

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 15 Juillet 2022 par

Victor Bergé-Laval

**Etude des réseaux moteurs du tronc cérébral impliqués dans
l'activité rythmique des muscles des voies aériennes supérieures**

Discipline

Biologie Santé

Spécialité

Neurosciences

École doctorale

ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire/Partenaires de recherche

Institut de Neurosciences des Systèmes

Laboratoire Traitement du Signal et de l'Image

Institut de Neurobiologie de la Méditerranée



Composition du jury

Jean-Paul PRAUD

Rapporteur

Professeur titulaire et Praticien Hospitalier – Sherbrooke

Florence CAYETANOT

Rapporteuse

Maître de conférences – Paris

Muriel THOBY-BRISSON

Examinatrice

Directrice de Recherche – Bordeaux

Alain FRUGIERE

Président du jury

Professeur des Universités – Paris

Christian GESTREAU

Directeur de thèse

Maître de conférences – Marseille

Affidavit

Je soussigné, Victor Bergé-Laval, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Christian Gestreau, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 3 mai 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Résumé

L'oropharynx est un conduit commun pour l'air et la nourriture. Il est mobilisé par les muscles des voies aériennes supérieures. Le contrôle nerveux de la langue et du pharynx lors de la respiration, la déglutition et la succion dépend de générateurs centraux situés dans le tronc cérébral. Quels sont les mécanismes mis en jeu pour moduler et contrôler l'activité des mêmes muscles au cours de tâches motrices distinctes ? Quelles structures nerveuses permettent de protéger les poumons lors de la déglutition ?

Nous montrons ici que la quipazine, un agoniste sérotoninergique, peut être administrée sur la préparation perfusée in situ de rat juvénile (P15-21) pour augmenter la fréquence de déglutition et que cet effet est médié par les noyaux du raphé bulbaire caudal. Sur ce nouveau modèle, nous avons examiné si les structures pontiques participent à la commande motrice de la langue et du larynx lors de la déglutition et contribuent à la protection des poumons. Après transection ponto-bulbaire, la commande laryngée respiratoire disparaît, mais lors de la déglutition, la commande hypoglosse diminue et la commande laryngée ne varie pas. Aussi, la lésion altère la coordination respiration-déglutition. Le pont joue donc un rôle clé dans la protection des poumons. Certains motoneurones protruseurs de la langue ainsi que de nombreux neurones de la colonne respiratoire ventrale déchargent lors de la respiration et la déglutition. Ces résultats confirment le fonctionnement dynamique des réseaux du tronc cérébral. La préparation in situ a été développée chez le raton âgé de 6-9 jours et une activité de type succion a été observée. Le Thr4,Gly7-oxytocin (TGOT), un agoniste ocytocinergique, augmente la succion et cet effet est aboli après ajout d'un antagoniste des récepteurs à l'ocytocine.

Ce travail fournit de nouvelles données intéressantes sur les mécanismes neuronaux permettant le contrôle moteur rythmique des muscles du carrefour aéro-digestif et représente une avancée méthodologique importante.

Mots clés : Respiration, Déglutition, Succion, Langue, Pharynx, Réseaux neuronaux, Tronc cérébral

Abstract

The oropharynx is a common passage for air and food and is mobilized by the muscles of the upper airways. Brainstem central pattern generators elaborate rhythmic command to the tongue and larynx during breathing, swallowing and sucking. What are the mechanisms modulating and controlling the activity of the same muscles during distinct motor tasks? What are the main structures involved in airway protection?

Here, we show that quipazine, a serotonergic agonist, can be administered in the rat perfused preparation to increase swallowing. The caudal raphe nuclei are likely mediating this modulatory effect. Using this model, we examined whether ponto-bulbar nuclei participate in the motor control of the tongue and larynx during swallowing and contribute to reflex protection of the lungs. A ponto-bulbar transection disrupts the laryngeal respiratory drive but does not alter laryngeal control during swallowing. Also, the lesion decreases the swallowing hypoglossal activity and alters the swallow-breathing coordination. Thus, the pons plays a key role in protecting the lungs. We show that some motoneurons to tongue protrudors and many neurons of the ventral respiratory column discharge during breathing and swallowing. These results confirm the dynamic function of brainstem networks. Perfused preparations were also developed in 6-9 days old rat and sucking-like activity was observed. The oxytocinergic agonist TGOT increases sucking, this effect being abolished by prior administration of an oxytocin receptor antagonist.

This work provides new data on the neural mechanisms allowing rhythmic motor control of the upper airways and represents an important methodological advance.

Keywords : Breathing, Swallowing, Sucking, Tongue and larynx, Neuronal networks, Brainstem

Remerciements

Je souhaite remercier l'Agence Nationale de la Recherche pour avoir financé mon travail doctoral.

Ce travail de thèse a été réalisé tout d'abord au sein de l'Institut de Neurosciences des Systèmes dirigé par le Docteur Viktor Jirsa, puis au sein de l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée dirigé par le Docteur Rosa Cossart. Je les remercie de m'avoir accueilli au sein de leur institut.

Je souhaite remercier et exprimer ma gratitude envers le Docteur Florence Cayetanot et le Professeur Jean-Paul Praud pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur et évaluer ce manuscrit de thèse, ainsi qu'au Docteur Muriel Thoby-Brisson et au Professeur Alain Frugiere d'avoir accepté de participer à l'examen de ce travail.

Je remercie le Docteur Alfredo Hernandez ainsi que Monsieur Yvan Avdeew pour le travail effectué lors de notre partenariat avec votre laboratoire.

Je remercie le Docteur Clément Menuet pour sa gentillesse, ses conseils et son aide, ainsi que Mademoiselle Julie Buron pour son aide précieuse lors de mon arrivée à l'INMED.

Cette thèse je la dois au Docteur Christian Gestreau. Après m'avoir marqué dès ton premier cours en licence, tant par le sujet que par ta passion de transmettre, j'ai toujours cru que travailler à tes côtés serait réservé aux meilleurs de la promo, ce qui était loin d'être mon cas... Cependant j'ai pris le risque d'être refoulé, et c'est avec joie que tu m'as donné ma chance, non pas une fois mais deux fois. La première fois en tant que stagiaire, et la deuxième fois en tant que doctorant. C'est toi qui m'as proposé cette thèse avec toi, et je ne te remercierais jamais assez de cette confiance et de cet honneur. Pour cela je te remercie du fond du cœur. Bien plus qu'un directeur de thèse, tu as été pour moi un mentor et une personne en qui je pouvais avoir confiance et me confier. Bien que je n'aie pas réussi à titiller ta fibre scientifique, j'ai tout de même fait de mon mieux pour ne pas te décevoir, car tu mérites qu'on se donne à fond. Je te remercie pour ton guidage, tes réflexions bluffantes, en t'écoutant on dirait que faire de la science est facile (mais en fait non), pour tes conseils (scientifiques et autres), mais aussi pour ton immense gentillesse. Je n'ai pas souvenir d'une seule fois où tu m'as réprimandé pour mes erreurs, et pourtant je suis sûr que je l'aurai mérité à plusieurs reprises.

Cette thèse je la dois aussi à mes grands-parents, Mar et Daddy, sans qui je n'aurai jamais pu faire d'études aussi longues, mais aussi me construire en tant qu'homme. Votre sagesse a toujours su me guider, votre soutien digne d'Atlas m'a toujours été vital et vous avez toujours cru en moi. J'ai énormément de chance de vous avoir dans ma vie. Papa, je te remercie d'avoir toujours été là pour moi pendant mes études, et je sais que je te dois la réussite de mes examens, car nos séances de révisions ont toujours été des plus intenses ! Je te remercie aussi maman, je suis sûr que tu as fait de ton mieux. Je pense à toi aussi Maminou, tu aurais été si fière...

A mes frères et sœurs, en particulier Constance, Georgia et Pierre. Vous m'avez toujours soutenu et je vous aime.

A mes amis d'enfance, Baptiste, Martin, Marin, vous êtes comme mes frères et je vous remercie de me supporter depuis tout ce temps ! Mais aussi Lucie, Pierre, Jérémy, Erwan, Marina ainsi qu'à toi Jonathan, qui comprend ce que c'est d'être un imposteur !

A mon épouse, Amira, qui m'a soutenu, encouragé et fait ressentir comme le meilleur du monde. Tu as fait tout ce que tu as pu pour me permettre de préparer cette thèse, de la rédiger et la soutenir. On en a vécu des moments difficiles pendant toute cette période, et je suis sans doute l'homme le plus chanceux de t'avoir. Tu as toute ma tendresse et plus encore. Je remercie aussi Jalel et Najet, vous vous êtes occupé de moi comme un fils. Je te remercie aussi Amal, tu m'as toujours fait sentir comme parti de la famille. De plus, vous avez fait de votre mieux pour me permettre de rédiger mon manuscrit dans les meilleures conditions possibles lorsque j'étais chez vous, et pour cela je vous serai éternellement reconnaissant.

Table des matières

Résumé	2
Table des matières	3
Abréviations	6
Présentation générale et contexte de la thèse	11
Introduction	20
Chapitre 1 : Anatomie et commande motrice des voies aériennes supérieures et des muscles respiratoires thoraciques	22
I. L'émergence du carrefour aéro-digestif	22
II. Les voies aériennes supérieures.....	24
A. Les fosses nasales	24
B. La cavité buccale.....	26
C. Le pharynx	31
D. Le larynx	35
III. Les voies aériennes inférieures	40
A. La trachée et les bronches	40
B. Le diaphragme	41
C. Les muscles abdominaux	45
D. Les muscles intercostaux et accessoires respiratoires.....	47
Chapitre 2 : les générateurs de rythme centraux	48
I. Notion de générateur central d'activité motrice ou CPG	48
II. Caractéristiques des CPGs et exemple du CPG locomoteur	50
III. Mécanismes de la rythmogénèse	53
Chapitre 3 : Activité musculaire et contrôle nerveux de la respiration	57
I. Aspects mécaniques de la respiration.....	57
II. Le développement du réseau respiratoire	59
A. Stade embryonnaire	61
B. Maturation du réseau respiratoire	63
III. Le CPG respiratoire adulte	66
A. Contrôle périphérique	67
B. Localisation des structures du CPGr adulte	69
C. La rythmogénèse respiratoire adulte	77
D. La phase inspiratoire	79
E. L'expiration précoce ou post-inspiration	79
F. L'expiration tardive	80
Chapitre 4 : Activité musculaire et contrôle nerveux de la déglutition	82

I.	Aspects mécaniques de la déglutition.....	82
II.	Contrôle nerveux de la déglutition	86
A.	Contrôle périphérique	86
B.	Contrôle central de la déglutition.....	91
III.	La déglutition nutritive et non-nutritive	95
	Chapitre 5 : La coordination entre la respiration et la déglutition.....	98
	Chapitre 6 : Aspects physiopathologiques de la déglutition	107
I.	La dysphagie.....	107
II.	Prévalence, pathophysiologie et conséquences	108
III.	Evaluation clinique et expérimentale de la déglutition	110
	Chapitre 7 : Succion et mastication	114
I.	Succion nutritive et non-nutritive	114
II.	De la succion à la mastication	117
III.	Quelques données concernant la mastication	119
	Objectifs spécifiques de la thèse.....	121
	Matériels et méthodes.....	126
I.	Préparation perfusée <i>in situ</i>	127
II.	Enregistrement des paramètres physiologiques.....	128
	Résultats	132
	Chapitre 1 : Effets d'un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{2A} sur la déglutition <i>in situ</i>	133
I.	Introduction	133
II.	Matériels et méthodes	136
III.	Résultats.....	140
IV.	Discussion.....	153
	Chapitre 2 : Effet de l'abolition de la phase post-inspiratoire sur la déglutition et sur la coordination respiration-déglutition	162
I.	Introduction	162
II.	Matériels et méthodes	166
III.	Résultats.....	171
IV.	Discussion.....	176
	Chapitre 3 : Activités de décharge des motoneurones hypoglosses et des neurones de la colonne respiratoire ventrale au cours de la respiration et la déglutition	185
I.	Introduction	185
II.	Matériels et méthodes	187
III.	Résultats.....	188
IV.	Discussion.....	195

Chapitre 4 : Analyse des décharges motrices chez le raton nouveau-né <i>in situ</i> et influence d'un agoniste des récepteurs à l'ocytocine	199
I. Introduction	199
II. Matériels et méthodes	202
III. Résultats.....	205
IV. Discussion.....	214
Discussion générale	220
I. Les réseaux multifonctionnels	223
II. Signification de l'activité inspiratoire pendant la déglutition : exemple du Schluckatmung	232
III. Réflexions sur la neuromodulation de la déglutition.....	236
IV. Réflexions sur le déclenchement expérimental de la déglutition	240
V. Plasticité du CPG de la déglutition et rôle des afférences	244
VI. L'ocytocine est-elle impliquée dans la succion ?	246
VII. Optogénétique et traceurs neuronaux : une révolution dans la compréhension des réseaux neuronaux.....	249
Annexe.....	254
Optimisation des électrodes organiques, stimulation nerveuse vagale et mort soudaine liée à l'épilepsie	255
I. Contexte général de l'étude	255
II. Etat de l'art	256
III. Objectifs du travail	263
IV. Résumé des résultats obtenus	265
Bibliographie	279
Articles	323

Abréviations

4-AP : 4 Amino pyridine

5-HT : Sérotonine 5-hydroxytryptamine

5-HTR : Récepteur à la sérotonine

A5 et A6 : Noyaux noradrénergiques

AG : Age gestationnel

AICA : Artère cérébelleuse inférieure antérieure

AMPA : Aminométhylphosphonique

AMPc : Adenosine 3',5'monophosphate cyclique

AN : Noyau accessoire

ANOVA : Analyse de la variance

ANR : Agence nationale de la recherche

AUC : Aire sous la courbe ou « Area Under the Curve »

Aug : Croissant

AVC : Accident vasculaire cérébral

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau ou « Brain-Derived Neurotrophic Factor »

BK-Ca : Canaux potassique inactivés par le calcium à large conductance (Big Potassium)

BotC : Complexe de Bötzing

BP : Pression sanguine ou « Blood Pressure »

Chi² : Test du khi carré ou khi-deux

CPG : Générateur central de rythme ou « Central Pattern Generator »

CPGd : Générateur central de rythme déglutiteur

CPGm : Générateur central de rythme masticateur

CPGr : Générateur central de rythme respiratoire

CPP : Chlorophényl piperazine

CVR : Colonne respiratoire ventrale

DC : Courant continu ou « Direct Current »

Dec : Décroissant

Dig Ant : Digastrique antérieur

DP : Dépolarisation propagée

E : Expiratoire

E1 : ou Post-I, post-inspiration ou expiration précoce
 E14-20 : Jour embryonnaire 14-20
 E2 : Expiration tardive
 ECG : Electrocardiogramme
 EEG : Electroencéphalogramme
 EMG : Electromyogramme
 epF : Groupe respiratoire parafacial embryonnaire ou « embryonic paraFacial respiratory group »
 ES : Electrode à succion
 Exp-Sw-Exp : Déglutitions apparaissant pendant la phase expiratoire
 Exp-Sw-I : Déglutitions apparaissant avant l'inspiration
 GABA : Acide γ -aminobutyrique
 GAP : Jonctions communicantes
 GRD : Groupe respiratoire dorsal
 GRP : Groupe respiratoire pontique
 GRV : Groupe respiratoire ventral
 GRVc : Groupe respiratoire ventral caudal
 GRVr : Groupe respiratoire ventral rostral
 Het : Hétérozygote
 HR : Fréquence cardiaque ou « Heart Rate »
 I : Inspiration (ou Inspiratoire en fonction du contexte)
 ICaN : Courant non-sélectif activé par le calcium
 Ih : Courant activé par l'hyperpolarisation
 IKCa : Courant potassique dépendant du calcium
 INaP : Courants sodique persistant
 INMED : Institut de Neurobiologie de la Méditerranée
 INS : Institut Neuroscience Système
 interrupt-I ou I-Sw-I : Déglutitions interrompant l'inspiration
 IRMf : Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
 I-Sw : Déglutitions apparaissant pendant la phase inspiratoire sans l'interrompre
 I-Sw-Exp : Déglutitions apparaissant pendant la post-inspiration
 KCC2 : Cotransporteur potassium chloride 2
 KF : Noyau de Kolliker-Fuse

KO : Knock-Out

Kv1.1 : Sous-famille A de canaux potassiques voltage-dépendants 1

LCRa : Liquide céphalorachidien artificiel

LTSI : Laboratoire Traitement du Signal et de l'Image

M1 : Cortex moteur primaire

mmHg : Millimètre de mercure

NA ou Amb : Noyau ambigu

NC I : Nerf crânien olfactif

NC II : Nerf crânien optique

NC IX : Nerf crânien Glossopharyngien

NC V : Nerf crânien Trijumeau

NC VII : Nerf crânien Facial

NC X : Nerf crânien Vague

NC XI : Nerf crânien Accessoire

NC : Nerf crânien

NK1R : Récepteur neurokinine 1

NKCC1 : Cotransporteur sodium potassium chloride 1

NLR : Nerf laryngé récurrent

NLS : Nerf laryngé supérieur

NLSe : Nerf laryngé supérieur externe

NLSi : Nerf laryngé interne

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NR : Non respiratoire

NS Thr : nerf thoracique

NS : Nerf spinal

ns : Non significatif

NTS : Noyau du tractus solitaire

NX XII : Nerf crânien Hypoglosse

OCT : Optimal Cutting Temperature compound

OE : Electrode organique ou « Organic Electrode »

OT : Ocytocine

OTR : Récepteur à l'ocytocine

P6-30 : Jours après la naissance
 PA : Potentiel d'action
 Para-Amb : Région para-ambigu
 PB : Complexe parabrachial
 P-cells : Cellules « pompe » ou « Pump Cells »
 PEDOT : poly(3,4-éthylènedioxythiophène)
 PEMP : Potentiels évoqués moteurs pharyngés
 pFRG : Groupe respiratoire parafacial ou « paraFacial Respiratory Group »
 Phr : Nerf phrénique
 PICA : Artère cérébelleuse inférieure postérieure
 PiCo : Complexe post-inspiratoire
 Post-I : ou E1, post-inspiration ou expiration précoce (ou Post-inspiratoire en fonction du contexte)
 PP : Plexus pharyngien
 PreBotC : Complexe de pré-Bötzinger
 Pré-I : Pré-inspiratoire
 PSS : poly(styrène sulfonate)
 PVN : Noyau paraventriculaire
 PWS : Syndrome de Prader-Willi ou « Prader-Willi Syndrome »
 QPZ : Quipazine
 Ramp-I : Décharge inspiratoire en rampe
 Rf : Fréquence respiratoire ou « Respiratory frequency »
 RLM : Région locomotrice mésencéphalique
 RTN : Noyau rétro-trapézoïde
 S1 : Cortex somatosensoriel
 SD : Ecart type ou « Standard deviation »
 SK-Ca : Canaux potassiques inactivés par le calcium à faible conductance (Small Potassium)
 SMA : Aire motrice supplémentaire
 SMT : Stimulation magnétique transcrânienne
 SNC : Système nerveux central
 SNP : Système nerveux périphérique
 SON : Noyau supraoptique
 SP : Substance P

SR : Fréquence des déglutitions ou « Swallow Rate »

SSR : Récepteurs à la somatostatine

SSR : SSR126767A

STA : Spike Trigger Averaging

SUDEP : Mort soudaine et inexpliquée liée à l'épilepsie ou « sudden unexplained death in epilepsy »

TGOT : Agoniste ocytocinergique Thr4, Gly7-oxytocin

TP : Transection ponto-bulbaire

TRP : Transient Receptor Potential

TTL : Transistor-Transistor Logic

TWST : Timed Water Swallowing Test

UES : Sphincter œsophagien supérieur

V1a : Récepteurs à la vasopressine 1

V2a : Récepteurs à la vasopressine 2

VAI : Voies aériennes inférieures

VAS : Voies aériennes supérieures

VEES : Evaluation vidéo-endoscopique de la déglutition

Vertèbre C : Vertèbre cervicale

Vertèbre L : Vertèbre lombaire

Vertèbre T : Vertèbre thoracique

VFSS : Evaluation vidéo-fluoroscopique de la déglutition

Vglut2 : Transporteurs vésiculaires de type 2 du glutamate

VNS : Stimulation nerveuse vagale

Présentation générale et contexte de la thèse

Les travaux de recherches présentés dans cette thèse concernent les réseaux neuronaux du tronc cérébral impliqués dans l'élaboration de diverses commandes motrices rythmiques comme l'activité respiratoire, la déglutition ou encore l'activité de succion.

Il s'agit d'activités rythmiques indispensables à la survie des organismes et engagées dans le processus fondamental d'homéostasie, qui visent à maintenir les paramètres vitaux comme le taux d'oxygène ou de nutriments dans le sang artériel, dans les limites physiologiques. Ces rythmes moteurs sont à la base des fonctions de nutrition chez les mammifères. Il n'est donc pas surprenant que les réseaux qui génèrent ces rythmes soient à la fois robustes et flexibles. Leur mise en place au cours du neurodéveloppement est assurée par de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires qui pour la plupart sont conservés au sein du phylome. Les dérèglements de ces réseaux peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies. Parmi ces dernières, quelques-unes sont en lien direct ou indirect avec le travail effectué dans cette thèse. Nous pouvons citer l'aspiration pulmonaire, qui peut se caractériser par un trouble de la coordination respiration-déglutition pouvant être très invalidant et conduire à la mort, ou bien les troubles de la succion chez le nouveau-né qui mettent en péril son développement, ou encore la mort soudaine inexplicée liée à l'épilepsie lors de laquelle les réseaux du tronc cérébral sont sévèrement touchés ce qui conduit à un arrêt cardiorespiratoire.

Le sujet principal de ma thèse, qui constitue donc le fil conducteur de ce manuscrit, concerne le contrôle nerveux de l'activité motrice linguale et pharyngée lors de plusieurs comportements moteurs rythmiques. Avant d'expliquer au lecteur les tenants et les aboutissants de ce travail et d'exposer le contexte précis dans lequel ces recherches ont été effectuées, je tenais à effectuer quelques remarques générales. Ce type d'étude est assez peu répandu et d'un abord plutôt complexe pour plusieurs raisons.

D'une part, il est évidemment nécessaire de s'intéresser non pas à une activité motrice isolée mais à plusieurs rythmes moteurs. Contrairement à la respiration, les afférences sensorielles sont essentielles au déclenchement de la déglutition. Le rythme de déglutition spontané est peu fréquent et très inégal, et son étude nécessite un ou plusieurs modèles expérimentaux permettant d'induire ce réflexe et de le mesurer de manière plus stable. D'autre part, la succion est une activité motrice transitoire puisqu'elle s'exprime principalement en période post-natale. Son étude nécessite là encore d'avoir un modèle expérimental approprié. Enfin, pour pouvoir caractériser fonctionnellement ces activités motrices et mesurer des paramètres pertinents à l'échelle des nerfs ou des neurones, il est nécessaire de déployer de bonnes méthodes d'analyse.

Au total, le travail présenté s'inscrit dans le domaine de la neurophysiologie intégrative et tente, sur le plan fondamental, de mieux comprendre le fonctionnement des réseaux du tronc cérébral lors de l'exécution de plusieurs tâches motrices impliquant les muscles des voies aériennes supérieures. Le contexte de ces études et aussi la diversité thématique du travail présenté seront précisés dans les paragraphes ci-dessous. Nous verrons aussi comment les diverses notions importantes qui sont abordées dans ce travail ont orienté le plan de ce manuscrit. De manière volontaire, la plupart des références bibliographiques ont été omises dans ce préambule afin d'en fluidifier la lecture.

Les voies aériennes supérieures constituent une voie commune pour l'air et les aliments, elles représentent un véritable carrefour aérodigestif. Le premier paragraphe de l'Introduction rappelle au lecteur comment le carrefour aérodigestif a émergé au cours de l'évolution et ce que cela a entraîné sur le plan neurophysiologique. La motricité oro-pharyngo-laryngée repose sur des mouvements précis et coordonnés des muscles de la langue, du pharynx et du larynx. Nous souhaitons donc détailler dans les chapitres suivants les éléments relatifs à l'anatomie fonctionnelle et à l'innervation des voies aériennes supérieures

et inférieures. Nos travaux s'intéressent au contrôle nerveux lors de la commande respiratoire rythmique, mais aussi lors de la séquence motrice de déglutition ou de succion. Ils concernent donc les réseaux neuronaux du tronc cérébral capables de générer une séquence motrice complexe que l'on nomme « Générateurs centraux d'activités motrices » (ou CPGs). Les chapitres suivants de l'Introduction résument les connaissances sur les réseaux neuronaux de type CPG, en illustrent quelques exemples puis détaillent le fonctionnement du CPG respiratoire, puis celui du CPG de la déglutition, avant de s'attarder sur les mécanismes de la coordination entre ces deux fonctions qui ont fait l'objet d'une attention particulière dans ce travail.

Je tenais à souligner ici que le travail effectué au cours de ma thèse est en continuité avec les recherches précédentes conduites par mon encadrant, le Dr Christian Gestreau. Ces recherches ainsi que d'autres ont démontré que des neurones moteurs et prémoteurs du tronc cérébral pouvaient être actifs lors de plusieurs tâches motrices ce qui suppose l'existence d'éléments partagés au sein de plusieurs réseaux ([Gestreau et al, 1996](#); [Gestreau et al, 2000](#); [Gestreau et al, 2005](#); [Baekey et al, 2001](#); [Roda et al, 2002](#); [Roda et al, 2004](#); [Davenport et al, 2011](#); [Ramirez et Baertsch 2018](#)). Ces travaux remettent en cause l'idée que les réseaux moteurs du tronc cérébral sont des réseaux dédiés à telle ou telle fonction. Ils formeraient plutôt des ensembles neuronaux dynamiques. Ce mode de fonctionnement des CPGs chez les mammifères s'apparente à la plasticité fonctionnelle nommée « reconfiguration des réseaux neuronaux » qui a été démontrée initialement chez les invertébrés (e.g. [Meyrand et al, 1994](#)). C'est donc dans ce contexte d'étude du fonctionnement dynamique des réseaux neuronaux du tronc cérébral que s'inscrivent en grande partie les travaux entrepris lors de ma thèse.

Comme cela est détaillé dans l'Introduction du mémoire, la respiration et la déglutition sont coordonnées et plusieurs mécanismes nerveux concourent à éviter que la déglutition ne se produise lors de l'inspiration. Chez de très nombreuses espèces, la déglutition se produit à

certain moments précis du cycle respiratoire, plus particulièrement lors de la transition entre la phase inspiratoire et la phase post-inspiratoire (pour les études chez le chat, voir [Dick et al, 1993](#); [Pitts et al, 2015](#); [Horton et al, 2018](#)). D'un point de vue mécanique, les cordes vocales sont déjà en adduction partielle lors de la phase post-inspiratoire. Il est donc possible que cet état du larynx à ce moment précis du cycle respiratoire représente un avantage mécanique pour exécuter une déglutition qui nécessite la fermeture complète de la glotte.

Sur le plan neurophysiologique, nous nous sommes posé la question de savoir quelle pouvait être l'importance de la phase post-inspiratoire 1) dans la coordination entre l'activité respiratoire et la déglutition, et 2) dans la commande motrice hypoglosse et laryngée.

De nouveaux outils méthodologiques sont souvent indispensables aux avancées expérimentales. Dans ce cadre, j'ai d'abord développé un premier modèle d'études original permettant de déclencher et d'analyser la déglutition plus facilement. En employant la préparation perfusée *in situ* chez le rat, j'ai **testé l'hypothèse selon laquelle l'injection de quipazine, un agoniste sérotoninergique, provoque l'apparition de déglutitions isolées au sein d'un cycle respiratoire et augmente la fréquence de la déglutition**. Compte-tenu des résultats positifs obtenus, j'ai pu utiliser ce modèle d'induction de déglutition par voie pharmacologique pour le reste du travail de thèse.

Une partie de mon travail de thèse concerne le développement de la motricité oropharyngée au cours de la période post-natale. Dans ce sens, un dernier chapitre d'Introduction est dédié à l'activité motrice de succion. Il permet notamment de préciser au lecteur que l'activité motrice respiratoire, la déglutition et le réflexe de succion sont fonctionnels à la naissance, mais que ces trois activités motrices débutent néanmoins au cours de la période fœtale. Chez le nourrisson comme chez l'animal, le réflexe de succion est coordonné avec la respiration et la déglutition afin d'assurer l'ingestion (alimentation liquide).

Par la suite, les structures masticatrices se développent et les dents apparaissent. Progressivement, le comportement de succion est donc remplacé par la mastication, permettant au nourrisson d'ingérer des aliments solides. La triade succion-déglutition-respiration est ainsi remplacée par la triade mastication-déglutition-respiration ([Blass et Teicher 1980](#); [Westneat et Hall 1992](#)). Très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de genèse de la succion et les « centres de la succion » ne sont toujours pas identifiés. On sait cependant que la succion peut être induite dès la naissance par stimulation du pourtour labial chez le rat nouveau-né décérébré ([Thexton et Griffiths 1979](#)), ainsi que chez le nouveau-né humain ([Greene et al, 2016](#)). Selon ces auteurs le réflexe de succion décroît puis disparaît entre P18 et P25. D'un point de vue mécanique, l'activité rythmique de succion met en jeu séquentiellement les muscles des lèvres pour assurer l'étanchéité au niveau de la cavité buccale et se fixer au sein ou à la tétine du biberon, les muscles protruseurs et rétracteurs de la langue, ainsi que les muscles contrôlant l'ouverture et la fermeture de la mâchoire. Il est donc possible que la succion dépende d'un CPG situé dans le tronc cérébral, lequel interagit très probablement de manière dynamique avec les CPG de la respiration et de la déglutition.

