme lésé après un mois de traitement. Plus aucune différence entre les animaux traités et non-traités n'est observable après deux mois de traitement par rTMS, indiquant que notre protocole accélérerait un processus se produisant naturellement au cours du temps. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'expression de CREB dans les motoneurones phréniques est réduite plus tôt chez les animaux traités, signifiant que son expression n'est peut-être plus « nécessaire » plus rapidement car les phénomènes de plasticité en aval de la signalisation CREB sont activés plus

rapidement. Notre protocole n'a de plus aucun effet sur l'activité ou même l'excitabilité de l'hémi-diaphragme paralysé en eupnée, mais induit néanmoins un renforcement du CPP observable après deux mois de traitement chez les animaux recevant un challenge respiratoire (asphyxie transitoire). Ces effets fonctionnels seraient permis par un potentiel renforcement des voies descendantes respiratoires spinales. En effet, une augmentation du nombre de cônes de croissance axonaux (fibres positives GAP-43) est observée au niveau du funicule ventrolatéral du côté intact, ce qui peut être un reflet global de l'effet du traitement par rTMS sur toutes les voies descendantes stimulées. Ce phénomène serait de plus facilité par une réduction de la présence de cellules CD68 positives du côté intact dans la moelle épinière C1-C3.

Des protocoles chroniques de stimulation magnétique répétée ont déjà été testés dans des modèles de trauma spinal dans le but d'induire une récupération fonctionnelle, plus précisément locomotrice, les modèles utilisés étant des modèles de trauma thoraciques chez le rat ou la souris (Leydeker et al., 2013; Petrosyan et al., 2015; Chalfouh et al., 2020; Delarue et al., 2021). Chez la souris, ces protocoles délivrés à 10 Hz ou 15 Hz induisent une amélioration de la fonction locomotrice (Leydeker et al., 2013; Chalfouh et al., 2020). Chez le rat un protocole délivré à 0,2 Hz induit une facilitation synaptique spinale qui peut être observée via l'enregistrement des PEM des pattes arrières suite à l'administration d'un unique stimulus de TMS ou TSMS (Petrosyan et al., 2017). Il n'induit une récupération locomotrice qu'en étant couplé à un protocole d'exercice et d'injection d'un vecteur délivrant de la neurotrophine-3 (Petrosyan et al., 2015). Ces protocoles de rTMS ont été délivrés au niveau du site lésionnel, c'est-à-dire au niveau spinal, contrairement à notre protocole qui lui est délivré au niveau cérébral, notre but étant de toucher les neurones connectés au réseau neurorespiratoire et projetant sur les neurones respiratoires du tronc cérébral, qui eux-mêmes innervent les motoneurones phréniques. Cette différence de protocole pourrait expliquer la divergence de résultats entre ces études. De plus, les protocoles de rTSMS ayant montré des effets seuls ont été réalisés chez la souris. La rTMS pourrait éventuellement avoir un effet neuromodulateur plus efficace chez la souris que chez le rat.

Il est aussi à noter que l'effet de notre protocole de rTMS a initialement été vérifié chez le rat anesthésié (Michel-Flutot et al., 2021b). Or, nous avons directement transposé ce protocole chez des rats vigiles, protocole qui est délivré à 50 % du maximum output de la machine. Le protocole n'induit ainsi aucune réponse musculaire chez les rats anesthésiés, alors qu'il induit des contractions musculaires visibles chez les rats vigiles. En effet, l'anesthésie à l'uréthane utilisée dans notre première étude est connue pour être un dépresseur de l'excitabilité neuronale (Vogler, 2006). Le niveau d'excitabilité neuronal des animaux n'était donc pas le même au moment de l'application du protocole de rTMS entre les deux études, ce qui pourrait expliquer la différence d'effet entre nos deux études,

bien que nous n'ayons pu observer cette augmentation d'excitabilité que jusqu'à une heure post-rTMS chez les animaux sains anesthésiés.

Pour améliorer l'effet de notre protocole chronique de rTMS sur la fonction respiratoire après trauma spinal cervical, nous pourrions l'appliquer directement au niveau du tronc cérébral plutôt qu'au niveau cortical afin de directement stimuler les neurones du rVRG innervant les motoneurones phréniques. Il pourrait aussi être couplé à d'autres thérapeutiques telles qu'un protocole d'exercice à l'image de ce qui a été fait dans ce travail doctoral (Jesus et al., 2021). L'administration de chondroïtinase ABC au site de la lésion pourrait être utilisée en complément afin de fournir un environnement favorable à la plasticité synaptique, ou encore à un protocole d'hypoxie intermittente afin de moduler l'activité des neurones respiratoires de façon différente d'avec la rTMS, ce qui pourrait peut-être potentialiser l'effet de ces deux thérapeutiques.

2.2. Utilisation de la stimulation magnétique trans-spinale comme outil d'évaluation de la fonction nerveuse dans un modèle de trauma du système nerveux périphérique

Nous avons souhaité vérifier la faisabilité de l'évaluation de la fonction nerveuse de façon non-invasive par enregistrement des PEM du muscle gastrocnémien induit par stimulation magnétique trans-spinale dans un modèle d'écrasement du nerf tibial chez le rat. Nous avons dans un premier temps comparé l'effet de l'isoflurane et de l'uréthane sur l'excitabilité neuronale pour une même puissance de délivrance du champ magnétique. L'anesthésie à l'isoflurane permettant d'obtenir des PEM d'amplitude plus importante que sous anesthésie à l'uréthane, et surtout réversible, nous avons choisi de réaliser cette étude en utilisant l'isoflurane comme anesthésique. L'utilisation d'autres anesthésiques réversibles tels que des pentobarbitals, du propofol ou de la kétamine mélangée à des drogues anesthésiques (xylazine) auraient aussi pu être utilisés, mais l'anesthésie volatile est celle présentant le moins d'effets secondaires et ayant l'induction et la réversibilité la plus rapide. Leur effet sur l'excitabilité neuronale reste cependant à être comparé avec les autres anesthésiques disponibles. L'halothane aurait cependant pu être un bon choix de substitution comme anesthésie gazeuse, celui-ci ayant apparemment un effet moindre sur la dépression du système nerveux central par rapport à l'isoflurane (Vogler, 2006).

La stimulation magnétique étant délivrée de façon trans-spinale, celle-ci va directement induire la dépolarisation des motoneurones sous-jacents, c'est-à-dire les motoneurones innervant entre autres le muscle gastrocnémien. L'application de stimulations paires délivrées à différentes fréquences se fait généralement au niveau cortical, et sert à révéler les circuits corticaux inhibiteurs et excitateurs liés au réseau neuronal permettant le mouvement du muscle enregistré (Lenz et al., 2016;

Lefaucheur, 2019). Dans notre cas, elles peuvent servir à évaluer l'efficacité de la jonction neuromusculaire dans le cadre d'animaux sains (Van der Kloot and Molgó, 1994). En effet, le trajet du signal part des motoneurons jusqu'à la terminaison synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire, puis induit une dépolarisation des muscles innervés. Nos résultats montrent qu'une stimulation pairée délivrée à 10Hz permet d'augmenter l'amplitude du second PEM, alors qu'une stimulation pairée délivrée à 30Hz induit une réduction de l'amplitude du second PEM. Les stimulations pairées délivrées à 10Hz induiraient donc une forme de facilitation, ce qui pourrait être le reflet d'un encrage accru des vésicules à la membrane plasmique, ce qui conduirait à un relargage plus important de l'acétylcholine dans la fente synaptique en réponse au deuxième pulse. En ce qui concerne l'effet des stimulations pairées délivrées à 30Hz, il pourrait être le reflet d'un manque de vésicules disponibles pour l'exocytose après le second pulse, les deux stimulations étant trop rapprochées dans le temps pour permettre l'encrage d'un nombre suffisant de vésicules à la membrane après la première stimulation. Il en résulterait une amplitude de PEM plus faible en réponse au second pulse par rapport à la première, à l'image de nos résultats. Ainsi l'application de stimulations magnétique trans-spinale pairées permettrait d'évaluer le fonctionnement de la jonction neuromusculaire *in vivo* de manière non-invasive.

Nous avons ensuite montré que la stimulation magnétique trans-spinale pouvait être une méthode d'évaluation non-invasive, fiable et reproductible pour évaluer la fonction et l'intégrité d'un nerf périphérique grâce à notre modèle de trauma du nerf tibial. Nous avons en effet enregistré une perte d'amplitude des PEM du muscle gastrocnémien gauche dans les cinq minutes qui ont succédé à l'écrasement du nerf tibial du même côté. Aucune récupération spontanée n'a pu être observée sept jours post-écrasement, et la section du nerf n'a pas induit de modification des PEM résiduels enregistrés, démontrant que l'écrasement a bien lésé une majorité des fibres nerveuses tibiales. Le modèle le plus utilisé pour étudier la physiopathologie des lésions du système nerveux périphérique et les potentielles thérapeutiques associées est l'écrasement du nerf sciatique chez le rat (Alvites et al., 2018). Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de réaliser un écrasement du nerf tibial, celui-ci étant une des ramifications du nerf sciatique et innervant spécifiquement le muscle gastrocnémien. En effet, la bobine de stimulation magnétique étant de taille importante, nous avons préféré éloigner au maximum le site de lésion du nerf de la bobine pour éviter que le champ magnétique ne puisse stimuler la zone sous-lésionnelle, ce qui aurait induit un biais dans les données obtenues. Les méthodes d'évaluations utilisées *in vivo* utilisent principalement des techniques d'électrophysiologies invasives, tel que l'enregistrement des PEM induits par stimulation électrique. Cette technique est celle sur laquelle nous nous sommes basés pour notre étude, la différence résidant dans l'aspect non-invasif de la stimulation magnétique par rapport à la stimulation électrique qui elle requiert de stimuler directement le nerf (Alvites et al., 2018). Nos résultats ont par la suite été

confirmés *ex vivo* par histologie. Nous avons en effet observé d'une part une réduction de la surface occupée par la myéline, mais aussi que la myéline restante semble atrophiée et fusionnée avec les fibres nerveuses visibles. Cette absence de récupération fonctionnelle à sept jours post-écrasement rejoint les conclusions d'autres études qui ont montré qu'une récupération pouvait être observée à partir de huit semaines post-lésion (Bridge et al., 1994), et que des signes de réinnervations étaient visibles autour de trois à quatre semaines post-écrasement (Kemp et al., 2017).

Il serait donc intéressant de vérifier à quel point les PEM du muscle gastrocnémien induits par stimulation magnétique trans-spinale peuvent être utiles pour évaluer la récupération fonctionnelle spontanée du nerf lésé à des temps plus long post-trauma. De plus, l'utilisation de protocoles de stimulation magnétique trans-spinale répétée pourraient être utilisés comme potentielles thérapeutiques, les techniques de stimulation de nerf ayant déjà montré des effets bénéfiques dans les processus de régénération et de récupération fonctionnelle (Alvites et al., 2018).

2.3. Effet d'un traitement au 2-Déoxy-D-Glucose sur les fonctions respiratoire et cardiovasculaire

L'inflammation qui se met en place dans la moelle épinière après trauma spinal est connue pour être l'un des facteurs limitants les processus de plasticité neuronale, et donc de récupération fonctionnelle (Bradbury and Burnside, 2019). Le 2-DG est une molécule entrant en compétition avec le glucose pour sa métabolisation, mais ayant pour caractéristique de s'accumuler dans la cellule sous forme de 2-DG-6-phosphate qui va alors inhiber en partie l'activité de l'hexokinase et de la phosphoglucose isomerase (Wick et al., 1957). Il en résulte alors une réduction des processus de glycolyse. Or, les processus inflammatoires nécessitent un apport important en énergie, c'est-à-dire une activité glycolytique importante (York et al., 2021). Nous avons donc tenté de réduire l'inflammation qui se met en place après trauma spinal en via une réduction de la glycolyse par administration de 2-DG dans notre modèle d'hémisection en C2 chez le rat, et observé ses effets sur les paramètres respiratoires et cardiovasculaires.

Nos résultats montrent que contrairement à notre hypothèse de départ, notre traitement au 2-DG n'induit aucun effet, qu'il soit bénéfique ou néfaste, chez nos animaux lésés. En revanche, ce traitement a des effets ventilatoires, cardiovasculaires et moléculaires inattendu chez nos animaux Sham, effets qui pourraient refléter une inflammation généralisée induite par le 2-DG chez ces animaux. En effet, notre traitement journalier au 2-DG pendant sept jours induit une augmentation du volume courant et du volume minute associé chez les animaux traités au 2-DG par rapport aux animaux non-traités (NaCl 0,9%), qu'ils soient Sham ou lésés en C2, sans effet sur l'activité diaphragmatique. Or il a

été montré qu'une inflammation généralisée induite par une injection de LPS avait un effet sur la ventilation chez le rat (Huxtable et al., 2011). Lors d'une inflammation, l'activité mitochondriale est augmentée, ce qui requiert une augmentation de la consommation d'oxygène et pourrait donc expliquer nos résultats, et serait vérifiable par pléthysmographie métabolique. L'augmentation du volume courant en absence d'augmentation de l'activité diaphragmatique pourrait s'expliquer quant à elle par un recrutement des muscles respiratoires accessoires.

Une pression artérielle élevée est de plus observée chez les animaux Sham traités au 2-DG. Cette observation peut être corrélée avec l'aspect ventilatoire, dans le sens où l'oxygène est délivré à l'organisme via le système sanguin. Une augmentation de la pression artérielle pourrait donc être le reflet d'un besoin de délivrer l'oxygène plus rapidement. Cette hypothèse reste cependant à vérifier, par exemple par la technique d'échocardiographie qui pourrait permettre d'obtenir des valeurs de débit cardiaque, ainsi que de vérifier la fonction cardiaque. Il a en effet été montré que le 2-DG pouvait induire des effets cardiotoxiques (Minor et al., 2010; Terse et al., 2016), ou même cardiorespiratoires (Vijayaraghavan et al., 2006) chez le rat et chez la souris.

Enfin, l'expression des CSPG est aussi significativement augmentée dans la corne antérieure de la moelle épinière C3-C6 chez les animaux Sham traités au 2-DG par rapport aux autres groupes. Les CSPG font partie de la matrice extracellulaire entourant les neurones, et sont connus pour être exprimés à l'état basal afin d'éviter les processus aberrants de plasticité. Ils sont de plus surexprimés par les astrocytes réactifs en cas d'inflammation du système nerveux central, comme dans le cas d'un trauma spinal (Kwok et al., 2011). Nos résultats semblent donc aller dans le sens d'un état inflammatoire qui se serait mis en place dans la moelle épinière C3-C6 en raison du traitement au 2-DG, ce qui reste à confirmer par l'étude d'autres marqueurs de l'inflammation tels que l'expression de iNOS ou de la NADPH-oxydase, ou encore de l'activation des cellules microgliales ou de la présence de macrophages dans cette zone, à l'image de ce qui a été réalisé dans ce travail doctoral (partie résultats 1.3.). La variation dans le métabolisme énergétique supposée des animaux pourrait aussi être vérifiée par l'étude de l'expression de l'AMPK ou de mTOR, molécules clef et senseurs du métabolisme énergétique cellulaire, par exemple au niveau des neurones, des astrocytes potentiellement devenus réactifs ou encore des cellules microgliales potentiellement activées.

Mis à part pour la ventilation, les effets apparemment négatifs de notre traitement au 2-DG ne sont pas retrouvés chez les animaux lésés traités au 2-DG. Cette observation pourrait cependant s'expliquer par le fait que les animaux lésés présentent une dysfonction systolique comme nous l'avons montré dans ce travail doctoral (partie résultats 1.2.), ce qui pourrait empêcher l'augmentation de pression artérielle observée chez les animaux Sham. En ce qui concerne la sur expression de CSPG, les processus inflammatoires qui se mettent en place en raison de la lésion spinale pourraient supplanter les processus inflammatoires induits par le 2-DG, empêchant celui-ci d'induire les mêmes effets que

ceux observés chez les animaux Sham. Cette hypothèse d'une inflammation généralisée induite par le 2-DG chez les animaux Sham reste cependant à vérifier, plusieurs études n'ayant en effet pas observé d'effet toxique du 2-DG (Stafstrom et al., 2009; Ockuly et al., 2012).

2.4. Effet de protocoles d'exercice sur l'activité respiratoire

Les données présentées dans ce projet montrent d'une part que la composition des fibres musculaires est modifiée après hémisection spinale en C2 chez la souris C57BL/6, ce qui peut conduire à une atrophie musculaire, en particulier diaphragmatique, et d'autre part qu'un entraînement locomoteur forcé en aérobie de six semaines sur roue d'exercice permet d'induire des modifications dans la composition de ces fibres musculaires, permettant d'induire une résistance à la fatigue musculaire, ce qui participe à la récupération de la capacité de course chez ces souris lésées.

Pour les muscles locomoteurs étudiés, c'est-à-dire le muscle extenseur des doigts, le muscle tibial antérieur et le muscle soléaire, le protocole d'exercice n'induit aucune variation de la taille des fibres. Une plus grande vascularisation de ces muscles est cependant observée. Le type d'exercice utilisé ici est caractérisé par des contractions musculaires répétées, soutenues et d'intensité faible sur une période prolongée. La contraction d'un muscle squelettique est connue pour induire une production de radicaux libres (ROS entre autres) par la mitochondrie, l'augmentation d'activité de cette dernière étant requise lors d'un exercice. Or, les voies conduisant au remodelage des fibres musculaires sont régulées en partie par les ROS (Qaisar et al., 2016). Nous nous attendions donc à ce que notre protocole d'exercice ait un impact sur la taille ou la composition des fibres musculaires des muscles locomoteurs, d'autant que d'autres protocoles d'exercice similaires, mais incrémentaux, ont induit une modification de la taille des fibres musculaires de muscles locomoteurs chez des souris après trauma spinal thoracique (Battistuzzo et al., 2017). Cette absence d'effet de notre protocole sur le remodelage des fibres musculaires pourrait s'expliquer par un exercice de trop faible intensité, ou en tout cas sans changement de difficulté au cours du temps, et pouvant être supporté dans le temps uniquement par un meilleur apport en oxygène des fibres, caractérisé dans ce travail par l'augmentation de la vascularisation observée chez les souris entraînées par rapport aux souris non entraînées.

En ce qui concerne le muscle diaphragmatique, son activité est réduite, voire abolie du côté lésé, ce qui est typique du modèle utilisé dans ce travail doctoral (Michel-Flutot et al., 2021a), et décrit dans la littérature (Minor et al., 2006; Vinit et al., 2006; Mantilla et al., 2013b). Au niveau de la composition de ses fibres musculaires, des fibres de type I et IIa ont été identifiées dans ce travail, les fibres non marquées correspondant aux fibres de type IIb/x. Nous avons ainsi pu observer que la distribution globale des fibres est modifiée entre le côté intact et le côté lésé chez les souris lésées non

entraînées, ce qui correspond à une forme de plasticité neuromusculaire due à la perte d'activité des motoneurones phréniques déafférentés. Ces résultats sont donc cohérents avec les données de la littérature indiquant qu'une inactivité musculaire diaphragmatique peut conduire à une modification de la taille et de la distribution des types de fibres présentes quarante-deux jours après hémisection en C2 chez le rat (Mantilla et al., 2013b).