Afin de tester tout ou partie de ces hypothèses, il était indispensable de disposer d'un modèle expérimental d'étude. Dans ce but, **j'ai mis au point la préparation *in situ* chez le rat nouveau-né à des âges très précoces (dès P6 jusqu'à P21) afin de pouvoir analyser et comparer l'activité oromotrice au cours du développement.** L'équipe de recherche de F. Muscatelli à l'INMED s'intéresse particulièrement à l'ocytocine, une neurohormone produite par l'hypothalamus, qui est abondamment sécrétée dans le cerveau du nouveau-né au cours de la première semaine de vie et qui est également présente dans le lait maternel. Nous avons donc voulu **savoir si l'ocytocine était capable de moduler l'activité motrice oropharyngée sur la préparation *in situ* de P6-P9 à P21.**

Le dernier chapitre de l'introduction expose l'ensemble des objectifs spécifiques de ce travail de thèse.

Le manuscrit compte 4 chapitres de résultats. **Le premier** concerne le modèle d'induction de déglutition par voie pharmacologique. Nous montrons que l'injection systémique ou centrale d'un agoniste sérotoninergique, la quipazine, permet d'induire des épisodes de déglutitions isolées comparables aux déglutitions spontanées et augmente significativement la fréquence de la déglutition pendant 15 à 20 minutes. Les déglutitions spontanées apparaissent sans stimulation ou manipulation expérimentale. Elles correspondent néanmoins à des déglutitions réflexes mettant en jeu les afférences périphériques. Cet effet de la quipazine serait médié par les neurones du raphé bulbaire caudal lesquels augmenteraient l'excitabilité du réseau de la déglutition. **Le second chapitre** présente les résultats des expériences de transection ponto-bulbaire. La séparation des structures respiratoires pontiques du reste du réseau neuronal respiratoire entraîne une perte de la phase post-inspiratoire. Dans ces conditions, nous montrons que la déglutition est maintenue et qu'elle continue d'être déclenchée préférentiellement juste après l'arrêt de la phase inspiratoire. La coordination respiration-déglutition est cependant altérée puisque de nombreux épisodes de déglutition se produisent juste avant l'inspiration. De plus, la transection ponto-bulbaire s'accompagne d'une réduction de la commande motrice hypoglosse lors de la déglutition, tandis que la commande laryngée cruciale à ce réflexe n'est pas modifiée. **Le troisième chapitre** des résultats concerne l'activité de décharge des motoneurones hypoglosses et de certains neurones de la colonne respiratoire centrale lors de la déglutition et la respiration. Nous montrons que certains motoneurones protruseurs sont actifs lors de l'inspiration et la déglutition, ce qui suggère la co-contraction de muscles antagonistes lors de la rétraction de la langue. **Le quatrième chapitre** des résultats traite des effets de l'ocytocine sur l'activité oromotrice précoce. Cette série d'études a permis d'identifier chez les animaux les plus jeunes

(P6-P9) une séquence motrice rythmique similaire à la succion. Nous montrons que l'injection de TGOT, un agoniste sélectif des récepteurs à l'ocytocine, augmente la fréquence de ces événements moteurs de type succion. Cet effet est aboli après blocage des récepteurs à l'ocytocine par un antagoniste sélectif. Les résultats suggèrent que l'ocytocine augmente l'excitabilité du réseau de la succion. L'ocytocine, en revanche, ne modifie pas significativement les activités oromotrices liées à la respiration et la déglutition.

Une **discussion générale** fait suite à l'exposé des résultats et tente d'interpréter les données recueillies.

Enfin, je présente en **annexe de ma thèse** d'autres résultats concernant les réseaux moteurs du tronc cérébral obtenus dans un contexte d'étude très différent. En effet, ces travaux annexes ont trait à la mort soudaine inexplicée liée à l'épilepsie. Cette thématique devait être l'axe principal de ma thèse. En effet, j'ai été recruté au laboratoire sous la direction du Dr Christian Gestreau à la suite de l'obtention d'une subvention ANR obtenue à l'Institut de Neurosciences des Systèmes (INS), dans l'équipe PhysioNet dirigée par Christophe Bernard (partenaire 2 de l'ANR), en collaboration avec le laboratoire LTSI à Rennes (Dir. A. Hernandez, coordinateur de l'ANR). Ce projet financé s'intitulait « Stimulation adaptative et personnalisée du Nerf Vague ». L'objectif principal du projet était de tester une nouvelle technologie d'électrodes (les électrodes organiques) et de nouvelles méthodes de traitement des données dans le but d'optimiser la stimulation nerveuse vagale (VNS). L'idée était d'implémenter un système de stimulation en boucle fermée, spécifique au sujet faisant l'objet de la thérapie VNS. Ce travail a donc consisté à réaliser des expérimentations approfondies in-silico, in-situ et in-vivo pour tester l'utilité du système proposé sur une cible thérapeutique prometteuse de la VNS : la prévention de la mort soudaine inexplicée chez les patients épileptiques (SUDEP). Pour diverses raisons résumées en annexe, ces travaux ont permis l'obtention de résultats partiels mais n'ont pas pu être conduits à leur terme. Les difficultés

rencontrées lors de la mise en œuvre de ces recherches et la collecte de trop peu de résultats expliquent pourquoi j'ai dû réorienter mon travail sur l'étude des réseaux neuronaux du tronc cérébral impliqués dans la commande motrice oropharyngée.

Introduction

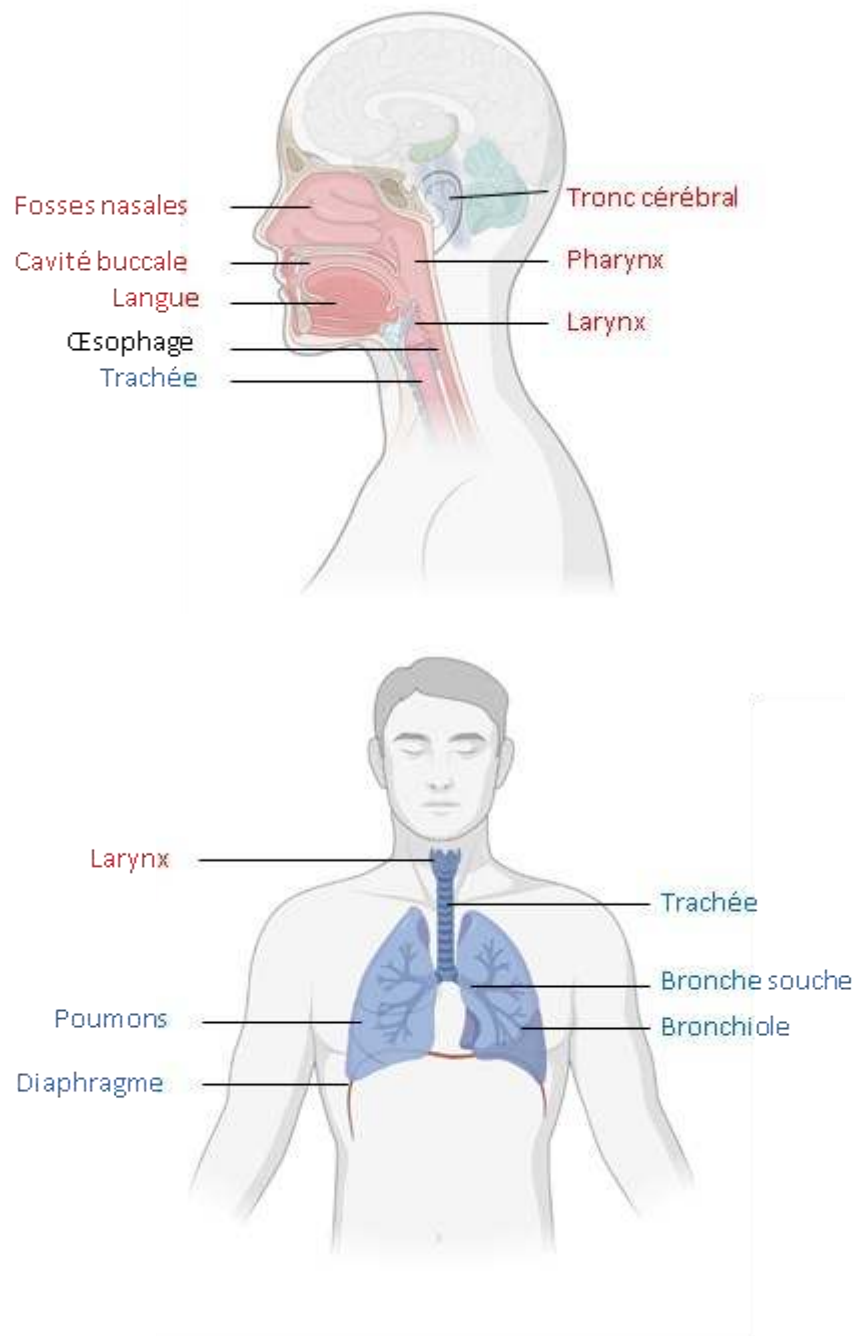


Figure 1 : Anatomie générale des voies aériennes **supérieures et **inférieures**.**
(Fait avec BioRender)

Chapitre 1 : Anatomie et commande motrice des voies aériennes supérieures et des muscles respiratoires thoraciques

Dans cette partie j'aborderai brièvement quelques aspects de l'évolution qui ont conduit à l'émergence du carrefour aéro-digestif, puis je décrirai les structures appartenant aux voies aériennes supérieures (fosse nasale, cavité buccale, pharynx et larynx) ainsi qu'aux voies aériennes inférieures (trachée, bronches et poumons). Juste après les éléments descriptifs d'anatomie, je préciserai quels sont les principaux muscles permettant de mobiliser ces structures, ainsi que l'innervation dont ils font l'objet.

I. L'émergence du carrefour aéro-digestif

L'embryologie et l'anatomie du système respiratoire humain reflètent les transformations évolutives retrouvées dans l'appareil respiratoire primitif. Les branchies des poissons sont très vascularisées, emplies de muscles, de cartilages et de nerfs, et permettent le pompage de l'eau pour faciliter l'échange de gaz. À mesure que les tétrapodes ont évolué, les branchies ont perdu leur fonction respiratoire. Cependant, les artères, les veines, les nerfs, la musculature et le support cartilagineux associés s'intègrent au pharynx et à la tête. L'évolution d'un système respiratoire permettant la vie terrestre à partir des branchies des organismes aquatiques est une étape essentielle permettant le développement des mammifères terrestres ([Figure 1](#)).

C'est il y a plus de 375 millions d'années que sont apparus les poumons en combinaison avec les branchies, notamment chez le Tiktaalik, une espèce de transition entre les poissons et les tétrapodes. Ce double organe respiratoire aurait existé à cause de la très faible teneur en O₂ des eaux stagnantes et pour un apport direct d'O₂ au cœur (lors de la respiration branchiale, l'O₂ ne parvient au cœur qu'après avoir perfusé les tissus causant une forte pression sélective). Les poumons sont ensuite restés dans l'arbre évolutif des espèces

avec les tétrapodes, permettant un exode du milieu aquatique vers le milieu terrestre il y a environ 300 millions d'années. De ces tétrapodes proviennent les amniotes, puis les mammifères. Les vertébrés ont des organes respiratoires spécialisés, permettant une croissance importante du corps, qui serait autrement limitée par un rapport surface-volume inefficace pour la diffusion de gaz. Chez les poissons, les branchies permettent à l'oxygène dissous dans l'eau de pénétrer dans le corps. Chaque arc branchial est composé de cartilages porteurs et est fortement vascularisé, permettant un échange de gaz efficace. Ces arcs permettent l'apparition du pharynx, structure complexe qui connecte la cavité orale au système respiratoire proximal et au système digestif. Similaires aux tétrapodes, les amphibiens ont un double système respiratoire, une ventilation buccale et cutanée. Leur ventilation buccale se fait par un mode de surpression, où la cavité buccale emmagasine l'air pour la propulser vers les poumons. Cependant chez les mammifères la respiration se fait par dépression, trait évolutif ayant permis à la cavité buccale de perdre son rôle respiratoire. Plus efficace énergiquement et adaptée aux changements potentiels de l'environnement, la pompe respiratoire thoracique permet l'apparition du carrefour aéro-digestif au niveau du pharynx. Cette intersection complexe que représente la cavité oropharyngée devient un site de coordination majeur entre deux fonctions vitales, la respiration et la déglutition.

Le larynx est apparu pour la première fois chez les Dipneustes (ou Ceratodontimorpha) qui étaient capable de respiration branchiale et pulmonaire. Cet organe émerge de la nécessité cruciale d'éviter l'inondation de l'appareil respiratoire servant à la respiration aérienne ([Kirchner 1993](#)). Grâce à l'émergence concomitante du larynx, ce carrefour aéro-digestif devient également le siège d'autres activités motrices complexes telles que la vocalisation et les réflexes de protection des voies aériennes comme la toux ou l'éternuement ([Roux 2002](#)). Des études ont montré que la capacité d'un mammifère à respirer, avaler et produire un son est due au positionnement spécifique du larynx. Chez la plupart des

mammifères, ainsi que chez les nourrissons, le larynx est initialement placé haut dans le cou, ce qui permet la superposition de l'épiglotte et du voile du palais pendant l'alimentation. Ce joint permet au nourrisson de téter et de se nourrir tout en respirant continuellement dans la cavité nasale, car les voies digestives et les voies aériennes supérieures sont temporairement séparées. Contrairement à d'autres mammifères, la position du larynx change chez l'adulte ; le larynx est repositionné plus bas dans le cou, et le joint entre l'épiglotte et le palais mou n'est plus possible. Cette descente du larynx crée un espace supralaryngé plus grand dans le pharynx, qui permet probablement la production sonore et la parole ([Laitman et Reidenberg 1993](#)). Dès lors, il n'est pas surprenant que le carrefour aérodigestif possède une haute diversité de fonctions motrices conférée par une musculature dense permettant des mouvements précis et complexes, comme le montreront les chapitres suivants. Les muscles des voies aériennes supérieures sont en effet indispensables pour les fonctions de nutrition au sens large, comme la respiration, la déglutition et la succion qui ont fait l'objet de mes travaux de thèse.

II. Les voies aériennes supérieures

A. Les fosses nasales

Bien que la cavité buccale permette de respirer plus rapidement étant à peu près deux fois moins résistante, 85 % de la population adulte respire de préférence par le nez, sauf pendant les périodes d'exercice ou pendant la parole. La résistance du nez provient de deux sources principales : la fosse nasale et la muqueuse. L'une des principales fonctions de la fosse nasale est de lubrifier et d'humidifier l'air inspiré tout en éliminant les particules de l'air en suspension avant qu'elles n'atteignent les voies respiratoires inférieures. Le mucus nasal, qui joue un rôle essentiel dans ce processus, est légèrement acide, avec un pH compris entre 5,5 et 6,5 et participe à la fonction de protection immunitaire ([Widdicombe 1986](#)). Après sécrétion, le mucus forme une couche à faible viscosité, sur laquelle repose une couche de gel

tenace de 12 microns à 15 microns d'épaisseur. La majeure partie du mucus est balayée de l'avant vers l'arrière par l'action coordonnée des cils des cellules épithéliales pour être finalement expulsé vers le pharynx, mais les cils propulsent aussi le mucus vers le vestibule nasal et hors du nez. Dans un nez sain, le déplacement moyen des particules piégées dans le mucus est d'environ 6 mm par minute, mais peut être plus rapide en fonction des besoins ([Quinlan et al, 1969](#)). La fosse nasale réchauffe l'air inspiré grâce à son architecture qui permet de créer un flux d'air turbulent, maximisant le contact avec la muqueuse. La chaleur provenant de la microcirculation nasale est suffisante pour réchauffer l'air à température ambiante de 10°C au moment où il atteint le pharynx. Les vaisseaux de la muqueuse sont disposés de manière à s'écouler dans le sens opposé au flux nasal, ce qui rend l'échange plus efficace. Lorsque l'on expire de l'air chaud, celui-ci passe par la muqueuse nasale qui est relativement froide, ainsi une certaine chaleur est rendue au système, provoquant de la condensation de vapeur d'eau et donc une régénération de l'humidité. Lorsque la muqueuse nasale est considérablement refroidie, comme par une journée d'hiver à l'extérieur, la capacité humidifiante du nez est réduite, et la condensation accrue conduit à de l'écoulement nasal ([Berman 1988](#)).

La musculature du nez est innervée par le nerf facial (VIIème paire de nerfs crâniens), plus particulièrement des rameaux infra-orbitaires de la branche temporo-faciale, et leurs motoneurones se trouvent dans le noyau moteur du nerf facial. Cette musculature est divisée en élévateurs, dépresseurs, adducteurs et abducteurs, permettant une large gamme de fonctions. Le muscle pyramidal et le muscle élévateur de l'aile du nez et de la lèvre supérieure s'insèrent dans les cartilages alaires permettent d'élever et de raccourcir le nez, afin de dilater des valves nasales. Le muscle transverse situé dans les deux tiers du milieu du nez, permet à la fois de comprimer et de dilater les narines. Le muscle abaisseur du septum nasal s'insère

dans le septum, et permet comme son nom l'indique, d'abaisser le nez ([Letourneau et Daniel 1988](#)).

Les principales afférences sensorielles du nez proviennent des divisions maxillaires et ophtalmiques du nerf crânien trijumeau (Vème paire de nerfs crâniens). La division maxillaire pénètre dans le toit de la fosse ptérygo-palatine via le foramen rotundum, puis envoie plusieurs branches sensorielles vers les structures médianes. Les branches innervant la fosse nasale entrent dans le nez à travers le foramen sphéno-palatin via le ganglion sphéno-palatin. Le nerf naso-palatin innerve la gencive antérieure et supérieure. Les contributions sensorielles de la division ophtalmique du nerf trijumeau proviennent du nerf naso-ciliaire qui se divise à son tour en nerfs ethmoïdes antérieurs et postérieurs et entrent dans le nez avec leurs artères respectives. Le nerf ethmoïde antérieur alimente la paroi nasale latérale antérieure, tandis que le nerf ethmoïde postérieur innerve le septum postérieur et supérieur et la paroi nasale latérale ([Geurkink 1983](#); [Lane 2004](#)).

A. La cavité buccale

La bouche joue non seulement un rôle vital dans l'apport et l'initiation de la digestion des aliments, mais est également essentielle à la formation de la parole et à la respiration. Les dents, qui sont les principales structures de la cavité buccale, déchirent et broient la nourriture ingérée. La langue permet la digestion de la nourriture en comprimant et en pressant la nourriture contre le palais, ce qui conduit à la formation du bolus alimentaire avalé par la suite dans l'œsophage grâce au mouvement de déglutition ([Dotiwala et Samra 2022](#)). La langue sert également à fournir la perception du goût car elle contient divers chémorécepteurs sur sa surface dorsale qui servent de papilles gustatives. En outre, la langue est aussi l'articulateur le plus important de la parole, car elle se déforme pour prononcer des mots. Le palais sert de barrière mécanique séparant la cavité buccale des voies respiratoires nasales, permettant la respiration pendant la mastication (**Figure 2**).

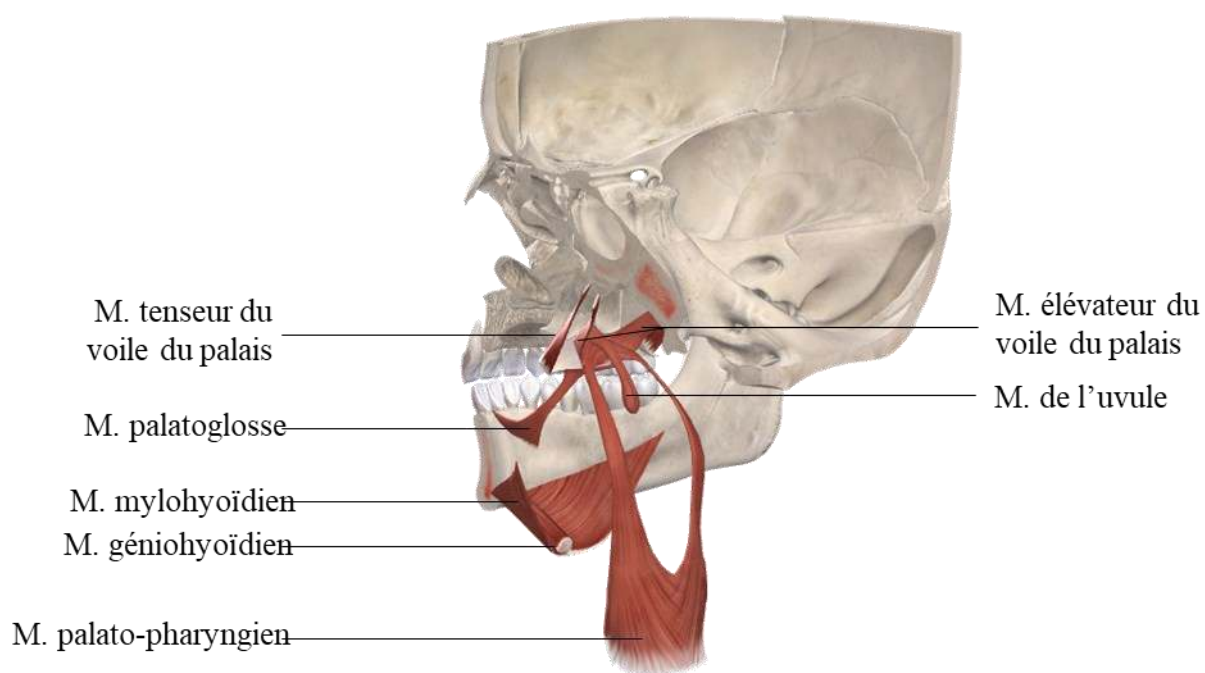
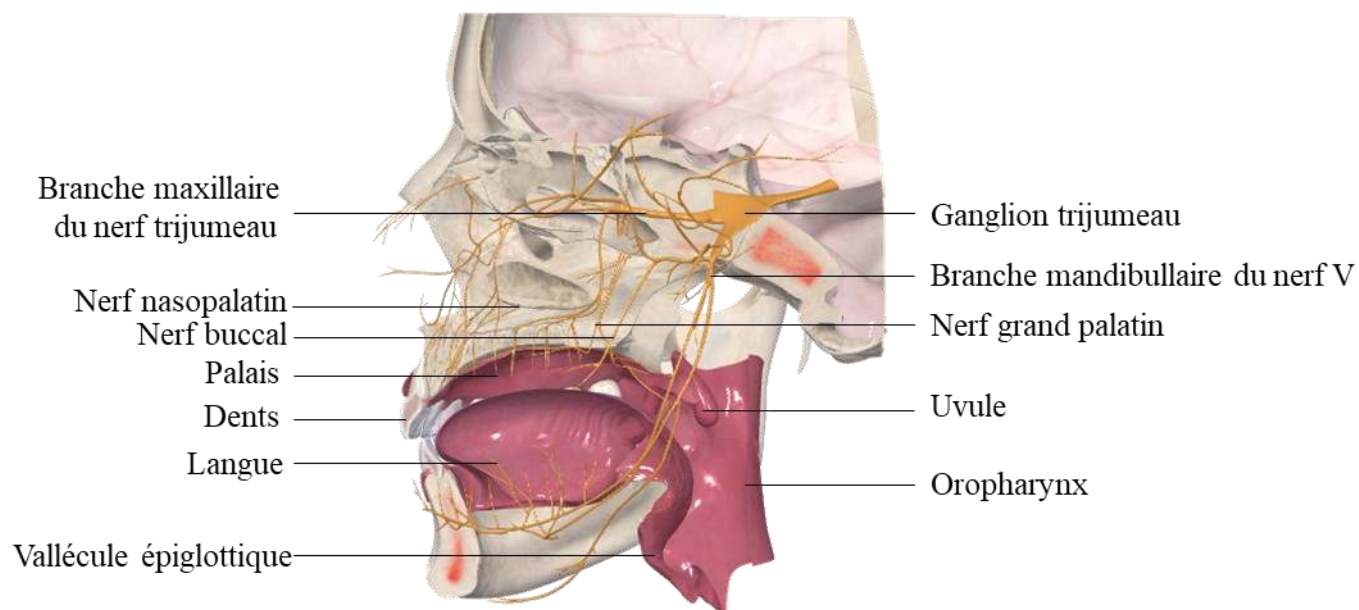


Figure 2 : Innervation et musculature de la cavité buccale. M. = Muscle, nerf V = nerf trijumeau (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

Le plancher de la cavité buccale est constitué du muscle mylohyoïdien et du géniohyoïdien, qui permettent l'élévation du complexe hyoïde-laryngé pendant la déglutition. La partie supérieure de la cavité buccale est composée du palais mou, et contient cinq muscles différents : le tenseur du voile du palais qui relève le voile du palais et permet l'ouverture de la trompe auditive lors de la déglutition, le muscle de la luette qui permet d'adapter le palais mou au mur pharyngé postérieur pendant la déglutition, l'élévateur du voile du palais qui permet d'attirer le palais mou en haut et en arrière, le palato-pharyngien qui abaisse le voile du palais avec le dernier muscle, le palatoglosse (**Figure 2**).

L'innervation de la cavité buccale incluant les muqueuses buccales, les dents et les structures de soutien provient des divisions maxillaires et mandibulaires du nerf trijumeau. Le grand palatin et les nerfs naso-palatins dérivent du nerf maxillaire et innervent le palais dur, tandis que la petite branche palatine du nerf maxillaire innerve le palais mou. Le nerf buccal, également une branche de la division mandibulaire du nerf trijumeau, innerve la joue (**Figure 2**).

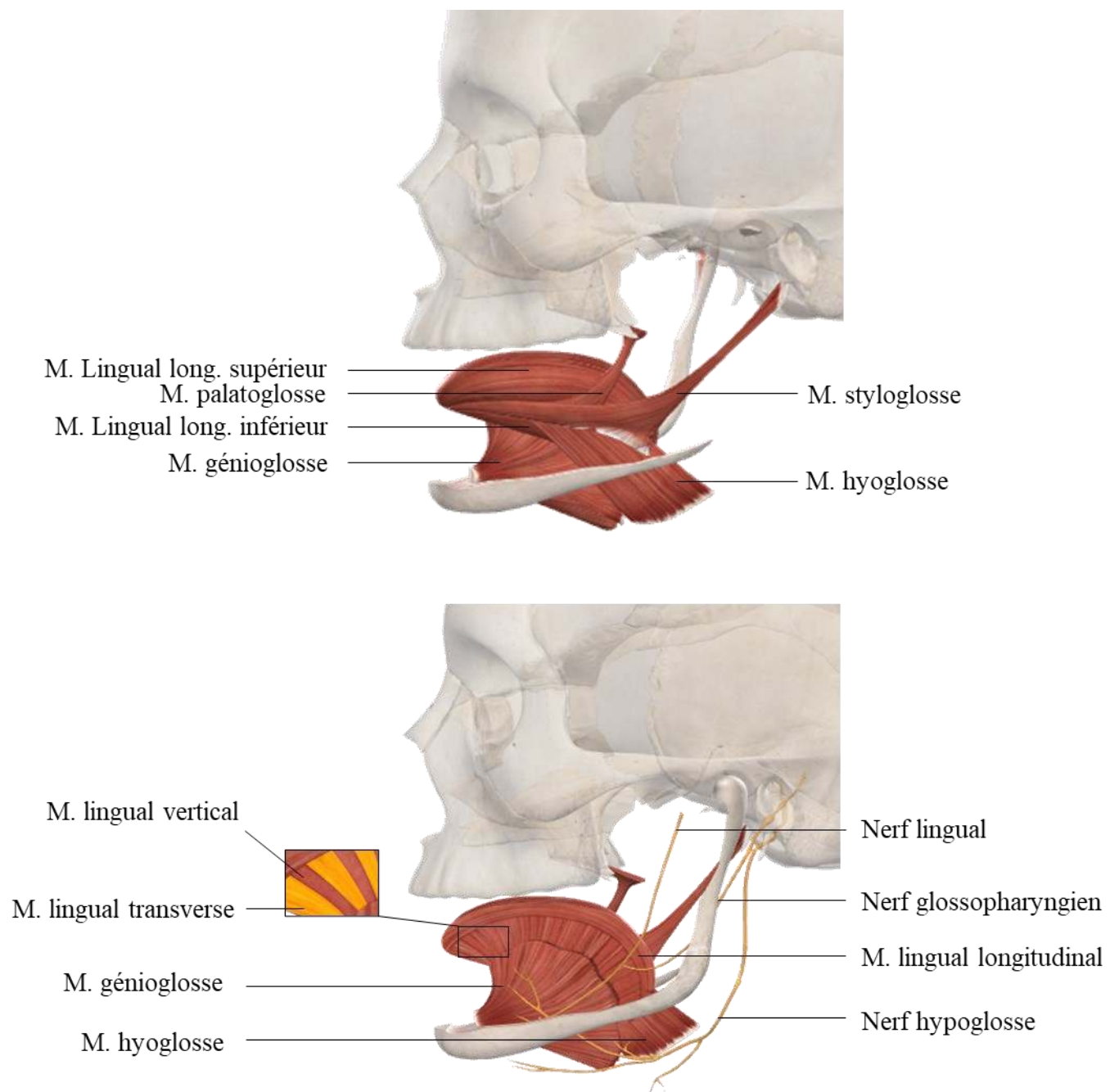


Figure 3 : Anatomie, innervation et musculature de la langue. M. = Muscle (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

La langue est un organe moteur unique qui se compose presque entièrement de muscles avec très peu de soutien squelettique (**Figure 3**). Elle joue un rôle important lors de la respiration, ainsi qu'un rôle majeur pour la déglutition et la phonation. Elle est attachée par ses muscles à l'os hyoïde, la mandibule, l'apophyse styloïde, le palais et le pharynx, et est divisée en deux parties par le sillon terminal. Le foramen caecum à l'apex du sillon terminal indique le site d'origine embryonnaire du tractus thyroïdienne. Elle se compose de huit paires de muscles squelettiques : quatre muscles extrinsèques (attachés à des os) : le génioglosse, le styloglosse, l'hyoglosse et la palatoglosse, et quatre muscles intrinsèques (sans aucun support osseux) : le transverse, le vertical, longitudinal inférieur et longitudinal supérieur (**Figure 3**). Les muscles extrinsèques proviennent d'attachements osseux externes et se terminent dans la langue, tandis que les muscles intrinsèques proviennent et se terminent dans la masse de la langue. 00

L'action des muscles linguaux est résumée ci-dessous :

- Le génioglosse est protruseur de la langue et aplatit la langue sur le plancher buccal lorsqu'il est totalement contracté,
- Le styloglosse tire sur les côtés de la langue pour créer un creux pendant la déglutition et est rétracteur de la langue,
- L'hyoglosse est un abaisseur et rétracteur de la langue,
- Le palatoglosse élève la langue postérieure, ferme l'isthme oropharyngé, aide à l'initiation à la déglutition, et empêche le déversement de salive du vestibule dans l'oropharynx en maintenant l'arc palatoglosse,
- Le transverse allonge et étrecit la langue,
- Le vertical aplatit la langue,

- Le longitudinal inférieur raccourcit et recourbe vers le bas la langue,
- Le longitudinal supérieur raccourcit et recourbe vers le haut la langue.

L'innervation motrice de tous les muscles intrinsèques et extrinsèques de la langue vient du nerf hypoglosse (XIIème paire de nerfs crâniens), à l'exception du muscle palatoglosse, glossostaphylin et pharyngoglosse, qui reçoivent respectivement leur innervation du nerf vague, du nerf palatin postérieur et du nerf lingual ([Figure 3](#)). Concernant les afférences sensorielles, le tiers postérieur de la langue est innervé par le nerf glossopharyngien (IXème paire de nerfs crâniens), apportant la sensation de goût et du toucher, alors que les deux tiers antérieurs de la langue sont innervés de manière différente pour le goût et le toucher : la branche du nerf facial appelée la corde du tympan, apporte la sensation de goût, et le nerf lingual (branche mandibulaire du nerf trijumeau) apporte la sensation du toucher ([Dotiwala et Samra 2022](#)).

B. Le pharynx

Le pharynx est une structure dite « de liaison » située au milieu du cou ([Figure 4](#)). Il s'agit d'une structure primordiale qui, comme la cavité buccale, est partagée par deux systèmes d'organes, à savoir le système digestif et le système respiratoire. Le pharynx est en forme d'entonnoir, car son extrémité supérieure située juste sous la surface inférieure du crâne est plus large que son extrémité inférieure (plus étroite) située au niveau de la sixième vertèbre cervicale (C6) où débute l'œsophage postérieur et le larynx antérieur. Son intégrité musculaire est nécessaire à plusieurs fonctions vitales liées à ces deux systèmes, comme la déglutition, la conduction de l'air et la production de voix ([Sakamoto 2014](#); [Heyd et Yellon 2022](#); [Ball et al, 2022](#)).

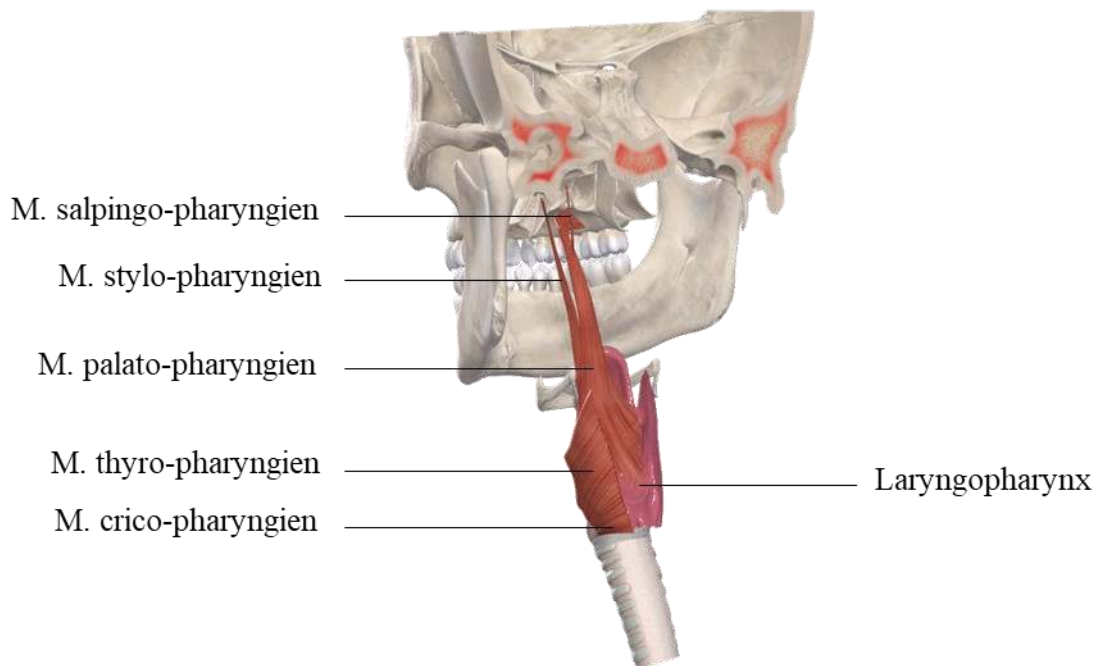
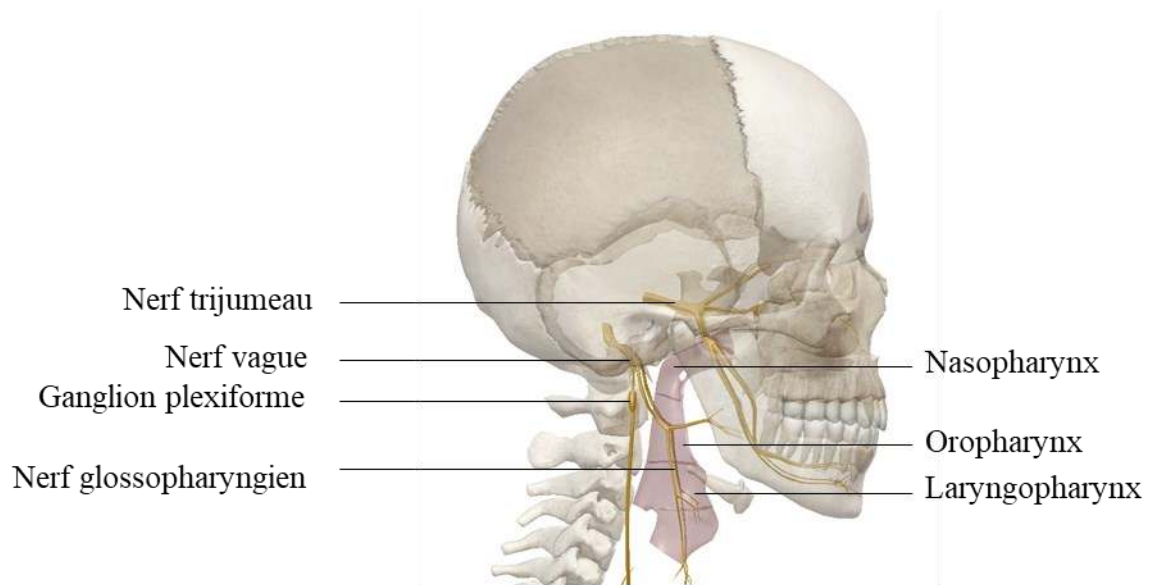


Figure 4 : Anatomie, innervation et musculature du pharynx. M. = Muscle (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

Le pharynx se divise en trois parties. Du haut vers le bas on peut distinguer : le nasopharynx, situé derrière les orifices nasaux postérieurs (les choanes), l'oropharynx, situé derrière l'ouverture de la cavité buccale, et le laryngopharynx, situé derrière l'entrée (ouverture) du larynx ([Figure 4](#)).

Le naso-pharynx n'est lié qu'aux voies respiratoires car seul l'air passe au travers à partir des cavités nasales. De plus, à la surface dorso-latérale du nasopharynx, deux ouvertures, une de chaque côté, sont présentes, ce sont les tubes auditifs (trompe d'Eustache ou pharyngo-tympaniques). Ces tubes sont reliés aux oreilles moyennes (cavités tympaniques) et servent principalement à égaliser la pression et à faciliter le drainage des sécrétions des oreilles moyennes.

L'oropharynx est une continuation de la cavité buccale et permet de passer le bolus vers le laryngopharynx. Lorsque le bolus passe de la cavité buccale au pharynx, les muscles du palais mou se contractent pour fermer la choane afin que la nourriture ne pénètre pas dans la cavité nasale. Simultanément, l'épiglotte (cartilage se trouvant sur la partie supérieure du larynx) bascule vers l'arrière et le bas pour fermer l'entrée laryngée et empêcher la nourriture d'entrer dans les voies respiratoires.

Enfin, le laryngopharynx reçoit le bolus de l'oropharynx et le passe dans l'œsophage pour la digestion, grâce à la relaxation (ouverture) du sphincter œsophagien supérieur. L'air inspiré par le nez passe par les deux parties supérieures du pharynx (nasale et orale) pour ensuite atteindre l'entrée du larynx et rejoindre enfin la trachée, les bronches et les poumons ([Shaw et Martino 2013](#); [Kagaya et al, 2015](#); [Heyd et Yellon 2022](#); [Casale et Hatcher 2022](#)).

Les muscles du pharynx jouent un rôle dans de nombreux processus vitaux tels que la respiration, la déglutition et la parole. La coordination de la musculature pharyngée avec les muscles du larynx et de la langue est essentielle à l'efficacité de ces fonctions humaines

essentielles. Généralement classés par leur orientation (circulaire ou longitudinale), ces muscles permettent au pharynx de changer de taille et de forme pour atteindre la fonction requise (**Figure 4**).

Comme cela a été précisé plus haut, le pharynx s'étend de la base du crâne au cartilage cricoïde. Les trois muscles constricteurs pharyngiens sont délimités par leur position relative (supérieure, moyenne et inférieure). Leurs différents points d'attache et leur contraction séquentielle et involontaire permettent à la lumière pharyngée de se fermer du haut (crâne) vers le bas pour le péristaltisme pendant la déglutition, tout en restant alternativement ouverte pour la respiration et la parole.

Les muscles longitudinaux, palato-pharyngien, stylo-pharyngien et salpingo-pharyngien, fusionnent caudalement pour devenir la paroi latérale du pharynx (**Figure 4**). Ils permettent de raccourcir et d'élever le pharynx pendant la déglutition. En raison de leur insertion sur le sinus piriforme, on suppose que leur contraction participe à l'élimination des résidus alimentaires. Le muscle crico-pharyngien fonctionne comme partie du sphincter œsophagien supérieur et a une relation étroite avec les trois paires de muscles longitudinaux et avec le muscle constricteur inférieur du pharynx.

L'échec de la relaxation du muscle crico-pharyngien pendant la déglutition (achalasie crico-pharyngée) peut conduire à la fois à la dysphagie et à un relâchement pathologique du pharynx appelé diverticule de Zenker. Comme le crico-pharyngien ne se détend pas de façon habituelle, la pression exercée par les muscles constricteurs et le bolus s'accumulent dans le pharynx, provoquant un débordement du pharynx qui se remplit de nourriture.

Le pharynx reçoit des fibres nerveuses sensorielles et motrices. Les fibres sensorielles (afférentes) alimentent la muqueuse des trois parties du pharynx et transmettent les sensations (douleur, température, pression et toucher). Le nasopharynx est innervé par la division

maxillaire du nerf trijumeau. L'oropharynx est innervé par le nerf glossopharyngien, et le laryngopharynx est innervé par le nerf laryngé interne, branche du nerf laryngé supérieur (nerf vague ; voir les détails dans le paragraphe suivant). Concernant les fibres motrices, la majorité des muscles du pharynx sont innervés par le nerf vague, à l'exception du muscle stylopharyngien, qui est innervé par le nerf glossopharyngien ([Heyd et Yellon 2022](#); [Ball et al, 2022](#)).

C. Le larynx

Le larynx est un segment cartilagineux situé au niveau des vertèbres C3 à C7 (**Figure 5**). La fonction principale du larynx chez les humains et les autres vertébrés est de protéger les voies respiratoires inférieures contre le risque d'aspiration de nourriture dans la trachée (fausse route). Il contient également les cordes vocales et fonctionne comme une boîte vocale pour produire des sons. Un grand larynx corrèle avec une voix plus profonde. D'un point de vue phylogénétique, le larynx de l'Homme a atteint son plus haut développement évolutif avec la capacité d'articuler la parole, cette structure étant absente chez les invertébrés et les poissons (sauf les dipneustes). Le larynx est d'environ 4 à 5 cm de longueur et de largeur, avec un diamètre antérieur-postérieur légèrement plus court. La région supérieure du larynx est l'épiglotte, et est attachée à l'os hyoïde qui lui est relié à la partie inférieure du pharynx. La partie inférieure du larynx se connecte à la région supérieure de la trachée. Le larynx est constitué de neuf cartilages : le cartilage thyroïdien, le cartilage cricoïde, l'épiglotte, les cartilages aryténoïdes, les cartilages corniculés et les cartilages cunéiformes. Les trois premiers sont des cartilages non appariés, et les trois derniers sont des cartilages appariés. Ces cartilages sont déplacés à l'aide de différents ligaments et muscles. Il existe deux types de ligaments : les ligaments extrinsèques qui fixent le larynx à d'autres structures telles que l'os hyoïde ou la trachée, et les ligaments intrinsèques qui relient les cartilages du larynx entre eux.

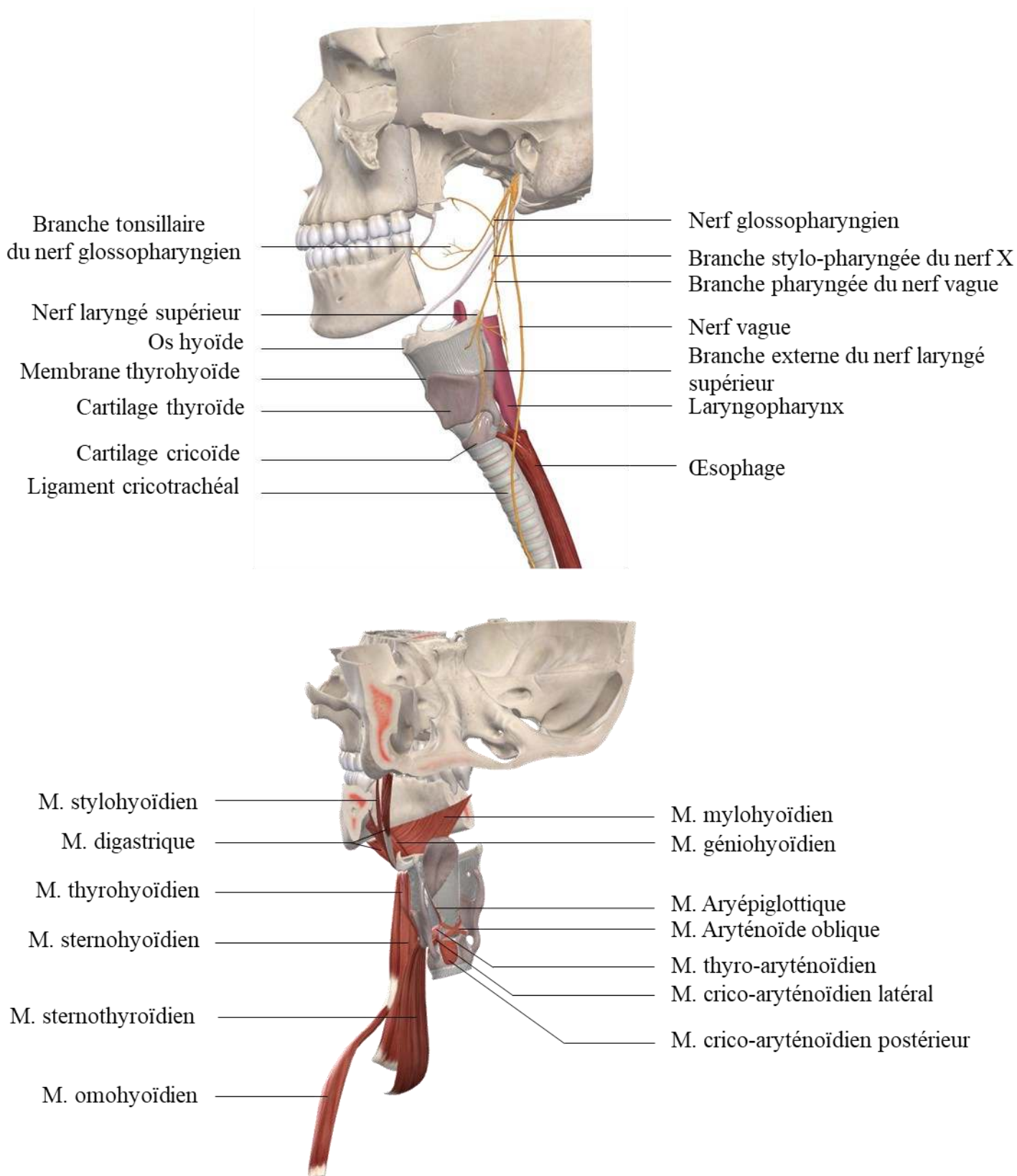


Figure 5 : Anatomie, innervation et musculature du larynx. M. = Muscle, nerf X = nerf vague (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

Les ligaments intrinsèques sont le crico-thyroïdien, le crico-corniculé, le thyro-épiglottique, le thyro-aryténoïdien et les ligaments aryépiglottiques. Les ligaments extrinsèques sont les ligaments thyro-hyoïdien, hyo-épiglottique et crico-trachéal.

Le larynx est constitué de muscles intrinsèques (proprio-laryngés) et extrinsèques (qui se fixent à la fois au larynx et à d'autres structures de proximité) qui jouent un rôle dans les changements du mouvement de l'air, la déglutition et la production de la voix (**Figure 5**). Les muscles intrinsèques du larynx permettent une variété de fonctions, dont beaucoup peuvent être catégorisés par leur action sur le ligament vocal. Les adducteurs sont : le thyro-aryténoïdien, le crico-aryténoïdien latéral et les muscles inter-aryténoïdiens. Le thyro-aryténoïdien prend naissance à la ligne oblique du cartilage thyroïdien et s'insère à la surface antérieure du cartilage aryténoïde ipsilatéral. Ses fonctions comprennent à la fois l'adduction des cordes vocales et la diminution de la tension du ligament vocal pour en moduler la hauteur. Le crico-aryténoïdien latéral, qui prend naissance sur le cartilage cricoïde latéral et s'insère à l'apophyse musculaire de l'aryténoïde, ferme les cordes vocales et fait pivoter intérieurement l'aryténoïde. Le muscle inter-aryténoïdien travaille en synergie avec le crico-aryténoïdien latéral en maintenant la fermeture de la glotte après que les cordes se sont fermées. Le seul abducteur du ligament vocal est le muscle crico-aryténoïdien postérieur. Ce muscle prend naissance au cricoïde postérieur et s'insère sur l'apophyse musculaire postérieure de l'aryténoïde. Son action est d'écarter et de faire tourner extérieurement l'aryténoïde en antagonisme au muscle crico-aryténoïdien latéral. Le muscle crico-thyroïdien permet de déplacer le cartilage thyroïdien vers le bas en se contractant et resserre les cordes vocales.

L'épiglotte est tirée en arrière sur l'entrée laryngée afin d'empêcher l'aspiration du bolus. Les muscles aryépiglottiques prennent naissance à l'apex des aryténoïdes et s'insèrent à la bordure latérale de l'épiglotte. De même, les muscles aryténoïdes obliques prennent

naissance à l'apex aryténoïde et s'insèrent au repli aryépiglottique. Le muscle thyro-épiglottique prend naissance sur la surface interne du cartilage thyroïdien et s'insère sur le bord de l'épiglotte. Lors de la contraction, ce muscle inférieur déplace l'épiglotte. Ces muscles travaillent en synergie pour fermer l'entrée laryngée en tirant l'épiglotte vers l'arrière et vers le bas.

Plusieurs muscles cervicaux agissent extrinsèquement sur le larynx pour faciliter la phonation et la déglutition. Les muscles insérés sur le bord supérieur de l'os hyoïde (géniohyoïdien, digastrique, mylohyoïdien, thyrohyoïdien et stylohyoïdien) et du pharynx (stylopharyngien, palatopharyngien et cricopharyngien) agissent conjointement pour élever le larynx. Les muscles insérés sur la surface inférieure de l'os hyoïde (muscles sternohyoïdiens et omohyoïdiens) et le muscle sternothyroïdien permettent d'abaisser le larynx. En raison de l'élévation du larynx pendant la déglutition, les manœuvres d'examen physique de la thyroïde impliquent souvent que le patient avale volontairement pour mieux localiser cette glande.

Le larynx est innervé par le nerf laryngé récurrent et le nerf laryngé supérieur, différentes branches du nerf vague (**Figure 5**). Le nerf laryngé supérieur provient du ganglion inférieur du nerf vague. Il reçoit également les branches du ganglion cervical supérieur du système nerveux sympathique et descend entre les vaisseaux carotides et le pharynx, atteignant le larynx juste en dessous de l'os hyoïde où il se divise en deux branches, l'interne et l'externe. Le nerf laryngé externe alimente le muscle crico-thyroïdien. Le nerf laryngé interne descend vers la membrane thyro-hyoïdien avec l'artère laryngée supérieure, s'étendant à travers l'épiglotte, et alimentent la muqueuse entourant l'entrée du larynx. Le nerf laryngé récurrent est le nerf principal responsable de l'innervation de tous les muscles intrinsèques du larynx, à l'exception du muscle crico-thyroïdien. Les nerfs récurrents droit et gauche ne sont pas symétriques. Le nerf récurrent gauche provient du nerf vague qui s'enroule dans le thorax autour de l'arc aortique (alors que le nerf récurrent droit s'enroule autour de l'artère sous-

clavière) et passe vers le haut de la trachée et de l'œsophage avant d'entrer dans le larynx juste après l'articulation crico-

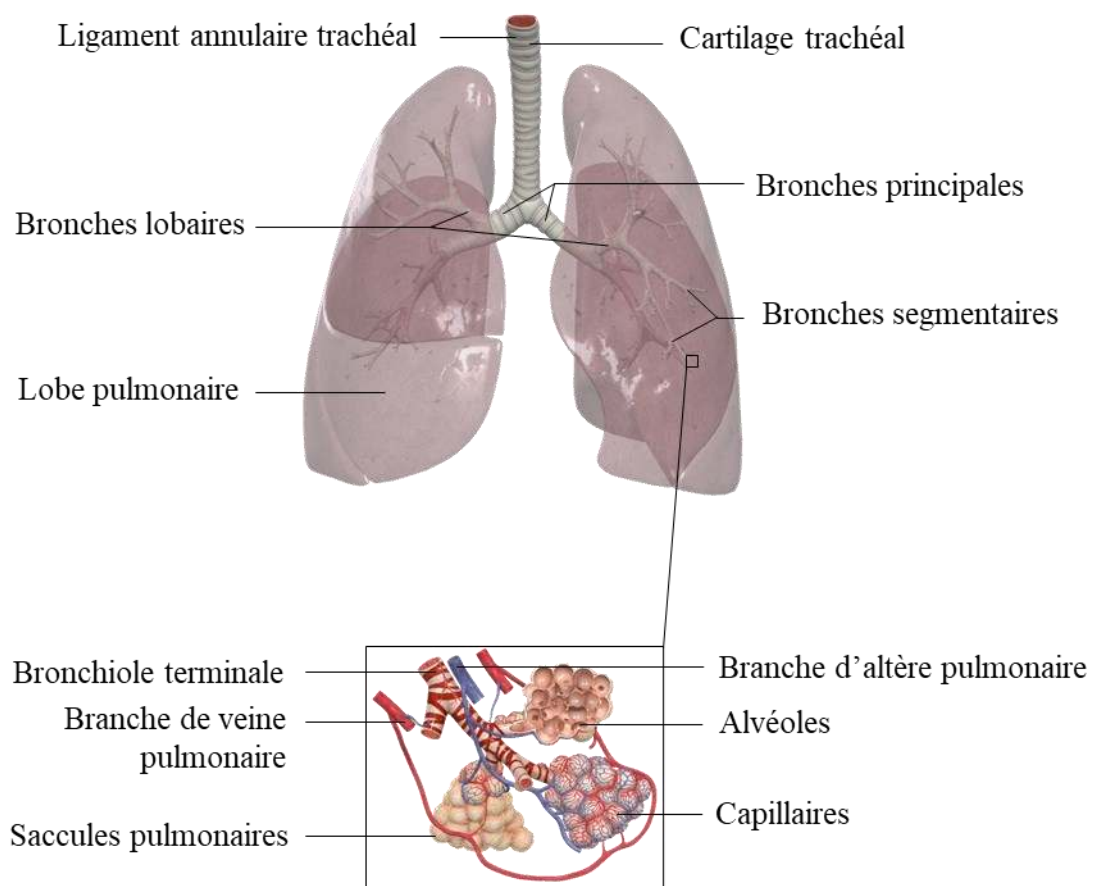


Figure 6 : Anatomie des poumons et bronches (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

thyroïdienne sous le muscle constricteur inférieur du pharynx. Le nerf récurrent droit se ramifie à partir du vague à la base du cou, formant une boucle dans l'artère sous-clavière, va vers le haut de la trachée (latéralement) et entre dans le larynx entre les cartilages cricoïde et thyroïde.

III. Les voies aériennes inférieures

A. La trachée et les bronches

La trachée est une voie respiratoire conductrice essentielle pour le passage bidirectionnel de l'air. C'est une structure en forme de Y composée de cartilage hyalin en forme de U sur les parois antérieures et latérales, avec le muscle trachéal formant la paroi postérieure de la trachée (**Figure 6**). Toute la lumière trachéale est constituée d'un épithélium pseudostratifié doublée de cellules cylindriques et de cellules caliciformes ciliées qui créent la muqueuse trachéale. La trachée fait partie du système respiratoire conducteur qui commence immédiatement sous le larynx lequel est relié au cartilage cricothyroïde (niveau C6) par le ligament crico-trachéal. La trachée, formée de 16 à 20 anneaux de cartilage hyalin connectés par des ligaments annulaires, se termine à la carène trachéale. Elle se divise ensuite en deux bronches principales : la bronche droite et gauche ([Krupinski et al, 2019](#); [Jacobsen et al, 2022](#); [Rizvi et al, 2022](#)). Le rôle de la trachée est donc de conduire l'air provenant des VAS vers les VAI, puis les bronches distribuent cet air dans tous les poumons, afin que celui-ci atteigne le lieu d'échanges gazeux : les alvéoles pulmonaires. Le trajet de l'air passe alors (dans l'ordre) de la trachée vers les bronches, bronchioles, bronchioles terminales (constituant l'arbre bronchique), les conduits alvéolaires, les sacs alvéolaires, puis les alvéoles pulmonaires.

La trachée contient un muscle lisse appelé le muscle trachéal qui est situé dans la partie postérieure de celle-ci. Ce muscle a un effet constricteur, permettant à la trachée de se resserrer lorsqu'il y a besoin d'expulser l'air avec force, comme lors de la toux ([Minnich et](#)

[Mathisen 2007](#)). Les bronches contiennent des muscles lisses qui peuvent se contracter ou se dilater afin de contrôler le débit aérien dans les bronches (mais de manière plus importante pendant l'expiration). De plus, les bronchioles ont des muscles lisses et fibres élastiques qui permettent de maintenir leur intégrité.

La trachée reçoit une innervation parasymphatique et sympathique. Elle est innervée par les deux branches du nerf laryngé récurrent et permettent son innervation sensorielle et motrice, ainsi qu'une augmentation des sécrétions. Les muscles lisses des bronches sont innervés par des fibres parasymphatiques et sympathiques. Les fibres parasymphatiques proviennent du nerf vague, et permettent la bronchoconstriction, mais aussi la vasodilatation de vaisseaux sanguins pulmonaires et augmentent la sécrétion des glandes présentes dans les bronches. Les fibres sympathiques proviennent du ganglion sympathique paravertébral et permettent la bronchodilatation, la vasoconstriction et inhibent la sécrétion des glandes.