Le protocole d'exercice utilisé induit ici une augmentation de la vascularisation, ainsi qu'une réduction de la taille des fibres IIa du muscle diaphragmatique du côté intact chez les souris lésées entraînées par rapport aux non entraînées, ce type de fibres étant glycolytique et oxydatif avec une contraction rapide (Qaisar et al., 2016). Cette réduction doit être le reflet d'une réduction de leur utilisation au profit des fibres de type I par exemple, qui elles ont un métabolisme surtout oxydatif et sont à contraction lente, ce qui permet d'avoir un effort maintenu dans la durée (Qaisar et al., 2016). Cette adaptation chez le diaphragme non paralysé a peut-être eu lieu afin de lui permettre de mieux compenser pour la perte d'activité du diaphragme paralysé durant le protocole d'exercice, les souris devant augmenter leur oxygénation.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent qu'un protocole d'exercice forcé en aérobie permet d'améliorer la vascularisation diaphragmatique, et de modifier la composition en fibres de l'hémidiaphragme non paralysé afin de mieux compenser pour la perte d'activité de l'hémidiaphragme paralysé. Ce protocole ne permet néanmoins pas d'observer une quelconque récupération fonctionnelle respiratoire. Un protocole d'une durée supérieure, ou d'intensité incrémentale pourrait peut-être permettre d'obtenir de meilleurs résultats, d'autant que les réseaux neuronaux locomoteurs et respiratoires sont liés. En effet, l'augmentation du rythme locomoteur est associée à une augmentation du rythme respiratoire *ex vivo* sur préparation de moelle épinière isolée (Le Gal et al., 2020), et *in vivo*, un exercice physique induit une augmentation de la consommation d'O₂ et de la production de CO₂, et donc une variation du pH sanguin. Cela conduit donc à l'activation des récepteurs présents sur les corps carotidiens et donc une augmentation du rythme respiratoire comme détaillé précédemment (Chapitre « PLASTICITE POST-LESIONNELLE DANS LES SYSTEMES NEURORESPIRATOIRE ET CARDIOVASCULAIRE », partie 1.1.4.). Un protocole permettant une meilleure interaction entre ces réseaux devrait donc peut-être permettre d'induire de la plasticité dans le réseau respiratoire, et donc au moins de renforcer des connexions résiduelles entre les neurones respiratoires du tronc cérébral et les motoneurones phréniques.

En conclusion, ce travail doctoral a permis de démontrer que l'échographie est une méthode d'évaluation non-invasive et fiable permettant d'évaluer l'activité diaphragmatique chez des rats sains, mais aussi dans un cadre pathologique comme après trauma spinal cervical. Nous avons aussi montré que chez notre modèle d'hémisection spinale en C2 chez le rat, un déficit systolique est observé à sept

jours post-lésion. Nous avons aussi apporté des précisions sur les processus inflammatoires qui se mettent en place dans la moelle épinière C3-C6 dans la zone des motoneurones phrénique. Chez notre modèle de souris hémilésé en C2, une paralysie hémidiaphragmatique permanente est observée jusqu'à au moins un mois post-lésion. Nous avons de plus mis en évidence la formation de pièges extracellulaires par les neutrophiles infiltrants, ainsi que par les cellules microgliales activées au niveau de la zone lésionnelle à un jour post-lésion. Tous ces résultats ont donc contribué à améliorer les connaissances sur la physiopathologie des traumatismes médullaires cervicaux chez le rat et chez la souris. En ce qui concerne les thérapeutiques étudiées dans ce travail doctoral, l'administration de 2-DG n'a pas montré d'effet positif chez les rats lésés, mais a en revanche montré des effets négatifs chez les rats sains, indiquant que ce composé pourrait avoir de potentiels effets neurotoxiques. Le protocole d'exercice en aérobic utilisé chez les souris lésées en C2 n'a induit aucune amélioration fonctionnelle respiratoire chez les animaux, mais permettrait néanmoins d'augmenter la vascularisation du diaphragme et de modifier le type de fibres musculaires présentes pour permettre une meilleure compensation par le diaphragme intact. Enfin en ce qui concerne le traitement rTMS utilisé, celui-ci, délivré de façon unique, permet d'augmenter l'excitabilité du réseau phrénique chez des rats sains anesthésiés. Délivré de façon chronique chez des rats hémilésés en C2, il permet de renforcer l'activité de l'hémidiaphragme intact afin de mieux compenser pour la perte d'activité de l'hémidiaphragme lésé. Un renforcement des voies croisées phréniques a de plus pu être observé après un mois de traitement par rTMS, même si celui-ci n'a pas d'effet sur l'activité de l'hémidiaphragme paralysé. Ainsi, nos résultats montrent que les protocoles thérapeutiques étudiés, si adaptés et améliorés, pourraient être utilisés seuls ou même mieux, combinés avec d'autres thérapeutiques prometteuses afin de mettre au point de potentielles stratégies visant à induire une récupération fonctionnelle respiratoire et cardiovasculaire après trauma spinal cervical.

REFERENCES

- Adams MM, Hicks AL (2005) Spasticity after spinal cord injury. *Spinal Cord* 43:577-586.
- Aftanas LI, Gevorgyan MM, Zhanaeva SY, Dzemidovich SS, Kulikova KI, Al'perina EL, Danilenko KV, Idova GV (2018) Therapeutic Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) on Neuroinflammation and Neuroplasticity in Patients with Parkinson's Disease: a Placebo-Controlled Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 165:195-199.
- Agarwal S, Loder SJ, Cholok D, Li J, Bian G, Yalavarthi S, Li S, Carson WF, Hwang C, Marini S, Pagani C, Edwards N, Delano MJ, Standiford TJ, Knight JS, Kunkel SL, Mishina Y, Ward PA, Levi B (2019) Disruption of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Links Mechanical Strain to Post-traumatic Inflammation. *Frontiers in immunology* 10:2148-2148.
- Agrawal I, Sharma N, Saxena S, Arvind S, Chakraborty D, Chakraborty DB, Jha D, Ghatak S, Epari S, Gupta T, Jha S (2021) Dopamine induces functional extracellular traps in microglia. *iScience* 24:101968.
- Aisaka A, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Kimura H, Shimada M (1999) Two modes of corticospinal reinnervation occur close to spinal targets following unilateral lesion of the motor cortex in neonatal hamsters. *Neuroscience* 90:53-67.
- Albregues J et al. (2018) Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* 361.
- Alilain WJ, Goshgarian HG (2007) MK-801 upregulates NR2A protein levels and induces functional recovery of the ipsilateral hemidiaphragm following acute C2 hemisection in adult rats. *J Spinal Cord Med* 30:346-354.
- Alilain WJ, Goshgarian HG (2008) Glutamate receptor plasticity and activity-regulated cytoskeletal associated protein regulation in the phrenic motor nucleus may mediate spontaneous recovery of the hemidiaphragm following chronic cervical spinal cord injury. *Experimental neurology* 212:348-357.
- Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J (2011) Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* 475:196-200.
- Allen A (1914) REMARKS ON THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE SPINAL CORD DUE TO IMPACT. AN EXPERIMENTAL STUDY. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 41:141-147.
- Allen AM (2002) Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension* 39:275-280.
- Allen AR (1911) SURGERY OF EXPERIMENTAL LESION OF SPINAL CORD EQUIVALENT TO CRUSH INJURY OF FRACTURE DISLOCATION OF SPINAL COLUMN: A PRELIMINARY REPORT. *Journal of the American Medical Association* LVII:878-880.
- Allen LL, Seven YB, Baker TL, Mitchell GS (2019) Cervical spinal contusion alters Na(+)-K(+)2Cl- and K(+)-Cl- cation-chloride cotransporter expression in phrenic motor neurons. *Respiratory physiology & neurobiology* 261:15-23.
- Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Grãos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ* 12:1329-1343.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573-591.
- Alunni A, Bally-Cuif L (2016) A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development* 143:741-753.
- Alvites R, Rita Caseiro A, Santos Pedrosa S, Vieira Branquinho M, Ronchi G, Geuna S, Varejão ASP, Colette Maurício A (2018) Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Medicine* 5:1466404.
- Amini P, Stojkov D, Felser A, Jackson CB, Courage C, Schaller A, Gelman L, Soriano ME, Nuoffer JM, Scorrano L, Benarafa C, Yousefi S, Simon HU (2018) Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nat Commun* 9:2958.
- Anderson TM, Garcia AJ, 3rd, Baertsch NA, Pollak J, Bloom JC, Wei AD, Rai KG, Ramirez JM (2016) A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature* 536:76-80.
- Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157.
- Ankeny DP, Guan Z, Popovich PG (2009) B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J Clin Invest* 119:2990-2999.
- Ashhad S, Feldman JL (2020) Emergent Elements of Inspiratory Rhythmogenesis: Network Synchronization and Synchrony Propagation. *Neuron* 106:482-497.e484.
- Ashrafi G, Schwarz TL (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20:31-42.
- Aydin-Abidin S, Trippe J, Funke K, Eysel UT, Benali A (2008) High- and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation differentially activates c-Fos and zif268 protein expression in the rat brain. *Exp Brain Res* 188:249-261.
- Babic T, Ciriello J (2004) Medullary and spinal cord projections from cardiovascular responsive sites in the rostral ventromedial medulla. *J Comp Neurol* 469:391-412.
- Bach KB, Mitchell GS (1996) Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respiration Physiology* 104:251-260.
- Bach KB, Mitchell GS (1998) Hypercapnia-induced long-term depression of respiratory activity requires alpha2-adrenergic receptors. *J Appl Physiol* (1985) 84:2099-2105.
- Bach KB, Kinkead R, Mitchell GS (1999) Post-hypoxia frequency decline in rats: sensitivity to repeated hypoxia and alpha2-adrenoreceptor antagonism. *Brain research* 817:25-33.
- Baker-Herman TL, Mitchell GS (2002) Phrenic Long-Term Facilitation Requires Spinal Serotonin Receptor Activation and Protein Synthesis. *The Journal of Neuroscience* 22:6239-6246.
- Baldwin SA, Broderick R, Blades DA, Scheff SW (1998) Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP- and vimentin-positive astrocytes after spinal cord contusion with the New York University spinal cord injury device. *Journal of neurotrauma* 15:1015-1026.
- Ballerma M, Fouad K (2006) Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *European Journal of Neuroscience* 23:1988-1996.
- Bareyre FM, Schwab ME (2003) Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends in neurosciences* 26:555-563.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Misgeld T, Sanes JR (2005) Transgenic labeling of the corticospinal tract for monitoring axonal responses to spinal cord injury. *Nat Med* 11:1355-1360.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nature neuroscience* 7:269-277.
- Baroncelli L, Lunghi C (2021) Neuroplasticity of the visual cortex: in sickness and in health. *Experimental neurology* 335:113515.
- Barron T, Kim JH (2019) Neuronal input triggers Ca(2+) influx through AMPA receptors and voltage-gated Ca(2+) channels in oligodendrocytes. *Glia* 67:1922-1932.
- Barth TM, Stanfield BB (1990) The recovery of forelimb-placing behavior in rats with neonatal unilateral cortical damage involves the remaining hemisphere. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:3449-3459.

- Bartus K, James ND, Bosch KD, Bradbury EJ (2012) Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Experimental neurology* 235:5-17.
- Bartus K, James ND, Didangelos A, Bosch KD, Verhaagen J, Yanez-Munoz RJ, Rogers JH, Schneider BL, Muir EM, Bradbury EJ (2014) Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:4822-4836.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma* 12:1-21.
- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG (2006) Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of neurotrauma* 23:635-659.
- Basura GJ, Nantwi KD, Goshgarian HG (2002) Theophylline-induced respiratory recovery following cervical spinal cord hemisection is augmented by serotonin 2 receptor stimulation. *Brain research* 956:1-13.
- Basura GJ, Zhou S-Y, Walker PD, Goshgarian HG (2001) Distribution of Serotonin 2A and 2C Receptor mRNA Expression in the Cervical Ventral Horn and Phrenic Motoneurons Following Spinal Cord Hemisection. *Experimental neurology* 169:255-263.
- Battistuzzo CR, Rank MM, Flynn JR, Morgan DL, Callister R, Callister RJ, Galea MP (2017) Effects Of treadmill training on hindlimb muscles of spinal cord-injured mice. *Muscle & nerve* 55:232-242.
- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moysé E (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130:75-90.
- Baussart B, Stamegna JC, Polentes J, Tadié M, Gauthier P (2006) A new model of upper cervical spinal contusion inducing a persistent unilateral diaphragmatic deficit in the adult rat. *Neurobiology of disease* 22:562-574.
- Bédard A, Gravel C, Parent A (2006) Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates. *Exp Brain Res* 170:501-512.
- Belci M, Catley M, Husain M, Frankel HL, Davey NJ (2004) Magnetic brain stimulation can improve clinical outcome in incomplete spinal cord injured patients. *Spinal Cord* 42:417-419.
- Bellver-Landete V, Bretheau F, Mailhot B, Vallières N, Lessard M, Janelle ME, Vernoux N, Tremblay M, Fuehrmann T, Shoichet MS, Lacroix S (2019) Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat Commun* 10:518.
- Benali A, Trippe J, Weiler E, Mix A, Petrasch-Parwez E, Girzalsky W, Eysel UT, Erdmann R, Funke K (2011) Theta-burst transcranial magnetic stimulation alters cortical inhibition. *J Neurosci* 31:1193-1203.
- Benito J, Kumru H, Murillo N, Costa U, Medina J, Tormos JM, Pascual-Leone A, Vidal J (2012) Motor and gait improvement in patients with incomplete spinal cord injury induced by high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 18:106-112.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* 10:138-145.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11464-11469.
- Bernstein DR, Stelzner DJ (1983) Plasticity of the corticospinal tract following midthoracic spinal injury in the postnatal rat. *J Comp Neurol* 221:382-400.
- Bernstein ME, Bernstein JJ (1973) Regeneration of axons and synaptic complex formation rostral to the site of hemisection in the spinal cord of the monkey. *Int J Neurosci* 5:15-26.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.
- Bezudnaya T, Lane MA, Marchenko V (2018) Paced breathing and phrenic nerve responses evoked by epidural stimulation following complete high cervical spinal cord injury in rats. *J Appl Physiol* (1985) 125:687-696.
- Biering-Sorensen F, Biering-Sorensen T, Liu N, Malmqvist L, Wecht JM, Krassioukov A (2017) Alterations in cardiac autonomic control in spinal cord injury. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*.
- Binda P, Kurzawski JW, Lunghi C, Biagi L, Tosetti M, Morrone MC (2018) Response to short-term deprivation of the human adult visual cortex measured with 7T BOLD. *eLife* 7.
- Bisgard GE (2000) Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respiration Physiology* 121:237-246.
- Blanquie O, Bradke F (2018) Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 51:60-69.
- Bliss TVP, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Blough HA, Giuntoli RL (1979) Successful treatment of human genital herpes infections with 2-deoxy-D-glucose. *JAMA* 241:2798-2801.
- Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20:70-78.
- Bochorishvili G, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG (2012) Pre-Bötzing complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. *Journal of Comparative Neurology* 520:1047-1061.
- Boeltz S et al. (2019) To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 26:395-408.
- Bonizzato M, James ND, Pidpruzhnykova G, Pavlova N, Shkorbatova P, Baud L, Martinez-Gonzalez C, Squair JW, DiGiovanna J, Barraud Q, Micera S, Courtine G (2021) Multi-pronged neuromodulation intervention engages the residual motor circuitry to facilitate walking in a rat model of spinal cord injury. *Nat Commun* 12:1925.
- Boulenguez P, Gauthier P, Kastner A (2007a) Respiratory neuron subpopulations and pathways potentially involved in the reactivation of phrenic motoneurons after C2 hemisection. *Brain research* 1148:96-104.
- Boulenguez P, Gestreau C, Vinit S, Stamegna J-C, Kastner A, Gauthier P (2007b) Specific and artifactual labeling in the rat spinal cord and medulla after injection of monosynaptic retrograde tracers into the diaphragm. *Neuroscience Letters* 417:206-211.
- 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.
- Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S (2003) MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:805-814.
- Bradbury EJ, Burnside ER (2019) Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nat Commun* 10:3879.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
- Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K (2010) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200:125-140.

- Bravo G, Rojas-Martínez R, Larios F, Hong E, Castañeda-Hernández G, Rojas G, Guízar-Sahagún G (2001) Mechanisms involved in the cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury. *Life Sci* 68:1527-1534.
- Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C (1994) Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. *Experimental neurology* 127:284-290.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
- Brockes JP, Kumar A (2008) Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:525-549.
- Brouwer B, Bugaresti J, Ashby P (1992) Changes in corticospinal facilitation of lower limb spinal motor neurons after spinal cord lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:20-24.
- Brown A, Ricci MJ, Weaver LC (2004) NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Experimental neurology* 188:115-127.
- Bryant TH, Yoshida S, de Castro D, Lipski J (1993) Expiratory neurons of the Bötzing Complex in the rat: a morphological study following intracellular labeling with biocytin. *J Comp Neurol* 335:267-282.
- Cajal S (1930) Degeneration and Regeneration of the Nervous System. *Nature* 125:230-231.
- Cameron WE, Averill DB, Berger AJ (1983) Morphology of cat phrenic motoneurons as revealed by intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 219:70-80.
- Campos LW, Chakrabarty S, Haque R, Martin JH (2008) Regenerating motor bridge axons refine connections and synapse on lumbar motoneurons to bypass chronic spinal cord injury. *J Comp Neurol* 506:838-850.
- Capogna M (1998) Presynaptic facilitation of synaptic transmission in the hippocampus. *Pharmacol Ther* 77:203-223.
- Capogrosso M, Wenger N, Raspopovic S, Musienko P, Beauparlant J, Bassi Luciani L, Courtine G, Micera S (2013) A computational model for epidural electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:19326-19340.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends in neurosciences* 28:436-445.
- Carson RG, Ruddy KL, McNickle E (2016) What Do TMS-Evoked Motor Potentials Tell Us About Motor Learning? *Advances in experimental medicine and biology* 957:143-157.
- Castro-Moure F, Goshgarian HG (1997) Morphological plasticity induced in the phrenic nucleus following cervical cold block of descending respiratory drive. *Experimental neurology* 147:299-310.
- Chalfouh C, Guillou C, Hardouin J, Delarue Q, Li X, Duclos C, Schapman D, Marie JP, Cosette P, Guérout N (2020) The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect. *Neurotherapeutics*.
- Chang CW, Shieh SF, Li CM, Wu WT, Chang KF (2006) Measurement of motor nerve conduction velocity of the sciatic nerve in patients with piriformis syndrome: a magnetic stimulation study. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 87:1371-1375.
- Chatfield PO, Mead S (1948) Role of the vagi in the crossed phrenic phenomenon. *Am J Physiol* 154:417-422.
- Cheeran B, Talelli P, Mori F, Koch G, Suppa A, Edwards M, Houlden H, Bhatia K, Greenwood R, Rothwell JC (2008) A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol* 586:5717-5725.
- Chen GY, Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10:826-837.
- Cheng L, Sami A, Ghosh B, Urban MW, Heinsinger NM, Liang SS, Smith GM, Wright MC, Li S, Lepore AC (2021a) LAR inhibitory peptide promotes recovery of diaphragm function and multiple forms of respiratory neural circuit plasticity after cervical spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 147:105153.
- Cheng X, Yu Z, Xu J, Quan D, Long H (2021b) Pathophysiological Changes and the Role of Notch-1 Activation After Decompression in a Compressive Spinal Cord Injury Rat Model. *Front Neurosci* 15:579431.
- Chevalier M, Toporikova N, Simmers J, Thoby-Brisson M (2016) Development of pacemaker properties and rhythmogenic mechanisms in the mouse embryonic respiratory network. *eLife* 5.
- Chiba A, Oshio K, Inase M (2003) Magnetically evoked EMGs in rats. *Neurol Res* 25:87-91.
- Chklovskii DB, Mel BW, Svoboda K (2004) Cortical rewiring and information storage. *Nature* 431:782-788.
- Choi DW (2020) Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Front Neurosci* 14:579953.
- Chou YH, Hickey PT, Sundman M, Song AW, Chen NK (2015) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor symptoms in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol* 72:432-440.
- Christensen MD, Hulsebosch CE (1997) Spinal cord injury and anti-NGF treatment results in changes in CGRP density and distribution in the dorsal horn in the rat. *Experimental neurology* 147:463-475.
- Christiansen L, Chen B, Lei Y, Urbin MA, Richardson MSA, Oudega M, Sandhu M, Rymer WZ, Trumbower RD, Mitchell GS, Perez MA (2021) Acute intermittent hypoxia boosts spinal plasticity in humans with tetraplegia. *Experimental neurology* 335:113483.
- Ciesla MC, Seven YB, Allen LL, Smith KN, Asa ZA, Simon AK, Holland AE, Santiago JV, Stefan K, Ross A, Gonzalez-Rothi EJ, Mitchell GS (2021) Serotonergic innervation of respiratory motor nuclei after cervical spinal injury: Impact of intermittent hypoxia. *Experimental neurology* 338:113609.
- Clarac F, Vinay L, Cazalets JR, Fady JC, Jamon M (1998) Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Res Brain Res Rev* 28:35-43.
- Classen J, Liepert J, Wise SP, Hallett M, Cohen LG (1998) Rapid plasticity of human cortical movement representation induced by practice. *J Neurophysiol* 79:1117-1123.
- Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, Du J, Aykin-Burns N, Smith BJ, Li L, Spitz DR, Cullen JJ (2008) 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med* 44:322-331.
- Connor SA, Wang YT (2016) A Place at the Table: LTD as a Mediator of Memory Genesis. *Neuroscientist* 22:359-371.
- Coomer CA, Carlon-Andres I, Iliopoulou M, Dustin ML, Compeer EB, Compton AA, Padilla-Parra S (2020) Single-cell glycolytic activity regulates membrane tension and HIV-1 fusion. *PLoS Pathog* 16:e1008359.
- Cooney SJ, Zhao Y, Byrnes KR (2014) Characterization of the expression and inflammatory activity of NADPH oxidase after spinal cord injury. *Free Radic Res* 48:929-939.
- Coote JH (1988) The organisation of cardiovascular neurons in the spinal cord. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 110:147-285.
- Coote JH (2007) Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system. *Exp Physiol* 92:3-18.
- Coote JH, Spyer KM (2018) Central control of autonomic function. *Brain Neurosci Adv* 2:2398212818812012-2398212818812012.
- Cormier CM, Mukhida K, Walker G, Marsh DR (2010) Development of autonomic dysreflexia after spinal cord injury is associated with a lack of serotonergic axons in the intermediolateral cell column. *Journal of neurotrauma* 27:1805-1818.

- Côté MP, Amin AA, Tom VJ, Houle JD (2011) Peripheral nerve grafts support regeneration after spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 8:294-303.
- Courtine G, Roy RR, Raven J, Hodgson J, McKay H, Yang H, Zhong H, Tuszynski MH, Edgerton VR (2005) Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain : a journal of neurology* 128:2338-2358.
- Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR, Sofroniew MV (2008) Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* 14:69-74.
- Courtney RJ, Steiner SM, Benyesh-Melnick M (1973) Effects of 2-deoxy-D-glucose on herpes simplex virus replication. *Virology* 52:447-455.
- Coxon JP, Peat NM, Byblow WD (2014) Primary motor cortex disinhibition during motor skill learning. *J Neurophysiol* 112:156-164.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J (2014) Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology* 253:197-207.
- Cullen CL, Senesi M, Tang AD, Clutterbuck MT, Auderset L, O'Rourke ME, Rodger J, Young KM (2019) Low-intensity transcranial magnetic stimulation promotes the survival and maturation of newborn oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Glia* 67:1462-1477.
- Currie KD, West CR, Krassioukov AV (2016) Differences in Left Ventricular Global Function and Mechanics in Paralympic Athletes with Cervical and Thoracic Spinal Cord Injuries. *Front Physiol* 7:110.
- Dale-Nagle EA, Hoffman MS, MacFarlane PM, Mitchell GS (2010) Multiple pathways to long-lasting phrenic motor facilitation. *Advances in experimental medicine and biology* 669:225-230.
- Dale EA, Zhong H, Edgerton VR (2016) Cervical Spinal Stimulation and Respiratory Recovery after Upper Cervical Spinal Cord Injury. *The FASEB Journal* 30:1294.1297-1294.1297.
- Dale EA, Sunshine MD, Kelly MN, Mitchell GS, Fuller DD, Reier PJ (2019) Chronic, closed-loop, cervical epidural stimulation elicits plasticity in diaphragm motor output and upregulates spinal neurotrophic factor gene expression. *The FASEB Journal* 33:843.810-843.810.
- Darlot F, Vinit S, Matarazzo V, Kastner A (2017) Sustained cell body reactivity and loss of NeuN in a subset of axotomized bulbospinal neurons after a chronic high cervical spinal cord injury. *The European journal of neuroscience* 46:2729-2745.
- Darlot F, Cayetanot F, Gauthier P, Matarazzo V, Kastner A (2012) Extensive respiratory plasticity after cervical spinal cord injury in rats: axonal sprouting and rerouting of ventrolateral bulbospinal pathways. *Experimental neurology* 236:88-102.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8:752-758.
- David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214:931-933.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4563-4572.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, González-Barón S, Spyer KM (2001) Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetised rat. *Pflugers Arch* 441:434-443.
- Dawid Milner MS, Lara JP, López de Miguel MP, López-González MV, Spyer KM, González-Barón S (2003) A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. *Brain research* 982:108-118.
- de Goede AA, Ter Braack EM, van Putten M (2016) Single and paired pulse transcranial magnetic stimulation in drug naïve epilepsy. *Clin Neurophysiol* 127:3140-3155.
- de Groot PC, van Dijk A, Dijk E, Hopman MT (2006) Preserved cardiac function after chronic spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 87:1195-1200.
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenber MJ, Pasterkamp RJ, Gispen WH, Verhaagen J (2002) Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Experimental neurology* 175:61-75.
- Deason J, Robb LG (1911) ON THE PATHWAYS FOR THE BULBAR RESPIRATORY IMPULSES IN THE SPINAL CORD. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 28:57-63.
- Decherchi P, Gauthier P (2002) Regeneration of acutely and chronically injured descending respiratory pathways within post-traumatic nerve grafts. *Neuroscience* 112:141-152.
- Decherchi P, Lammari-Barreault N, Gauthier P (1996) Regeneration of respiratory pathways within spinal peripheral nerve grafts. *Experimental neurology* 137:1-14.
- Defrin R, Grunhaus L, Zamir D, Zeilig G (2007) The effect of a series of repetitive transcranial magnetic stimulations of the motor cortex on central pain after spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 88:1574-1580.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Feldman JL (2002) Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron* 34:821-830.
- Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL (2018) Breathing matters. *Nature reviews Neuroscience* 19:351-367.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:446-453.
- Delarue Q, Chalfouh C, Guérout N (2021) Spinal cord injury: can we repair spinal cord non-invasively by using magnetic stimulation? *Neural Regen Res* 16:2429-2430.
- Delarue Q, Mayeur A, Chalfouh C, Honoré A, Duclos C, Di Giovanni M, Li X, Salaun M, Dampierre J, Vaudry D, Marie JP, Guérout N (2020) Inhibition of ADAMTS-4 Expression in Olfactory Ensheathing Cells Enhances Recovery after Transplantation within Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 37:507-516.
- Demoule A, Verin E, Locher C, Derenne JP, Similowski T (2003) Validation of surface recordings of the diaphragm response to transcranial magnetic stimulation in humans. *J Appl Physiol* (1985) 94:453-461.
- Deramandt TB, Dill C, Bonay M (2013) Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. *Med Mal Infect* 43:100-107.
- DeVeau KM, Martin EK, King NT, Shum-Siu A, Keller BB, West CR, Magnuson DSK (2018) Challenging cardiac function post-spinal cord injury with dobutamine. *Auton Neurosci* 209:19-24.
- Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Calabresi P (2008) Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci* 29:402-412.
- Di Lazzaro V, Restuccia D, Oliviero A, Profice P, Ferrara L, Insola A, Mazzone P, Ttonali P, Rothwell JC (1998) Magnetic transcranial stimulation at intensities below active motor threshold activates intracortical inhibitory circuits. *Experimental Brain Research* 119:265-268.

- Dick TE, Coles SK (2000) Ventrolateral pons mediates short-term depression of respiratory frequency after brief hypoxia. *Respir Physiol* 121:87-100.
- Didangelos A, Iberl M, Vinsland E, Bartus K, Bradbury EJ (2014) Regulation of IL-10 by chondroitinase ABC promotes a distinct immune response following spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:16424-16432.
- DiMarco AF (2005) Restoration of respiratory muscle function following spinal cord injury. Review of electrical and magnetic stimulation techniques. *Respiratory physiology & neurobiology* 147:273-287.
- Dionísio A, Duarte IC, Patrício M, Castelo-Branco M (2018) The Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Stroke Rehabilitation: A Systematic Review. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 27:1-31.
- Ditterline BL, Wade S, Ugiliweneza B, Singam NSV, Harkema SJ, Stoddard MF, Hirsch GA (2020) Systolic and diastolic function in chronic spinal cord injury. *PLoS one* 15:e0236490.
- Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS (2004) Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord* 42:383-395.
- Dobbins EG, Feldman JL (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347:64-86.
- Donnelly DJ, Popovich PG (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental neurology* 209:378-388.
- Donoghue JP, Suner S, Sanes JN (1990) Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions. *Exp Brain Res* 79:492-503.
- Doperalski NJ, Fuller DD (2006) Long-term facilitation of ipsilateral but not contralateral phrenic output after cervical spinal cord hemisection. *Experimental neurology* 200:74-81.
- Doster RS, Rogers LM, Gaddy JA, Aronoff DM (2018) Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. *J Innate Immun* 10:3-13.
- Dougherty BJ, Lee KZ, Lane MA, Reier PJ, Fuller DD (2012a) Contribution of the spontaneous crossed-phrenic phenomenon to inspiratory tidal volume in spontaneously breathing rats. *J Appl Physiol* (1985) 112:96-105.
- Dougherty BJ, Lee KZ, Gonzalez-Rothi EJ, Lane MA, Reier PJ, Fuller DD (2012b) Recovery of inspiratory intercostal muscle activity following high cervical hemisection. *Respiratory physiology & neurobiology* 183:186-192.
- Dougherty BJ, Terada J, Springborn SR, Vinit S, MacFarlane PM, Mitchell GS (2018) Daily acute intermittent hypoxia improves breathing function with acute and chronic spinal injury via distinct mechanisms. *Respiratory physiology & neurobiology* 256:50-57.
- Driussi C, Lus A, Bizzarini E, Antonini-Canterin F, d'Andrea A, Bossone E, Vriz O (2014) Structural and functional left ventricular impairment in subjects with chronic spinal cord injury and no overt cardiovascular disease. *J Spinal Cord Med* 37:85-92.
- Dutschmann M, Herbert H (2006) The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *European Journal of Neuroscience* 24:1071-1084.
- Dutschmann M, Jones SE, Subramanian HH, Stanic D, Bautista TG (2014) The physiological significance of postinspiration in respiratory control. *Progress in brain research* 212:113-130.
- Dwarakanath B, Jain V (2009) Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. *Future Oncol* 5:581-585.
- Ebendal T (1976) The relative roles of contact inhibition and contact guidance in orientation of axons extending on aligned collagen fibrils in vitro. *Experimental Cell Research* 98:159-169.
- Eckenhoff MF, Rakic P (1988) Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8:2729-2747.
- Eidelberg EE (1973) Cardiovascular response to experimental spinal cord compression. *J Neurosurg* 38:326-331.
- El-Bohy AA, Goshgarian HG (1999) The use of single phrenic axon recordings to assess diaphragm recovery after cervical spinal cord injury. *Experimental neurology* 156:172-179.
- Ellenberger HH, Feldman JL (1988) Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats. *J Comp Neurol* 269:47-57.
- Ertürk A, Hellal F, Enes J, Bradke F (2007) Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9169-9180.
- Etiévant A, Manta S, Latapy C, Magno LA, Fecteau S, Beaulieu JM (2015) Repetitive transcranial magnetic stimulation induces long-lasting changes in protein expression and histone acetylation. *Scientific reports* 5:16873.
- Eysmann SB, Douglas PS, Katz SE, Sarkarati M, Wei JY (1995) Left ventricular mass and diastolic filling patterns in quadriplegia and implications for effects of normal aging on the heart. *Am J Cardiol* 75:201-203.
- Fagioli M, Hensch TK (2000) Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature* 404:183-186.
- Fan B, Wei Z, Yao X, Shi G, Cheng X, Zhou X, Zhou H, Ning G, Kong X, Feng S (2018) Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. *Cell Transplant* 27:853-866.
- Farooque A, Afrin F, Adhikari JS, Dwarakanath BS (2009) Protection of normal cells and tissues during radio- and chemosensitization of tumors by 2-deoxy-D-glucose. *J Cancer Res Ther* 5 Suppl 1:S32-35.
- Fawcett JW (2018) The Paper that Restarted Modern Central Nervous System Axon Regeneration Research. *Trends in neurosciences* 41:239-242.
- Fawcett JW, Schwab ME, Montani L, Brazda N, Müller HW (2012) Defeating inhibition of regeneration by scar and myelin components. *Handb Clin Neurol* 109:503-522.
- Faysoil A, Michel-Flutot P, Lofaso F, Carlier R, El Hajjam M, Vinit S, Mansart A (2021) Analysis of inspiratory and expiratory muscles using ultrasound in rats: A reproducible and non-invasive tool to study respiratory function. *Respir Physiol Neurobiol* 285:103596.
- Faysoil A, Behin A, Ognia A, Mompoint D, Amthor H, Clair B, Laforet P, Mansart A, Prigent H, Orlikowski D, Stojkovic T, Vinit S, Carlier R, Eymard B, Lofaso F, Annane D (2018) Diaphragm: Pathophysiology and Ultrasound Imaging in Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis* 5:1-10.
- Feldman JL, Loewy AD, Speck DF (1985) Projections from the ventral respiratory group to phrenic and intercostal motoneurons in cat: an autoradiographic study. *J Neurosci* 5:1993-2000.
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annual review of physiology* 75:423-452.
- Feldman JL, Smith JC, Ellenberger HH, Connelly CA, Liu GS, Greer JJ, Lindsay AD, Otto MR (1990) Neurogenesis of respiratory rhythm and pattern: emerging concepts. *Am J Physiol* 259:R879-886.
- Feliciano DM, Bordey A, Bonfanti L (2015) Noncanonical Sites of Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a018846.

- Felix ER, Cardenas DD, Bryce TN, Charlifue S, Lee TK, MacIntyre B, Mulroy S, Taylor H (2021) Prevalence and impact of neuropathic and non-neuropathic pain in chronic spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*.
- Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.
- Ferreira LM, Floriddia EM, Quadrato G, Di Giovanni S (2012) Neural regeneration: lessons from regenerating and non-regenerating systems. *Mol Neurobiol* 46:227-241.
- Filbin MT (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews Neuroscience* 4:703-713.
- Firkins SS, Bates CA, Stelzner DJ (1993) Corticospinal tract plasticity and astroglial reactivity after cervical spinal injury in the postnatal rat. *Experimental neurology* 120:1-15.
- Fischer I, Dulin JN, Lane MA (2020) Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. *Nature reviews Neuroscience*.
- Fitch MT, Silver J (1997) Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Experimental neurology* 148:587-603.
- Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, Unger T (1992) Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19:555-561.
- Flynn JR, Dunn LR, Galea MP, Callister R, Callister RJ, Rank MM (2013) Exercise training after spinal cord injury selectively alters synaptic properties in neurons in adult mouse spinal cord. *Journal of neurotrauma* 30:891-896.
- Forgione N, Chamankhah M, Fehlings MG (2017) A mouse model of bilateral cervical contusion-compression spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 34:1227-1239.
- Fouad K, Pedersen V, Schwab ME, Brösamle C (2001) Cervical sprouting of corticospinal fibers after thoracic spinal cord injury accompanies shifts in evoked motor responses. *Curr Biol* 11:1766-1770.
- Frenkel MY, Bear MF (2004) How monocular deprivation shifts ocular dominance in visual cortex of young mice. *Neuron* 44:917-923.
- Fuchs E, Flügge G (2014) Adult neuroplasticity: more than 40 years of research. *Neural Plast* 2014:541870.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231-241.
- Fujiki M, Steward O (1997) High frequency transcranial magnetic stimulation mimics the effects of ECS in upregulating astroglial gene expression in the murine CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 44:301-308.
- Fujiki M, Kobayashi H, Inoue R, Ishii K (2004) Immediate plasticity in the motor pathways after spinal cord hemisection: implications for transcranial magnetic motor-evoked potentials. *Experimental neurology* 187:468-477.
- Fuller DD, Mitchell GS (2017) Respiratory neuroplasticity – Overview, significance and future directions. *Experimental neurology* 287:144-152.
- Fuller DD, Zabka AG, Baker TL, Mitchell GS (2001) Selected Contribution: Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 90:2001-2006.
- Fuller DD, Johnson SM, Olson EB, Jr., Mitchell GS (2003) Synaptic pathways to phrenic motoneurons are enhanced by chronic intermittent hypoxia after cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 23:2993-3000.
- Fuller DD, Golder FJ, Olson EB, Jr., Mitchell GS (2006) Recovery of phrenic activity and ventilation after cervical spinal hemisection in rats. *J Appl Physiol* (1985) 100:800-806.
- Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS (2000) Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol* 121:135-146.
- Fuller DD, Baker-Herman TL, Golder FJ, Doperalski NJ, Watters JJ, Mitchell GS (2005) Cervical spinal cord injury upregulates ventral spinal 5-HT_{2A} receptors. *Journal of neurotrauma* 22:203-213.
- Fuller DD, Doperalski NJ, Dougherty BJ, Sandhu MS, Bolser DC, Reier PJ (2008) Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats. *Exp Neurol* 211:97-106.
- Fuller DD, Sandhu MS, Doperalski NJ, Lane MA, White TE, Bishop MD, Reier PJ (2009) Graded unilateral cervical spinal cord injury and respiratory motor recovery. *Respiratory physiology & neurobiology* 165:245-253.
- Furicchia JV, Goshgarian HG (1987) Dendritic organization of phrenic motoneurons in the adult rat. *Experimental neurology* 96:621-634.
- Furlan JC, Fehlings MG (2008) Cardiovascular complications after acute spinal cord injury: pathophysiology, diagnosis, and management. *Neurosurg Focus* 25:E13.
- Furlan JC, Fehlings MG, Shannon P, Norenberg MD, Krassioukov AV (2003) Descending vasomotor pathways in humans: correlation between axonal preservation and cardiovascular dysfunction after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 20:1351-1363.
- Gao W, Yu LG, Liu YL, Wang YZ, Huang XL (2015) Mechanism of GABA receptors involved in spasticity inhibition induced by transcranial magnetic stimulation following spinal cord injury. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 35:241-247.
- Gao W, Yu LG, Liu YL, Chen M, Wang YZ, Huang XL (2017) Effects of high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on KCC2 expression in rats with spasticity following spinal cord injury. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 37:777-781.
- García-Álías G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW (2009) Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nature neuroscience* 12:1145-1151.
- Garraway SM, Huie JR (2016) Spinal Plasticity and Behavior: BDNF-Induced Neuromodulation in Uninjured and Injured Spinal Cord. *Neural Plast* 2016:9857201.
- Garza-Lombó C, Schroder A, Reyes-Reyes EM, Franco R (2018) mTOR/AMPK signaling in the brain: Cell metabolism, proteostasis and survival. *Curr Opin Toxicol* 8:102-110.
- Gaudet AD, Popovich PG (2014) Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord. *Experimental neurology* 258:24-34.
- Gauthier P, Réga P, Lammari-Barreault N, Polentes J (2002) Functional reconnections established by central respiratory neurons regenerating axons into a nerve graft bridging the respiratory centers to the cervical spinal cord. *J Neurosci Res* 70:65-81.
- Gee CM, Williams AM, Sheel AW, Eves ND, West CR (2019) Respiratory muscle training in athletes with cervical spinal cord injury: effects on cardiopulmonary function and exercise capacity. *J Physiol* 597:3673-3685.
- Gensel JC, Zhang B (2015) Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain research* 1619:1-11.
- Gerasimenko YP, Azelev VD, Nikitin OA, Lavrov IA (2003) Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 33:247-254.
- Gerasimenko YP, Lavrov IA, Courtine G, Ichiyama RM, Dy CJ, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR (2006) Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats. *J Neurosci Methods* 157:253-263.
- Ghali MGZ (2017) The crossed phrenic phenomenon. *Neural Regen Res* 12:845-864.