B. Le diaphragme

Le diaphragme est le muscle principal de l'inspiration. Lorsque le diaphragme se contracte, il descend plus bas dans la cavité abdominale, ce qui entraîne une augmentation du volume intrathoracique. Cela entraîne également une augmentation du diamètre vertical de la cavité thoracique, ce qui entraîne une baisse de la pression intrathoracique. Lorsque le diaphragme se détend, il monte entraînant une diminution du volume intrathoracique et, par conséquent, une augmentation de la pression intrathoracique.

Le diaphragme sépare la cavité thoracique de la cavité abdominale ([Figure 7](#)). C'est une cloison musculo-tendineuse en « double-dôme » qui se compose d'une feuille continue de muscle entourant un tendon central. Le muscle diaphragmatique est nommé en fonction de ses points périphériques d'attachement. La partie sternale se fixe à l'aspect postérieur du processus xiphoïde. La partie costale se fixe aux surfaces internes des six cartilages costaux

inférieurs. Enfin, la partie lombaire se fixe aux ligaments arqués médiaux et latéraux, ainsi qu'aux trois vertèbres lombaires supérieures. Le diaphragme est fixé en son centre et en périphérie. Les

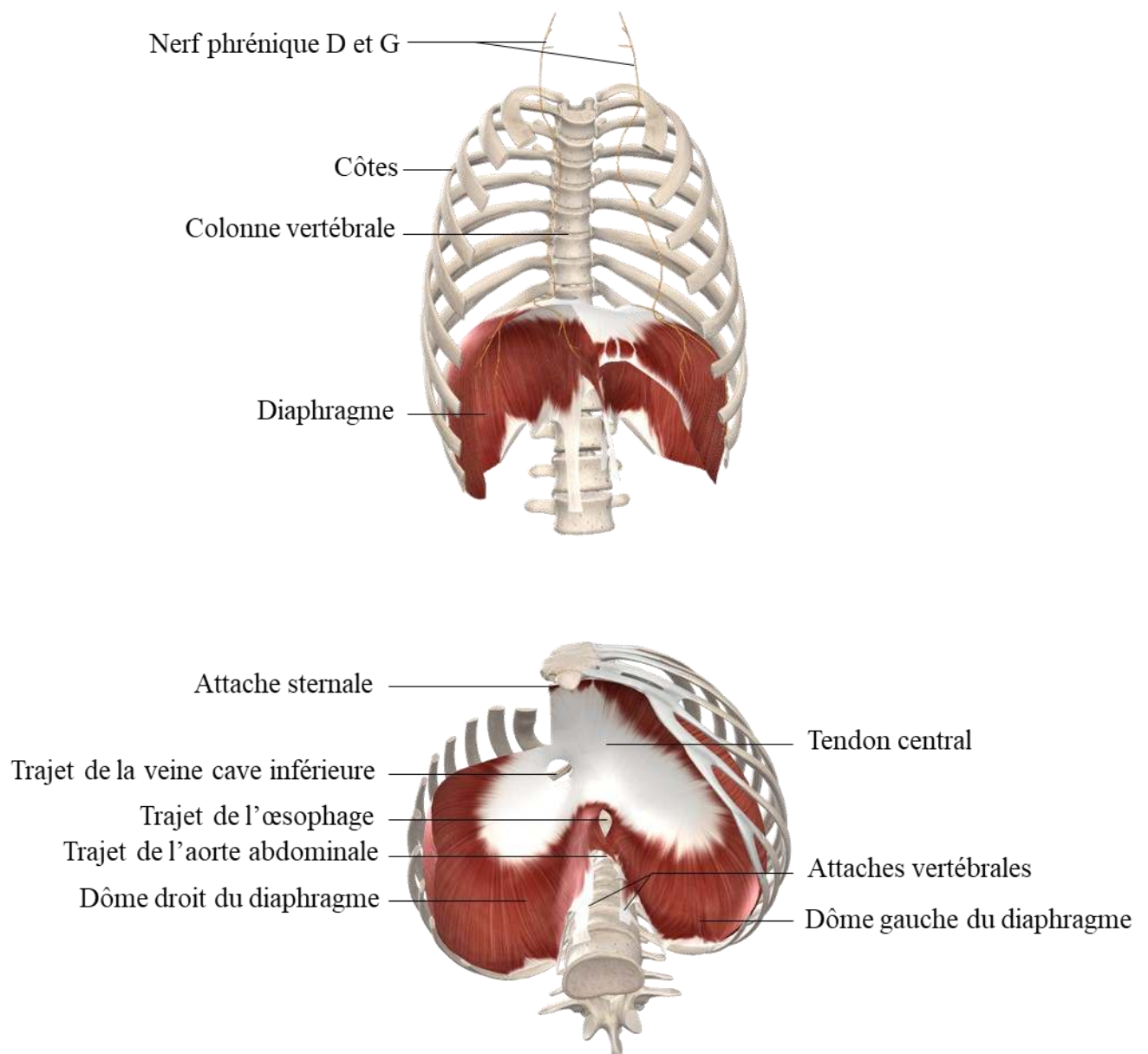


Figure 7 : Anatomie et innervation du muscle du diaphragme (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

attaches périphériques sont situées au processus xiphoïde du sternum, aux vertèbres lombaires et ligament arqué, ainsi qu'aux cartilages des côtes 7 à 10 et directement aux côtes 11 à 12. Les segments du diaphragme qui s'attachent aux vertèbres lombaires sont connus sous le nom de pilier gauche et droit. Même si le diaphragme sépare la cavité abdominale et thoracique, il permet tout de même à certaines structures de passer par ses trois ouvertures : la veine cave inférieure traverse le diaphragme via le foramen de la veine cave inférieure. Cette ouverture est située dans le tendon central au niveau de la huitième vertèbre thoracique. Le hiatus œsophagien est situé dans la musculature du diaphragme, au niveau de la dixième vertèbre thoracique. Les nerfs vagues postérieurs et antérieurs passent par ce hiatus. Enfin, le hiatus aortique est situé entre les deux piliers au niveau de la douzième vertèbre thoracique. Le canal thoracique et la veine azygos passent par le hiatus aortique.

Le diaphragme est innervé par le nerf phrénique (**Figure 7**). Le nerf phrénique provient de la ramification d'axones dont les corps cellulaires se situent dans la corne ventrale des segments C3 à C5 de la moelle épinière chez l'Homme ([Mendelsohn et al, 2011](#)) et jusqu'à C6 chez le rat ([Gottschall 1981](#)), et il y en a un de chaque côté : le nerf phrénique droit et gauche. Depuis cette origine, le nerf phrénique suit un trajet passant par le cou, le cœur puis les poumons pour atteindre le diaphragme. Au total, le nerf phrénique est constitué d'environ 50% d'axones moteurs, de 40% d'axones sensoriels et de 10% d'axones provenant du nerf phrénique accessoire ([Duron et Marlot 1980](#); [Langford et Schmidt 1983](#); [Paraskevas et al, 2016](#); [Nair et al, 2017a](#)). De plus, les nerfs phréniques droit et gauche ne sont pas identiques en composition, et le nerf phrénique droit de rat possède ~20% d'axones supplémentaires. Physiologiquement, ceci se traduit par une zone d'innervation du diaphragme plus importante pour le phrénique droit que pour le gauche ([Laskowski et al, 1991](#)).

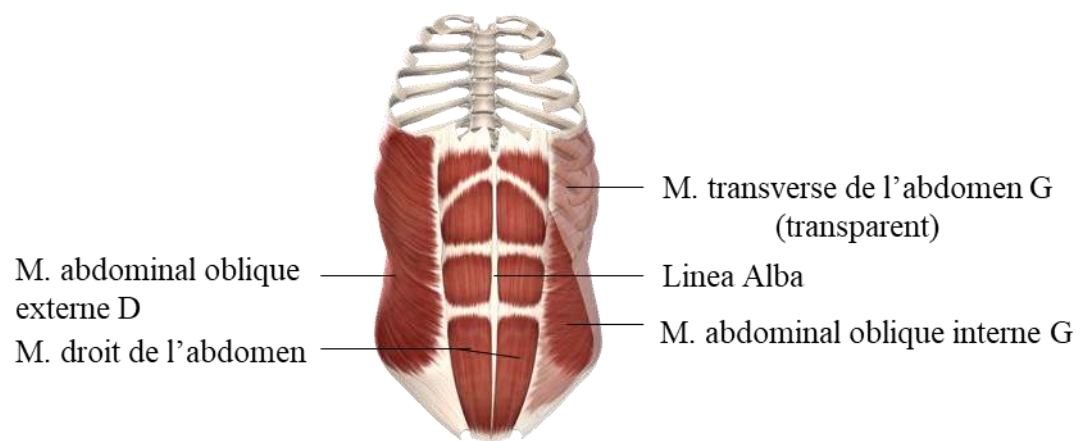


Figure 8 : Représentation des muscles abdominaux. M. = Muscle (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

C. Les muscles abdominaux

Les muscles abdominaux aident dans le processus de respiration, protègent les organes internes, fournissent le soutien postural, et servent à fléchir, étendre, et tourner le tronc du corps. Les quatre principaux groupes musculaires abdominaux, de l'intérieur à l'extérieur sont : muscle transverse de l'abdomen, muscle droit de l'abdomen, muscle interne et externe oblique (**Figure 8**). La ligne blanche de l'abdomen est formée à partir de l'entrelacement des aponévroses de l'oblique externe, de l'oblique interne et du transverse de l'abdomen. L'aponévrose du muscle oblique interne se divise pour encapsuler les muscles droits abdominaux au-dessus de la ligne arquée.

L'abdomen est relativement déficient en soutien squelettique, comprenant uniquement la colonne vertébrale et les côtes inférieures postérieures. La partie supérieure de la paroi abdominale est reliée à la structure squelettique de la cage thoracique et la partie inférieure aux os pelviens. Cette carence osseuse relative permet la flexibilité du tronc, ainsi que la distensibilité pour tenir compte des changements dynamiques dans le volume du contenu abdominal. La contraction simultanée des muscles abdominaux peut faciliter la génération de pression intra-abdominale et intrathoracique critique pour les éternuements, la toux, les vomissements et la défécation. En période de demande physiologique ou pathologique accrue pour la ventilation des voies respiratoires, les muscles antérolatéraux agissent comme des muscles accessoires de la respiration en augmentant la pression intra-abdominale pour provoquer l'expiration active.

Les muscles abdominaux sont innervés par les nerfs intercostaux inférieurs (T7-T11), le nerf subcostal (T12), le nerf iliohypogastrique (L1) et le nerf ilioinguinal (L1).

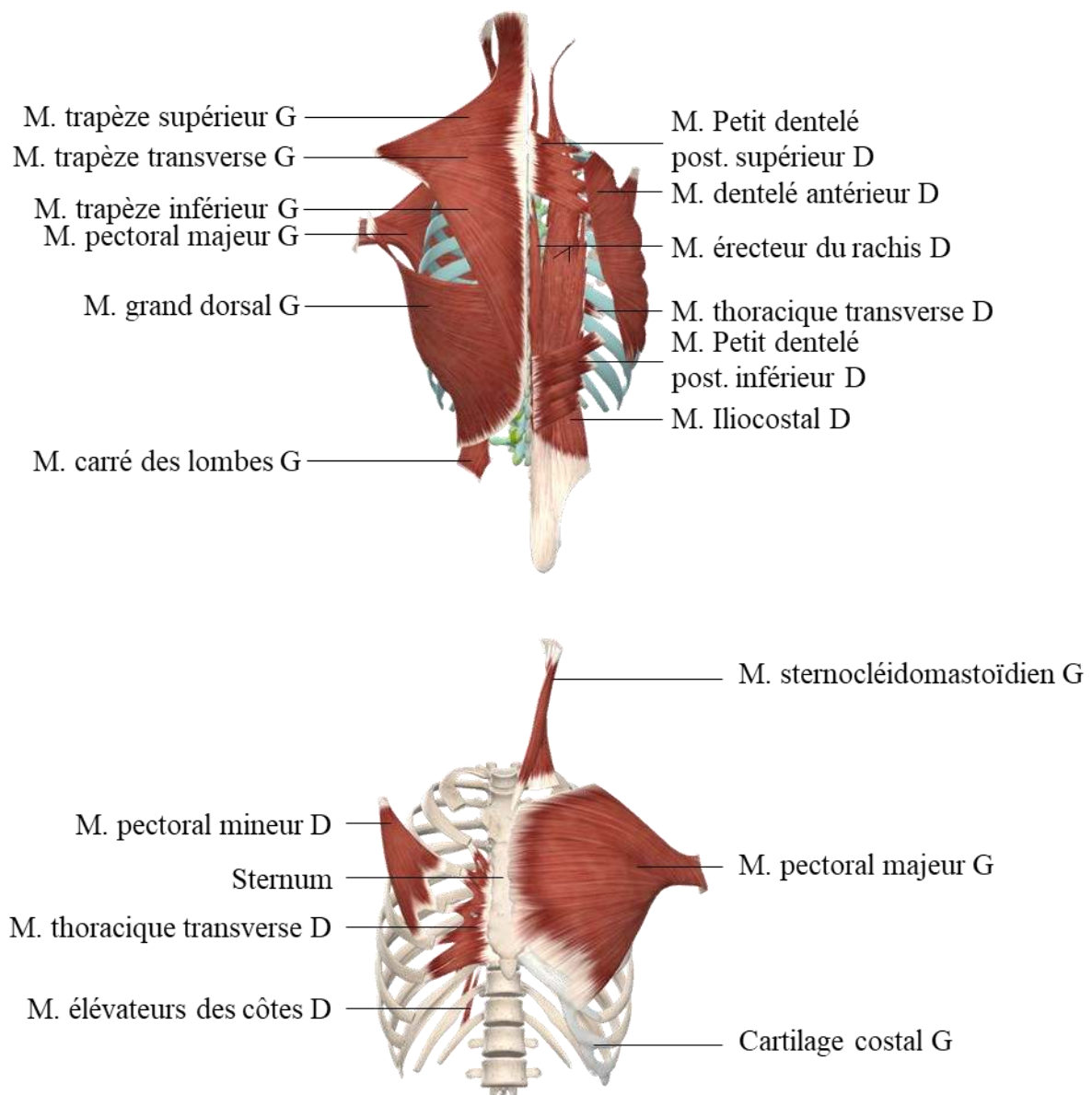


Figure 9 : Représentation des muscles accessoires respiratoires. Pour une meilleure lisibilité, n'est représenté ici que la partie Droite (D) ou Gauche (G) du même muscle (M.) (*Fait avec Complete Anatomy 2022*)

D. Les muscles intercostaux et accessoires respiratoires

L'efficacité des muscles de la pompe respiratoire est renforcée par la stabilisation de la paroi thoracique via les effets mécaniques des muscles respiratoires accessoires (**Figure 9**). Un certain nombre de muscles proviennent de la paroi thoracique ou y sont insérés. Ces muscles comprennent les grands et petits pectoraux innervés par les nerfs pectoraux latéral et médial, le grand dorsal innervé par le nerf thoraco-dorsal, le sternocléidomastoïdien innervé par le nerf accessoire, le thoracique transverse innervé par les nerfs thoraciques, le dentelé antérieur innervé par le nerf thoracique long, le petit dentelé postérieur supérieur et inférieur innervés par les nerfs intercostaux T9-T11, le trapèze supérieur innervé par le nerf accessoire, l'érecteur du rachis innervé par plusieurs nerfs allant de la division postérieure du nerf spinal C1 jusqu'au cinquième nerf lombaire L5, l'iliocostal qui s'étend des cervicales jusqu'au lombaires est innervé par les nerfs spinaux des étages correspondants, le muscle carré des lombes innervé par le nerf subcostal, et les muscles élévateurs des côtes innervés par le rameau postérieur du huitième nerf spinal cervical et par les rameaux postérieurs des nerfs spinaux thoraciques. Ces muscles agissent pour stabiliser et raidir notre paroi thoracique pendant l'activation musculaire de la pompe respiratoire, améliorant ainsi l'effet sur la pression intrathoracique qui se traduit à son tour par des pressions intra-pleurales et intra-pulmonaires modifiées et des changements dans le débit d'air et le volume pulmonaire. Les muscles respiratoires accessoires sont relativement inactifs pendant la ventilation au repos et ne sont généralement recrutés que dans des conditions d'effort inspiratoire ou expiratoire accru, par exemple, pendant l'exercice ou en raison de conditions pathologiques. Ainsi, certains peuvent classer ces muscles accessoires dans le même groupe que les principaux muscles de la pompe inspiratoire et expiratoire.

Chapitre 2 : les générateurs de rythme centraux

I. Notion de générateur central d'activité motrice ou CPG

On a tous en tête l'exemple du poulet qui peut encore courir et battre des ailes après avoir été décapité. Ces mouvements rythmiques sont produits par des réseaux neuronaux présents dans la moelle épinière, en interaction possible avec les afférences sensorielles. En fait, il existe toute une diversité d'activités motrices rythmiques qui peuvent être produites centralement, même en l'absence de rétroaction sensorielle, dont la locomotion et la respiration. Ces observations suggèrent l'existence de structures neurales autonomes au sein du système nerveux central capables de produire une activité rythmique stéréotypée.

Ces réseaux s'appellent les générateurs centraux d'activité motrice (abrégé ci-après CPG pour le terme anglo-saxon Central Pattern Generator). Ce sont des circuits intégratifs capables de fonctionner de manière autonome, qui génèrent des patrons moteurs répétitifs et stéréotypés pouvant être indépendants de toutes entrées sensorielles. Le fonctionnement de ces réseaux repose sur leur capacité à générer un rythme et un pattern moteur (mise en forme d'une ou plusieurs sorties motrice). On peut cependant noter que dans de nombreuses études, y compris sur le CPG respiratoire que nous détaillerons plus loin, le terme « générateur de rythme » est souvent employé à la place de CPG. Ce glissement sémantique s'explique certainement par l'engouement des chercheurs à identifier les mécanismes intimes à l'origine de la rythmogénèse grâce à la mise au point de modèles expérimentaux *in vitro* que l'on peut qualifier de « réductionnistes » car ils permettent de préserver le rythme mais pas nécessairement le pattern moteur. Concernant la genèse d'un rythme moteur, une seule cellule pourrait être vue comme un CPG si tant est qu'elle puisse produire des potentiels d'actions de manière rythmique et entraîner un mouvement, tel que les cellules pacemaker du cœur par exemple, qui peuvent produire des contractions rythmiques du cœur, même si celui-ci est isolé

in vitro. Cependant, les CPGs sont bien plus complexes car il s'agit d'ensembles de neurones ou systèmes de neurones qui produisent un comportement moteur rythmique, mais pouvant être initiés et arrêtés par les informations sensorielles et par la volonté de l'animal, là où les cellules pacemakers cardiaques sont actives tout le temps de manière autonome.

Le premier à avoir proposé des preuves scientifiques de l'existence des CPGs est Thomas Graham Brown ([1911-1914](#)) qui a montré chez le chat que la marche pouvait être produite par la moelle épinière sans l'influence du cortex ni des récepteurs périphériques sensoriels de la moelle épinière. Ensuite, ce sont les études chez le criquet qui ont fait avancer la recherche sur les CPGs ([Wilson 1961](#)). Ces études ont montré que les ganglions isolés et dénervés (dépourvus d'efférences et afférences sensorielles) de la sauterelle pouvaient produire une activité rythmique ressemblant à celle observée lors du battement des ailes du criquet. Cette activité rythmique pouvait également être induite par des neuromodulateurs. En 1966, une équipe russe travaillant chez le chat décérébré a trouvé qu'une stimulation électrique de la région locomotrice du mésencéphale pouvait induire la marche, le trot et même la course (Shik et al, 1966). De plus, d'autres mouvements associés à la locomotion ont pu être produits par l'injection de dopamine dans la moelle épinière, mais aussi simplement en disposant le chat debout sur un tapis roulant automatique ([Barbeau et Rossignol 1991](#)).

Afin d'étudier les CPGs, un des modèles d'étude les plus utilisés a été la lamproie. Outre le fait qu'*in vitro* la moelle épinière de la lamproie peut survivre pendant des jours, celle-ci présente aussi relativement peu de neurones facilement stimulables et étudiables. *In vitro*, la moelle épinière de lamproie présente une activité rythmique similaire à la nage, mais aussi des mouvements qui permettraient de creuser ou de ramper ([Ayers et al, 1983](#)).

Chez les crustacés, ce sont des chaînes de ganglions qui forment les CPGs ([Chrachri et Clarac 1989](#); [Mulloney 2003](#); [Grabowska et al, 2015](#)). Ces ganglions peuvent s'activer de manière rythmique et alternée. Ceci se traduit par un décalage de phase entre des ganglions

adjacents, produisant une succession de mouvements opposés. Par exemple, chez le homard et le têtard, une chaîne isolée de ganglions présentant ces caractéristiques peut générer une activité rythmique semblable à celle de la nage ([Mulloney et al, 1987](#); [Tunstall et Roberts 1994](#); [Liao et Fetcho 2008](#)). Les neurobiologistes continuent d'étudier l'implication des CPGs dans différents comportements moteurs, et il en ressort aujourd'hui que les CPGs jouent un rôle dans la plupart des comportements rythmiques ([Marder et Calabrese 1996](#); [Marder et Bucher 2007](#); [Goulding 2009](#); [Kandel et al, 2012](#); [Berg 2018](#); [Grillner et Kozlov 2021](#)). Ainsi, les études chez les invertébrés ont permis de caractériser les premiers neurones constituant un CPG, de révéler leurs propriétés cellulaires et de définir l'organisation synaptique à l'échelle du réseau ([Hodgkin et Huxley 1952](#); [Bucher et al, 2007](#); [Bellen et al, 2010](#); [Kandel et al, 2014](#)).

II. Caractéristiques des CPGs et exemple du CPG locomoteur

Il existe plusieurs dizaines de CPGs à l'origine de différents comportements moteurs chez le mammifère ([Wood 2017](#)). Ceux situés dans le tronc cérébral, dont le réseau respiratoire (ou CPGr) et le réseau déglutiteur (ou CPGd), feront l'objet d'un chapitre à part dans cette Introduction car ils nous intéressent tout particulièrement. Ici, nous souhaitons prendre l'exemple du réseau ou CPG locomoteur car ce réseau a fait l'objet d'un très grand nombre d'études et a permis de fournir de solides connaissances dans le domaine. On retrouve un réseau de type « CPG locomoteur » chez les invertébrés et les vertébrés ([Delcomyn 1977](#); [Grillner 1981](#)). Ces neurones participent aux actions d'auto-propulsion telle que la marche, la course, le saut ou l'action de ramper.

Les principales caractéristiques qui permettent de définir un CPG peuvent être rappelées ici. Un CPG est un ensemble de neurones capable de 1) générer une activité rythmique et stéréotypée de manière endogène, 2) rester fonctionnel en l'absence de retour

provenant des structures supraspinales et/ou des retours sensoriels, et 3) d'assurer la genèse d'un rythme et d'un pattern moteur grâce à des propriétés endogènes particulières de certains neurones (e.g., les neurones pacemakers) et/ou grâce aux propriétés synaptiques du réseau (voir paragraphe suivant). Nous verrons plus loin qu'il en est de même pour le réseau respiratoire, car on retrouve des propriétés autorythmiques ou « pacemaker » chez certains neurones, notamment ceux localisés dans le complexe de pré-Botzinger ([Smith et al, 1991](#); [Del Negro et al, 2005](#)). Pour le réseau de la déglutition enfin, ce sont certains neurones du noyau du tractus solitaire (ou NTS) qui expriment des propriétés endogènes de type pacemaker, lesquelles dépendent du NMDA ([Tell et Jean 1991](#); [Jean 2001](#); [Tazerart et al, 2008](#)).

Même en l'absence de signaux transmis par les fibres afférences, le CPG est capable de contrôler le timing et le pattern de la séquence motrice locomotrice. Les retours sensoriels tels que ceux médiés par la proprioception sont cependant importants pour réguler finement l'activité du réseau ([Winter 1991](#); [Guertin 2009](#)). Le réseau contrôlant la locomotion des membres postérieurs serait situé dans la région spinale T13-L2 ([Guertin 2009](#); [Antri et al, 2011](#)). Quatre populations de neurones participent à la genèse du rythme locomoteur : 1) les neurones Vglut2-positifs, qui lorsqu'ils sont activés produisent une activité ressemblant à la locomotion *in vitro* ([Hagglund et al, 2010](#); [Hagglund et al, 2013](#)), 2) les neurones V2a qui permettent l'alternance bilatérale lors de la course ([Lundfald et al, 2007](#); [McLean et al, 2008](#); [Crone et al, 2008](#); [Crone et al, 2009](#)), 3) les neurones SHOX2, dont le blocage par optogénétique provoque une déficience dans l'alternance gauche-droite ainsi que sur la rythmogénèse locomotrice ([Dougherty et al, 2013](#)), et 4) les neurones HB9 positifs de la colonne ventrale, qui sont actifs rythmiquement pendant la locomotion et présentent une activité pacemaker-like ([Brownstone et Wilson 2008](#); [Masino et al, 2012](#)).

Bien que ce CPG locomoteur situé dans la moëlle épinière génère le rythme et le pattern moteur, l'initiation et le contrôle de la vitesse dépendent de la région locomotrice mésencéphalique (RLM), localisée dans le tronc cérébral. La stimulation électrique tonique de

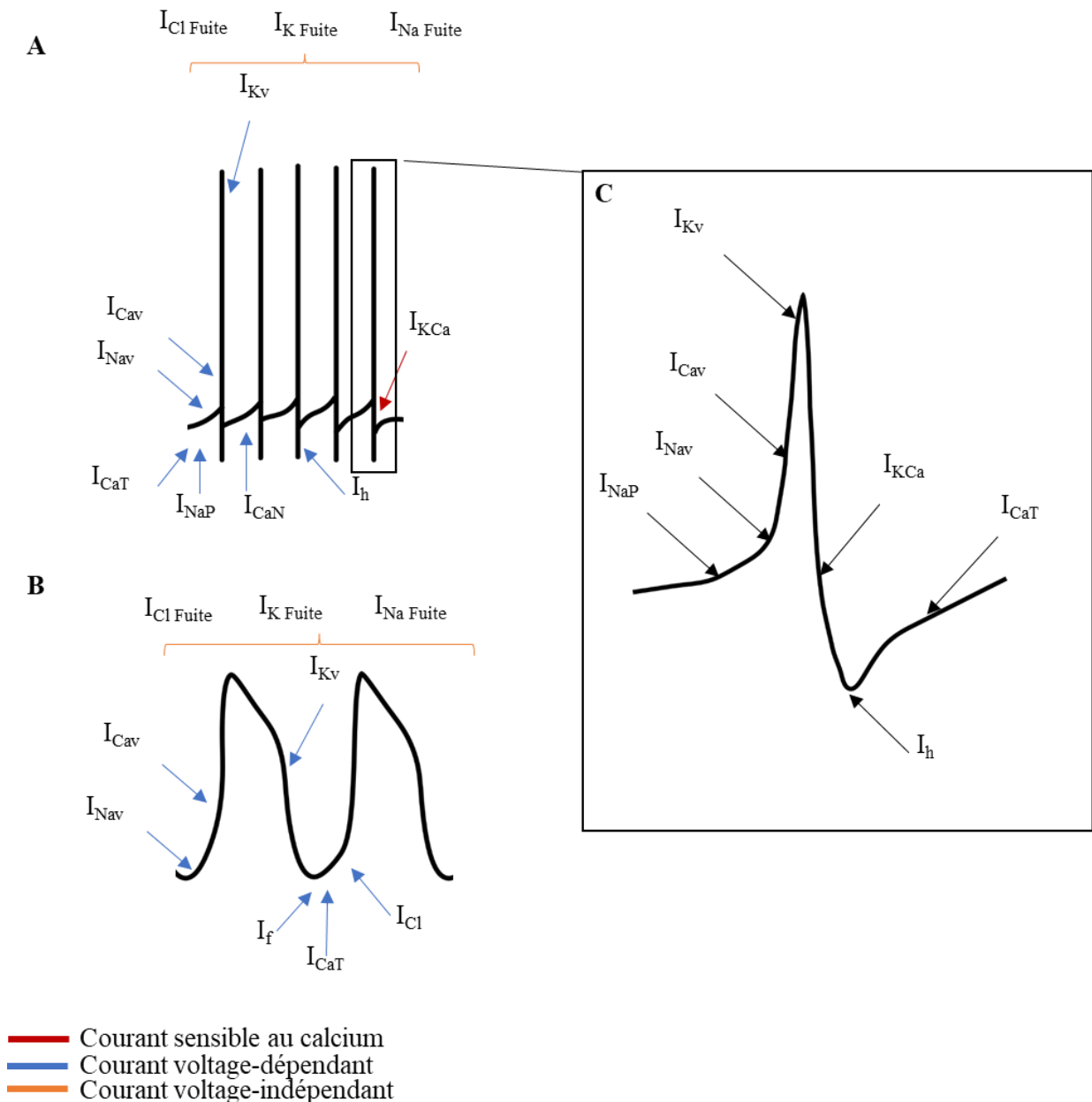


Figure 10 : Exemples de courants permettant l'émergence d'activité spontanée de différentes cellules pacemaker. Les courants de fuite potassique, sodique et chlore ($I_{K\text{ Fuite}}$ / $I_{Na\text{ Fuite}}$ / $I_{Cl\text{ Fuite}}$) déterminent le potentiel de repos de la membrane. **(A)** Exemple de pattern de décharge d'un neurone pacemaker du système nerveux central. La décharge de ce neurone dépend du courant sodium persistant (I_{NaP}) qui dépolarise la membrane et permet d'activer les canaux sodium voltage-dépendant (I_{Nav}). La dépolarisation rapide active des canaux calciques et potassiques voltage-dépendant (I_{Cav} / I_{Kv}). L'after-hyperpolarisation est médiée par des courants potassiques calcium-dépendants (I_{KCa}), suivie par les courants activés par l'hyperpolarisation (I_h) et les courants calciques de type T (I_{CaT}). **(B)** Patron de décharge de cardiomyocyte du nœud sinusal. Le courant pacemaker principal est un courant entrant dépolarisant activé par l'hyperpolarisation membranaire appelé « funny current » (I_f). Les courants I_{Nav} et I_{Cav} contribuent à la phase de dépolarisation du potentiel d'action et les courants I_{Kv} participent à la phase d'hyperpolarisation. **(C)** Agrandissement d'un potentiel d'action. (Adaptée de Lu et Feng, 2012).

cette région chez le chat a montré qu'on pouvait stimuler la locomotion ([Shik et al, 1966](#); [Shik et al, 1969](#)). Récemment, une étude optogénétique a montré que les neurones glutamatergiques de cette région permettaient de déclencher la course ([Roseberry et al, 2016](#)).