- Girard SD, Dev ze A, Nivet E, Gepner B, Roman FS, F ron F (2011) Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *J Vis Exp*.
- Glazewski S, Giese KP, Silva A, Fox K (2000) The role of alpha-CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity. *Nature neuroscience* 3:911-918.
- Golder FJ, Mitchell GS (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 FJ, Reier PJ, Davenport PW, Bolser DC (2001) Cervical spinal cord injury alters the pattern of breathing in anesthetized rats. *J Appl Physiol* 91:2451-2458.
- Golder FJ, Fuller DD, Davenport PW, Johnson RD, Reier PJ, Bolser DC (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 FJ, Fuller DD, Lovett-Barr MR, Vinit S, Resnick DK, Mitchell GS (2011) Breathing patterns after mid-cervical spinal contusion in rats. *Experimental neurology* 231:97-103.
- Gondim FA, Lopes AC, Jr., Oliveira GR, Rodrigues CL, Leal PR, Santos AA, Rola FH (2004) Cardiovascular control after spinal cord injury. *Curr Vasc Pharmacol* 2:71-79.
- Gonzalez-Rothi EJ, Tadjalli A, Allen LL, Ciesla MC, Chami ME, Mitchell GS (2021) Protocol-Specific Effects of Intermittent Hypoxia Pre-Conditioning on Phrenic Motor Plasticity in Rats with Chronic Cervical Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 38:1292-1305.
- Gonzalez-Rothi EJ, Streeter KA, Hanna MH, Stamas AC, Reier PJ, Baekey DM, Fuller DD (2017) High-frequency epidural stimulation across the respiratory cycle evokes phrenic short-term potentiation after incomplete cervical spinal cord injury. *J Neurophysiol* 118:2344-2357.
- Goodchild AK, Dampney RA, Bandler R (1982) A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J Neurosci Methods* 6:351-363.
- Gorlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol* 6:260-271.
- Goshgarian HG (1979) Developmental plasticity in the respiratory pathway of the adult rat. *Exp Neurol* 66:547-555.
- Goshgarian HG (1981) The role of cervical afferent nerve fiber inhibition of the crossed phrenic phenomenon. *Experimental neurology* 72:211-225.
- Goshgarian HG (2003) Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J Appl Physiol* 94:795-810.
- Goshgarian HG (2009) The crossed phrenic phenomenon and recovery of function following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:85-93.
- Goshgarian HG, Guth L (1977) Demonstration of functionally ineffective synapses in the guinea pig spinal cord. *Experimental neurology* 57:613-621.
- Goshgarian HG, Ellenberger HH, Feldman JL (1991) Decussation of bulbospinal respiratory axons at the level of the phrenic nuclei in adult rats: a possible substrate for the crossed phrenic phenomenon. *Experimental neurology* 111:135-139.
- Gould E (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews Neuroscience* 8:481-488.
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10910-10917.
- Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP (2001) Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:2442-2450.
- Gransee HM, Zhan WZ, Sieck GC, Mantilla CB (2013) Targeted delivery of TrkB receptor to phrenic motoneurons enhances functional recovery of rhythmic phrenic activity after cervical spinal hemisection. *PLoS one* 8:e64755.
- Gransee HM, Gonzalez Porras MA, Zhan WZ, Sieck GC, Mantilla CB (2017) Motoneuron glutamatergic receptor expression following recovery from cervical spinal hemisection. *J Comp Neurol* 525:1192-1205.
- Graziadei PP, Karlan MS, Graziadei GA, Bernstein JJ (1980) Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfactory system after section of the fila olfactoria. *Brain research* 186:289-300.
- Groat RA, Peele TL (1945) BLOOD PRESSURE RESPONSE TO ACUTELY INCREASED PRESSURE UPON THE SPINAL CORD. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 144:578-587.
- Grotendorst GR (1997) Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:171-179.
- Grunhaus L, Dannon PN, Gershon AA (2002) Transcranial magnetic stimulation: a new tool in the fight against depression. *Dialogues Clin Neurosci* 4:93-103.
- Guenther CH, Windelborn JA, Tubon TC, Jr., Yin JC, Mitchell GS (2012) Increased atypical PKC expression and activity in the phrenic motor nucleus following cervical spinal injury. *Experimental neurology* 234:513-520.
- Guha A, Tator CH (1988) Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J Trauma* 28:481-490.
- Guinamard R, Simard C, Del Negro C (2013) Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacol Ther* 138:272-284.
- Gulli G, Tarperi C, Cevese A, Acler M, Bongiovanni G, Manganotti P (2013) Effects of prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation on the autonomic regulation of cardiovascular function. *Exp Brain Res* 226:265-271.
- Guo M, Wu L, Song Z, Yang B (2020) Enhancement of Neural Stem Cell Proliferation in Rats with Spinal Cord Injury by a Combination of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) and Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells (hUCB-MSCs). *Med Sci Monit* 26:e924445.
- Gutierrez DV, Clark M, Nwanna O, Alilain WJ (2013) Intermittent hypoxia training after C2 hemisection modifies the expression of PTEN and mTOR. *Experimental neurology* 248:45-52.
- Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews Neuroscience* 7:335-346.
- Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, Fortuna MG, Abbott SB, DePuy SD (2009) Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. *Respiratory physiology & neurobiology* 168:59-68.
- Hackett AR, Lee JK (2016) Understanding the NG2 Glial Scar after Spinal Cord Injury. *Front Neurol* 7:199.
- Haggerty AE, Marlow MM, Oudega M (2017) Extracellular matrix components as therapeutics for spinal cord injury. *Neurosci Lett* 652:50-55.
- Halder S, Mehta AK (2021) 2-Deoxy-D-glucose: is this the final cure for COVID-19: or yet another mirage? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 25:4448-4450.
- Hamada M, Murase N, Hasan A, Balaratnam M, Rothwell JC (2013) The role of interneuron networks in driving human motor cortical plasticity. *Cereb Cortex* 23:1593-1605.
- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsumishita Y, Fukuzawa K (1996) Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radic Biol Med* 20:1-9.

- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Sakai K, Furubayashi T, Machii K, Kanazawa I (1998) Paired-pulse magnetic stimulation of the human motor cortex: Differences among I waves. *Journal of Physiology* 509:607-618.
- Hanna AS, Côté MP, Houlé J, Dempsey R (2011) Nerve grafting for spinal cord injury in cats: are we close to translational research? *Neurosurgery* 68:N14-15.
- Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A (2016) AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol* 26:190-201.
- Hardy TA, Chadwick MR, Davies MJ (2019) Mechanisms of improved exercise capacity following respiratory muscle training in athletes with cervical spinal cord injury. *J Physiol* 597:5531-5532.
- Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira C, Willhite A, Rejc E, Grossman RG, Edgerton VR (2011) Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet* 377:1938-1947.
- Harman KA, States G, Wade A, Stepp C, Wainwright G, DeVeau K, King N, Shum-Siu A, Magnuson DSK (2018) Temporal analysis of cardiovascular control and function following incomplete T3 and T10 spinal cord injury in rodents. *Physiol Rep* 6:e13634.
- Hashimoto M, Ino H, Koda M, Murakami M, Yoshinaga K, Yamazaki M, Moriya H (2004) Regulation of semaphorin 3A expression in neurons of the rat spinal cord and cerebral cortex after transection injury. *Acta Neuropathol* 107:250-256.
- Hatton GI (1986) Plasticity in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system. *Fed Proc* 45:2328-2333.
- Hayes HB, Jayaraman A, Herrmann M, Mitchell GS, Rymer WZ, Trumbower RD (2014) Daily intermittent hypoxia enhances walking after chronic spinal cord injury. A randomized trial 82:104-113.
- Hector SM, Biering-Sørensen T, Krassioukov A, Biering-Sørensen F (2013) Cardiac arrhythmias associated with spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine* 36:591-599.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature reviews Neuroscience* 6:877-888.
- Hensch TK, Stryker MP (2004) Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science* 303:1678-1681.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282:1504-1508.
- Herdegen T, Waetzig V (2001) The JNK and p38 signal transduction following axotomy. *Restor Neurol Neurosci* 19:29-39.
- Herdegen T, Skene P, Bähr M (1997) The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends in neurosciences* 20:227-231.
- Herman R, He J, D'Luzansky S, Willis W, Dilli S (2002) Spinal cord stimulation facilitates functional walking in a chronic, incomplete spinal cord injured. *Spinal Cord* 40:65-68.
- Herring BE, Nicoll RA (2016) Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annual review of physiology* 78:351-365.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28:254-260.
- Hinze A, Stolzing A (2011) Differentiation of mouse bone marrow derived stem cells toward microglia-like cells. *BMC Cell Biology* 12:35.
- Hiwaki O, Ueno S (1990) Selective Magnetic Stimulation Of The Spinal Cord. In: [1990] Proceedings of the Twelfth Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, pp 436-437.
- Hofer SB, Mrsic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hübener M (2006) Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nature neuroscience* 9:127-132.
- Hoffman MS, Mitchell GS (2013) Spinal 5-HT7 receptors and protein kinase A constrain intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. *Neuroscience* 250:632-643.
- Holland L, Murphy B, Passmore S, Yelder P (2015) Time course of corticospinal excitability changes following a novel motor training task. *Neurosci Lett* 591:81-85.
- Hooks BM, Chen C (2020) Circuitry Underlying Experience-Dependent Plasticity in the Mouse Visual System. *Neuron* 106:21-36.
- Horn JP, McAfee DA (1977) Modulation of cyclic nucleotide levels in peripheral nerve without effect on resting or compound action potentials. *J Physiol* 269:753-766.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2218-2228.
- Hou S, Rabchevsky AG (2014) Autonomic consequences of spinal cord injury. *Compr Physiol* 4:1419-1453.
- Hou S, Lu P, Blesch A (2013a) Characterization of supraspinal vasomotor pathways and autonomic dysreflexia after spinal cord injury in F344 rats. *Auton Neurosci* 176:54-63.
- Hou S, Tom VJ, Graham L, Lu P, Blesch A (2013b) Partial restoration of cardiovascular function by embryonic neural stem cell grafts after complete spinal cord transection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:17138-17149.
- Houle JD, Tom VJ, Mayes D, Wagoner G, Phillips N, Silver J (2006) Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7405-7415.
- Huang Y-Z, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC (2005) Theta Burst Stimulation of the Human Motor Cortex. *Neuron* 45:201-206.
- Hubel DH, Wiesel TN (1965) Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* 28:1041-1059.
- Hubel DH, Wiesel TN (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 206:419-436.
- Hulsebosch CE (2002) Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ* 26:238-255.
- Hulsebosch CE (2008) Gliopathy ensures persistent inflammation and chronic pain after spinal cord injury. *Experimental neurology* 214:6-9.
- Hunanyan AS, Petrosyan HA, Alessi V, Arvanian VL (2012) Repetitive spinal electromagnetic stimulation opens a window of synaptic plasticity in damaged spinal cord: role of NMDA receptors. *J Neurophysiol* 107:3027-3039.
- Hund-Georgiadis M, von Cramon DY (1999) Motor-learning-related changes in piano players and non-musicians revealed by functional magnetic-resonance signals. *Exp Brain Res* 125:417-425.
- Huncker M, Schmid A, Soricter S, Schmidt-Trucksäb A, Mrosek P, Keul J (1998) Cardiovascular differences between sedentary and wheelchair-trained subjects with paraplegia. *Med Sci Sports Exerc* 30:609-613.
- Hutson TH, Di Giovanni S (2019) The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration. *Nat Rev Neurol* 15:732-745.
- Huxtable AG, Vinit S, Windelborn JA, Crader SM, Guenther CH, Watters JJ, Mitchell GS (2011) Systemic inflammation impairs respiratory chemoreflexes and plasticity. *Respiratory physiology & neurobiology* 178:482-489.

- Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR (2005) Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation. *Neurosci Lett* 383:339-344.
- Inoue N, Nakao H, Migishima R, Hino T, Matsui M, Hayashi F, Nakao K, Manabe T, Aiba A, Inokuchi K (2009) Requirement of the immediate early gene *vesl-1S/homer-1a* for fear memory formation. *Mol Brain* 2:7.
- Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, Greene LA, Barbacid M, Yancopoulos GD (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* 10:137-149.
- Irvine SF, Kwok JCF (2018) Perineuronal Nets in Spinal Motoneurons: Chondroitin Sulphate Proteoglycan around Alpha Motoneurons. *International journal of molecular sciences* 19.
- Jain VK, Kalia VK, Gopinath PM, Naqvi S, Kucheria K (1979) Optimization of cancer therapy: Part III--Effects of combining 2-deoxy-D-glucose treatment with gamma-irradiation on normal mice. *Indian J Exp Biol* 17:1320-1325.
- James ND, Shea J, Muir EM, Verhaagen J, Schneider BL, Bradbury EJ (2015) Chondroitinase gene therapy improves upper limb function following cervical contusion injury. *Experimental neurology* 271:131-135.
- Janczewski WA, Feldman JL (2006) Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* 570:407-420.
- Jänig W (2006) The Integrative Action of the Autonomic Nervous System.
- Jassova K, Albrecht J, Ceresnakova S, Papezova H, Anders M (2019) Repetitive transcranial magnetic stimulation significantly influences the eating behavior in depressive patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15:2579-2586.
- Jazayeri SB, Beygi S, Shokraneh F, Hagen EM, Rahimi-Movaghar V (2015) Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Eur Spine J* 24:905-918.
- Jazmati D, Neubacher U, Funke K (2018) Neuropeptide Y as a possible homeostatic element for changes in cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Brain Stimul* 11:797-805.
- Jenkins R, Tetzlaff W, Hunt SP (1993) Differential expression of immediate early genes in rubrospinal neurons following axotomy in rat. *The European journal of neuroscience* 5:203-209.
- Jensen JL, Marstrand PC, Nielsen JB (2005) Motor skill training and strength training are associated with different plastic changes in the central nervous system. *J Appl Physiol* (1985) 99:1558-1568.
- Jesus I, Michel-Flutot P, Deramautd TB, Paucard A, Vanhee V, Vinit S, Bonay M (2021) Effects of aerobic exercise training on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury. *Scientific reports* 11:112.
- Jia M, Njapo SA, Rastogi V, Hedna VS (2015) Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs* 29:153-162.
- Jin J, Shie FS, Liu J, Wang Y, Davis J, Schantz AM, Montine KS, Montine TJ, Zhang J (2007) Prostaglandin E2 receptor subtype 2 (EP2) regulates microglial activation and associated neurotoxicity induced by aggregated alpha-synuclein. *J Neuroinflammation* 4:2.
- Jin W, Zhu L, Guan Q, Chen G, Wang QF, Yin HX, Hang CH, Shi JX, Wang HD (2008) Influence of Nrf2 genotype on pulmonary NF-kappaB activity and inflammatory response after traumatic brain injury. *Ann Clin Lab Sci* 38:221-227.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Johnson CD, Perea López RM, Rodríguez L (1998) Acute spinal cord and head injury: case report and discussion of cardiac, respiratory and endocrine abnormalities. *Bol Asoc Med P R* 90:95-101.
- Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Experimental neurology* 182:399-411.
- Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG (2016) AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Mol Cell Biol* 36:1931-1942.
- Jung SY, Seo TB, Kim DY (2016) Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. *J Exerc Rehabil* 12:284-292.
- Kagan ZB, RamRakhiani AK, Lazzi G, Normann RA, Warren DJ (2016) In Vivo Magnetic Stimulation of Rat Sciatic Nerve With Centimeter- and Millimeter-Scale Solenoid Coils. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 24:1138-1147.
- Kakinohana O, Hefferan MP, Nakamura S, Kakinohana M, Galik J, Tomori Z, Marsala J, Yaksh TL, Marsala M (2006) Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: a qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience* 141:1569-1583.
- Kalia VK, Jain VK, Otto FJ (1982) Optimization of cancer therapy: Part IV--Effects of 2-deoxy-D-glucose on radiation induced chromosomal damage in PHA-stimulated peripheral human leukocytes. *Indian J Exp Biol* 20:884-888.
- Kam K, Worrell JW, Ventalon C, Emiliani V, Feldman JL (2013) Emergence of population bursts from simultaneous activation of small subsets of preBötzing complex inspiratory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:3332-3338.
- Kamida T, Fujiki M, Hori S, Isono M (1998) Conduction pathways of motor evoked potentials following transcranial magnetic stimulation: a rodent study using a "figure-8" coil. *Muscle & nerve* 21:722-731.
- Kamida T, Fujiki M, Baba H, Ono T, Abe T, Kobayashi H (2007) The relationship between paired pulse magnetic MEP and surgical prognosis in patients with intractable epilepsy. *Seizure* 16:113-119.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth A (2013) *Principles of Neural Science*, Fifth Edition Edition: New-York: McGraw-Hill.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kang BS, Shin HI, Bang MS (2009) Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation over the hand motor cortical area on central pain after spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 90:1766-1771.
- Kaplan MS (1981) Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* 195:323-338.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kasamatsu T, Shirokawa T (1985) Involvement of beta-adrenoreceptors in the shift of ocular dominance after monocular deprivation. *Exp Brain Res* 59:507-514.
- Kasamatsu T, Imamura K (2020) Ocular dominance plasticity: Molecular mechanisms revisited. *J Comp Neurol* 528:3039-3074.
- Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM (2017) Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. *International journal of molecular sciences* 18.
- Kemp SW, Cederna PS, Midha R (2017) Comparative outcome measures in peripheral regeneration studies. *Experimental neurology* 287:348-357.
- Keniry M, Parsons R (2008) The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 27:5477-5485.

- Keomani E, Deramandt TB, 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* 87:e51235.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.
- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13435-13444.
- Kim JY, Choi GS, Cho YW, Cho H, Hwang SJ, Ahn SH (2013) Attenuation of spinal cord injury-induced astroglial and microglial activation by repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *J Korean Med Sci* 28:295-299.
- Kindred JH, Finetto C, Cash JJ, Bowden MG (2021) Standing Neurophysiological Assessment of Lower Extremity Muscles Post-Stroke. *J Vis Exp*.
- Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS (2001a) Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130:207-218.
- Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS (2001b) Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:207-218.
- Klapka N, Müller HW (2006) Collagen matrix in spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 23:422-435.
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M (1992) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8:947-956.
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature neuroscience* 9:1117-1124.
- Koizumi H, Koshiya N, Chia JX, Cao F, Nugent J, Zhang R, Smith JC (2013) Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Botzinger complex respiratory microcircuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:2994-3009.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Kokotilo KJ, Eng JJ, Curt A (2009) Reorganization and preservation of motor control of the brain in spinal cord injury: a systematic review. *Journal of neurotrauma* 26:2113-2126.
- Kommenov D, Solarewicz JZ, Afzal F, Nantwi KD, Kuhn DM, Mateika JH (2016) 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 (Bethesda, Md : 1985)* 121:545-557.
- Kornack DR, Rakic P (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4752-4757.
- Korzhova J, Sinitsyn D, Chervyakov A, Poydasheva A, Zakharova M, Suponeva N, Chernikova L, Piradov M (2018) Transcranial and spinal cord magnetic stimulation in treatment of spasticity: a literature review and meta-analysis. *Eur J Phys Rehabil Med* 54:75-84.
- Kosmidis EK, Pierrefiche O, Vibert JF (2004) Respiratory-like rhythmic activity can be produced by an excitatory network of non-pacemaker neuron models. *J Neurophysiol* 92:686-699.
- Kosta P, Warren DJ, Lazzi G (2019) Selective stimulation of rat sciatic nerve using an array of mm-size magnetic coils: a simulation study. *Healthc Technol Lett* 6:70-75.
- Kosta P, Mize J, Warren DJ, Lazzi G (2020) Simulation-Based Optimization of Figure-of-Eight Coil Designs and Orientations for Magnetic Stimulation of Peripheral Nerve. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 28:2901-2913.
- Kowalski KE, Hsieh YH, Dick TE, DiMarco AF (2013) Diaphragm activation via high frequency spinal cord stimulation in a rodent model of spinal cord injury. *Experimental neurology* 247:689-693.
- Kozel FA (2018) Clinical Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Posttraumatic Stress Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Bipolar Disorder. *Psychiatr Clin North Am* 41:433-446.
- Krassioukov A, Claydon VE (2006) The clinical problems in cardiovascular control following spinal cord injury: an overview. *Progress in brain research* 152:223-229.
- Krassioukov A, Stillman M, Beck LA (2020) A Primary Care Provider's Guide to Autonomic Dysfunction Following Spinal Cord Injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 26:123-127.
- Krassioukov AV, Weaver LC (1995) Episodic hypertension due to autonomic dysreflexia in acute and chronic spinal cord-injured rats. *Am J Physiol* 268:H2077-2083.
- Krassioukov AV, Furlan JC, Fehlings MG (2003) Autonomic dysreflexia in acute spinal cord injury: an under-recognized clinical entity. *Journal of neurotrauma* 20:707-716.
- Krishnan VS, Shin SS, Belegu V, Celnik P, Reimers M, Smith KR, Pelled G (2019) Multimodal Evaluation of TMS - Induced Somatosensory Plasticity and Behavioral Recovery in Rats With Contusion Spinal Cord Injury. *Front Neurosci* 13:387.
- Kroemer G, Pouyssegur J (2008) Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13:472-482.
- Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD (1993) Corticocortical inhibition in human motor cortex. *The Journal of Physiology* 471:501-519.
- Kumar K, Nath R, Wyant GM (1991) Treatment of chronic pain by epidural spinal cord stimulation: a 10-year experience. *J Neurosurg* 75:402-407.
- Kumru H, Murillo N, Samsó JV, Valls-Sole J, Edwards D, Pelayo R, Valero-Cabre A, Tormos JM, Pascual-Leone A (2010) Reduction of spasticity with repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 24:435-441.
- Kurtoglu M, Maher JC, Lampidis TJ (2007) Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal* 9:1383-1390.
- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental neurobiology* 71:1073-1089.
- Kwok JCF, Heller JP, Zhao R-R, Fawcett JW (2014) Targeting Inhibitory Chondroitin Sulphate Proteoglycans to Promote Plasticity After Injury. In: *Axon Growth and Regeneration: Methods and Protocols* (Murray AJ, ed), pp 127-138. New York, NY: Springer New York.
- Labedi A, Benali A, Mix A, Neubacher U, Funke K (2014) Modulation of inhibitory activity markers by intermittent theta-burst stimulation in rat cortex is NMDA-receptor dependent. *Brain Stimul* 7:394-400.
- Laird AS, Carriev P, Waite PM (2006) Cardiovascular and temperature changes in spinal cord injured rats at rest and during autonomic dysreflexia. *J Physiol* 577:539-548.

- Lane MA, Fuller DD, White TE, Reier PJ (2008a) Respiratory neuroplasticity and cervical spinal cord injury: translational perspectives. *Trends in neurosciences* 31:538-547.
- Lane MA, Lee K-Z, Fuller DD, Reier PJ (2009) Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:123-132.
- Lane MA, White TE, Coutts MA, Jones AL, Sandhu MS, Bloom DC, Bolser DC, Yates BJ, Fuller DD, Reier PJ (2008b) Cervical prephrenic interneurons in the normal and lesioned spinal cord of the adult rat. *J Comp Neurol* 511:692-709.
- Lane MA, White TE, Coutts MA, Jones AL, Sandhu MS, Bloom DC, Bolser DC, Yates BJ, Fuller DD, Reier PJ (2008c) Cervical prephrenic interneurons in the normal and lesioned spinal cord of the adult rat. *J Comp Neurol* 511:692-709.
- Lang BT, Cregg JM, DePaul MA, Tran AP, Xu K, Dyck SM, Madalena KM, Brown BP, Weng YL, Li S, Karimi-Abdolrezaee S, Busch SA, Shen Y, Silver J (2015) Modulation of the proteoglycan receptor PTPsigma promotes recovery after spinal cord injury. *Nature* 518:404-408.
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt (2016) Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 17:412.
- Le Gal JP, Colnot E, Caroit L, Bacqué-Cazenave J, Thoby-Brisson M, Juvin L, Morin D (2020) Modulation of respiratory network activity by forelimb and hindlimb locomotor generators. *The European journal of neuroscience* 52:3181-3195.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Haganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-959.
- Lee JS, Fang SY, Roan JN, Jou IM, Lam CF (2016) Spinal cord injury enhances arterial expression and reactivity of α 1-adrenergic receptors-mechanistic investigation into autonomic dysreflexia. *Spine J* 16:65-71.
- Lee K-Z, Gonzalez-Rothi EJ (2017) Contribution of 5-HT_{2A} receptors on diaphragmatic recovery after chronic cervical spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 244:51-55.
- Lee KZ, Huang YJ, Tsai IL (2014a) Respiratory motor outputs following unilateral midcervical spinal cord injury in the adult rat. *J Appl Physiol* 116:395-405.
- Lee KZ, Chiang SC, Li YJ (2017) Mild Acute Intermittent Hypoxia Improves Respiratory Function in Unanesthetized Rats With Midcervical Contusion. *Neurorehabil Neural Repair* 31:364-375.
- Lee KZ, Liou LM, Vinit S (2021) Diaphragm Motor-Evoked Potential Induced by Cervical Magnetic Stimulation following Cervical Spinal Cord Contusion in the Rat. *Journal of neurotrauma* 38:2122-2140.
- Lee KZ, Lane MA, Dougherty BJ, Mercier LM, Sandhu MS, Sanchez JC, Reier PJ, Fuller DD (2014b) Intraspinal transplantation and modulation of donor neuron electrophysiological activity. *Experimental neurology* 251:47-57.
- Lee YS, Sindhu RK, Lin CY, Ehdai A, Lin VW, Vaziri ND (2004) Effects of nerve graft on nitric oxide synthase, NAD(P)H oxidase, and antioxidant enzymes in chronic spinal cord injury. *Free Radic Biol Med* 36:330-339.
- Lefaucheur JP (2019) Transcranial magnetic stimulation. *Handb Clin Neurol* 160:559-580.
- Leiter I, Bascañana P, Bengel FM, Bankstahl JP, Bankstahl M (2019) Attenuation of epileptogenesis by 2-deoxy-d-glucose is accompanied by increased cerebral glucose supply, microglial activation and reduced astrocytosis. *Neurobiology of disease* 130:104510.
- Lemon RN (2008) Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 31:195-218.
- Lemos JR, da Cunha FA, Lopes AJ, Guimarães FS, do Amaral Vasconcellos FV, Dos Santos Vigário P (2020) Respiratory muscle training in non-athletes and athletes with spinal cord injury: A systematic review of the effects on pulmonary function, respiratory muscle strength and endurance, and cardiorespiratory fitness based on the FITT principle of exercise prescription. *J Back Musculoskelet Rehabil* 33:655-667.
- Lenz M, Vlachos A (2016) Releasing the Cortical Brake by Non-Invasive Electromagnetic Stimulation? rTMS Induces LTD of GABAergic Neurotransmission. *Front Neural Circuits* 10:96.
- Lenz M, Platschek S, Priesemann V, Becker D, Willems LM, Ziemann U, Deller T, Muller-Dahlhaus F, Jedlicka P, Vlachos A (2015) Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct Funct* 220:3323-3337.
- Lenz M, Galanis C, Muller-Dahlhaus F, Opitz A, Wierenga CJ, Szabo G, Ziemann U, Deller T, Funke K, Vlachos A (2016) Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat Commun* 7:10020.
- Leszczyńska K, Wincek A, Fortuna W, Huber J, Łukaszek J, Okurowski S, Chmielak K, Tabakow P (2020) Treatment of patients with cervical and upper thoracic incomplete spinal cord injury using repetitive transcranial magnetic stimulation. *Int J Artif Organs* 43:323-331.
- Levine J (2016) The reactions and role of NG2 glia in spinal cord injury. *Brain research* 1638:199-208.
- Levine JM (1994) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:4716-4730.
- Lewandowski G, Steward O (2014) AAVshRNA-mediated suppression of PTEN in adult rats in combination with salmon fibrin administration enables regenerative growth of corticospinal axons and enhances recovery of voluntary motor function after cervical spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:9951-9962.
- Lewis LJ, Brookhart JM (1951) Significance of the crossed phrenic phenomenon. *Am J Physiol* 166:241-254.
- Leydeker M, Delva S, Tserlyuk I, Yau J, Wagdy M, Hawash A, Bendaoud S, Mohamed S, Wieraszko A, Ahmed Z (2013) The effects of 15 Hz trans-spinal magnetic stimulation on locomotor control in mice with chronic contusive spinal cord injury. *Electromagn Biol Med* 32:155-164.
- Li K, Javed E, Scura D, Hala TJ, Seetharam S, Falnikar A, Richard JP, Chorath A, Maragakis NJ, Wright MC, Lepore AC (2015) Human iPSC cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury. *Experimental neurology* 271:479-492.
- Li K, Nicaise C, Sannie D, Hala TJ, Javed E, Parker JL, Putatunda R, Regan KA, Suain V, Brion JP, Rhoderick F, Wright MC, Poulsen DJ, Lepore AC (2014) Overexpression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 exacerbates phrenic motor neuron degeneration, diaphragm compromise, and forelimb motor dysfunction following cervical contusion spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:7622-7638.
- Li Y, Li L, Pan W (2019) Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) modulates hippocampal structural synaptic plasticity in rats. *Physiol Res* 68:99-105.
- Lin M-T, Vinit S, Lee K-Z (2021) Functional role of carbon dioxide on intermittent hypoxia induced respiratory response following mid-cervical contusion in the rat. *Experimental neurology* 339:113610.

- Lin X, Zhang F, Bradbury CM, Kaushal A, Li L, Spitz DR, Aft RL, Gius D (2003) 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res* 63:3413-3417.
- Linden RD, Zhang YP, Burke DA, Hunt MA, Harpring JE, Shields CB (1999) Magnetic motor evoked potential monitoring in the rat. *J Neurosurg* 91:205-210.
- Lindsay AD, Greer JJ, Feldman JL (1991) Phrenic motoneuron morphology in the neonatal rat. *J Comp Neurol* 308:169-179.
- Lindwall C, Dahlin L, Lundborg G, Kanje M (2004) Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal root ganglia sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 27:267-279.
- Ling L, Bach KB, Mitchell GS (1994) Serotonin reveals ineffective spinal pathways to contralateral phrenic motoneurons in spinally hemisectioned rats. *Exp Brain Res* 101:35-43.
- Linsenmeyer TA, Campagnolo DI, Chou IH (1996) Silent autonomic dysreflexia during voiding in men with spinal cord injuries. *J Urol* 155:519-522.
- Lipski J, Zhang X, Kruszewska B, Kanjhan R (1994) Morphological study of long axonal projections of ventral medullary inspiratory neurons in the rat. *Brain research* 640:171-184.
- Liu K, Lu Y, Lee JK, Samara R, Willenberg R, Sears-Kraxberger I, Tedeschi A, Park KK, Jin D, Cai B, Xu B, Connolly L, Steward O, Zheng B, He Z (2010) PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nature neuroscience* 13:1075-1081.
- Llewellyn-Smith IJ (2009) Anatomy of synaptic circuits controlling the activity of sympathetic preganglionic neurons. *J Chem Neuroanat* 38:231-239.
- Logan A, Berry M (1993) Transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in the injured CNS. *Trends Pharmacol Sci* 14:337-342.
- Long Y, Zhuang K, Ji Z, Han Y, Fei Y, Zheng W, Song Z, Yang H (2019) 2-Deoxy-D-Glucose Exhibits Anti-seizure Effects by Mediating the Netrin-G1-KATP Signaling Pathway in Epilepsy. *Neurochem Res* 44:994-1004.
- Lotze M, Braun C, Birbaumer N, Anders S, Cohen LG (2003) Motor learning elicited by voluntary drive. *Brain : a journal of neurology* 126:866-872.
- Lovett-Barr MR, Satriotomo I, Muir GD, Wilkerson JE, Hoffman MS, Vinit S, Mitchell GS (2012) Repetitive intermittent hypoxia induces respiratory and somatic motor recovery after chronic cervical spinal injury. *J Neurosci* 32:3591-3600.
- Lowery A, Patel A, Ames R, Ramsey F, Slattery B, Pazonis T (2021) Prevalence of Venous Thromboembolism Following Acute Spinal Cord Injury in an Urban Inner City Hospital. *Int J Spine Surg* 15:562-569.
- Loy K, Bareyre FM (2019) Rehabilitation following spinal cord injury: how animal models can help our understanding of exercise-induced neuroplasticity. *Neural Regen Res* 14:405-412.
- Loy K, Fourneau J, Meng N, Denecke C, Locatelli G, Bareyre FM (2021) Semaphorin 7A restricts serotonergic innervation and ensures recovery after spinal cord injury. *Cell Mol Life Sci* 78:2911-2927.
- Lu P, Blesch A, Tuszynski MH (2001) Neurotrophism without neurotrophism: BDNF promotes survival but not growth of lesioned corticospinal neurons. *J Comp Neurol* 436:456-470.
- Luigjes J, Segrave R, de Joode N, Figeo M, Denys D (2019) Efficacy of Invasive and Non-Invasive Brain Modulation Interventions for Addiction. *Neuropsychol Rev* 29:116-138.
- Lujan HL, DiCarlo SE (2020) Direct comparison of cervical and high thoracic spinal cord injury reveals distinct autonomic and cardiovascular consequences. *J Appl Physiol* 128:554-564.
- Lujan HL, Tonson A, Wiseman RW, DiCarlo SE (2018) Chronic, complete cervical(6-7) cord transection: distinct autonomic and cardiac deficits. *J Appl Physiol* 124:1471-1482.
- Ma YH, Zhang Y, Cao L, Su JC, Wang ZW, Xu AB, Zhang SC (2010) Effect of neurotrophin-3 genetically modified olfactory ensheathing cells transplantation on spinal cord injury. *Cell Transplant* 19:167-177.
- Macdonald DB, Stigsby B, Al Homoud I, Abalkhail T, Mokeem A (2012) Utility of motor evoked potentials for intraoperative nerve root monitoring. *J Clin Neurophysiol* 29:118-125.
- MacFarlane PM, Vinit S, Mitchell GS (2014) Spinal nNOS regulates phrenic motor facilitation by a 5-HT2B receptor- and NADPH oxidase-dependent mechanism. *Neuroscience* 269:67-78.
- MacFarlane PM, Vinit S, Mitchell GS (2017) Enhancement of phrenic long-term facilitation following repetitive acute intermittent hypoxia is blocked by the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*:ajpregu 00306 02017.
- Madiai F, Hussain SR, Goettl VM, Burry RW, Stephens RL, Jr., Hackshaw KV (2003) Upregulation of FGF-2 in reactive spinal cord astrocytes following unilateral lumbar spinal nerve ligation. *Exp Brain Res* 148:366-376.
- Maehama T, Patzelt A, Lengert M, Hutter KJ, Kanazawa K, Hausen H, Rösl F (1998) Selective down-regulation of human papillomavirus transcription by 2-deoxyglucose. *Int J Cancer* 76:639-646.
- Maignan E, Dong WX, Legrand M, Safar M, Cucho JL (2000) Sympathetic activity in the rat: effects of anaesthesia on noradrenaline kinetics. *J Auton Nerv Syst* 80:46-51.
- Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED, 3rd, Lebkowski JS (2017) Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med* 6:1917-1929.
- Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC (2009) Retrograde labeling of phrenic motoneurons by intrapleural injection. *J Neurosci Methods* 182:244-249.
- Mantilla CB, Bailey JP, Zhan WZ, Sieck GC (2012) Phrenic motoneuron expression of serotonergic and glutamatergic receptors following upper cervical spinal cord injury. *Experimental neurology* 234:191-199.
- Mantilla CB, Gransee HM, Zhan WZ, Sieck GC (2013a) Motoneuron BDNF/TrkB signaling enhances functional recovery after cervical spinal cord injury. *Experimental neurology* 247:101-109.
- Mantilla CB, Gransee HM, Zhan W-Z, Sieck GC (2017a) Impact of glutamatergic and serotonergic neurotransmission on diaphragm muscle activity after cervical spinal hemisection. *J Neurophysiol* 118:1732-1738.
- Mantilla CB, Gransee HM, Zhan WZ, Sieck GC (2017b) Impact of glutamatergic and serotonergic neurotransmission on diaphragm muscle activity after cervical spinal hemisection. *J Neurophysiol* 118:1732-1738.
- Mantilla CB, Greising SM, Zhan WZ, Seven YB, Sieck GC (2013b) 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* (1985) 114:380-386.
- Mantilla CB, Greising SM, Zhan W-Z, Seven YB, Sieck GC (2013c) 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* 114:380-386.
- Mantilla CB, Greising SM, Stowe JM, Zhan W-Z, Sieck GC (2014) TrkB kinase activity is critical for recovery of respiratory function after cervical spinal cord hemisection. *Experimental neurology* 261:190-195.