III. Mécanismes de la rythmogénèse

Deux mécanismes principaux ont été proposés pour expliquer la rythmogénèse des CPGs. Soit le rythme est généré par les propriétés intrinsèques des neurones qui composent le réseau, il s'agira alors de neurones pacemakers, soit le rythme est généré par les propriétés de réseau issues des connexions synaptiques des neurones constituant le réseau ([Rekling et Feldman 1998](#); [Rekling et al, 2000](#)). La particularité des neurones pacemaker dans un CPG est que lorsqu'ils sont spécifiquement bloqués, tout le CPG sera stoppé, alors qu'un réseau dont le rythme ne repose pas sur les propriétés intrinsèques de ses neurones ne sera pas arrêté si une population de neurones particulière est isolée et inhibée (bien qu'il puisse être fortement déstabilisé). Cependant, il ne serait pas avisé de voir le fonctionnement de ces deux modèles de CPG comme étant totalement différents, car ils possèdent certains mécanismes similaires qui permettent la rythmogénèse. Parmi ces mécanismes, on retrouve un certain nombre de courants ioniques participant à l'activité rythmique des neurones appartenant à un CPG.

Il y a les courants sodiques persistants ou INaP, les courants non sélectifs activés par le calcium ou ICaN, les courants activés par l'hyperpolarisation ou Ih, et les courants potassiques dépendants du calcium ou IKCa (**Figure 10**, [Lu et Feng 2012](#)). Le courant entrant INaP fait partie des courants sodiques voltages dépendants qui permettent la génération et la conduction des potentiels d'action des cellules excitables. Celui-ci a la particularité de ne pas s'inactiver ou de le faire de manière lente. Ce courant est notamment impliqué dans la rythmogénèse du CPG respiratoire, locomoteur et masticateur (**Figure 10-AC**). Plus spécifiquement, le blocage des courants INaP dans le complexe de pré-botzinger abolit

l'activité des neurones pacemakers de cette zone et stoppe la respiration ([Del Negro et al, 2002](#); [Koizumi et Smith 2008](#)), mais aussi affaiblit l'activité de décharge des différents neurones spinaux impliqués dans l'oscillation de la locomotion ([Kuo et al, 2006](#)). Les ICaN sont des courants entrants activés par une élévation en calcium cytoplasmique, permettant de larges courants entrants transportés par le sodium et ont une activation et inactivation lente. Il a été montré que ces courants étaient impliqués dans le CPG_r en générant une commande rythmique lorsque les conditions sont normales, alors que lorsqu'il y a un milieu pauvre en oxygène, la rythmogénèse repose sur les courants INaP ([Pena et al, 2004](#)). Les courants I_h sont activés par l'hyperpolarisation des cellules et permettent d'induire une rampe de dépolarisation afin d'initier le cycle d'activité suivant. Lorsque l'on bloque ces canaux dans le ganglion stomatogastrique du homard, on observe une baisse importante de l'activité du réseau ([Peck et al, 2006](#)). Les IKCa sont des courants sortants fondamentaux pour la régulation de l'excitabilité neuronale. Ils permettent l'hyperpolarisation cellulaire en fonction de la concentration de calcium intracellulaire en ouvrant des courants potassiques. On peut retrouver deux types de courant IKCa déterminés par leur façon de s'inactiver : les "Big conductance voltage- and calcium-gated potassium channel" ou BK-Ca qui s'inactivent en fonction de leur dépendance intrinsèque au voltage, et les "Small conductance calcium-gated potassium channel" ou SK-Ca qui s'inactivent grâce à la diminution du calcium intracellulaire ([Vergara et al, 1998](#)). Il a été montré que le blocage des SK-Ca réduisait l'hyperpolarisation qui suit la décharge des neurones produisant le rythme de nage pour la lamproie, et du CPG masticateur et locomoteur spinal chez le rat ([El Manira et al, 1994](#); [Cazalets et al, 1999](#); [Del Negro et al, 1999](#)). D'autres types de courants sortants sont aussi importants pour la terminaison de la décharge neuronale, comme les courants potassiques de fuite, particulièrement importants pour la régulation de la fréquence respiratoire ([Koizumi et Smith](#)

[2008](#)). En effet, la réduction de l'activité de ces canaux entraîne une accélération de la fréquence respiratoire.

L'ensemble de ces courants permet de générer les activités rythmiques de ces différents CPGs : des potentiels d'actions rapides et soutenus dans le temps (INaP et ICaN), des mécanismes robustes d'hyperpolarisation (IKCa), puis une ré-initiation du rythme après l'hyperpolarisation (Ih) (**Figure 10**). Le facteur qui permettra de franchir le seuil d'activation de ces canaux varie en fonction du type de réseau : il sera intrinsèque s'il s'agit de cellules pacemaker à la base de la rythmogénèse ou bien synaptique s'il s'agit de propriétés de réseau. Une certaine balance entre ces mécanismes est essentielle ([Smith et al, 2000](#); [Rubin et al, 2009](#)), et ceux-ci peuvent être modulés voire inhibés par différents facteurs. En effet, ces courants peuvent activer d'autres courants qui ne sont pas affectés par le potentiel membranaire, et les neurotransmetteurs utilisés par ces réseaux peuvent activer des cascades intracellulaires secondaires modifiant le comportement de ces canaux ioniques.

Les cellules gliales peuvent également être impliquées dans ces réseaux complexes. En effet, on sait aujourd'hui que les cellules gliales expriment des canaux ioniques voltage dépendants, des récepteurs AMPA ainsi que des pompes ioniques ([Wigley et al, 2007](#); [Kadala et al, 2015](#)) et que ceux-ci exercent un rôle dans diverses fonctions telles que l'apprentissage, l'intégration sensori-motrice ou l'épilepsie ([Fellin et al, 2006](#); [Takata et al, 2011](#); [Min et Nevian 2012](#)). Le rôle de la glie dans l'homéostasie ionique est particulièrement intéressant concernant les générateurs de rythme. Les changements de concentration des principaux ions qui régulent l'activité cérébrale exercent d'énormes effets sur l'excitabilité neuronale et sont déterminants pour le mode de décharge de l'activité neuronale. Or les cellules gliales sont impliquées dans la régulation de différents ions, dont le potassium et le calcium ([Auld et Robitaille 2003](#)). L'activation des canaux calciques des cellules gliales provoque le repompage du calcium contenu dans la fente synaptique ([Smith 1992](#)). C'est dans ce contexte

que l'équipe du docteur Kolta s'est intéressée au rôle de la glie dans le CPG de la mastication et a montré qu'en modulant la concentration extracellulaire de calcium, les cellules gliales influencent de façon déterminante l'activité de décharge des neurones générant le rythme masticateur ([Kolta et al, 2010](#)). Cette régulation du calcium extracellulaire jouerait un rôle critique dans le fonctionnement des courants INaP, affectant le rythme de la mastication. D'autres études ont révélé que les changements de concentration de calcium extracellulaire affectaient le CPG locomoteur spinal chez le rat ([Brocard et al, 2013](#)) et le CPGr de la souris. Chez la souris une augmentation de calcium extracellulaire dans le complexe de pré-botzinger provoque une réduction du rythme respiratoire ([Panaitescu et al, 2009](#)). Ainsi, l'activité gliale semble être importante pour le fonctionnement des réseaux rythmiques.

Chapitre 3 : Activité musculaire et contrôle nerveux de la respiration

I. Aspects mécaniques de la respiration

La ventilation pulmonaire est réalisée grâce à une succession de mouvements de l'appareil respiratoire ou cycles respiratoires. Chaque cycle respiratoire se compose d'une inspiration où l'air pénètre à l'intérieur des poumons et d'une expiration où l'air est exhalé hors des poumons pour rejoindre l'air atmosphérique. On considère classiquement que pour une respiration au repos, l'inspiration est une phase active et l'expiration est une phase passive. En réalité, le cycle respiratoire est plus complexe que cela car la phase expiratoire doit être scindée, d'un point de vue mécanique, en une phase dite d'expiration précoce (ou post-inspiration), cette phase étant active, et une phase dite d'expiration tardive, cette dernière étant passive.

Ci-dessous, nous présenterons brièvement chacune des trois phases du cycle respiratoire et détaillerons l'action des principaux muscles impliqués ainsi que leurs conséquences sur l'appareil respiratoire et le déplacement de l'air.

- L'inspiration se fait principalement grâce à l'activité du diaphragme (voir la première partie de l'introduction pour les détails anatomiques des muscles respiratoires). En effet, le diaphragme joue un rôle de piston et la contraction de ce seul muscle est responsable d'environ 75% du mouvement d'inspiration. En se contractant, le diaphragme effectue une course vers le bas (de 1 à 3 cm chez l'Homme) ce qui exerce une pression sur la cavité abdominale mais permet surtout au thorax d'effectuer un mouvement d'expansion dans les trois dimensions de l'espace. Cette expansion du thorax et par là-même des poumons entraîne alors une légère dépression intra-pulmonaire (quelques millimètres seulement en dessous de la pression atmosphérique) ce qui provoque l'entrée d'air dans les poumons. L'action du

diaphragme peut être complétée par la musculature dite accessoire, dont les muscles intercostaux externes qui soulèvent les côtes et participent ainsi à l'expansion de la cage thoracique. Lorsque l'inspiration est forcée, comme c'est le cas lors d'un effort physique, d'autres muscles sont recrutés pendant la phase inspiratoire : les muscles sterno-cléido-mastoïdiens, les scalènes, le petit et grand pectoral, ainsi que le petit et le grand dentelé. L'action conjointe de tous ces muscles permet d'effectuer un mouvement inspiratoire de grande ampleur et de mobiliser ainsi le volume inspiratoire de réserve en plus du volume courant. De manière importante, les muscles des voies aériennes supérieures contribuent au bon déroulement de l'inspiration. Leur action combinée permet en effet d'augmenter le diamètre des voies aériennes supérieures et de diminuer la résistance au passage de l'air dans les poumons. Cette diminution de résistance se fait grâce à un mouvement d'aplatissement et/ou de protrusion de la langue, d'une dilatation du pharynx ainsi que d'une abduction du larynx, cette dernière entraînant une augmentation du diamètre de la fente glottique.

- La post-inspiration ou expiration précoce est caractérisée par le relâchement des abducteurs du larynx et la contraction des adducteurs du larynx. Cette adduction correspond au rapprochement l'une de l'autre des cordes vocales entraînant le rétrécissement de la fente glottique. Cette adduction est maximale dès le début de l'expiration puis diminue au fur et à mesure, permettant ainsi l'ouverture progressive du larynx. L'adduction laryngée possède un double rôle : elle permet d'une part de limiter la vitesse d'exhalation de l'air, et par là-même de prolonger les échanges gazeux alvéolo-capillaires, et d'autre part, en évitant un dégonflement pulmonaire trop brutal, elle contribue à éviter l'atélectasie (ou collapsus alvéolaire). Nous verrons également plus loin que cette phase du cycle respiratoire est également essentielle à l'expression de comportements non-respiratoires nécessitant les mêmes muscles, tels que la déglutition, la toux ou encore la vocalisation ([Gestreau et al, 1996](#); [Gestreau et al, 2000](#); [Gestreau et al, 2005](#)).

- L'expiration tardive est essentiellement passive lors d'une respiration de repos. En effet, le relâchement des muscles inspiratoires, dont le mouvement du diaphragme vers l'intérieur du thorax, ainsi que la force élastique de recul de la cage thoracique et des poumons, provoquent une légère surpression intra-pulmonaire suffisante pour que l'air sorte des poumons. Lors de cette phase, les adducteurs du larynx étant également relâchés, l'air exhalé ne rencontre donc pas de résistance particulière au niveau des voies aériennes supérieures. L'expiration tardive peut cependant devenir active lorsque la demande métabolique augmente. Dans ce cas, on observe principalement une activation des muscles abdominaux. La contraction des muscles abdominaux, ainsi que le recrutement des muscles intercostaux internes (abaisseurs des côtes), permettent d'augmenter la pression intra-abdominale, déplaçant le diaphragme plus loin dans le thorax, ce qui augmente la pression intra-pulmonaire et mobilise le volume de réserve expiratoire en plus du volume courant.

II. Le développement du réseau respiratoire

Les mouvements respiratoires chez les Mammifères sont générés par l'activité rythmique d'un réseau de neurones situé dans le tronc cérébral appelé le « générateur central d'activité respiratoire » ou CPGr. Ce réseau fait l'objet d'une maturation au cours du développement. Dans ce chapitre, nous allons décrire le fonctionnement du réseau respiratoire, depuis son émergence au cours de la gestation jusqu'au stade adulte, ainsi que les principaux mécanismes permettant sa modulation.

Chez les mammifères, la respiration doit être opérationnelle dès la naissance. Cosmi et al, ([2003](#)) a montré des évidences chez l'Homme : des mouvements respiratoires étaient présentes dès le 5ème mois de gestation, tels que des mouvements thoraciques et du liquide amniotique dans les cavités nasales ([Rigatto 1992](#)). Chez le rongeur, une étude a montré

qu'un embryon âgé de 16 jours (E16) présenté à l'air libre était capable de présenter des activités

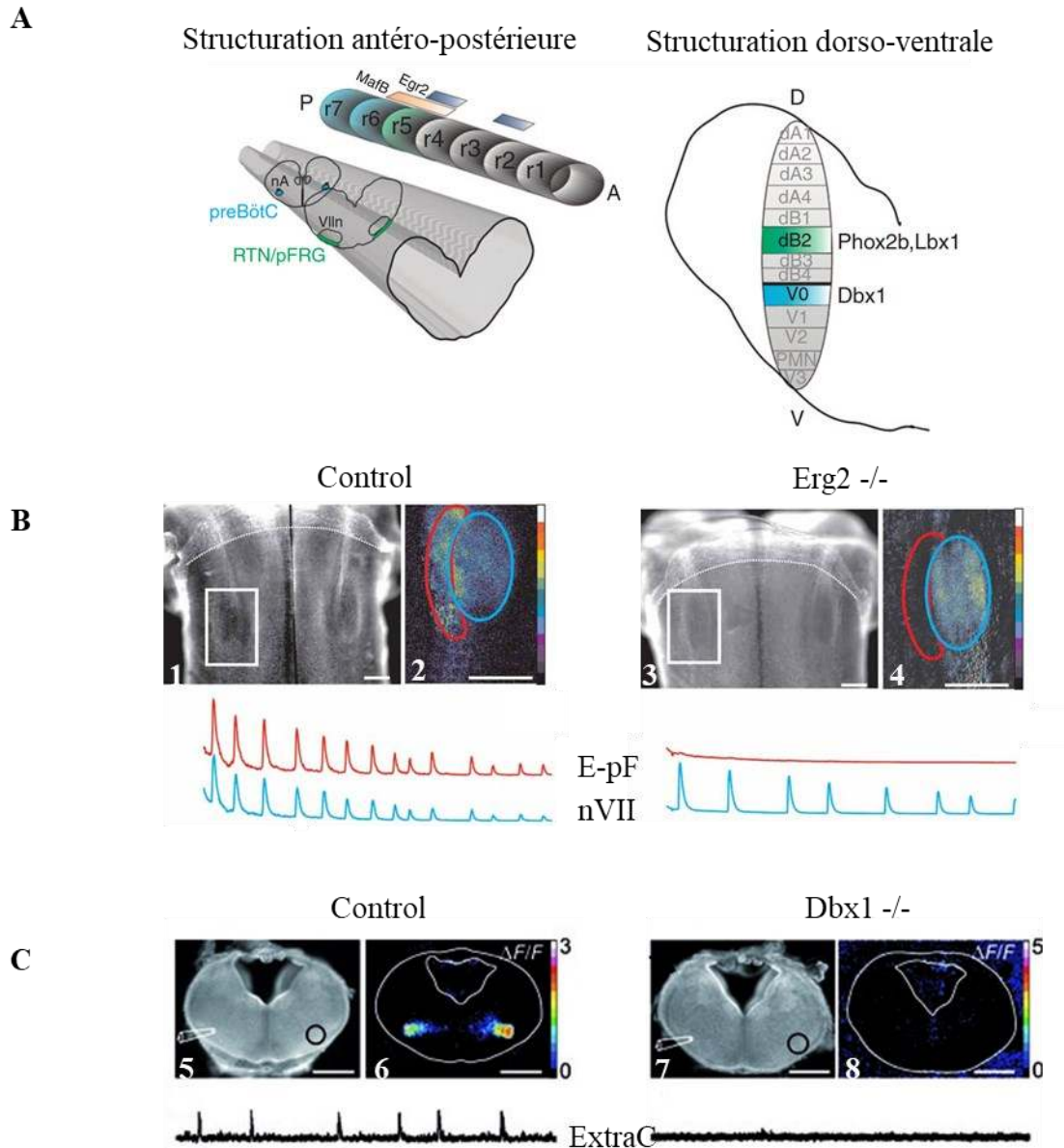


Figure 11 : Structuration développementale du complexe de préBötzinger et du RTN/pFRG. (A) Schéma représentant la structuration du complexe de préBötzinger et du RTN/pFRG pendant le développement dans l'axe antéro-postérieur (AP) et l'axe dorso-ventral (DV). Pendant l'embryogénèse, le rhombencéphale est divisé dans l'axe AP en rhombomères (r1 à r7) définis par différents facteurs de transcription tels que MafB et Egr2. Dans l'axe DV, différents domaines (ou populations de neurones) tels que dB2 et V0 sont définis par d'autres facteurs de transcription tels que Phox2b, Lbx1 et Dbx1. (*Adapté de Mellen et Thoby-Brisson, 2012*). **(B)** Activité du noyau parafacial embryonnaire (e-pF) en condition contrôle (gauche) et en condition Erg2 KO (droite) à E15,5. Les images 1 et 3 illustrent le tronc cérébral isolé in vitro et la région où l'activité calcique est analysée (rectangle blanc). L'agrandissement de cette région correspond aux images 2 et 4. Celles-ci montrent l'activité de l'e-pF (rouge) et du noyau moteur facial (nVII, bleu). Les tracés en dessous des images témoignent des variations de fluorescence au cours du temps de l'e-pF (rouge) et du nVII (bleu) en condition contrôle et Erg2 KO. On remarque l'absence d'activité de l'e-pF en condition Erg2 KO, ainsi que le maintien d'une activité du nVII dont le rythme est plus faible (*Adapté de Thoby-Brisson et al, 2009*). **(C)** Activité des neurones du complexe de pré-botzinger (preBotC) mesurée à E15,5 à partir de tranches de tronc cérébral isolées in vitro chez des souris contrôle et Dbx1 KO (panels 5 et 7). Les panels 6 et 8 montrent les variations de fluorescence des neurones mesurées dans le preBotC. On note l'absence d'activité du preBotC en condition Dbx1 KO. Le tracé noir représente l'enregistrement extracellulaire (ExtraC) de la zone correspondant au preBotC. (*Adaptée de Bouvier et al, 2010*).

respiratoires basiques, mais ne pouvait pas survivre, alors qu'à E18, les embryons étaient capables de respirer de manière plus complexe et de survivre si les conditions étaient propices ([Viemari et al, 2003](#)). Ainsi, le réseau respiratoire est bien présent et fonctionnel avant la naissance. Les études faites chez le rongeur soutiennent l'hypothèse que le réseau respiratoire embryonnaire est composé de deux oscillateurs en interaction : le groupe respiratoire parafacial (pFRG aussi appelé epF lorsqu'il s'agit du stage embryonnaire pour « embryonic parafacial respiratory group ») ([Onimaru et Homma 2003](#)) et le complexe preBötzinger (preBötC) ([Smith et al, 1991](#)).

A. Stade embryonnaire

Le développement de puissants outils génétiques a permis de déterminer l'âge auquel se mettent en place le PreBotC et l'epF dans le tronc cérébral (**Figure 11**). En effet, la manipulation de certains gènes impliqués dans la formation des neurones du PreBotC et de l'epF a permis d'étudier leur développement et leur implication dans le contrôle central de la respiration au stade embryonnaire ([Gray et al, 1999a](#); [Dubreuil et al, 2008](#)). Par exemple, l'epF dérive du domaine dB2 du rhombomère 5 et les neurones de l'epF expriment plusieurs facteurs de transcription, dont Phox2b (lequel permet plus largement d'identifier les neurones impliqués dans les réflexes autonomes) ([Dubreuil et al, 2008](#); [Dubreuil et al, 2009a](#)), Lbx1 (qui permet la structuration antéro-postérieure) ([Pagliardini et al, 2008](#)), Atoh1 ou Math1 (impliqué dans la caractérisation des cellules neurales et non-neurales) ([Dubreuil et al, 2008](#); [Rose et al, 2009](#)), ou encore Tshirt3 (ou Tshz3), un facteur de transcription à doigt de zinc (qui permet le maintien de l'ion zinc dans les protéines) ([Caubit et al, 2010](#)) (**Figure 11-A**). Chez les rongeurs, les délétions ou mutations de ces facteurs de transcription conduisent à des troubles de formation du pFRG/epF et à des défaillances respiratoires (**Figure 11-B**). Ces neurones sont glutamatergiques (expriment le transporteur vésiculaire du glutamate VGlut2) et expriment le récepteur à la substance P (NK1R) ([Dubreuil et al, 2008](#); [Dubreuil et al,](#)

[2009b](#); [Stornetta et al, 2009](#)). Le même procédé a pu être utilisé pour identifier les neurones spécifiques du PreBotC (**Figure 11-C**).

En effet, les neurones du PreBotC proviennent de progéniteurs exprimant le facteur de transcription Dbx1 et MafB, et leur délétion abolit complètement l'activité respiratoire, et résulte en une malformation du PreBotC ([Blanchi et al, 2003](#); [Bouvier et al, 2010](#); [Gray et al, 2010](#)). Ces neurones peuvent aussi exprimer VGlut2 et les récepteurs NK1R, ainsi que les récepteurs à la somatostatine (SST) ([Gray et al, 1999a](#); [Stornetta et al, 2003](#); [Bouvier et al, 2010](#); [Gray et al, 2010](#)). Bien que le epF/pFRG et le PreBotC aient des rôles fonctionnels distincts, ils interagissent pendant la respiration normale. L'interaction entre ces deux noyaux est nécessaire pendant le développement embryonnaire et à la naissance car une modification délétère de l'un des deux résulte en la mort de l'animal ([Blanchi et al, 2003](#); [Pagliardini et al, 2008](#); [Thoby-Brisson et al, 2009](#); [Dubreuil et al, 2009a](#); [Rose et al, 2009](#); [Caubit et al, 2010](#); [Bouvier et al, 2010](#); [Gray et al, 2010](#)). Cependant, plus tard dans le développement post-natal de l'animal, la perturbation de l'un ou l'autre des circuits n'est plus létale, montrant qu'un mécanisme « de secours » peut se mettre en place lorsque le réseau respiratoire est plus développé ([Tan et al, 2010](#); [Bochorishvili et al, 2012](#)). La rythmogénèse respiratoire embryonnaire est possible grâce aux propriétés intrinsèques des neurones qui constituent ces deux noyaux. Certains neurones du PreBotC présentent une activité pacemaker (c'est-à-dire qu'ils peuvent présenter des potentiels d'action de manière autonome). Cette structure et ses propriétés émergent à partir du stade E15,5 ([Smith et al, 1991](#); [Johnson et al, 1994](#); [Koshiya et Smith 1999](#); [Thoby-Brisson et Ramirez 2001](#); [Pena et al, 2004](#); [Thoby-Brisson et al, 2005](#); [Del Negro et al, 2005](#); [Mellen et Mishra 2010](#)). L'activité pacemaker des neurones du PreBotC est permise grâce aux canaux ioniques sodiques persistants INaP et les canaux non sélectifs activés par le calcium ICaN décrits dans le chapitre 2-III ([Thoby-Brisson et Ramirez 2001](#); [Del Negro et al, 2002](#); [Pena et al, 2004](#); [Del Negro et al, 2005](#)). L'epF possède aussi des

neurones pacemakers dépendants du courant I_{NaP} ainsi que du courant I_h (activés par l'hyperpolarisation) qui jouent un rôle important dans la fréquence respiratoire. De plus, des études sur tranche d'epF isolé ont montré que l'epF était actif dès le stade E14,5, soit un jour avant le PreBotC ([Onimaru et al, 1989](#); [Thoby-Brisson et al, 2009](#)). On considère aujourd'hui que l'epF joue un rôle important dans l'initiation du rythme respiratoire embryonnaire. La précession d'activité de ce noyau lui permettrait d'entraîner le PreBotC ([Thoby-Brisson et al, 2009](#)). La synchronisation des neurones pacemakers de l'epF est assurée par des jonctions GAP, contrairement au mécanisme de synchronisation des pacemakers du PreBotC qui repose sur une transmission excitatrice glutamatergique. Aussi, les neurones epF reçoivent des entrées excitatrices glutamatergiques provenant du PreBotC, ce qui peut sembler paradoxal compte-tenu que ces deux structures ne sont pas actives simultanément mais au contraire, sont en opposition de phase ([Thoby-Brisson et al, 2009](#)). De plus, lorsqu'on déconnecte pharmacologiquement ou mécaniquement ces noyaux, leur fréquence d'activité respective change, avec l'epF qui augmente en fréquence et le PreBotC qui baisse. Ceci suppose l'existence de connections réciproques excitatrices et/ou inhibitrices permettant leur couplage ([Onimaru et al, 2003](#)).

De fait, le réseau respiratoire est mis en place dès le stade embryonnaire mais il n'est toutefois pas complètement formé et continue sa maturation après la naissance.

B. Maturation du réseau respiratoire

A la naissance le réseau respiratoire doit être fonctionnel, cependant il reste immature. Passant d'un milieu où l'apport en oxygène est constant, où l'environnement s'adapte aux besoins du fœtus pour son développement, le nouveau-né doit soudainement s'adapter lui-même à un environnement changeant. De plus, dès la naissance, le réseau respiratoire doit aussi être capable de se coordonner avec d'autres réseaux fonctionnels tels que ceux permettant la succion ou la déglutition. La maturation du système respiratoire est dépendante

de ce que l'on appelle « la plasticité liée à l'expérience » : là où le développement embryonnaire est sous le contrôle génétique ([Champagnat et al, 2011](#)), la maturation post-natale est épigénétique, c'est à dire que l'environnement va influencer la façon dont les cellules du réseau vont utiliser ces gènes. La naissance est une période critique. L'expérience acquise au cours de la période critique peut perturber et modifier le développement, alors que la même expérience avant ou après a peu ou pas d'effet. Un exemple connu d'influence délétère est l'exposition périnatale à l'hypoxie chez le rat qui va empêcher l'animal de s'adapter à l'hypoxie dans le futur ([Lumbroso et Joseph 2009](#)). La chémo-sensibilité du nouveau-né est faible et augmente au cours des premières semaines de vie. L'augmentation de pression artérielle qui suit l'accouchement provoque ce que l'on appelle une réinitialisation de la chémo-sensibilité des corps carotidiens ([Blanco et al, 1988](#)). De manière intéressante, l'augmentation de pression artérielle *in utero* provoque cette réinitialisation de manière précoce, alors qu'une exposition à l'hypoxie à la naissance la retarde ([Eden et Hanson 1987](#); [Blanco et al, 1988](#); [Hertzberg et al, 1992](#); [Sladek et al, 1993](#)).