- Mao L, Wang H, Qiao L, Wang X (2010) Disruption of Nrf2 enhances the upregulation of nuclear factor- κ B activity, tumor necrosis factor- α , and matrix metalloproteinase-9 after spinal cord injury in mice. *Mediators Inflamm* 2010:238321.
- Marks GA, Birabil CG, Speciale SG (2005) Adenosine A1 receptors mediate inhibition of cAMP formation in vitro in the pontine, REM sleep induction zone. *Brain research* 1061:124-127.
- Martin DM, McClintock SM, Forster JJ, Lo TY, Loo CK (2017a) Cognitive enhancing effects of rTMS administered to the prefrontal cortex in patients with depression: A systematic review and meta-analysis of individual task effects. *Depress Anxiety* 34:1029-1039.
- Martin E, El-Behi M, Fontaine B, Delarasse C (2017b) Analysis of Microglia and Monocyte-derived Macrophages from the Central Nervous System by Flow Cytometry. *J Vis Exp*.
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1997) Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91:927-938.
- Martinez M, Delivet-Mongrain H, Leblond H, Rossignol S (2011) Recovery of hindlimb locomotion after incomplete spinal cord injury in the cat involves spontaneous compensatory changes within the spinal locomotor circuitry. *J Neurophysiol* 106:1969-1984.
- Marufa SA, Hsieh TH, Liou JC, Chen HY, Peng CW (2021) Neuromodulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neural plasticity and motor functions in rats with an incomplete spinal cord injury: A preliminary study. *PLoS one* 16:e0252965.
- Mathias CJ (1995) Orthostatic hypotension: causes, mechanisms, and influencing factors. *Neurology* 45:S6-11.
- Matos-Souza JR, Python KR, Oliveira RT, Téo FH, Blotta MH, Cliquet A, Jr., Nadruz W, Jr. (2011) Altered left ventricular diastolic function in subjects with spinal cord injury. *Spinal Cord* 49:65-69.
- Matsumoto H, Konoma Y, Fujii K, Hanajima R, Terao Y, Ugawa Y (2013) A conduction block in sciatic nerves can be detected by magnetic motor root stimulation. *J Neurol Sci* 331:174-176.
- Mauelshagen J, Parker GR, Carew TJ (1996) Dynamics of induction and expression of long-term synaptic facilitation in Aplysia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:7099-7108.
- Mautes AE, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ (2000) Vascular Events After Spinal Cord Injury: Contribution to Secondary Pathogenesis. *Physical Therapy* 80:673-687.
- Mayorov DN, Adams MA, Krassioukov AV (2001) Telemetric blood pressure monitoring in conscious rats before and after compression injury of spinal cord. *J Neurotrauma* 18:727-736.
- Mazeraud A, Righy C, Bouchereau E, Benghanem S, Bozza FA, Sharshar T (2020) Septic-Associated Encephalopathy: a Comprehensive Review. *Neurotherapeutics* 17:392-403.
- McClintock SM, Reti IM, Carpenter LL, McDonald WM, Dubin M, Taylor SF, Cook IA, O'Reardon J, Husain MM, Wall C, Krystal AD, Sampson SM, Morales O, Nelson BG, Latoussakis V, George MS, Lisanby SH (2018) Consensus Recommendations for the Clinical Application of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in the Treatment of Depression. *J Clin Psychiatry* 79.
- McDonnell MN, Orekhov Y, Ziemann U (2006) The role of GABAB receptors in intracortical inhibition in the human motor cortex. *Experimental Brain Research* 173:86-93.
- McKay WB, Stokic DS, Dimitrijevic MR (1997) Assessment of corticospinal function in spinal cord injury using transcranial motor cortex stimulation: a review. *Journal of neurotrauma* 14:539-548.
- Mendonça T, Brito R, Luna P, Campêlo M, Shirahige L, Fontes L, Dias R, Piscitelli D, Monte-Silva K (2021) Repetitive transcranial magnetic stimulation on the modulation of cortical and spinal cord excitability in individuals with spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci*.
- Menezes K, De Menezes JRL, Nascimento MA, Santos RDS, Coelho-Sampaio T (2010) Poly laminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. *The FASEB Journal* 24:4513-4522.
- Merli GJ, Crabbe S, Paluzzi RG, Fritz D (1993) Etiology, incidence, and prevention of deep vein thrombosis in acute spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 74:1199-1205.
- Michel-Flutot P, Mansart A, Deramaudt BT, Jesus I, Lee K, Bonay M, Vinit S (2021a) Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respiratory physiology & neurobiology* 284:103568.
- Michel-Flutot P, Zholudeva LV, Randelman ML, Deramaudt TB, Mansart A, Alvarez J-C, Lee K-Z, Petitjean M, Bonay M, Lane MA, Vinit S (2021b) High frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation promotes long lasting phrenic motoneuron excitability via GABAergic networks. *Respiratory physiology & neurobiology*:103704.
- Milich LM, Ryan CB, Lee JK (2019) The origin, fate, and contribution of macrophages to spinal cord injury pathology. *Acta Neuropathol* 137:785-797.
- Miller MW, Nowakowski RS (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain research* 457:44-52.
- Minic Z, Wilson S, Liu F, Sankari A, Mao G, Goshgarian H (2017) Nanoconjugate-bound adenosine A1 receptor antagonist enhances recovery of breathing following acute cervical spinal cord injury. *Experimental neurology* 292:56-62.
- Minor KH, Akison LK, Goshgarian HG, Seeds NW (2006) Spinal cord injury-induced plasticity in the mouse--the crossed phrenic phenomenon. *Experimental neurology* 200:486-495.
- Minor RK, Smith DL, Jr., Sossong AM, Kaushik S, Poosala S, Spangler EL, Roth GS, Lane M, Allison DB, de Cabo R, Ingram DK, Mattison JA (2010) Chronic ingestion of 2-deoxy-D-glucose induces cardiac vacuolization and increases mortality in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 243:332-339.
- Mintz I, Korn H (1991) Serotonergic facilitation of quantal release at central inhibitory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:3359-3370.
- Mischel NA, Subramanian M, Dombrowski MD, Llewellyn-Smith IJ, Mueller PJ (2015) (In)activity-related neuroplasticity in brainstem control of sympathetic outflow: unraveling underlying molecular, cellular, and anatomical mechanisms. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 309:H235-H243.
- Mitchell GS, Johnson SM (2003) Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* (1985) 94:358-374.
- Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA, Bavis RW, Mack KJ, Olson EB, Jr. (2001) Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol* (1985) 90:2466-2475.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5:49-55.
- Mohammed H, Hollis ER, 2nd (2018) Cortical Reorganization of Sensorimotor Systems and the Role of Intracortical Circuits After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* 15:588-603.

- Mohanti BK, Rath GK, Anantha N, Kannan V, Das BS, Chandramouli BA, Banerjee AK, Das S, Jena A, Ravichandran R, Sahi UP, Kumar R, Kapoor N, Kalia VK, Dwarakanath BS, Jain V (1996) Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35:103-111.
- Moraud EM, Capogrosso M, Formento E, Wenger N, DiGiovanna J, Courtine G, Micera S (2016) Mechanisms Underlying the Neuromodulation of Spinal Circuits for Correcting Gait and Balance Deficits after Spinal Cord Injury. *Neuron* 89:814-828.
- Moreno-Duarte I, Morse LR, Alam M, Bikson M, Zafonte R, Fregni F (2014) Targeted therapies using electrical and magnetic neural stimulation for the treatment of chronic pain in spinal cord injury. *Neuroimage* 85 Pt 3:1003-1013.
- Moreno DE, Yu XJ, Goshgarian HG (1992a) 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.
- Moreno DE, Yu XJ, Goshgarian HG (1992b) 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.
- Morishita H, Hensch TK (2008) Critical period revisited: impact on vision. *Curr Opin Neurobiol* 18:101-107.
- Muellbacher W, Ziemann U, Boroojerdi B, Cohen L, Hallett M (2001) Role of the human motor cortex in rapid motor learning. *Exp Brain Res* 136:431-438.
- Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A (2005) Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 233:496-515.
- Myers J, Lee M, Kiratli J (2007) Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management. *Am J Phys Med Rehabil* 86:142-152.
- Myoga H, Nonaka S, Matsuyama K, Mori S (1995) Postnatal development of locomotor movements in normal and para-chlorophenylalanine-treated newborn rats. *Neurosci Res* 21:211-221.
- Nakanishi T, Fujita Y, Tanaka T, Yamashita T (2019) Anti-repulsive guidance molecule-a antibody treatment and repetitive transcranial magnetic stimulation have synergistic effects on motor recovery after spinal cord injury. *Neurosci Lett* 709:134329.
- Nantwi KD (2009) Recovery of respiratory activity after C2 hemisection (C2HS): Involvement of adenosinergic mechanisms. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:102-114.
- Nantwi KD, El-Bohy A, Goshgarian HG (1996) Actions of systemic theophylline on hemidiaphragmatic recovery in rats following cervical spinal cord hemisection. *Experimental neurology* 140:53-59.
- Nantwi KD, Basura GJ, Goshgarian HG (2003) Effects of long-term theophylline exposure on recovery of respiratory function and expression of adenosine A1 mRNA in cervical spinal cord hemisected adult rats. *Experimental neurology* 182:232-239.
- Nantwi KD, El-Bohy AA, Schrimsher GW, Reier PJ, Goshgarian HG (1999) Spontaneous Functional Recovery in a Paralyzed Hemidiaphragm Following Upper Cervical Spinal Cord Injury in Adult Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 13:225-234.
- Nardone R, Höller Y, Brigo F, Seidl M, Christova M, Bergmann J, Golaszewski S, Trinka E (2013) Functional brain reorganization after spinal cord injury: systematic review of animal and human studies. *Brain research* 1504:58-73.
- Nardone R, Höller Y, Langthaler PB, Lochner P, Golaszewski S, Schwenker K, Brigo F, Trinka E (2017) rTMS of the prefrontal cortex has analgesic effects on neuropathic pain in subjects with spinal cord injury. *Spinal Cord* 55:20-25.
- Nardone R, Sebastianelli L, Versace V, Brigo F, Golaszewski S, Pucks-Faes E, Saltuari L, Trinka E (2020) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in subjects with sleep disorders. *Sleep Med* 71:113-121.
- Nash MS, Bilsker S, Marcillo AE, Isaac SM, Botelho LA, Klose KJ, Green BA, Rountree MT, Shea JD (1991) Reversal of adaptive left ventricular atrophy following electrically-stimulated exercise training in human tetraplegics. *Paraplegia* 29:590-599.
- Navarrete-Opazo A, Mitchell GS (2014) Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307:R1181-R1197.
- Navarrete-Opazo A, Dougherty BJ, Mitchell GS (2017a) Enhanced recovery of breathing capacity from combined adenosine 2A receptor inhibition and daily acute intermittent hypoxia after chronic cervical spinal injury. *Exp Neurol* 287:93-101.
- Navarrete-Opazo A, Vinit S, Dougherty BJ, Mitchell GS (2015) Daily acute intermittent hypoxia elicits functional recovery of diaphragm and inspiratory intercostal muscle activity after acute cervical spinal injury. *Exp Neurol* 266:1-10.
- Navarrete-Opazo A, Alcayaga JJ, Sepúlveda O, Varas G (2017b) Intermittent Hypoxia and Locomotor Training Enhances Dynamic but Not Standing Balance in Patients With Incomplete Spinal Cord Injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 98:415-424.
- Navarrete-Opazo A, Alcayaga J, Sepúlveda O, Rojas E, Astudillo C (2016) Repetitive Intermittent Hypoxia and Locomotor Training Enhances Walking Function in Incomplete Spinal Cord Injury Subjects: A Randomized, Triple-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Journal of neurotrauma* 34:1803-1812.
- Navarrete-Opazo AA, Vinit S, Mitchell GS (2014) Adenosine 2A Receptor Inhibition Enhances Intermittent Hypoxia-Induced Diaphragm but Not Intercostal Long-Term Facilitation. *Journal of neurotrauma* 31:1975-1984.
- Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ (2007) Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF-alpha. *J Neurochem* 102:900-912.
- Nicaise C, Putatunda R, Hala TJ, Regan KA, Frank DM, Brion J-P, Leroy K, Pochet R, Wright MC, Lepore AC (2012) Degeneration of phrenic motor neurons induces long-term diaphragm deficits following mid-cervical spinal contusion in mice. *Journal of neurotrauma* 29:2748-2760.
- Nichols NL, Mitchell GS (2021) Mechanisms of severe acute intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. *J Neurophysiol* 125:1146-1156.
- Nichols NL, Dale EA, Mitchell GS (2012) Severe acute intermittent hypoxia elicits phrenic long-term facilitation by a novel adenosine-dependent mechanism. *Journal of Applied Physiology* 112:1678-1688.
- Nichols NL, Vinit S, Bauernschmidt L, Mitchell GS (2015) Respiratory function after selective respiratory motor neuron death from intrapleural CTB-saporin injections. *Experimental neurology* 267:18-29.
- Niederöst B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE (2002) Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:10368-10376.
- Nielsen JB, Perez MA, Oudega M, Enriquez-Denton M, Aimonetti JM (2007) Evaluation of transcranial magnetic stimulation for investigating transmission in descending motor tracts in the rat. *The European journal of neuroscience* 25:805-814.
- Nieoullon A, Rispal-Padel L (1976) Somatotopic localization in cat motor cortex. *Brain research* 105:405-422.
- Nierat MC, Hudson AL, Chaskalovic J, Similowski T, Laviolette L (2015) Repetitive transcranial magnetic stimulation over the supplementary motor area modifies breathing pattern in response to inspiratory loading in normal humans. *Front Physiol* 6:273.

- Niklison-Chirou MV, Agostini M, Amelio I, Melino G (2020) Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *International journal of molecular sciences* 21.
- Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z (2002) Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:7526-7535.
- Novotny J, Oberdieck P, Titova A, Pelisek J, Chandraratne S, Nicol P, Hapfelmeier A, Joner M, Maegdefessel L, Poppert H, Pircher J, Massberg S, Friedrich B, Zimmer C, Schulz C, Boeckh-Behrens T (2020) Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology* 94:e2346-e2360.
- O'Hara TE, Jr., Goshgarian HG (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.
- O'Neill LA, Hardie DG (2013) Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493:346-355.
- Oberman LM, Enticott PG, Casanova MF, Rotenberg A, Pascual-Leone A, McCracken JT (2016) Transcranial magnetic stimulation in autism spectrum disorder: Challenges, promise, and roadmap for future research. *Autism Res* 9:184-203.
- Ockuly JC, Gielissen JM, Levenick CV, Zeal C, Groble K, Munsey K, Sutula TP, Stafstrom CE (2012) Behavioral, cognitive, and safety profile of 2-deoxy-2-glucose (2DG) in adult rats. *Epilepsy Res* 101:246-252.
- Oestreicher AB, De Graan PN, Gispén WH, Verhaagen J, Schrama LH (1997) B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog Neurobiol* 53:627-686.
- Ohnishi Y, Yamamoto M, Sugiura Y, Setoyama D, Kishima H (2021) Rostro-caudal different energy metabolism leading to differences in degeneration in spinal cord injury. *Brain Commun* 3:fcab058.
- Ohtake Y, Wong D, Abdul-Muneer PM, Selzer ME, Li S (2016) Two PTP receptors mediate CSPG inhibition by convergent and divergent signaling pathways in neurons. *Scientific reports* 6:37152.
- OMS. (2013) Spinal cord injury. In: World Health Organisation.
- Oo T, Watt JW, Soni BM, Sett PK (1999) Delayed diaphragm recovery in 12 patients after high cervical spinal cord injury. A retrospective review of the diaphragm status of 107 patients ventilated after acute spinal cord injury. *Spinal Cord* 37:117-122.
- Oudega M, Perez MA (2012) Corticospinal reorganization after spinal cord injury. *J Physiol* 590:3647-3663.
- Owuor ED, Kong AN (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 64:765-770.
- Pace RW, Mackay DD, Feldman JL, Del Negro CA (2007) Role of persistent sodium current in mouse preBötzing Complex neurons and respiratory rhythm generation. *J Physiol* 580:485-496.
- Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, Priebe A, Zieliński R, Fokt I, Ziemiński M, Jaśkiewicz A, Borowski R, Domoradzki T, Priebe W (2019) 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *International journal of molecular sciences* 21.
- Panja D, Bramham CR (2014) BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology* 76 Pt C:664-676.
- Park E, Velumian AA, Fehlings MG (2004) The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of neurotrauma* 21:754-774.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (2010) PTEN/mTOR and axon regeneration. *Experimental neurology* 223:45-50.
- Parris GE (2008) 2-deoxy-D-glucose as a potential drug against fusogenic viruses including HIV. *Med Hypotheses* 70:776-782.
- Partida E, Mironets E, Hou S, Tom VJ (2016) Cardiovascular dysfunction following spinal cord injury. *Neural Regen Res* 11:189-194.
- Pascual-Leone A, Nguyet D, Cohen LG, Brasil-Neto JP, Cammarota A, Hallett M (1995) Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J Neurophysiol* 74:1037-1045.
- Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, Bunge MB (2004) cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10:610-616.
- Pekcec A, Löscher W, Potschka H (2006) Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *Neuroreport* 17:571-574.
- Perez MA, Lungholt BK, Nyborg K, Nielsen JB (2004) Motor skill training induces changes in the excitability of the leg cortical area in healthy humans. *Exp Brain Res* 159:197-205.
- Perim RR, Kubilis PS, Seven YB, Mitchell GS (2020) Hypoxia-induced hypotension elicits adenosine-dependent phrenic long-term facilitation after carotid denervation. *Experimental neurology* 333:113429.
- Perim RR, Sunshine MD, Welch JF, Holland A, Ross A, Mitchell GS, Gonzalez-Rothi EJ (2021) Daily acute intermittent hypoxia enhances phrenic motor output and stimulus-evoked phrenic responses in rats. *J Neurophysiol*.
- Petrosyan HA, Alessi V, Hunanyan AS, Sisto SA, Arvanian VL (2015) Spinal electro-magnetic stimulation combined with transgene delivery of neurotrophin NT-3 and exercise: novel combination therapy for spinal contusion injury. *J Neurophysiol* 114:2923-2940.
- Petrosyan HA, Alessi V, Sisto SA, Kaufman M, Arvanian VL (2017) Transcranial magnetic stimulation (TMS) responses elicited in hindlimb muscles as an assessment of synaptic plasticity in spino-muscular circuitry after chronic spinal cord injury. *Neuroscience Letters* 642:37-42.
- Pfund Z, Chugani DC, Juhász C, Muzik O, Chugani HT, Wilds IB, Seraji-Bozorgzad N, Moore GJ (2000) Evidence for coupling between glucose metabolism and glutamate cycling using FDG PET and 1H magnetic resonance spectroscopy in patients with epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:871-878.
- Piepmeyer JM, Lehmann KB, Lane JG (1985) Cardiovascular instability following acute cervical spinal cord trauma. *Cent Nerv Syst Trauma* 2:153-160.
- Pilowsky PM, de Castro D, Llewellyn-Smith I, Lipski J, Voss MD (1990) Serotonin immunoreactive boutons make synapses with feline phrenic motoneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:1091-1098.
- Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P (2010) A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 185:7413-7425.
- Pinsker H, Kupfermann I, Castellucci V, Kandel E (1970) Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167:1740-1742.
- Pomeshchik Y, Kidin I, Savchenko E, Rolova T, Yamamoto M, Levonen AL, Ylä-Herttua S, Malm T, Kanninen K, Koistinaho J (2014) Does Nrf2 gene transfer facilitate recovery after contusion spinal cord injury? *Antioxid Redox Signal* 20:1313-1323.
- Poornasjedi-Meibod MS, Mansouri M, Fossey M, Squair JW, Liu J, McNeill JH, West CR (2019) Experimental Spinal Cord Injury Causes Left-Ventricular Atrophy and Is Associated with an Upregulation of Proteolytic Pathways. *J Neurotrauma* 36:950-961.
- Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC (1996) Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 45:349-363.