L'évolution du réseau respiratoire peut être observée en perturbant son activité à différents âges. Chez le rat *in vivo* l'administration d'allopregnanolone (neurodépresseur) diminue la fréquence du respiratoire à E20 mais l'effet de cette drogue est de moins en moins fort après la naissance ([Ren et Greer 2006](#)). De plus, nous savons que plusieurs neurotransmetteurs subissent différentes modifications d'expression après la naissance, notamment un gradient d'expression du GABA, du NMDA ou du glutamate ou encore du facteur neurotrophique le BDNF, qui augmente avec l'âge ([Simakajornboon et Kuptanon 2005](#); [Renn et al, 2006](#); [Wong-Riley et al, 2013](#)), ce qui témoigne de l'évolution du réseau. Après la naissance, l'epF mature pour devenir le complexe RTN/pFRG (noyau rétro-trapézoïde/groupe respiratoire parafacial). Cette structure ne possède plus de neurones

pacemakers et ne forme donc plus un générateur de rythme respiratoire chez l'adulte mais devient au contraire une sorte

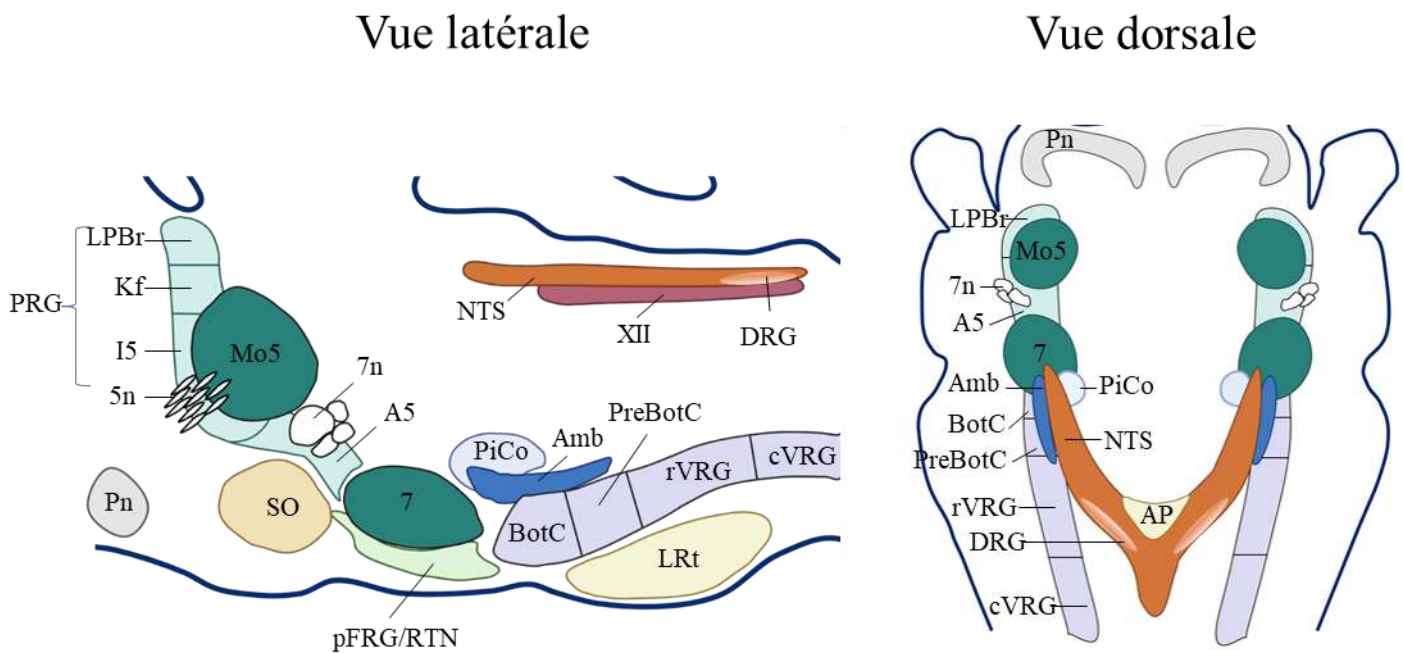


Figure 12 : Représentation schématique des structures du tronc cérébral impliquées dans le contrôle de la respiration. 5n : nerf trijumeau; 7 : noyau facial; 7n : nerf facial; A5 : groupe neuronal noradrénergique; Amb : noyau ambigu; AP : area postrema; BotC : complexe de bötzing; PreBotC : complexe de pré-bötzing; cVRG : groupe respiratoire ventral caudal; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral; DRG : groupe respiratoire dorsal; I5 : aire intertrigéminal; Kf : noyau de Kolliker-Fuse; LPBr : région parabrachiale latérale; LRt : noyau réticulé latéral; Mo5 : noyau moteur du nerf trijumeau; NTS : noyau du tractus solitaire; pFRG : groupe respiratoire parafacial; RTN : noyau rétrotrapézoïde; SO : olive supérieure; Pn : noyau pontique basilaire; PRG : groupe respiratoire pontique; PiCo : complexe post-inspiratoire. (Adaptée de Alheid et McCrimmon, 2008).

d'oscillateur conditionnel, actif principalement pendant l'expiration tardive ([Guyenet et Mulkey 2010](#); [Pagliardini et al, 2011](#)). Ces données montrent que le développement du réseau respiratoire se poursuit après la naissance et participe à l'adaptation de l'individu à son milieu. Ainsi, on considère aujourd'hui que la rythmogénèse respiratoire s'explique par des propriétés hybrides « pacemaker-réseau » où les connexions synaptiques établies entre de nombreuses structures respiratoires sont cruciales et où les propriétés intrinsèques de certains neurones, dont ceux du PreBotC, participent également au maintien et/ou à la modulation de l'activité respiratoire centrale.

Nous allons donc décrire dans les paragraphes ci-dessous les principales structures impliquées dans la genèse de l'activité respiratoire centrale chez l'adulte.

III. Le CPG respiratoire adulte

Le cœur du réseau générant le rythme et le pattern moteur respiratoire à trois phases se compose de multiples structures situées dans le tronc cérébral (**Figure 12**). On distingue classiquement la colonne respiratoire ventrale ([Ezure et Manabe 1988](#); [Ellenberger et Feldman 1990](#); [Hayakawa et al, 2004](#); [Morgado-Valle et Beltran-Parrazal 2017](#); [Ghali 2017](#)), le groupe respiratoire dorsal ([Richardson et Mitchell 1982](#); [Lipski et al, 1990](#); [Voss et al, 1990](#); [Ghali 2017](#)) et le groupe respiratoire pontique ([Molkov et al, 2017](#)). Ces structures permettent l'envoi de la commande respiratoire vers les différents muscles respiratoires via les nerfs crâniens ou spinaux décrits dans la première partie de l'introduction. Dans les chapitres qui suivent, nous détaillerons d'abord la localisation des structures qui composent le CPGr adulte puis l'implication des neurones respiratoires dans les trois phases de l'eupnée.

A. Contrôle périphérique

La commande motrice et sensorielle qui assure la ventilation est contrôlée par différents nerfs spinaux (NS phrénique et thoraciques), ainsi que par quatre des douze nerfs crâniens (NC V, IX, X et XII).

- Le nerf trijumeau (NC V) innerve notamment le palais via la branche maxillaire supérieure et permet le retour sensoriel du nez et des lèvres. La branche principale du NC V se divise en six branches collatérales, dont le nerf petit et grand palatin qui innerve le voile du palais. Pendant la respiration, les muscles du palais permettent une redirection du flux d'air en fonction des besoins respiratoires.

- Le nerf vague (NC X) se divise en différentes branches, et joue un rôle dans la plupart des structures des voies aériennes supérieures. Dans le pharynx, le nerf vague innerve l'hypopharynx et la région de l'épiglotte. La branche laryngée supérieure externe (NLSe) innerve le muscle crico-thyroïdien, et la branche récurrente (NLR) les muscles intrinsèques et extrinsèques du larynx. L'innervation afférente du larynx est majoritairement contrôlée par le NLS interne (NLSi), qui est exclusivement sensitive. Le NLS et le NLR voient leur corps cellulaire situé dans le ganglion plexiforme, au niveau de l'émergence du NC X du crâne. Pendant l'inspiration, les cordes vocales s'ouvrent grâce à l'activité du NLR qui contrôle les muscles abducteurs du larynx, alors que pendant la post-inspiration, l'enregistrement de l'activité du NLR décrit une adduction des cordes vocales.

- Le nerf glossopharyngien (NC IX) contient des fibres innervant le muscle Muscle stylopharyngien. La branche de ce nerf qui innerve la langue permet la sensibilité de la muqueuse de l'arrière de la langue.

- Le nerf hypoglosse (NC XII) est exclusivement moteur, et trouve son origine crânienne en passant par le canal condylien antérieur. Celui se divise en différentes branches,

telle que la branche descendante qui innerve les muscles sterno-cleïdo-hyoïdien et sterno-thyroïdien, la branche qui innerve le muscle thyrohyoïdien, celle qui innerve l'hyoglosse et le styloglosse, celle qui innerve le géniohyoïdien et les branches terminales innervant les muscles génioglosses et linguaux (inférieur, supérieur et transverse). Pendant l'inspiration, la langue décrit une action de protrusion, principalement médiée par le muscle génioglosse.

- Le nerf phrénique (NS Phr), ou plutôt le nerf phrénique droit et gauche, ont leurs corps cellulaires localisés dans la moelle épinière ventrale au niveau des vertèbres cervicales trois à cinq (C3-C5). Le Phr droit longe le muscle scalène antérieur et le Phr gauche longe l'artère sous-clavière. Au niveau du cœur, le Phr droit passe au niveau du ventricule droit et passe via le hiatus de la veine cave vers le diaphragme au niveau de la vertèbre thoracique huit (T8) innervant le dôme diaphragmatique droit, tandis que le Phr gauche longe le péricarde du ventricule gauche et atteint le diaphragme au niveau de son tendon innervant le dôme diaphragmatique gauche ([Bains et al, 2022](#)). Le NS Phr permet l'innervation motrice de tout le diaphragme, et contient les afférences sensorielles des fibres musculaires du diaphragme et du tendon central. Pendant l'inspiration, la contraction du diaphragme augmente la pression négative intrapulmonaire provoquant une entrée d'air dans les poumons. Le diaphragme est au repos pendant l'expiration et retrouve son état initial.

- Les nerfs thoraciques (NS Th), (à ne pas confondre avec le « nerf long thoracique »), sont originaires de la moelle épinière au niveau des vertèbres thoraciques et sont au nombre de douze. Les onze premiers nerfs thoraciques forment les nerfs intercostaux et innervent les muscles intercostaux ainsi que les muscles dentelés. Lors de l'inspiration, ces muscles assistent l'action du diaphragme, et sont actifs aussi pendant l'inspiration au repos. Pendant l'inspiration forcée, les muscles dentelés permettent d'élever les côtes d'avant en arrière afin d'allonger le thorax. Les six derniers nerfs thoraciques permettent d'innervier les muscles abdominaux qui sont les muscles expiratoires principaux.

B. Localisation des structures du CPGr adulte

La colonne respiratoire ventrale

La colonne respiratoire ventrale (CVR) s'étend de manière bilatérale et rostro-caudale le long du bulbe rachidien, comprenant à son extrémité basse la moelle épinière rostrale (-3,5mm par rapport à l'obex), jusqu'au noyau facial à son extrémité haute (+4,5mm par rapport à l'obex) ([Feldman et Del Negro 2006](#)). La CVR contient la plus grande quantité de neurones hétérogènes respiratoires bulbaires du tronc cérébral, et contient les structures générant le rythme respiratoire. Cette hétérogénéité permet de classer les neurones en différents noyaux en fonction de leur nature. Parmi la CVR, on retrouve le noyau rétro-trapézoïde/groupe respiratoire parafacial (RTN/pFRG), le complexe de Bötzing (BotC), le complexe de pré-Bötzing (PreBotC), le noyau ambigu (Amb), la réticulée ou région para-ambigue (para-Amb), et le groupe respiratoire ventral (GRV) qui se subdivise entre deux parties, le GRV caudal et rostral (GRVc et GRVr, respectivement) ([Alheid et al, 2002](#); [Monnier et al, 2003](#); [Feldman et Del Negro 2006](#); [Rybak et al, 2008](#)).

- Le complexe de botzinger est connu pour son activité expiratoire. Les premières études présentent l'activité de ces neurones comme produisant l'expiration tardive et réduisant l'activité inspiratoire des neurones pacemaker du PreBotC via des projections inhibitrices ([Richter 1982](#)). Il contient des neurones post-inspiratoires qui déchargent de manière décroissante (ou « decrementing » en terme anglo-saxon ou Dec Post-I) ([Ezure et Manabe 1988](#)), ainsi que des neurones expiratoires tardifs croissants (ou « augmenting » en terme anglo-saxon ou Aug late-E) ([Jiang et Lipski 1990](#)). Les neurones Aug Late-E exercent un tonus inhibiteur sur les neurones du BotC en lui-même, envoient une forte commande inhibitrice au PreBotC et au GRVr ([Yang et Feldman 2018](#)) et envoient une commande excitatrice les pré-motoneurones expiratoires du GRVc, ainsi que sur le groupe respiratoire pontique ([Jiang et Lipski 1990](#); [Nunez-Abades et al, 1993](#); [Molkov et al, 2017](#)). L'excitation

directe des neurones du BotC par injection de NMDA ou de glutamate provoque la cessation précoce de la décharge phrénique, témoignant de son effet inhibiteur sur le cycle respiratoire ([Chitravanshi et Sapru 1999](#); [Monnier et al, 2003](#)). Le BotC est aussi important pour le réflexe d'Hering-Breuer. Ce réflexe permet d'écourter la phase inspiratoire grâce au retour sensoriel des mécanorécepteurs pulmonaires ([Kubin et al, 2006](#)).

- Le complexe de pré-Bötzinger est situé directement caudal au BotC et est essentiel pour la rythmogénèse respiratoire ([Smith et al, 1991](#)). Le PreBotC est composé de neurones glutamatergiques, GABAergiques et glycinergiques qui se dépolarisent spontanément ([Gray et al, 2010](#); [Kuwana et al, 2006](#); [Morgado-Valle et al, 2010](#)) grâce aux courants INaP et ICaN ([Toporikova et Butera 2011](#)). La provenance (intra- ou extracellulaire) du calcium permettant l'activation des ICaN semble modifier les paramètres du rythme respiratoire, avec le calcium extracellulaire modifiant l'amplitude et le calcium intracellulaire modifiant la fréquence ([Phillips et al, 2019](#)). Ce noyau contient des neurones pré-inspiratoires (pré-I), des neurones inspiratoires augmentant (I-Aug) et des neurones inspiratoires diminuant (I-Dec) qui produisent des potentiels d'action de manière intrinsèque (pacemaker), ([Morgado-Valle et Beltran-Parrazal 2017](#)). Les neurones du PréBotC expriment les récepteurs à la substance P (NK1R), au GABA et aux opioïdes μ , ainsi que des transporteurs vésiculaires de type 2 du glutamate (VGlut2) ([Smith et al, 1991](#); [Sun et al, 1998](#); [Gray et al, 1999b](#); [Guyenet et al, 2002](#)). L'injection de glutamate ou de NMDA dans le PreBotC augmente la fréquence respiratoire ainsi que l'activité tonique phrénique ([Chitravanshi et Sapru 1999](#)). Chez la chèvre, une disruption pharmacologique du PreBotC via injection de substance P et de saporin provoque une cessation d'activité musculaire respiratoire ([Wenninger et al, 2004](#)).

- Le groupe respiratoire ventral est divisé en deux parties, un GRV rostral et un GRV caudal. Cette dissociation s'est faite par leur activité pendant le cycle respiratoire, le GRVr est actif pendant l'inspiration, et le GRVc pendant l'expiration ([Alheid et McCrimmon 2008](#)).

- Le GRVr contient des neurones glutamatergiques I-Aug qui projettent de manière monosynaptique vers les motoneurones phréniques cervicaux et les motoneurones des muscles intercostaux externes ([Dobbins et Feldman 1994](#); [Bianchi et al, 1995](#); [Iscoe 1998](#); [Guyenet et al, 2002](#)). Le GRVr contient aussi des neurones inspiratoires exprimant le NK1R, mais ceux-ci se distinguent de ceux du PreBotC par leur taille et leur pattern de décharge, car ces neurones sont I-Aug alors que ceux du PreBotC sont pré-I ([Alheid et McCrimmon 2008](#)). L'inhibition pharmacologique de cette zone diminue la fréquence respiratoire ([Alheid et McCrimmon 2008](#)).

- Le GRVc contient des neurones expiratoires augmentant (E-Aug) et diminuant (E-Dec). Les neurones E-Aug commandent les motoneurones abdominaux et intercostaux internes ([Ezure et al, 2003](#)), et les neurones E-Dec envoient des connections inhibitrices vers certains neurones inspiratoires de la CVR ([Saito et al, 2002](#); [Alheid et McCrimmon 2008](#)). L'injection de NMDA ou de glutamate dans le GRVc provoque une bradypnée voire une apnée ([Chitravanshi et Sapru 1999](#)).

- Le RTN et le pFRG sont situés au niveau ventral du bulbe rachidien, inférieur du noyau facial et s'étend un peu de manière caudale au BotC. Ces deux noyaux sont cités ensemble car leurs neurones se chevauchent voire se colocalisent et seules leurs fonctions les différencient ([Smith et al, 2009](#)). Les neurones du RTN sont chémosensibles au niveau de CO₂ et de pH sanguin ([Chan et al, 2006](#); [Guyenet et Mulkey 2010](#)) et projettent vers les noyaux de la CRV ainsi que le groupe respiratoire dorsal et pontique ([Rosin et al, 2006](#)). Lorsqu'activés, ces neurones permettent de stimuler la respiration lorsque le niveau de CO₂ augmente ou que le pH baisse ([Chan et al, 2006](#)). Le NTS envoie des projections des afférences chémosensibles au RTN afin que l'information y soit traitée ([Chan et al, 2006](#); [Takakura et al, 2006](#)). Le RTN reçoit aussi des afférences sérotoninergiques qui permettent de faciliter sa réponse face à l'hypercapnie ou l'alcalose ([Mulkey et al, 2007](#)). Le

pFRG, qui chevauche le RTN, contient des neurones Phox-2b et NK1R positifs qui sont à la fois sensibles aux variations de CO₂ et qui déchargent en phase avec la phase pré-inspiratoire ([Onimaru et al, 2006](#); [2009](#)). Contrairement à son rôle prépondérant pour la rythmogénèse respiratoire chez le nouveau-né, chez l'adulte son rôle est celui d'oscillateur qui envoie sa commande pré-inspiratoire vers les neurones du PreBotC ([Onimaru et al, 1987](#), [1988](#); [2003](#); [2006](#); [Guyenet et al, 2019](#)).

Le groupe respiratoire dorsal

Le groupe respiratoire dorsal (GRD) consiste en un groupe de neurones actifs pendant la respiration constituant une colonne bilatérale au niveau dorso-médian du bulbe rachidien, comprenant une sous-division ventro-latérale du NTS. Cependant cette population de neurones du GRD est peu dense par rapport à la CRV. On retrouve trois types de neurones dans le GRD, des neurones I-Aug, des neurones I-Dec et des neurones actifs en phase avec le remplissage des poumons, les cellules « pompes » ou P-Cells. Les neurones du GRD modulent l'activité respiratoire en relayant les informations sensorielles aux différents noyaux de la CRV et au pont ([Berger 1977](#); [Bianchi et al, 1995](#); [Li et al, 1999](#); [Arata et al, 2000](#); [Takakura et al, 2006](#)). La modulation de l'activité respiratoire évoquée par les P-Cells se fait grâce au retour vagal des mécanorécepteurs sensibles à l'étirement pulmonaire. Le GRD est d'ailleurs le premier relais d'information du réflexe d'Hering Breuer ([Wang et al, 2008](#)). Le GRD reçoit aussi des afférences provenant des chémorécepteurs et barorécepteurs aortiques et des carotides, renseignant sur la pression artérielle, le pH et la concentration d'O₂ et de CO₂ sanguin afin d'adapter la respiration aux changements ([Orem et Kubin 2000](#)). Le GRD fonctionne ainsi comme un relais primaire et secondaire important pour les informations sensorielles viscérales. De plus, beaucoup de neurones inspiratoires du GRD projettent vers la moelle épinière, formant des connections excitatrices avec les motoneurones phréniques et servant ainsi de commande inspiratoire supplémentaire ([Berger 2000](#)).

Le groupe respiratoire pontique

Le réseau respiratoire n'est pas limité aux structures présentes dans le bulbe rachidien. En effet, de nombreuses études ont montré que le groupe respiratoire pontique joue un rôle important dans le contrôle de la phase post-inspiratoire ([Dick et al, 1994](#); [Bianchi et al, 1995](#); [St-John 1998](#); [Dutschmann et Herbert 2006](#)). Ce rôle a été bien démontré dans le travail de Smith et collaborateurs ([2007](#)). En effet, en pratiquant des transections étagées le long du tronc cérébral à partir de la préparation *in situ*, ces auteurs ont montré que le rythme en trois phases généré par le réseau respiratoire lorsque le tronc cérébral était entier, se transformait en un rythme à deux phases (Inspiration suivie d'une expiration) après une section pratiquée entre le bulbe et le pont, puis enfin en un rythme à une seule phase (composé d'inspiration uniquement suivie d'une pause) lorsque la section était pratiquée plus caudalement dans le bulbe rachidien, entre le BotC et le PreBotC. Il est important de noter qu'après la section bulbo-pontique, la perte de la phase post-inspiratoire s'accompagnait d'un changement du pattern inspiratoire phrénique, avec la perte de la rampe phrénique en condition normale eupnéique et l'apparition d'un pattern apneustique (de forme carrée et de longue durée) caractéristique de l'absence des structures du pont.

Le groupe respiratoire pontique (GRP) est composé du noyau de Kolliker-Fuse (KF), du complexe parabrachial (PB) ([Bianchi et al, 1995](#); [Hilaire et al, 2004](#); [Bianchi et Gestreau 2009](#)). Les noyaux PB/KF reçoivent de nombreuses projections provenant du NTS ainsi que des zones cérébrales autonomes et limbiques ([Loewy et Burton 1978](#); [Fulwiler et Saper 1984](#)).

Le noyau KF, situé dans la partie dorso-latérale du pont, est le noyau le plus important du GRP. Le KF projette de manière étendue sur la CRV ([Ezure et al, 1998a](#); [Yokota et al, 2001](#)), c'est un noyau clé pour le traitement de l'information sensorielle du réseau respiratoire. Le KF reçoit des informations somato- et viscéro-sensorielles ascendantes et descendantes provenant du NTS, des noyaux trijumeaux spinaux, de la moelle cervicale supérieure

comprenant les relais principaux pour les informations sensorielles provenant des voies aériennes supérieures et inférieures et de la tête ([Menetrey et Basbaum 1987](#); [Herbert et al, 1990](#); [Slugg et Light 1994](#); [Feil et Herbert 1995](#); [Ezure et al, 1998b](#); [Panneton et al, 2000](#); [Song et al, 2011](#)). Il est aussi impliqué dans certains réflexes nécessitant une réinitialisation des phases respiratoires telles que la toux ([Shannon et al, 2004](#)), le réflexe d'Hering-Breuer ([Hayashi et al, 1996](#)), ainsi que la déglutition ([Gestreau et al, 2005](#); [Dutschmann et Dick 2012](#)). La plasticité du contrôle réflexe de la respiration pendant le retour sensoriel des mécanorecepteurs à l'étirement pulmonaire est fortement influencée par des neurones localisés dans le KF ([Siniaia et al, 2000](#)). Il est important de souligner que des pré-motoneurones hypoglosses sont présents dans le KF et sont importants pour l'activité respiratoire des motoneurones hypoglosses ([Roda et al, 2004](#); [Gestreau et al, 2005](#)). De plus, chez le rat, le KF module l'activité motrice hypoglosse pré-inspiratoire ([Dutschmann et al, 2007](#)).

Le complexe post-inspiratoire

En [2016](#), Anderson et collaborateurs ont découvert un nouveau réseau de neurones qui serait impliqué dans la genèse de la phase post-inspiratoire et nommé le complexe post-inspiratoire (ou PiCo de l'Anglais « post-inspiratory complex »). Le PiCo serait constitué de neurones cholinergiques situés dans le noyau intermédiaire de la réticulée bulbaire, en avant et au-dessus du noyau ambigu. Certains neurones du PiCo possèdent une activité pacemaker conditionnelle en rapport avec l'activité post-inspiratoire vagale. Les auteurs de cette découverte ont proposé l'hypothèse du triple oscillateur dans laquelle la genèse du rythme respiratoire reposerait sur le PreBotC et le PiCo dans les conditions de repos (rythme respiratoire à deux phases) et sur le PreBotC, le PiCo et le pFRG (rythme à trois phases) lorsque les besoins métaboliques sont élevés et que l'expiration devient active ([Anderson et Ramirez 2017](#)). Cependant, cette hypothèse est loin de faire l'unanimité. En effet, la présence

du PiCo n'a pour le moment été observée qu'en tranche isolée chez la souris âgée de 5 à 10 jours (P5-10). En condition de base, seule une activité sporadique (ou épisodique) du PiCo est détectée, et ce n'est qu'après injection de norépinephrine qu'une activité rythmique stable est enregistrée ([Anderson et al, 2016](#)).

En dépit de la centaine de citations de cet article depuis sa parution, une seule étude réalisée *in vivo* semble confirmer la présence du PiCo. En effet, Toor et collaborateurs ([2019](#)) montrent que l'injection d'isoguvacine dans cette région abolit l'activité post-inspiratoire du nerf vague en condition de repos. Cependant, cette même injection ne supprime pas l'activité vagale en condition d'hypoxie ce qui contredit partiellement l'hypothèse d'un triple oscillateur. Récemment, Dhingra et collaborateurs ([2020](#)) ont montré grâce à l'utilisation de potentiels de champs locaux pour enregistrer l'activité respiratoire du pont et du bulbe qu'ils pouvaient reconstituer le réseau respiratoire en quatre dimensions et de manière fonctionnelle. Les auteurs montrent que les potentiels de champs locaux respiratoires les plus distribués sont ceux enregistrés lors de la transition de phase inspiration/post-inspiration, ce qui suggère que les conductances synaptiques de plusieurs zones du réseau respiratoire sont maximales pendant cette transition de phase. Or le PiCo n'a pu être reconstitué grâce à cette méthode. Lorsqu'on compare l'implication du KF avec celui du PiCo dans la genèse de la post-inspiration, on peut voir que l'inhibition du KF avec l'isoguvacine bloque totalement l'activité post-inspiratoire laryngée ([Dutschmann et al, 2021](#)), tandis que l'injection d'isoguvacine dans le PiCo ne fait qu'affaiblir l'amplitude de l'activité post-inspiratoire ([Toor et al, 2019](#)). Il en est de même pour l'injection de DAMGO ([Anderson et al, 2016](#)), ce qui suggère que le pont est bien plus important pour la génération de la post-inspiration que le PiCo. Cependant, le travail de Toor et collaborateurs ([2019](#)) suggère que le PiCo est impliqué dans la commande laryngée lors de la déglutition et que cette structure pourrait faire partie du groupe déglutiteur ventral (voir plus bas).

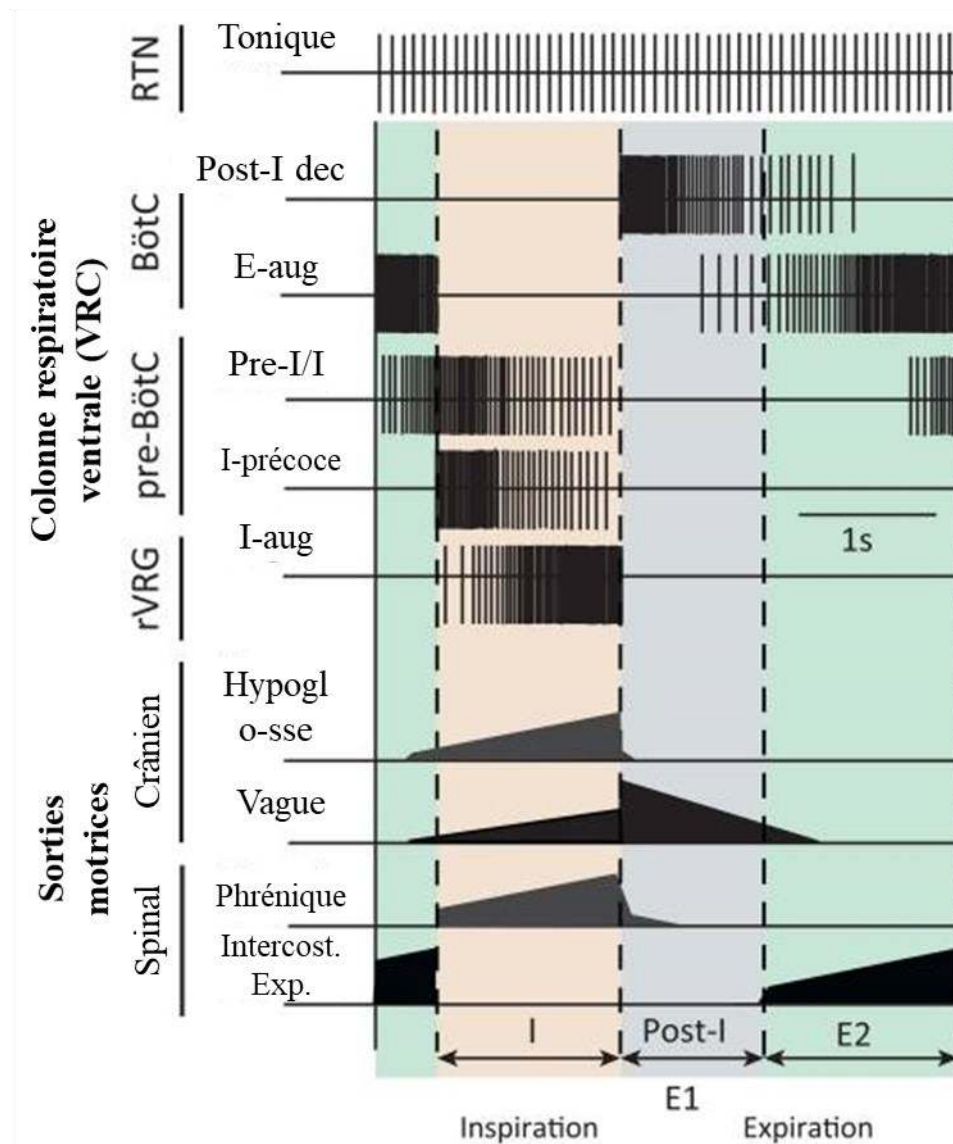


Figure 13 : Schéma illustrant les patterns de décharge des neurones et des nerfs impliqués dans la respiration lors des trois phases du cycle respiratoire. Pattern de décharge tonique, croissant (aug) ou décroissant (dec) observés sur différents neurones (tracés du haut). On note l'activité rythmique croissante ou décroissante des nerfs moteurs (tracés du bas). Les neurones respiratoires sont classés selon la phase du cycle respiratoire où ils sont actifs et selon leur pattern de décharge. (*Adaptée de Smith et al, 2013*).