- Popovich PG, Guan Z, McGaughy V, Fisher L, Hickey WF, Basso DM (2002) The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:623-633.
- Porter WT (1895) The Path of the Respiratory Impulse from the Bulb to the Phrenic Nuclei. *J Physiol* 17:455-485.
- Potter WB, O'Riordan KJ, Barnett D, Osting SM, Wagoner M, Burger C, Roopra A (2010) Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PLoS one* 5:e8996.
- Powell FL, Fu Z (2008) HIF-1 and ventilatory acclimatization to chronic hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology* 164:282-287.
- Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS (1998) Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* 112:123-134.
- Prakash M, Raxwal V, Froelicher VF, Kalisetti D, Vieira A, O'Mara G, Marcus R, Myers J, Kiratli J, Perkash I (2002) Electrocardiographic findings in patients with chronic spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil* 81:601-608.
- Prakash YS, Mantilla CB, Zhan WZ, Smithson KG, Sieck GC (2000) Phrenic motoneuron morphology during rapid diaphragm muscle growth. *J Appl Physiol* (1985) 89:563-572.
- Priest CA, Manley NC, Denham J, Wirth ED, 3rd, Lebkowski JS (2015) Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regen Med* 10:939-958.
- Pyner S, Coote JH (1999) Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons. *Neuroscience* 88:949-957.
- Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H (2016) Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med* 98:56-67.
- Qi HX, Stepniowska I, Kaas JH (2000) Reorganization of primary motor cortex in adult macaque monkeys with long-standing amputations. *J Neurophysiol* 84:2133-2147.
- Rabchevsky AG, Streit WJ (1998) Role of microglia in postinjury repair and regeneration of the CNS. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 4:187-192.
- Rabchevsky AG, Patel SP, Lyttle TS, Eldahan KC, O'Dell CR, Zhang Y, Popovich PG, Kitzman PH, Donohue KD (2012) Effects of gabapentin on muscle spasticity and both induced as well as spontaneous autonomic dysreflexia after complete spinal cord injury. *Front Physiol* 3:329.
- Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, Chiorean EG, Dipaola RS, Stein MN, Rocha Lima CM, Schlesselman JJ, Tolba K, Langmuir VK, Kroll S, Jung DT, Kurtoglu M, Rosenblatt J, Lampidis TJ (2013) A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:523-530.
- Raineteau O, Schwab ME (2001) Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature reviews Neuroscience* 2:263-273.
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227:1054-1056.
- Rauschecker JP, Singer W (1982) Binocular deprivation can erase the effects of preceding monocular or binocular vision in kitten cortex. *Brain research* 256:495-498.
- Rho JM, Shao LR, Stafstrom CE (2019) 2-Deoxyglucose and Beta-Hydroxybutyrate: Metabolic Agents for Seizure Control. *Front Cell Neurosci* 13:172.
- Rhodes KE, Fawcett JW (2004) Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *Journal of anatomy* 204:33-48.
- Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL (2012) Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8:e1002536.
- Ribic A (2020) Stability in the Face of Change: Lifelong Experience-Dependent Plasticity in the Sensory Cortex. *Front Cell Neurosci* 14:76.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980) Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284:264-265.
- Richter D, Ballantyne D, Remmers J (1986) How Is the Respiratory Rhythm Generated? A Model. *Physiology* 1:109-112.
- Richter DW, Smith JC (2014) Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology (Bethesda)* 29:58-71.
- Ridding MC, Rothwell JC (2007) Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? *Nature reviews Neuroscience* 8:559-567.
- Rimajova M, Lenzo NP, Wu JS, Bates KA, Campbell A, Dhaliwal SS, McCarthy M, Rodrigues M, Paton A, Rowe C, Foster JK, Martins RN (2008) Fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG)-PET in APOEepsilon4 carriers in the Australian population. *J Alzheimers Dis* 13:137-146.
- Romero MI, Rangappa N, Li L, Lightfoot E, Garry MG, Smith GM (2000) Extensive sprouting of sensory afferents and hyperalgesia induced by conditional expression of nerve growth factor in the adult spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4435-4445.
- Rosenbaum H, Renshaw B (1949) Descending respiratory pathways in the cervical spinal cord. *Am J Physiol* 157:468-476.
- Rosenblueth A, Ortiz T (1936) THE CROSSED RESPIRATORY IMPULSES TO THE PHRENIC. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 117:495-513.
- Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K, Winslow JW (1990) Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 4:767-773.
- Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, Kumamaru H, Salegio EA, Kadoya K, Weber JL, Liang JJ, Moseanko R, Hawbecker S, Huie JR, Havton LA, Nout-Lomas YS, Ferguson AR, Beattie MS, Bresnahan JC, Tuszynski MH (2018) Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord. *Nat Med* 24:484-490.
- Rosignol S, Frigon A (2011) Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 34:413-440.
- Rosignol S, Bouyer L, Barthélemy D, Langlet C, Leblond H (2002) Recovery of locomotion in the cat following spinal cord lesions. *Brain Research Reviews* 40:257-266.
- Rouiller EM, Liang FY, Moret V, Wiesendanger M (1991) Trajectory of redirected corticospinal axons after unilateral lesion of the sensorimotor cortex in neonatal rat; a phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *Experimental neurology* 114:53-65.
- Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG (2008) Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus* 25:E2.
- Rubin LJ, Magliola L, Feng X, Jones AW, Hale CC (2005) Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol* (1985) 98:296-306.
- Rusanescu G, Mao J (2015) Immature spinal cord neurons are dynamic regulators of adult nociceptive sensitivity. *J Cell Mol Med* 19:2352-2364.
- Russell SA, Bashaw GJ (2018) Axon guidance pathways and the control of gene expression. *Dev Dyn* 247:571-580.
- Sabatini DM (2017) Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:11818-11825.

- Sakima A, Yamazato M, Sesoko S, Muratani H, Fukiyama K (2000) Cardiovascular and sympathetic effects of L-glutamate and glycine injected into the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Hypertens Res* 23:633-641.
- Samarghandian S, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Khan H, Forouzanfar F, Aramjoo H, Farkhondeh T (2020) A Pivotal Role of the Nrf2 Signaling Pathway in Spinal Cord Injury: A Prospective Therapeutics Study. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 19:207-219.
- Sandhu MS, Gray E, Kocherginsky M, Jayaraman A, Mitchell GS, Rymer WZ (2019) Prednisolone Pretreatment Enhances Intermittent Hypoxia-Induced Plasticity in Persons With Chronic Incomplete Spinal Cord Injury. *Neurorehabil Neural Repair* 33:911-921.
- Sandhu MS, Dougherty BJ, Lane MA, Bolser DC, Kirkwood PA, Reier PJ, Fuller DD (2009a) Respiratory recovery following high cervical hemisection. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:94-101.
- Sandhu MS, Dougherty BJ, Lane MA, Bolser DC, Kirkwood PA, Reier PJ, Fuller DD (2009b) Respiratory recovery following high cervical hemisection. *Respiratory physiology & neurobiology* 169:94-101.
- Sanes JN, Suner S, Donoghue JP (1990) Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. I. Long-term patterns of reorganization following motor or mixed peripheral nerve lesions. *Exp Brain Res* 79:479-491.
- Sasaki S, Isa T, Pettersson LG, Alstermark B, Naito K, Yoshimura K, Seki K, Ohki Y (2004) Dexterous finger movements in primate without monosynaptic corticomotoneuronal excitation. *J Neurophysiol* 92:3142-3147.
- Satkunendrarajah K, Karadimas SK, Laliberte AM, Montandon G, Fehlings MG (2018) Cervical excitatory neurons sustain breathing after spinal cord injury. *Nature* 562:419-422.
- Sato M, Stryker MP (2008) Distinctive features of adult ocular dominance plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:10278-10286.
- Saunders NR, Kitchener P, Knott GW, Nicholls JG, Potter A, Smith TJ (1998) Development of walking, swimming and neuronal connections after complete spinal cord transection in the neonatal opossum, *Monodelphis domestica*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:339-355.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205:260-272.
- Schneggenburger R, Neher E (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406:889-893.
- Schwab ME, Strittmatter SM (2014) Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr Opin Neurobiol* 27:53-60.
- Seligman AM, Davis WA (1941) THE EFFECTS OF SOME DRUGS ON THE CROSSED PHRENIC PHENOMENON. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 134:102-106.
- Senjaya F, Midha R (2013) Nerve transfer strategies for spinal cord injury. *World Neurosurg* 80:e319-326.
- Shah SA, Amin FU, Khan M, Abid MN, Rehman SU, Kim TH, Kim MW, Kim MO (2016) Anthocyanins abrogate glutamate-induced AMPK activation, oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration in postnatal rat brain. *J Neuroinflammation* 13:286.
- Shang Y, Wang X, Shang X, Zhang H, Liu Z, Yin T, Zhang T (2016) Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats. *Neurobiol Learn Mem* 134 Pt B:369-378.
- Sharif H, Wainman L, O'Leary D, Ditor D (2017) The effect of blood volume and volume loading on left ventricular diastolic function in individuals with spinal cord injury. *Spinal Cord* 55:753-758.
- Sharshar T, Ross E, Hopkinson NS, Dayer M, Nickol A, Lofaso F, Moxham J, Similowski T, Polkey MI (2003) Effect of voluntary facilitation on the diaphragmatic response to transcranial magnetic stimulation. *J Appl Physiol* 95:26-34.
- Shatz CJ, Stryker MP (1978) Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol* 281:267-283.
- Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG (2009) PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* 326:592-596.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews Neuroscience* 5:146-156.
- Silverthorn DU (2010) *Human Physiology: an integrated approach*: PHI.
- Similowski T, Catala M, Rancurel G, Derenne JP (1996a) Impairment of central motor conduction to the diaphragm in stroke. *Am J Respir Crit Care Med* 154:436-441.
- Similowski T, Straus C, Coic L, Derenne JP (1996b) Facilitation-independent response of the diaphragm to cortical magnetic stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1771-1777.
- Simons AL, Mattson DM, Dornfeld K, Spitz DR (2009) Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 5 Suppl 1:S2-6.
- Singh LP, Devi TS, Nantwi KD (2012) Theophylline regulates inflammatory and neurotrophic factor signals in functional recovery after C2-hemisection in adult rats. *Experimental neurology* 238:79-88.
- Singh SP, Singh S, Jain V (1990) Effects of 5-bromo-2-deoxyuridine and 2-deoxy-D-glucose on radiation-induced micronuclei in mouse bone marrow. *Int J Radiat Biol* 58:791-797.
- Skene JH, Willard M (1981) Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J Cell Biol* 89:86-95.
- Smedfors G, Olson L, Karlsson TE (2018) A Nogo-Like Signaling Perspective from Birth to Adulthood and in Old Age: Brain Expression Patterns of Ligands, Receptors and Modulators. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11.
- Smith JC, Greer JJ, Liu GS, Feldman JL (1990) Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J Neurophysiol* 64:1149-1169.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991a) Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991b) Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.
- Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, Rybak IA, Paton JFR (2013) Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends in neurosciences* 36:152-162.
- Sofroniew MV (2014a) Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* 20:160-172.
- Sofroniew MV (2014b) Astroglialosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020420.
- Song Y, Li S, Song B, Zhang Y, Gao W, Li N, Fan K, Ma J (2014) The pathological changes in the spinal cord after dural tear with and without autologous fascia repair. *Eur Spine J* 23:1531-1540.
- Spyer KM (1994) Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol* 474:1-19.

- Squair JW, Liu J, Tetzlaff W, Krassioukov AV, West CR (2018a) Spinal cord injury-induced cardiomyocyte atrophy and impaired cardiac function are severity dependent. *Exp Physiol* 103:179-189.
- Squair JW, West CR, Popok D, Assinck P, Liu J, Tetzlaff W, Krassioukov AV (2017) High Thoracic Contusion Model for the Investigation of Cardiovascular Function after Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 34:671-684.
- Squair JW, DeVeau KM, Harman KA, Poormasjedi-Meibod MS, Hayes B, Liu J, Magnuson DSK, Krassioukov AV, West CR (2018b) Spinal Cord Injury Causes Systolic Dysfunction and Cardiomyocyte Atrophy. *J Neurotrauma* 35:424-434.
- Squire L, Kandel E (1999) *Memory: From Mind to Molecules: Scientific American Library*.
- Sroga JM, Jones TB, Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG (2003) Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 462:223-240.
- Staffaroni AM, Melrose RJ, Leskin LP, Riskin-Jones H, Harwood D, Mandelkern M, Sultzer DL (2017) The functional neuroanatomy of verbal memory in Alzheimer's disease: [(18)F]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) correlates of recency and recognition memory. *J Clin Exp Neuropsychol* 39:682-693.
- Stafstrom CE, Roopra A, Sutula TP (2008) Seizure suppression via glycolysis inhibition with 2-deoxy-D-glucose (2DG). *Epilepsia* 49 Suppl 8:97-100.
- Stafstrom CE, Ockuly JC, Murphree L, Valley MT, Roopra A, Sutula TP (2009) Anticonvulsant and antiepileptic actions of 2-deoxy-D-glucose in epilepsy models. *Ann Neurol* 65:435-447.
- Stamegna JC, Girard SD, Veron A, Sicard G, Khrestchatisky M, Feron F, Roman FS (2014) A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. *Stem Cell Res* 12:673-679.
- Stamegna JC, Sadelli K, Escoffier G, Girard SD, Veron AD, Bonnet A, Khrestchatisky M, Gauthier P, Roman FS (2018) Grafts of Olfactory Stem Cells Restore Breathing and Motor Functions after Rat Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 35:1765-1780.
- Stepanyants A, Hof PR, Chklovskii DB (2002) Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron* 34:275-288.
- Sternini C (1997) Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2:1-7.
- Stojkov D, Amini P, Oberson K, Sokollik C, Duppenhaler A, Simon HU, Yousefi S (2017) ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 216:4073-4090.
- Stokes BT, Reier PJ (1992) Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damage to the adult rat spinal cord. *Experimental neurology* 116:1-12.
- Streeter KA, Sunshine MD, Patel S, Gonzalez-Rothi EJ, Reier PJ, Baekey DM, Fuller DD (2017) Intermittent Hypoxia Enhances Functional Connectivity of Midcervical Spinal Interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37:8349-8362.
- Sun D, Jakobs TC (2012) Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist* 18:567-588.
- Sun T, Ye C, Wu J, Zhang Z, Cai Y, Yue F (2013) Treadmill step training promotes spinal cord neural plasticity after incomplete spinal cord injury. *Neural Regen Res* 8:2540-2547.
- Sykes M, Matheson NA, Brownjohn PW, Tang AD, Rodger J, Shemmell JB, Reynolds JN (2016) Differences in Motor Evoked Potentials Induced in Rats by Transcranial Magnetic Stimulation under Two Separate Anesthetics: Implications for Plasticity Studies. *Front Neural Circuits* 10:80.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572:503-523.
- Takeda A, Atobe Y, Kadota T, Goris RC, Funakoshi K (2015) Axonal regeneration through the fibrous scar in lesioned goldfish spinal cord. *Neuroscience* 284:134-152.
- Tan W, Pagliardini S, Yang P, Janczewski WA, Feldman JL (2010) Projections of preBötzing complex neurons in adult rats. *J Comp Neurol* 518:1862-1878.
- Tanaka H, Mori S, Kimura H (1992) Developmental changes in the serotonergic innervation of hindlimb extensor motoneurons in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res* 65:1-12.
- Tang A, Thickbroom G, Rodger J (2017) Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Brain: Mechanisms from Animal and Experimental Models. *Neuroscientist* 23:82-94.
- Tang AD, Lowe AS, Garrett AR, Woodward R, Bennett W, Canty AJ, Garry MI, Hinder MR, Summers JJ, Gersner R, Rotenberg A, Thickbroom G, Walton J, Rodger J (2016) Construction and Evaluation of Rodent-Specific rTMS Coils. *Front Neural Circuits* 10:47.
- Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75:15-26.
- Tazoe T, Perez MA (2015) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on recovery of function after spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 96:S145-155.
- Teasell RW, Arnold JM, Krassioukov A, Delaney GA (2000) Cardiovascular consequences of loss of supraspinal control of the sympathetic nervous system after spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 81:506-516.
- Terada J, Mitchell GS (2011) Diaphragm long-term facilitation following acute intermittent hypoxia during wakefulness and sleep. *J Appl Physiol* 110:1299-1310.
- Terse PS, Joshi PS, Bordelon NR, Brys AM, Patton KM, Arndt TP, Sutula TP (2016) 2-Deoxy-d-Glucose (2-DG)-Induced Cardiac Toxicity in Rat: NT-proBNP and BNP as Potential Early Cardiac Safety Biomarkers. *Int J Toxicol* 35:284-293.
- Tester NJ, Fuller DD, Fromm JS, Spiess MR, Behrman AL, Mateika JH (2014) Long-term facilitation of ventilation in humans with chronic spinal cord injury. *Am J Respir Crit Care Med* 189:57-65.
- Tetzlaff W, Alexander SW, Miller FD, Bisby MA (1991) Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:2528-2544.
- Thaker SK, Ch'ng J, Christofk HR (2019) Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol* 17:59.
- Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW (2019) Epilepsy in adults. *Lancet* 393:689-701.
- Tian GF, Peever JH, Duffin J (1999) Bötzing-complex, bulbosplinal expiratory neurones monosynaptically inhibit ventral-group respiratory neurones in the decerebrate rat. *Exp Brain Res* 124:173-180.
- Tibbs PA, Young B, McAllister RG, Brooks WH, Tackett L (1978) Studies of experimental cervical spinal cord transection. Part I: Hemodynamic changes after acute cervical spinal cord transection. *J Neurosurg* 49:558-562.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J (2004) Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:6531-6539.

- Tomé M, Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC (2009) Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem Cells* 27:2196-2208.
- Trippe J, Mix A, Aydin-Abidin S, Funke K, Benali A (2009) theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex. *Exp Brain Res* 199:411-421.
- Tsuboyama M, Kaye HL, Rotenberg A (2020) Review of Transcranial Magnetic Stimulation in Epilepsy. *Clin Ther* 42:1155-1168.
- Tsutsui S, Yamada H (2016) Basic Principles and Recent Trends of Transcranial Motor Evoked Potentials in Intraoperative Neurophysiologic Monitoring. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 56:451-456.
- Turi Z, Lenz M, Paulus W, Mittner M, Vlachos A (2021) Selecting stimulation intensity in repetitive transcranial magnetic stimulation studies: A systematic review between 1991 and 2020. *The European journal of neuroscience* 53:3404-3415.
- Tuszynski MH, Grill R, Jones LL, Brant A, Blesch A, Löw K, Lacroix S, Lu P (2003) NT-3 gene delivery elicits growth of chronically injured corticospinal axons and modestly improves functional deficits after chronic scar resection. *Experimental neurology* 181:47-56.
- Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, Yamamoto M, Kawaguchi S, Ishii R, Shinosaki K (2011) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry Clin Neurosci* 65:77-81.
- Ughrin YM, Chen ZJ, Levine JM (2003) Multiple regions of the NG2 proteoglycan inhibit neurite growth and induce growth cone collapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:175-186.
- Urban MW, Ghosh B, Block CG, Charsar BA, Smith GM, Wright MC, Li S, Lepore AC (2019a) Protein Tyrosine Phosphatase σ Inhibitory Peptide Promotes Recovery of Diaphragm Function and Sprouting of Bulbosplinal Respiratory Axons after Cervical Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 37:572-579.
- Urban MW, Ghosh B, Block CG, Strojny LR, Charsar BA, Goulão M, Komaravolu SS, Smith GM, Wright MC, Li S, Lepore AC (2019b) Long-Distance Axon Regeneration Promotes Recovery of Diaphragmatic Respiratory Function after Spinal Cord Injury. *eNeuro* 6.
- Vaibhav K, Braun M, Alverson K, Khodadadi H, Kutiyanawalla A, Ward A, Banerjee C, Sparks T, Malik A, Rashid MH, Khan MB, Waters MF, Hess DC, Arbab AS, Vender JR, Hoda N, Baban B, Dhandapani KM (2020) Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. *Science Advances* 6:eaax8847.
- Valls-Solé J, Pascual-Leone A, Wassermann EM, Hallett M (1992) Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section* 85:355-364.
- Van der Kloot W, Molgó J (1994) Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 74:899-991.
- van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Brück W, Unterberg A, Bührer C, von Deimling A (2001) Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 35:167-179.
- Vandermeeren Y, Bastings E, Fadiga L, Olivier E (2003) Long-latency motor evoked potentials in congenital hemiplegia. *Clin Neurophysiol* 114:1808-1818.
- 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.
- Verma A, Adhikary A, Woloschak G, Dwarakanath BS, Papineni RVL (2020) A combinatorial approach of a polypharmacological adjuvant 2-deoxy-D-glucose with low dose radiation therapy to quell the cytokine storm in COVID-19 management. *Int J Radiat Biol* 96:1323-1328.
- Veyrac A, Besnard A, Caboche J, Davis S, Laroche S (2014) The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity, and memory. *Prog Mol Biol Transl Sci* 122:89-129.
- Vijayaraghavan R, Kumar D, Dube SN, Singh R, Pandey KS, Bag BC, Kaushik MP, Sekhar K, Dwarakanath BS, Ravindranath T (2006) Acute toxicity and cardio-respiratory effects of 2-deoxy-D-glucose: a promising radio sensitiser. *Biomed Environ Sci* 19:96-103.
- Vinit S, Gauthier P, Stamegna JC, Kastner A (2006) High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J Neurotrauma* 23:1137-1146.
- Vinit S, Darlot F, Stamegna JC, Gauthier P, Kastner A (2009) Effect of cervical spinal cord hemisection on the expression of axon growth markers. *Neurosci Lett* 462:276-280.
- Vinit S, Darlot F, Aoulaïche H, Boulenguez P, Kastner A (2011) Distinct expression of c-Jun and HSP27 in axotomized and spared bulbospinal neurons after cervical spinal cord injury. *J Mol Neurosci* 45:119-133.
- Vinit S, Keomani E, Deramaudt TB, Bonay M, Petitjean M (2016) Reorganization of Respiratory Descending Pathways following Cervical Spinal Partial Section Investigated by Transcranial Magnetic Stimulation in the Rat. *PLoS one* 11:e0148180.
- Vinit S, Boulenguez P, Efthimiadi L, Stamegna J-C, Gauthier P, Kastner A (2005) Axotomized bulbospinal neurons express c-Jun after cervical spinal cord injury. *Neuroreport* 16:1535-1539.
- Vinit S, Darlot F, Stamegna JC, Sanchez P, Gauthier P, Kastner A (2008) Long-term reorganization of respiratory pathways after partial cervical spinal cord injury. *The European journal of neuroscience* 27:897-908.
- Vinit S, Keomani E, Deramaudt TB, Spruance VM, Bezdudnaya T, Lane MA, Bonay M, Petitjean M (2014) Interdisciplinary approaches of transcranial magnetic stimulation applied to a respiratory neuronal circuitry model. *PLoS one* 9:e113251.
- Vivodtzev I, Napolitano A, Picard G, Taylor JA (2020) Ventilatory support during whole-body row training improves oxygen uptake efficiency in patients with high-level spinal cord injury: A pilot study. *Respir Med* 171:106104.
- Vlachos A, Muller-Dahlhaus F, Roskopp J, Lenz M, Ziemann U, Deller T (2012) Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 32:17514-17523.
- Vogler GA (2006) Chapter 19 - Anesthesia and Analgesia. In: *The Laboratory Rat (Second Edition)* (Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, eds), pp 627-664. Burlington: Academic Press.
- Voss M, Lorenz NI, Luger AL, Steinbach JP, Rieger J, Ronellenfisch MW (2018) Rescue of 2-Deoxyglucose Side Effects by Ketogenic Diet. *International journal of molecular sciences* 19.
- Waltereit R, Weller M (2003) Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 27:99-106.
- Walters BC, Hadley MN, Hurlbert RJ, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Harrigan MR, Rozelle CJ, Ryken TC, Theodore N (2013) Guidelines for the management of acute cervical spine and spinal cord injuries: 2013 update. *Neurosurgery* 60:82-91.
- Wang C, Wang Y, Shi X, Tang X, Cheng W, Wang X, An Y, Li S, Xu H, Li Y, Luan W, Wang X, Chen Z, Liu M, Yu L (2019) The TRAPs From Microglial Vesicles Protect Against Listeria Infection in the CNS. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13.
- Wang HY, Crupi D, Liu J, Stucky A, Cruciatu G, Di Rocco A, Friedman E, Quartarone A, Ghilardi MF (2011) Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:11044-11054.
- Wang J, Li H, Yao Y, Ren Y, Lin J, Hu J, Zheng M, Song X, Zhao T, Chen YY, Shen Y, Zhu YJ, Wang LL (2018) β -Elemene Enhances GAP-43 Expression and Neurite Outgrowth by Inhibiting RhoA Kinase Activation in Rats with Spinal Cord Injury. *Neuroscience* 383:12-21.

- Wang P, Yin R, Wang S, Zhou T, Zhang Y, Xiao M, Wang H, Xu G (2021) Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) and Treadmill Training on Recovery of Motor Function in a Rat Model of Partial Spinal Cord Injury. *Med Sci Monit* 27:e931601.
- Wang Q, Zhao Y, Sun M, Liu S, Li B, Zhang L, Yang L (2014) 2-Deoxy-d-glucose attenuates sevoflurane-induced neuroinflammation through nuclear factor-kappa B pathway in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28:1183-1189.
- Wang X, de Rivero Vaccari JP, Wang H, Diaz P, German R, Marcillo AE, Keane RW (2012) Activation of the nuclear factor E2-related factor 2/antioxidant response element pathway is neuroprotective after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 29:936-945.
- Warren PM, Steiger SC, Dick TE, MacFarlane PM, Alilain WJ, Silver J (2018) Rapid and robust restoration of breathing long after spinal cord injury. *Nat Commun* 9:4843-4843.
- Watson RA, Yeung TM (2011) What is the potential of oligodendrocyte progenitor cells to successfully treat human spinal cord injury? *BMC Neurol* 11:113.
- Watzlawick R, Rind J, Sena ES, Brommer B, Zhang T, Kopp MA, Dirnagl U, Macleod MR, Howells DW, Schwab JM (2016) Olfactory Ensheathing Cell Transplantation in Experimental Spinal Cord Injury: Effect size and Reporting Bias of 62 Experimental Treatments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Biol* 14:e1002468.
- Weaver LC, Verghese P, Bruce JC, Fehlings MG, Krenz NR, Marsh DR (2001) Autonomic dysreflexia and primary afferent sprouting after clip-compression injury of the rat spinal cord. *Journal of neurotrauma* 18:1107-1119.
- Wecht JM et al. (2021) International Standards to document Autonomic Function following SCI (ISAFSCI): Second Edition. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 27:23-49.
- Wehrle R, Camand E, Chedotal A, Sotelo C, Dusart I (2005) Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *The European journal of neuroscience* 22:2134-2144.
- Weidner N, Ner A, Salimi N, Tuszyński MH (2001) Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3513-3518.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:7599-7609.
- Welch JF, Argento PJ, Mitchell GS, Fox EJ (2020) Reliability of diaphragmatic motor-evoked potentials induced by transcranial magnetic stimulation. *J Appl Physiol* (1985) 129:1393-1404.
- 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.
- Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah TR, Davis S, Forster HV (2004) Large lesions in the pre-Bötzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *J Appl Physiol* (1985) 97:1629-1636.
- West CR, Crawford MA, Poornasjedi-Meibod MS, Currie KD, Fallavollita A, Yuen V, McNeill JH, Krassioukov AV (2014) Passive hind-limb cycling improves cardiac function and reduces cardiovascular disease risk in experimental spinal cord injury. *J Physiol* 592:1771-1783.
- West CR, Squair JW, McCracken L, Currie KD, Somvanshi R, Yuen V, Phillips AA, Kumar U, McNeill JH, Krassioukov AV (2016) Cardiac Consequences of Autonomic Dysreflexia in Spinal Cord Injury. *Hypertension* 68:1281-1289.
- White TE, Lane MA, Sandhu MS, O'Steen BE, Fuller DD, Reier PJ (2010) Neuronal progenitor transplantation and respiratory outcomes following upper cervical spinal cord injury in adult rats. *Experimental neurology* 225:231-236.
- Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB (1957) Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *The Journal of biological chemistry* 224:963-969.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963) SINGLE-CELL RESPONSES IN STRIATE CORTEX OF KITTENS DEPRIVED OF VISION IN ONE EYE. *J Neurophysiol* 26:1003-1017.
- Wiesel TN, Hubel DH (1965) Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *J Neurophysiol* 28:1060-1072.
- Willenberg R, Zukor K, Liu K, He Z, Steward O (2016) Variable laterality of corticospinal tract axons that regenerate after spinal cord injury as a result of PTEN deletion or knock-down. *J Comp Neurol* 524:2654-2676.
- Wincek A, Huber J, Leszczyńska K, Fortuna W, Okurowski S, Chmielak K, Tabakow P (2021) The Long-Term Effect of Treatment Using the Transcranial Magnetic Stimulation rTMS in Patients after Incomplete Cervical or Thoracic Spinal Cord Injury. *J Clin Med* 10.
- Windelborn JA, Mitchell GS (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.
- Woodward GE, Hudson MT (1954) The effect of 2-desoxy-D-glucose on glycolysis and respiration of tumor and normal tissues. *Cancer Res* 14:599-605.
- Wu M. VS, 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*.
- Wu MJ, Vinit S, Chen CL, Lee KZ (2020) 5-HT7 Receptor Inhibition Transiently Improves Respiratory Function Following Daily Acute Intermittent Hypercapnic-Hypoxia in Rats With Chronic Midcervical Spinal Cord Contusion. *Neurorehabil Neural Repair* 34:333-343.
- Xi H, Kurtoglu M, Lampidis TJ (2014) The wonders of 2-deoxy-D-glucose. *IUBMB Life* 66:110-121.
- Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ (2013) Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK β leading to autophagy. *Biochem Pharmacol* 85:1463-1477.
- Xu J, Kim GM, Chen S, Yan P, Ahmed SH, Ku G, Beckman JS, Xu XM, Hsu CY (2001) iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 18:523-532.
- Yan T, Xie Q, Zheng Z, Zou K, Wang L (2017) Different frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for posttraumatic stress disorder (PTSD): A systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res* 89:125-135.
- Yang JY, Kim HS, Lee JK (2007) Changes in nitric oxide synthase expression in young and adult rats after spinal cord injury. *Spinal Cord* 45:731-738.
- Yang S, Chang MC (2020) Effect of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Pain Management: A Systematic Narrative Review. *Front Neurol* 11:114.
- Yao J, Chen S, Mao Z, Cadenas E, Brinton RD (2011) 2-Deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one* 6:e21788.

- Yao L, Daly W, Newland B, Yao S, Wang W, Chen BKK, Madigan N, Windebank A, Pandit A (2013) Improved axonal regeneration of transected spinal cord mediated by multichannel collagen conduits functionalized with neurotrophin-3 gene. *Gene Therapy* 20:1149-1157.
- Yılmaz B, Kesikburun S, Yaşar E, Tan AK (2014) The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on refractory neuropathic pain in spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 37:397-400.
- York EM, Zhang J, Choi HB, MacVicar BA (2021) Neuroinflammatory inhibition of synaptic long-term potentiation requires immunometabolic reprogramming of microglia. *Glia* 69:567-578.
- Yoshioka A, Hardy M, Younkin DP, Grinspan JB, Stern JL, Pleasure D (1995) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. *J Neurochem* 64:2442-2448.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, Schmid I, Simon HU (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 16:1438-1444.
- Yu XJ, Goshgarian HG (1993) Aging enhances synaptic efficacy in a latent motor pathway following spinal cord hemisection in adult rats. *Experimental neurology* 121:231-238.
- Yue L, Xiao-lin H, Tao S (2009) The effects of chronic repetitive transcranial magnetic stimulation on glutamate and gamma-aminobutyric acid in rat brain. *Brain research* 1260:94-99.
- Yukimasa T, Yoshimura R, Tamagawa A, Uozumi T, Shinkai K, Ueda N, Tsuji S, Nakamura J (2006) High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves refractory depression by influencing catecholamine and brain-derived neurotrophic factors. *Pharmacopsychiatry* 39:52-59.
- Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y (2014) 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer letters* 355:176-183.
- Zhang D, Fei Q, Li J, Zhang C, Sun Y, Zhu C, Wang F, Sun Y (2016) 2-Deoxyglucose Reverses the Promoting Effect of Insulin on Colorectal Cancer Cells In Vitro. *PLoS one* 11:e0151115.
- Zhang KH, Xiao HS, Lu PH, Shi J, Li GD, Wang YT, Han S, Zhang FX, Lu YJ, Zhang X, Xu XM (2004) Differential gene expression after complete spinal cord transection in adult rats: an analysis focused on a subchronic post-injury stage. *Neuroscience* 128:375-388.
- Zhang T, Zhu X, Wu H, Jiang K, Zhao G, Shaikat A, Deng G, Qiu C (2019) Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 α /HK2 axis of breast cancer cells: Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. *J Cell Mol Med* 23:3711-3723.
- Zhang YP, Burke DA, Shields LB, Chekmenev SY, Dincman T, Zhang Y, Zheng Y, Smith RR, Benton RL, DeVries WH, Hu X, Magnuson DS, Whittemore SR, Shields CB (2008) Spinal cord contusion based on precise vertebral stabilization and tissue displacement measured by combined assessment to discriminate small functional differences. *Journal of neurotrauma* 25:1227-1240.
- Zhao J, Li Z, Cong Y, Zhang J, Tan M, Zhang H, Geng N, Li M, Yu W, Shan P (2017) Repetitive transcranial magnetic stimulation improves cognitive function of Alzheimer's disease patients. *Oncotarget* 8:33864-33871.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7925-7930.
- Zholudeva LV, Lane MA (2019) Transplanting Cells for Spinal Cord Repair: Who, What, When, Where and Why? *Cell Transplant* 28:388-399.
- Zholudeva LV, Karliner JS, Dougherty KJ, Lane MA (2017) Anatomical Recruitment of Spinal V2a Interneurons into Phrenic Motor Circuitry after High Cervical Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 34:3058-3065.
- Zholudeva LV, Iyer N, Qiang L, Spruance VM, Randelman ML, White NW, Bezdudnaya T, Fischer I, Sakiyama-Elbert SE, Lane MA (2018) Transplantation of Neural Progenitors and V2a Interneurons after Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* 35:2883-2903.
- Zhou SY, Basura GJ, Goshgarian HG (2001) Serotonin(2) receptors mediate respiratory recovery after cervical spinal cord hemisection in adult rats. *J Appl Physiol* (1985) 91:2665-2673.
- Zhu K, Zhu Y, Hou X, Chen W, Qu X, Zhang Y, Li Z, Wang C, Chen J, Lv L, Wang J, Zhang D, Hou L (2021) NETs Lead to Sympathetic Hyperactivity After Traumatic Brain Injury Through the LL37-Hippo/MST1 Pathway. *Front Neurosci* 15:621477.
- Ziemann U, Rothwell JC, Ridding MC (1996) Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. *The Journal of Physiology* 496:873-881.
- Zimmer MB, Goshgarian HG (2007) GABA, not glycine, mediates inhibition of latent respiratory motor pathways after spinal cord injury. *Experimental neurology* 203:493-501.
- Zivkovic S, Ayazi M, Hammel G, Ren Y (2021) For Better or for Worse: A Look Into Neutrophils in Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci* 15:648076.
- Zorzo C, Higarza SG, Méndez M, Martínez JA, Pernía AM, Arias JL (2019) High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves neuronal activity without affecting astrocytes and microglia density. *Brain Res Bull* 150:13-20.