C. La rythmogénèse respiratoire adulte

Le réseau respiratoire est distribué dans tout le tronc cérébral ([Guyenet et al, 2019](#)) (**Figure 12-14**). Le pattern respiratoire en trois phases serait généré par des interconnexions inhibitrices formant un anneau inhibiteur, avec des populations de neurones qui interagissent entre elles. On retrouve les neurones pré-I, inspiratoires précoces et tardifs, et les E-Aug et E-Dec ([Smith et al, 2007](#)) (**Figure 13**). Ces réseaux reçoivent la commande primaire provenant des décharges spontanées des neurones pré-I du PreBotC ([Morgado-Valle et Beltran-Parrazal 2017](#)), qui envoient leur commande rythmique vers les neurones I-Aug du GRVr ([Molkov et al, 2017](#)), tout en inhibant les neurones Post-I (E-Dec) et E-Aug du BotC ([Richter et al, 1986](#); [Schwarzacher et al, 1991](#); [Molkov et al, 2017](#)). Ceci a pour effet de générer une phase inspiratoire croissante ([Molkov et al, 2017](#)). Les neurones post-I du BotC envoient une forte inhibition vers les neurones inspiratoires du PreBotC ainsi que vers les neurones I-Aug de la GRVr ([Molkov et al, 2017](#)). Les neurones post-I du BotC sont principalement glycinergiques et les neurones E-Aug sont principalement GABAergiques ([Ezure et Manabe 1988](#); [Schwarzacher et al, 1991](#); [Schmid et al, 1996](#)). L'activation séquentielle des neurones I-Aug et des neurones post-I du BotC permet d'interrompre la phase inspiratoire, on parle alors d'« off-switch » inspiratoire ([Smith et al, 2007](#); [2009](#); [Marchenko et al, 2016](#)). Les neurones E-Aug tardifs du BotC exercent une forte commande inhibitrice sur les neurones pré-I et I-Dec du PreBotC et sur les prémotoneurones I-Aug du GRVr ([Jiang et Lipski 1990](#); [Rybak et al, 2014](#)). En bref, les neurones glycinergiques post-I du BotC exercent une commande inhibitrice sur tous les neurones de la CVR et permettent l'off-switch inspiratoire ([Bianchi et al, 1995](#); [Smith et al, 2007](#); [2009](#); [Molkov et al, 2017](#)). Les neurones GABAergiques E-Aug tardifs du BotC inhibent les neurones post-I du BotC ([Ezure et Manabe 1988](#)), ainsi que les neurones inspiratoires ([Rybak et al, 2014](#)). Les neurones pré-I du PreBotC permettent la

décharge des neurones I-Dec précoces, qui eux inhibent les neurones E-Aug du BotC
([Viemari et al, 2011](#)).

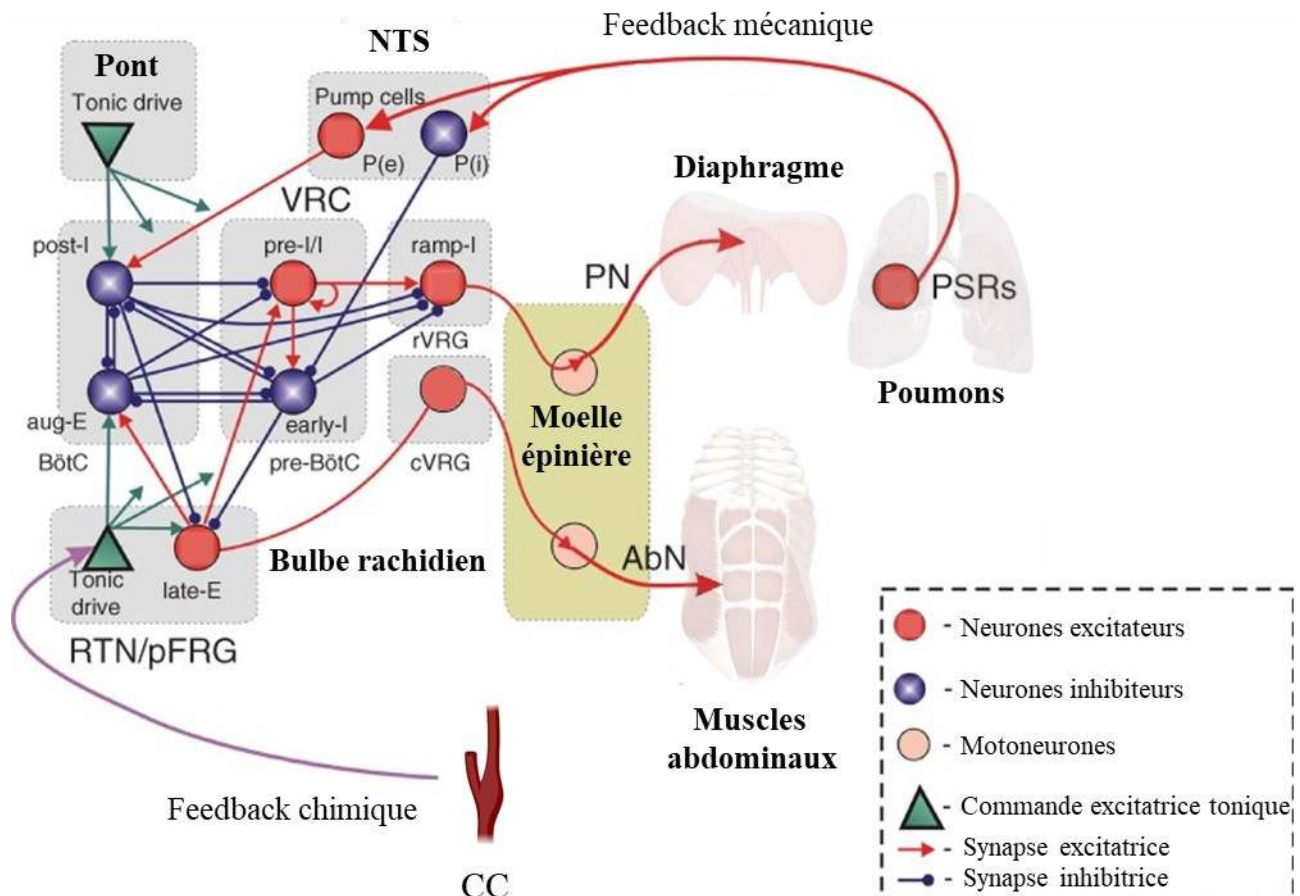


Figure 14 : Exemple de modélisation du réseau respiratoire. Le rythme respiratoire est généré par l'activité des neurones pré-inspiratoires (pre-I) et inspiratoires (I) du complexe de préBötzinger (pre-BotC) qui déchargent spontanément. Ces neurones commandent l'activité des neurones respiratoires du groupe respiratoire ventral rostral (rVRG) et façonnent le pattern croissant. Les neurones inspiratoires précoces (early-I) du pre-BotC envoient une commande inhibitrice aux neurones du rVRG. Ces neurones du pre-BotC reçoivent une commande inhibitrice provenant des neurones post-inspiratoire (post-I) et expiratoires tardifs croissants (aug-E) du complexe de bötzinger (BotC). Les neurones post-I reçoivent une commande excitatrice tonique provenant du noyau de Kölliker-Fuse (situé dans le pont) et du groupe respiratoire parafacial (pFRG). Les neurones post-I et aug-E du BotC présentent des interactions inhibitrices réciproques. Les neurones expiratoires tardifs (late-E) du pFRG envoient une commande excitatrice vers les pré-motoneurones du groupe respiratoire ventral caudal (cVRG), permettant l'activation des motoneurones innervant les muscles abdominaux. Les neurones du pFRG actifs pendant la phase pré-inspiratoire (pre-I) envoient une commande excitatrice vers les neurones pre-I du pre-BotC et permettent aussi l'expiration tardive lors d'hypercapnie. Les neurones I-aug et late-I du rVRG envoient une commande pré-motrice aux motoneurones inspiratoires du noyau moteur phrénique, hypoglosse et intercostal. AbN : nerf abdominal ; NTS : noyau du tractus solitaire ; P(e) : pumps cells excitatrices ; P(i) : pumps cells inhibitrices ; pFRG : groupe respiratoire parafacial ; PN : nerf phrénique ; pre-I/I : neurones pré-inspiratoire/inspiratoire pacemaker ; PSRs : récepteurs sensibles à l'étirement pulmonaire ; ramp-I : neurones inspiratoire déchargeant en rampe ; RTN : noyau rétro-trapézoïde ; VRC : colonne respiratoire ventrale. (Adaptée de Molkov et al, 2014).

Ces mécanismes d'inhibition sont critiques pour maintenir les 3 phases de l'eupnée et donc l'intégrité fonctionnelle du réseau respiratoire.

D. La phase inspiratoire

L'enregistrement de l'activité du nerf phrénique permet de mettre en évidence la commande inspiratoire transmise par le CPGr au diaphragme, ce dernier étant le principal muscle de l'inspiration. Lors de l'inspiration, on constate une augmentation progressive, dite "en rampe", de l'activité du nerf phrénique. Cette activité en rampe s'explique par plusieurs mécanismes. Le premier est dû aux neurones excitateurs pacemakers du PreBotC actifs avant et pendant l'inspiration. Ces neurones inspiratoires déchargent de manière croissante (ou en rampe ; ramp-I) et excitent les neurones du GRVr, dont la population principale est constituée de neurones prémoteurs bulbo-spinaux inspiratoires ([Figure 14](#), [Molkov et al, 2014](#)). Ces neurones projettent vers les motoneurones phréniques et les excitent donc de manière croissante ([Molkov et al, 2017](#)). Le deuxième est dû à une inhibition des neurones I-Aug provenant d'interneurones actifs vers le début de l'inspiration et/ou déchargeant de manière décroissante pendant l'inspiration ([Bayliss et al, 1994](#); [Duffin et al, 1995](#)). Leur activité décroissante au cours de l'inspiration expliquerait donc la désinhibition progressive des neurones I-Aug, favorisant l'activité en rampe de cette sortie motrice ([Figure 14](#)). Enfin, il est également possible qu'un processus d'auto-réexcitation existe pour les neurones I-Aug grâce à des collatérales d'axones présentes sur ces mêmes cellules et responsables de synapses axo-somatiques (boucle d'amplification).

E. L'expiration précoce ou post-inspiration

L'apparition de la post-inspiration se fait grâce à l'inhibition des neurones inspiratoires par les neurones E-Dec du BotC ([Figure 13](#)). L'activité de ces neurones n'est pas synchrone. Certaines cellules déchargent en fin d'inspiration, d'autres plutôt au début de

la post-inspiration, ce qui expliquerait que la cessation d'inspiration ne soit pas brutale ([Ezure 1990](#)). L'activité des neurones E-Dec est permise par la levée d'inhibition progressive des I-Dec, ainsi que par la commande phasicotonique provenant du pont ([Dutschmann et al, 2014](#); [Molkov et al, 2017](#)) (**Figure 14**). De plus, l'activité des mécano-recepteurs vagues sensibles à l'étirement pulmonaire favorise l'apparition de la phase post-inspiratoire ([Kubin et al, 2006](#)). Cependant, l'initiation de la post-inspiration via le groupe respiratoire pontique s'effectue même en l'absence de ce feedback pulmonaire. C'est notamment le cas dans les études faites sur la préparation perfusée *in situ* où les poumons sont retirés ([Gestreau et al, 2005](#)) (**Figure 14**).

F. L'expiration tardive

La décharge décroissante des E-Dec entraîne une levée d'inhibition progressive des neurones E-Aug du BotC. Ces derniers inhibent en retour les neurones inspiratoires du PreBotC, les neurones I-Aug du GRVr et du GRD, ainsi que les interneurons inhibiteurs I-Dec de la CVR (**Figure 14**). Ceci a pour conséquence de mettre fin à la phase post-inspiratoire, de maintenir l'arrêt inspiratoire et de favoriser la persistance de l'activité expiratoire. De plus, les E-Aug du BotC inhibent directement les motoneurons phréniques. Vers la fin de la phase expiratoire tardive les neurones pré-I et inspiratoires du PréBotC commencent à recevoir un input excitateur dû à la levée d'inhibition des neurones E-Dec, ainsi qu'à un phénomène d'échappement à l'inhibition, et commencent à s'activer. Ceci provoque une forte excitation des neurones inhibiteurs I-Dec de la CRV. Ces derniers vont alors provoquer une vague inhibitrice sur les neurones post-inspiratoires et E-Aug, favorisant ainsi la transition entre l'expiration et l'inspiration ([Smith et al, 2013](#)) (**Figure 14**).

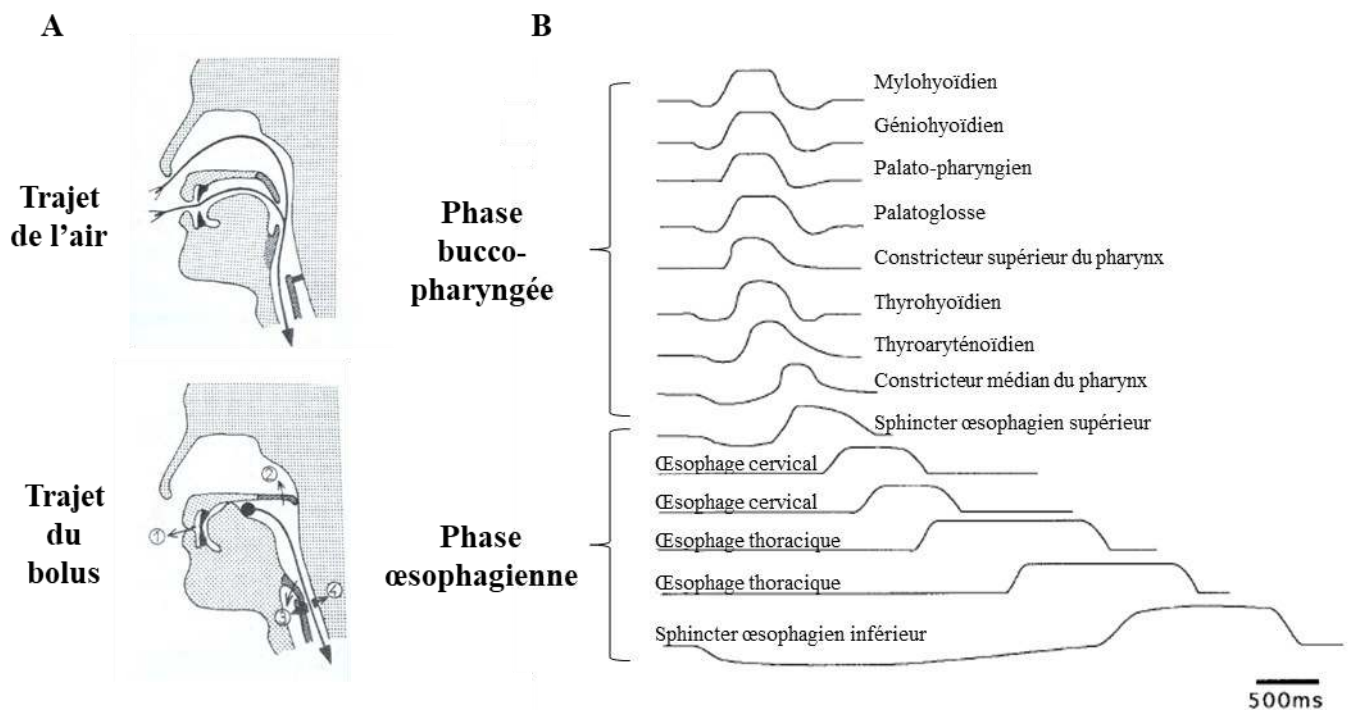


Figure 15 : Les différentes phases de la déglutition. (A) Représentation schématique des trajets empruntés par l'air (panel du haut) et par le bolus alimentaire (panel du bas) dans les voies aériennes supérieures. Les chiffres entourés représentent les étapes principales permettant d'effectuer une déglutition saine, avec 1) la fermeture de la bouche permettant d'établir une pression intrabuccale, 2) l'abaissement du voile du palais permettant la fermeture du nasopharynx, 3) la fermeture des cordes vocales empêchant le passage du bolus dans la trachée, et 4) le passage du bolus dans l'œsophage facilité par l'élévation de l'os hyoïde et l'ouverture du sphincter supérieur de l'œsophage. (*Adaptée de Brin et al, 2018*). (B) Représentation schématique d'enregistrements électromyographiques de muscles impliqués dans les phases bucco-pharyngées et œsophagiennes de la déglutition chez le chien non anesthésié. On remarque que les muscles impliqués dans la phase bucco-pharyngée sont actifs de manière presque synchrone pendant une courte période de temps, tandis que les muscles impliqués dans le péristaltisme lors de la phase œsophagienne montrent une séquence de contraction beaucoup plus lente. (*Adaptée de Jean, 2001*).

Chapitre 4 : Activité musculaire et contrôle nerveux de la déglutition

La déglutition est une activité motrice essentielle et complexe qui nécessite une organisation précise de l'activité neuronale et musculaire. Plus de 30 paires de muscles sont simultanément ou séquentiellement activés pendant la déglutition ([Dodds et al, 1990](#); [Jean 2001](#)). Ces muscles sont responsables des mouvements volontaires et involontaires des différents organes impliqués dans cette tâche. Comme dans les chapitres précédents dédiés à la respiration, nous aborderons d'abord brièvement l'activité musculaire indispensable à la réalisation des mouvements de déglutition, puis nous détaillerons les aspects neurophysiologiques de cette activité motrice.

Nota bene : Contrairement aux nombreuses données de la littérature sur la maturation du réseau respiratoire, relativement peu d'études se sont intéressées au développement embryonnaire du réseau de la déglutition. Cette thématique n'ayant pas été abordée dans cette thèse, les aspects concernant la maturation du réseau de la déglutition au cours du développement ne seront pas abordés dans cette introduction.

I. Aspects mécaniques de la déglutition

La déglutition se produit en quatre phases, dont une phase dite de préparation et trois phases principales ([Figure 15, Brin-Henry et al, 2018](#)). La déglutition commence par la prise orale des aliments (liquides ou solides) et se termine par l'arrivée des aliments dans l'estomac ([Figure 15-A](#)). Parmi les principales structures anatomiques nécessaires à la déglutition présentées dans la première partie de l'Introduction, on peut citer les lèvres, la mâchoire, la langue, le palais mou, le larynx, le pharynx et le sphincter œsophagien supérieur. Tous les composants doivent fonctionner parfaitement dans un court laps de temps (0,6 à 1,0 s) afin de garantir une ingestion sûre des aliments et des liquides ([Jean 2001](#); [Lang 2009](#)). La

compréhension de la biomécanique et de la neurophysiologie de la déglutition est essentielle au diagnostic et à l'évaluation de la déglutition chez les patients atteints de dysphagie. La complexité des processus de déglutition est souvent artificiellement divisée en étapes pour conceptualiser cette chaîne ininterrompue d'événements biomécaniques. Les trois composantes principales sont les phases orale, pharyngée et œsophagienne ([Perlman 1997](#)) (**Figure 15B**). Certains chercheurs détaillent davantage les étapes de la déglutition et distinguent la phase préparatoire orale et la phase de transit oral (ou linguale) au sein de la phase orale ([Leopold et Kagel 1997](#); [Jeri 1994](#)). D'autres intègrent les processus qui précèdent l'introduction du bolus dans la cavité buccale comme une partie importante de la déglutition nommée phase pré-orale ([Leopold et Kagel 1997](#); [Daniels et Huckabee 2014](#)).

- La phase pré-orale est une phase de préparation et fait référence aux mécanismes intrinsèques et extrinsèques qui se produisent avant l'ingestion du bolus. Il s'agit notamment de la reconnaissance du bolus par la vue et l'odorat ([Daniels et Huckabee 2014](#)). L'anticipation de l'ingestion, combinée aux stimuli olfactifs et visuels, active les zones corticales correspondantes, telles que le cortex olfactif, le cortex visuel, le thalamus et les cortex sensoriels primaires et d'association, connus pour influencer les comportements de déglutition ([Huckabee et Doeltgen 2012](#)). Les entrées visuelles et olfactives pré-digestives entraînent une augmentation de la production salivaire et une protection précoce des voies respiratoires ([Ebihara et al, 2006](#); [Ushioda et al, 2012](#)).

- La phase orale est exécutée de manière semi-automatique mais peuvent être contrôlées de manière volontaire à n'importe quel stade car elle implique le CPG de la mastication ([Miller 2013](#)). Celle-ci comprend l'administration orale de nourriture liquide, sa manipulation et sa formation en un bolus, ainsi que le transport du bolus dans le pharynx ([Perlman 1997](#); [Ertekin et Aydogdu 2003](#)). La base de la langue s'élève pendant la manipulation du bolus, limitant ainsi l'entrée du bolus dans le pharynx, ce qui est important

pour la protection des voies respiratoires. De plus, la fermeture labiale permet de contenir le bolus vers l'avant et est nécessaire à l'établissement de la pression intra-buccale indispensable au transfert du bolus ([Perlman 1997](#)). Une fois préparé, le bolus est déplacé par des contractions intrinsèques et extrinsèques des muscles de la langue dans un mouvement antérieur à postérieur contre le palais dur et vers le pharynx ([Taniguchi et al, 2013](#)). La durée globale de la phase orale s'adapte en fonction des caractéristiques du bolus et passe d'environ 0,5 s pour les liquides ([Dodds et al, 1990](#)) à environ 20 s pour un bolus solide ([Palmer 1998](#)). Le transit oral pris isolément, c'est-à-dire uniquement le temps où le bolus est propulsé hors de la cavité buccale après avoir été préparé, dure moins de 0,5 s pour les liquides mais se prolonge avec l'augmentation de la consistance du bolus ([Dantas et al, 1990](#)).

- La phase pharyngée est marquée par le début de l'excursion hyolaryngée, c'est-à-dire lorsque le larynx et l'hyoïde se déplacent vers le haut et vers l'avant ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Cette excursion est permise grâce à la contraction des muscles supra-hyoïdiens et des muscles thyro-hyoïdiens ([Pearson et al, 2012](#)). Parmi ces muscles, le mylohyoïde, le géniohyoïde et le digastrique antérieur jouent un rôle important dans le mouvement ascendant de l'hyoïde et du larynx pendant la déglutition ([Pearson et al, 2011](#); [Inokuchi et al, 2014](#)). Sur la base de l'imagerie vidéo-fluoroscopique d'adultes en bonne santé, la déglutition pharyngée débute généralement lorsque le bolus atteint l'aspect inférieur du ramus de la mandibule ([Stephen et al, 2005](#); [Martin-Harris et al, 2007](#)). La contraction conjointe de ces muscles submentaux (mylohyoïde, géniohyoïde et digastrique antérieur) est également importante pour stabiliser le plancher buccal lors du mouvement rapide de la langue vers la paroi pharyngée postérieure (rétraction linguale), ce qui aide à pousser le bol alimentaire de l'oropharynx vers le laryngopharynx ([Pearson et al, 2012](#)). D'autres muscles suprahyoïdiens, comme le stylohyoïde et le digastrique postérieur sont également impliqués dans l'élévation du complexe hyolaryngé pendant la phase pharyngée de la déglutition, mais avec un rôle

moins important ([Pearson et al, 2012](#)). La contraction des muscles temporaux est observée lors de la phase pharyngée de la déglutition ([Doty et Bosma 1956](#); [Jean 2001](#); [Inokuchi et al, 2014](#)). Parallèlement, les voies aériennes sont protégées par la fermeture et la compression du larynx à plusieurs niveaux, notamment la fermeture des plis vocaux, des faux plis vocaux, des cartilages aryénoïdes, des plis aryépiglottiques et de l'épiglotte, afin d'empêcher les aliments ou les liquides de pénétrer dans la trachée ([Daniels et Huckabee 2014](#)).

Cependant, il existe une variabilité considérable dans relation entre le début de la déglutition pharyngée et la localisation anatomique du bolus au sein d'un même individu et entre individus ([Stephen et al, 2005](#)). Cette relation est influencée par les caractéristiques du bolus ([Hamdy et al, 2003](#)) et le retour sensoriel ([Daniels et al, 2007](#)). Par exemple, un goût acide augmente l'entrée sensorielle dans le cortex et abaisse donc le seuil de déclenchement de la déglutition ([Kajii et al, 2002](#)). Une fois initiée, la phase pharyngée est caractérisée par une séquence rapide d'événements qui se chevauchent ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Après l'abaissement de la base de la langue et l'entrée du bolus dans le pharynx, le bolus est pressé vers la zone cricopharyngée par le rapprochement de la base de la langue et de la paroi pharyngée postérieure grâce aux muscles stylohyoïde, digastrique postérieur, styloglosse et glossopharyngien ([Jean 2001](#)). Simultanément, la fermeture du sphincter entre l'oropharynx et le nasopharynx est obtenue par la contraction des muscles palatopharyngiens et les muscles élévateurs du voile du palais ([Kahrilas 1993](#)). Ces actions provoquent l'augmentation de la pression pharyngée ([Perlman 1997](#)). Le pattern moteur pharyngé est principalement involontaire ([Gay et al, 1994](#); [Lamvik et al, 2015](#)).

- La phase œsophagienne commence lorsque le bolus traverse le sphincter œsophagien supérieur ; le bolus peut alors progresser de l'œsophage à l'estomac grâce au péristaltisme œsophagien ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Cette étape est sous contrôle neuromusculaire involontaire et sa durée varie, chez l'Homme, entre 8 et 20 secondes selon le type de bolus

([Dodds et al, 1973](#)). Une fois que le bolus a atteint l'extrémité caudale de l'œsophage, le sphincter œsophagien inférieur se relâche et permet le transfert du bolus dans l'estomac.

II. Contrôle nerveux de la déglutition

Les phases motrices caractéristiques de la déglutition sont contrôlées par deux parties du système nerveux : le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux central (SNC). Dans le SNP, les NC transmettent les informations sensorielles afférentes et les signaux moteurs efférents essentiels à la déglutition. Ces signaux sont médiés par une interaction entre le CPG de la déglutition (CPGd) situé dans le tronc cérébral et le cortex. Le pattern moteur de base pour la déglutition généré par le CPGd peut être modulé par d'autres structures corticales et sous-corticales du SNC ([Jean 2001](#)).

A. Contrôle périphérique

Le contrôle sensorimoteur de la déglutition est assuré par huit des douze nerfs crâniens (NC I, II, V, VII, IX, X, XI, XII). Certains de ces nerfs crâniens ont des composantes sensorielles (afférentes) ou motrices (efférentes), mais la majorité d'entre eux transmettent à la fois des informations sensorielles et motrices ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)).

- Les nerfs olfactif (NC I) et optique (NC II) transportent des informations sensorielles sur l'odeur et la vue de l'aliment ou de la boisson. Ces informations sont principalement reçues pendant la phase pré-orale de la déglutition. Contrairement à tous les autres NC, les noyaux nerveux du NC I et du NC II sont situés dans le cerveau et non dans le tronc cérébral ([Ten Donkelaar 2011](#)).

- Le nerf trijumeau (NC V) est le plus large NC et se divise en trois branches : ophtalmique, maxillaire et mandibulaire ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)). Ces deux dernières sont impliquées dans la déglutition. La branche maxillaire transporte exclusivement des informations sensorielles de la région du maxillaire, des joues, de la lèvre supérieure, des

dents supérieures, du palais dur, des gencives et des muqueuses de la bouche ([Ten Donkelaar 2011](#)). La branche mandibulaire transmet les informations sensorielles de la région mandibulaire, y compris le menton, la lèvre inférieure, les dents inférieures, les deux tiers antérieurs de la langue, les gencives et les muqueuses de la bouche ([Ten Donkelaar 2011](#)). La composante motrice de la branche mandibulaire innerve le muscle tenseur du voile du palais et les muscles de la mastication qui assurent la fermeture de la mâchoire (masséter, temporal et ptérygoïdien médial) ou l'ouverture de la mâchoire (mylohyoïdien, digastrique antérieur, ptérygoïdien latéral) ([Sasegbon et Hamdy 2017](#)). Cette branche motrice innerve deux des trois muscles submentaux et joue donc un rôle crucial dans l'excursion hyolaryngée.

- Le nerf facial (NC VII) a des composantes motrices et sensorielles divisées en cinq branches : temporale, zygomatique, buccale, mandibulaire marginale et cervicale ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)). De plus, le NC VII innerve les buccinateurs, les zygomatiques, l'orbicularis oris, le risorius, le stylohyoïde et le digastrique postérieur ([Sasegbon et Hamdy 2017](#)). La relaxation de l'orbicularis oris et l'activation des muscles faciaux accessoires, si nécessaire, permettent la prise orale de bolus de différentes tailles. L'activation de l'orbicularis oris tout au long de la phase orale crée une étanchéité labiale empêchant le déversement de liquides ou d'aliments hors de la bouche ([Matsuo et Palmer 2015](#)). La contraction du stylohyoïde et du digastrique postérieur soutient les mouvements de la base de langue vers le haut et vers le bas, ainsi que le mouvement supérieur de l'hyoïde, nécessaire pour contenir le bolus oral et transférer celui-ci vers le pharynx ([Pearson et al, 2012](#)). Les fibres sensorielles du NC VII transmettent les informations gustatives des deux tiers antérieurs de la langue ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)). De plus, le NC VII a également un rôle parasympathique et est responsable du contrôle de la production de salive des glandes submandibulaires et sublinguales ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)).

- Le nerf glossopharyngien (NC IX) innerve peu de régions motrices et sensorielles de manière isolée ; sa contribution la plus importante est d'être un composant du plexus pharyngé lorsqu'il est associé au NC X. De manière isolée, le NC IX transporte des informations sensorielles de l'entrée du pharynx, y compris le palais mou et l'amygdale, ainsi que la sensation et le goût du tiers postérieur de la langue ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)). La composante motrice de ce nerf innerve uniquement le muscle stylopharyngien ([Finsterer et Grisold 2015](#)). La contraction de ce muscle élève le larynx, raccourcit et dilate le pharynx. En outre, le NC IX innerve de manière parasympathique la glande salivaire parotide ([Finsterer et Grisold 2015](#)).

- Le nerf vague (NC X) est le plus long des nerfs crâniens et se compose de nombreuses branches. Trois branches dans le cou contribuent à la déglutition. La branche pharyngienne s'unit au nerf glossopharyngien pour former le plexus pharyngien, les deux autres branches constituent le nerf laryngé supérieur (NLS) et le nerf récurrent (NLR). Le NLS transporte les informations sensorielles des régions supérieures du larynx, y compris les plis vocaux ([Finsterer et Grisold 2015](#)). La fonction de ce nerf est particulièrement importante pour détecter l'invasion potentielle d'aliments ou de liquides avant et pendant la déglutition. En outre, le NLS innerve les muscles cricothyroïdiens, ce qui est important pour l'abduction des plis vocaux, permettant la respiration avant et après la déglutition. Avec le NC IX, le NLS innerve également le muscle cricopharyngien (ou sphincter supérieur de l'œsophage), entraînant une contraction tonique au repos et une relaxation pendant la phase pharyngée de la déglutition ([Sasegbon et Hamdy 2017](#)). Les fibres sensorielles du NLR fournissent des informations perceptives du larynx sous le niveau des plis vocaux, y compris les segments cervicaux de l'œsophage et de la trachée. Les aliments ou les résidus qui pénètrent dans les voies respiratoires seront ainsi détectés par ce nerf et pourront être éliminés par le réflexe de toux. Le NLR innerve les muscles laryngés intrinsèques, les interaryténoïdes, les

thyroaryténoïdes et les cricoaryténoïdes, tous trois nécessaires à l'adduction des plis vocaux pendant la déglutition (i.e. adduction du larynx indispensable à la protection des voies respiratoires) ou la production de la voix ([Perlman 1997](#)).

- Plexus pharyngien (NC IX et NC X) ou PP est formé par les nerfs vagues et glossopharyngiens afférents et efférents ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Les radicules nerveuses émergent des noyaux du NC dans la médulla latérale ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)). Le PP joue un rôle crucial pour de nombreux mécanismes de déglutition dans la phase pharyngée. Il transporte des informations sensorielles provenant de l'ensemble de l'oropharynx et du laryngopharynx, ce qui est important pour percevoir le bolus dans le pharynx et pour prévenir l'aspiration. La composante motrice de ce plexus innerve les muscles élévateurs du voile du palais qui sont partiellement responsables de la fermeture du sphincter entre l'oropharynx et le nasopharynx et qui contribuent de manière importante au système de pression pharyngé ([Perlman 1997](#)). En outre, le PP active le muscle palatoglosse empêchant le déversement prématuré du bolus dans le pharynx et le muscle glossopharyngien qui permet le rapprochement de la base de la langue et de la paroi pharyngée, ce qui génère une pression sur le bolus pendant la réponse pharyngée ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Enfin, le PP innerve le salpingopharyngé, le palatopharyngé et les trois muscles constricteurs du pharynx (supérieur, moyen et inférieur), ce qui permet le raccourcissement supraglottique et la compression du bolus ([Daniels et Huckabee 2014](#)).

- Le nerf hypoglosse (NC XII) n'a que des connexions motrices avec tous les muscles intrinsèques (muscle transverse, longitudinale et verticale) et la plupart des muscles extrinsèques de la langue (génioglosse, styloglosse, hyoglosse) ([Wilson-Pauwels et al, 2002](#)). Les muscles intrinsèques donnent à la langue différents contours et contribuent ainsi à la formation et à la propulsion du bolus dans le pharynx ([Felton et al, 2007](#)). Les muscles extrinsèques de la langue déplacent la langue dans différentes directions à l'intérieur de la

cavité buccale par le biais de l'élévation, la protrusion et la rétraction de la langue ([Felton et al., 2007](#)).

- L'anse cervicale (NC XII, C1, C2) est une combinaison de fibres provenant du nerf hypoglosse et des deux premiers nerfs spinaux cervicaux ([Dodds et al., 1990](#)). Elle décrit une fine boucle nerveuse dans la paroi antérieure de la gaine carotidienne qui relie la racine supérieure (prolongement du NC XII) à la racine inférieure (issue des nerfs rachidiens

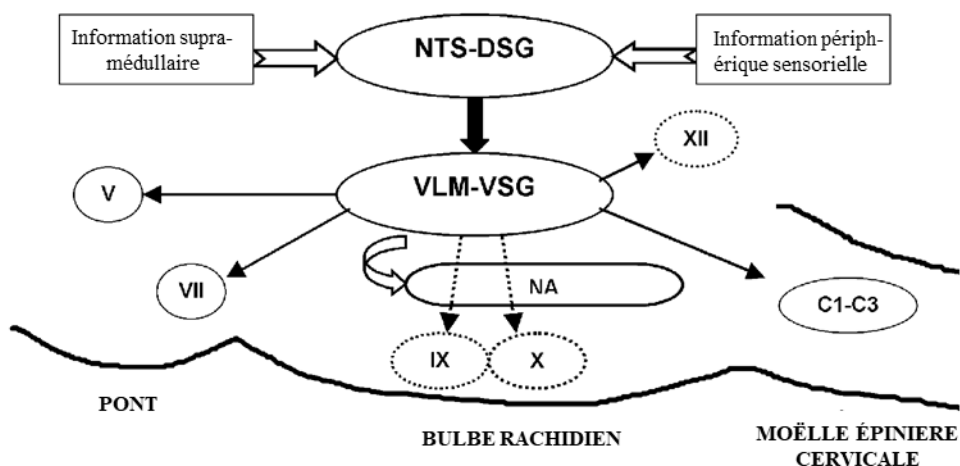


Figure 16 : Schéma représentant le générateur central de la déglutition. L'information sensorielle provenant de certains nerfs crâniens (V, VII, IX, X) et d'aires supra-médullaires rejoint le groupe déglutiteur dorsal (DSG) situé dans le noyau du tractus solitaire (NTS). Le DSG active ensuite le groupe déglutiteur ventral (VSG) situé dans le bulbe ventrolatéral (VLM). Le VSG distribue ensuite la commande déglutitrice vers les motoneurones des nerfs crâniens V, VII, IX, X, XII ainsi que certains motoneurones situés aux niveaux C1-C3 de la moëlle épinière. (*Adaptée de Ertekin et Aydogdu, 2003*).

cervicaux). Les fibres de l'anse cervicale s'étendent vers la partie inférieure du larynx et innervent les muscles infrahyoïdiens (omohyoïde, sternohyoïde, sternothyroïde, thyrohyoïde) et le géniohyoïde ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Par conséquent, l'anse cervicale contribue à l'excursion hyolaryngée et stabilise l'hyoïde par l'innervation des muscles de la sangle pendant l'ouverture de la mâchoire.

B. Contrôle central de la déglutition

Le contrôle nerveux de la déglutition - en particulier le fonctionnement précis du CPGd - est moins bien connu que celui de la respiration. Les études antérieures ont montré que le cœur du CPGd se situe dans le tronc cérébral, comme en témoignent les expériences chez l'animal décérébré, *in vivo* ou *in situ*, où la phase bucco-pharyngée de la déglutition (ou déglutition fictive) est préservée ([Grelot et al, 1992](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Gestreau et al, 2005](#); [Bautista et Dutschmann 2014](#); [Bautista et al, 2014](#)) (**Figure 16**). Cependant, le phénotype des neurones déglutiteurs, les connections synaptiques entre les différentes structures nerveuses impliquées dans la déglutition, ainsi que les neurotransmetteurs utilisés sont largement méconnus. En revanche de nombreuses études chez l'homme ont permis de préciser le rôle des structures supra-pontiques dans la phase orale de la déglutition, l'intégration sensorimotrice et la modulation du réflexe de déglutition. Le rôle de ces différents ensembles de structures sera brièvement résumé ci-dessous.

a. Le CPGd du tronc cérébral

Les fibres afférentes et efférentes des NC V, VII, IX, X, XI et XII se terminent ou proviennent de la représentation bilatérale de leurs noyaux dans le tronc cérébral ([Daniels et Huckabee 2014](#)) (**Figure 16**). La majorité de ces noyaux sont organisés en deux régions au sein du bulbe rachidien, à savoir les groupe déglutiteur dorsal et ventral ([Jean 2001](#); [Sasegbon et Hamdy 2017](#)). Il s'agit de régions interconnectées capables de se synchroniser

bilatéralement et formant le CPGd. Le CPGd génère un pattern moteur de base de la déglutition qui peut être modifié par des entrées provenant d'autres zones sous-corticales ou corticales du cerveau ([Hamdy et al, 1999](#); [Jean 2001](#)).

En détail, les fibres afférentes des NC VII, IX et X transmettant les informations sensorielles de la cavité orale, du larynx et du pharynx convergent dans le NTS dans le bulbe rachidien dorsal ([Sasegbon et Hamdy 2017](#)). Le NTS reçoit aussi des informations sensorielles viscérales du NC V ([Bieger et Neuhuber 2006](#)). Le NTS et la formation réticulaire adjacente font partie du groupe dorsal de la déglutition dans le bulbe rachidien ([Jean 2001](#)). Étant un noyau sensoriel primaire, ou relais d'intégration des informations viscérales, le NTS est essentiel pour l'initiation et l'organisation de la déglutition ([Jean 2001](#)). Le NTS communique avec un autre composant majeur du centre de déglutition du tronc cérébral : le noyau ambigu (NA) et la réticulée bulbaire adjacente. Le NA contient les noyaux moteurs primaires des NC IX, X et XI, avec des connexions efférentes associées au NC VII, NC V et NC XII ([Jean et al, 1983](#)). Le NA et la région réticulée adjacente constituent le groupe ventral de la déglutition ([Jean 2001](#)). Ces neurones ne peuvent pas générer la séquence motrice de déglutition mais ils reçoivent cette commande issue des neurones du CPGd, puis la distribuent alors aux différents motoneurones et muscles impliqués dans la déglutition ([Sasegbon et Hamdy 2017](#)).

b. Le cortex

La recherche en neuro-imagerie a identifié de multiples régions corticales actives avant et pendant la déglutition. Ces structures comprennent le cortex moteur primaire (M1), le cortex somatosensoriel (S1), l'aire prémotrice, l'aire motrice supplémentaire (SMA), le cortex cingulaire antérieur et postérieur, le cortex préfrontal, l'insula et le cortex temporopolaire ([Hamdy et al, 1999](#); [Malandraki et al, 2009](#)). Cependant, la plupart des études utilisant l'imagerie cérébrale pendant la déglutition souffrent de leur incapacité à différencier

l'activation corticale pour les composantes volontaires du contrôle oral et la réponse pharyngée de la déglutition. Le cervelet possède des voies efférentes directes à M1 et reçoit des entrées de M1 et S1 dans un système de boucle corticale pour l'exécution du mouvement ([Allen et Tsukahara 1974](#)). Une activation du cortex sensorimoteur est systématiquement rapportée pendant la déglutition volontaire ([Humbert et Robbins 2007](#); [Soros et al, 2009](#)). Au sein de ces zones, la plus grande activation en IRMf a été trouvée dans les représentations somatotopiques oropharyngées de ces cortex ([Hamdy et al, 1999](#); [Mosier et Bereznaya 2001](#); [Furlong et al, 2004](#)).

L'IRM fonctionnelle sur des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral a révélé que les lésions cérébrales acquises dans l'hémisphère gauche étaient principalement responsables des difficultés de la phase orale et que les lésions de l'hémisphère droit étaient associées aux difficultés de la phase pharyngée, entraînant également une aspiration plus fréquente ([Robbins et al, 1993](#)). Les chercheurs soutiennent que l'hémisphère gauche est responsable des aspects oraux plus volontaires de la déglutition et que l'hémisphère droit est davantage impliqué dans le contrôle de la phase pharyngée plus réflexe de la déglutition. Dziewas et ses collègues ([2003](#)) ont rapporté une forte activation de l'hémisphère gauche pendant la déglutition volontaire d'eau infusée oralement. En revanche, les auteurs ont signalé une activation plus bilatérale pendant la déglutition réflexe, l'eau étant infusée par voie transnasale dans le pharynx directement. Les résultats de ces études suggèrent que la latéralisation hémisphérique pourrait être une fonction de l'implication volontaire dans la déglutition. Cependant, la justification neurophysiologique de cette latéralisation hémisphérique probable pendant la déglutition n'a pas été trouvée et reste à étudier.

c. Le cervelet

Cette structure sous-corticale jouerait un rôle dans la modulation de la déglutition ([Rangarathnam et al, 2014](#)). De nombreuses études suggèrent une relation entre les lésions

cérébelleuses et les troubles de la déglutition. Par exemple, Alberts et Collaborateurs ([1992](#)) ont analysé le risque d'aspiration en fonction de l'emplacement de la lésion, y compris le cervelet, après un accident vasculaire cérébral. Douze de ces patients présentaient des lésions cérébelleuses (petits et gros vaisseaux, artère cérébelleuse inférieure postérieure) sur l'IRM et plus de 60 % des patients présentant des lésions cérébelleuses présentaient des aspirations trachéales. Malheureusement, les chercheurs n'ont pas décrit combien de patients présentaient une atteinte cérébelleuse isolée ou accompagnée de lésions supplémentaires dans d'autres parties du cerveau susceptibles de contribuer aux symptômes de la dysphagie.

Outre les résultats d'Alberts et Collaborateurs ([1992](#)), plusieurs études de cas isolés ont également signalé des troubles de la déglutition chez des patients présentant des lésions de l'artère cérébelleuse inférieure postérieure (PICA), l'une des principales artères alimentant le cervelet ([Massey et al, 1984](#); [Nagahiro et al, 1993](#)). Néanmoins, la PICA et l'artère cérébelleuse inférieure antérieure (AICA) alimentent également des structures du tronc cérébral importantes pour la déglutition. La PICA alimente la surface inférieure postérieure de l'hémisphère cérébelleux, la partie ipsilatérale du vermis inférieur et le bulbe rachidien ventral (incluant le NA et la réticulée adjacente), crucial pour les sorties motrices dans la déglutition via les NC IX, X et XII ([Savoirdo et al, 1987](#)). L'AICA alimente le pédoncule cérébelleux moyen et la partie latérale inférieure du pons (y compris le noyau et le nerf NC VII) ([Savoirdo et al, 1987](#)). Une lésion de l'AICA conduit souvent, sur le plan clinique, à un syndrome pontin inférieur latéral, entraînant des symptômes dysphagiques ([Savoirdo et al, 1987](#)). Il est donc difficile de déterminer les substrats neuraux précis qui sous-tendent les troubles de la déglutition chez les patients présentant des lésions de la PICA ou de l'AICA.

En résumé, les lésions du cervelet peuvent contribuer aux symptômes de la dysphagie, et éventuellement causer la dysphagie de manière isolée, mais cela n'a pas été systématiquement évalué. L'apport sanguin vasculaire partagé et la proximité anatomique

pourraient prédisposer les patients à une lésion du tronc cérébral en présence d'une lésion cérébelleuse. Une description détaillée de la localisation des lésions est nécessaire pour analyser et rapporter les résultats impliquant le cervelet dans la déglutition. Jayasekeran et Collaborateurs ([2011](#)) ont démontré une connexion non seulement fonctionnelle mais aussi anatomique entre le cervelet et le cortex moteur primaire chez 16 individus sains ([Jayasekeran et al, 2011](#)). La stimulation magnétique transcrânienne (SMT) appliquée sur le cervelet avant la stimulation motrice corticale a provoqué une réponse plus importante des potentiels évoqués moteurs pharyngés (PEMP) par rapport aux PEMP évoqués à partir du cortex moteur uniquement.

Cela implique que le cervelet joue le rôle d'un facilitateur de l'impact cortical sur la déglutition ([Jayasekeran et al, 2011](#)). Dans une revue récente, Rangarathnam et Collaborateurs ont discuté du rôle potentiel du cervelet dans la déglutition ([Rangarathnam et al, 2014](#)). En plus des preuves de l'activation du cervelet pendant la déglutition, les auteurs considèrent également la connectivité anatomique et fonctionnelle avec d'autres zones du cerveau. Ils ont proposé que le cervelet complète le contrôle moteur de la déglutition avec ses nombreuses connexions aux régions sensorimotrices corticales et aux structures sous-corticales.

III. La déglutition nutritive et non-nutritive

La déglutition peut être nutritive (DN) ou non (DNN), c'est-à-dire qu'elle implique ou non le passage d'un bol alimentaire (liquide ou solide) de la cavité buccale jusqu'à l'estomac. La DNN permet d'évacuer l'accumulation de la salive, mais aussi de protéger les voies aériennes inférieures en nettoyant le carrefour aérodigestif ; Logiquement, la DNN peut apparaître pendant le sommeil ([Nishino 1993](#); [Ertekin et al, 2001](#); [Ertekin et Aydogdu 2003](#); [Thach 2005](#); [Reix et al, 2006](#); [Lang 2009](#)). D'un point de vue physiologique, seules les deux

premières phases de la déglutition (phase pré-orale et orale, voir Chapitre 4 partie I de l'introduction) différent entre la DN et la DNN. En effet, la présence du bol alimentaire dans la cavité buccale nécessite un temps de préparation important et est associé à une activité complexe des afférences périphériques plus un contrôle cortical lors de la DN, ce qui n'est pas le cas lors de la DNN. La DNN est donc plutôt déclenchée par la stimulation des afférences pharyngolaryngées et ne présente donc pas les phases pré-orale et orale. En revanche, les phases pharyngée et œsophagienne correspondent à une séquence motrice stéréotypée, entièrement sous le contrôle du réseau bulbaire de la déglutition, ces phases étant identiques entre les deux types de déglutitions ([Pehlivan et al, 1996](#); [Jean 2001](#); [Lang 2009](#)).

La fréquence d'apparition des DN dépend de la volonté de l'individu à se nourrir. En revanche, l'apparition des DNN semble être constante et étalée sur la journée, allant de 1 par minute en moyenne pendant l'éveil, à 3 par heure pendant le sommeil chez l'adulte ([Pehlivan et al, 1996](#); [Sato et Nakashima 2006](#); [Afkari 2007](#)). Cette baisse de production des DNN s'expliquerait par une diminution de l'accumulation de salive pendant la nuit ([Sato et Nakashima 2006](#)). Le déclenchement des DNN dépend à la fois du volume de salive (constituant un seuil), du temps de sécrétion salivaire permettant d'atteindre le seuil, et de l'urgence à déglutir créée par l'excitation des récepteurs du carrefour aérodigestif ([Kapila et al, 1984](#); [Rudney et al, 1995](#)).

La coordination entre la déglutition et la respiration est essentielle. Un Chapitre est d'ailleurs dédié à ce sujet (Voir Chapitre 5 de l'introduction). Brièvement, la déglutition provoque un arrêt respiratoire appelé « apnée de déglutition », et la déglutition apparaît préférentiellement en début de phase expiratoire ([Nishino et Hiraga 1991](#); [Terzi et al, 2007](#)). Chez l'Homme adulte, cette coordination semble ne pas varier entre les DN et les DNN, en dehors du fait que lorsque les DN se répètent elles peuvent prolonger la durée de l'apnée de déglutition ([Terzi et al, 2007](#)). Une autre étude réalisée chez l'Homme indique cependant que

les DNN peuvent apparaître pendant la phase inspiratoire durant le sommeil ([Nishino 1993](#)). Chez l'agneau nouveau-né in vivo, il existe une différence de coordination entre la respiration et les DN et DNN. En effet, chez cet animal, les DNN apparaissent majoritairement pendant la phase inspiratoire et lors de la transition inspiration-expiration, alors que les DN sont davantage distribuées tout au long du cycle respiratoire, avec majoritairement des déglutitions inspiratoires, pré-inspiratoires et expiratoires précoces, certaines déglutitions apparaissant au cours d'une longue pause apnéique (différente de l'apnée de déglutition) ([Bernier et al, 2012](#); [Brisebois et al, 2014](#)).

Il est intéressant de noter qu'en condition pathologique telle que la maladie de parkinson, les DNN apparaissent de moins en moins souvent et semblent découplées de l'accumulation de salive ([Huxley et al, 1978](#); [Shaker 2006](#)). Cette diminution du nombre de DNN entraîne alors un mauvais nettoyage de l'accumulation salivaire, or, ces patients peuvent aussi souffrir de dysphagie, ce qui augmente drastiquement les risques d'aspiration trachéale lorsque ces deux symptômes sont présents, et particulièrement lors du sommeil. ([Levrting Jaghagen et al, 2003](#); [Sato et Nakashima 2009](#)). Différentes études faites chez l'agneau prématuré ont montré que différentes variables pouvaient influencer l'apparition des DNN. En effet, l'hypercapnie semble augmenter la fréquence d'apparition des DNN, alors que la stimulation des récepteurs bronchopulmonaire semble l'inhiber ([Duvareille et al, 2008](#); [Samson et al, 2008](#)).

Chapitre 5 : La coordination entre la respiration et la déglutition

Manger, déglutir et respirer sont des tâches motrices quotidiennes, apparemment simples, mais nécessitant en réalité un haut degré de coordination d'un point de vue musculaire et nerveux. La déglutition prévaut sur la respiration, dans le sens où on ne peut déglutir et respirer en même temps ([Nishino et al, 1985](#); [Nishino et Hiraga 1991](#); [McFarland et Lund 1995](#)). La respiration cesse brièvement pendant la déglutition et lorsque l'on boit un bolus liquide, la déglutition commence habituellement pendant la phase expiratoire de la respiration. La pause respiratoire se poursuit pendant 0,5 à 1,5 s durant la déglutition, et la respiration reprend avec la réinitialisation de l'expiration ([Selley et al, 1989](#); [Klahn et Perlman 1999](#); [Martin-Harris et al, 2005](#)). Cette reprise en expiration est considérée comme l'un des mécanismes qui empêchent l'inhalation de nourriture restant dans le pharynx après la déglutition ([Shaker et al, 1992](#)). Cependant, lorsqu'on avale de manière répétée en buvant dans une tasse, la respiration peut reprendre avec l'inspiration ([Dozier et al, 2006](#)). Manger des aliments solides modifie également le rythme respiratoire. Le rythme est perturbé avec le début de la mastication. La durée du cycle respiratoire diminue pendant la mastication, sauf s'il y a mastication suivie d'une déglutition ([Smith et al, 1989](#); [McFarland et Lund 1995](#); [Matsuo et Palmer 2009](#)). La relation temporelle « expirer-avaler-expirer » persiste pendant le repas mais les pauses respiratoires sont plus longues et commencent souvent de façon importante avant le début des déglutitions ([Palmer et Hiemae 2003](#); [Charbonneau et al, 2005](#); [Matsuo et al, 2008](#)).

L'étude de la déglutition s'est principalement concentrée sur les aspects physiologiques et neuroanatomiques, ainsi que sur leur association avec la respiration. Puisque la déglutition et la respiration partagent des muscles et des structures anatomiques communes, ces deux fonctions sont nécessairement coordonnées. Il existe différentes façons

pour la déglutition et la respiration d'interagir de manière coordonnée. Comme cela a été précisé plus haut, la plupart

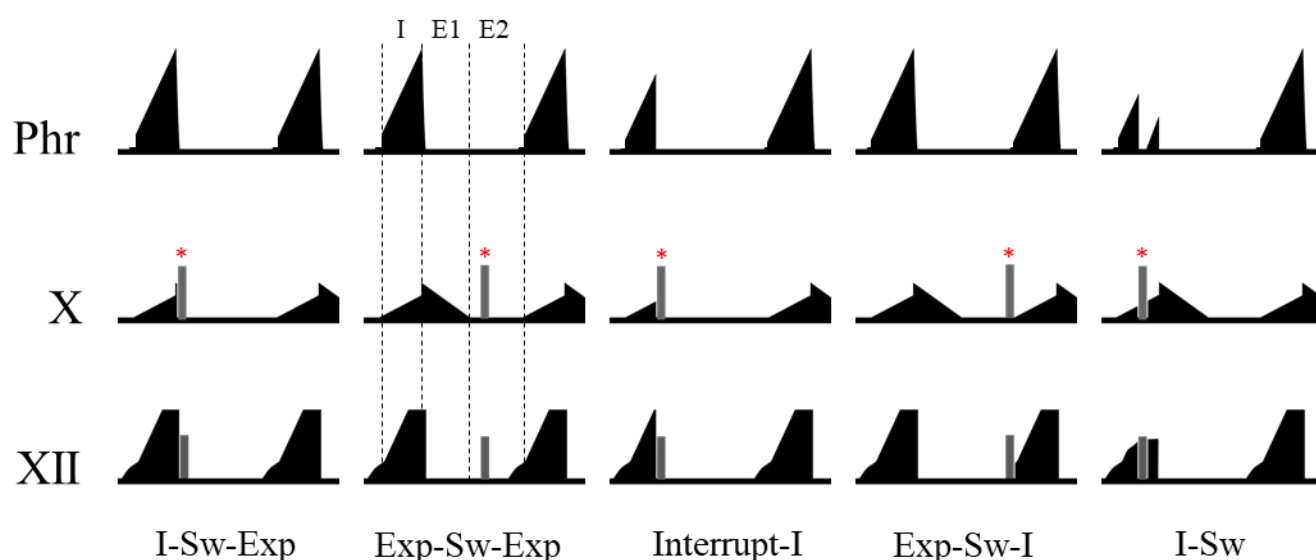


Figure 17 : Illustration schématique de la coordination respiration-déglutition. Les activités nerveuses recueillies lors de la respiration et la déglutition sont schématisées en noir et en gris, respectivement. L'activité du nerf phrénique (Phr), moteur du diaphragme, témoigne de la phase inspiratoire centrale (I). L'activité respiratoire du nerf vague (X) s'observe lors des phases I et post-inspiratoire (ou expiratoire précoce, E1). Elle permet les mouvements d'abduction puis d'adduction du larynx. L'activité I du nerf hypoglosse (XII) assure les mouvements de protrusion et/ou d'aplatissement de la langue. La phase expiratoire tardive (E2) est marquée par l'absence de décharge des nerfs Phr, X et XII en lien avec la respiration. La déglutition (Sw) se caractérise par un pic de décharge visible sur les nerfs X et XII qui correspond, respectivement, à l'adduction du larynx et à la rétraction de la langue. La déglutition se produit préférentiellement lors des transitions de phase du cycle respiratoire. Plusieurs types de coordination peuvent être observés : la déglutition apparaît fréquemment lors de la transition de phase I et E1 (dénommé ici I-Sw-Exp), elle se produit assez souvent plus tard en expiration lors de la transition E1-E2 (Exp-Sw-Exp), elle peut également interrompre la phase inspiratoire en cours (Interrupt I). Une augmentation du risque de dysphagie (ou fausse route alimentaire) est associée au déclenchement de la déglutition lors de la transition E2-I (Exp-Sw-I), ou encore au milieu de la phase I (I-Sw-I). (*Fait avec Photoshop*).

des déglutitions isolées se produisent pendant l'expiration, puis réinitialisent la durée de l'expiration. De manière intéressante, Martin-Harris et collaborateurs ont montré qu'il était possible d'entraîner des patients atteints de dysphagie chronique à déglutir pendant la phase expiratoire ([Martin-Harris et al, 2015](#)).

Nous avons vu que la déglutition commençait par un basculement de la langue vers l'arrière et que l'élévation du pharynx et du larynx, le basculement de l'épiglotte et la fermeture de la valve glottique permettaient de fermer les voies aériennes inférieures. De nombreuses études chez l'Homme et l'animal ont montré que les déglutitions se produisaient de façon préférentielle lors des transitions de phase du cycle respiratoire, le moment précis du déclenchement de la déglutition pouvant varier en fonction de l'urgence respiratoire ([Dick et al, 1993](#); [Paydarfar et Buerkel 1995](#); [Ono et al, 1998](#); [Feroah et al, 2002a](#); [Martin-Harris et al, 2005](#); [Roberge et al, 2007](#); [Wheeler Hegland et al, 2009](#); [Bonis et al, 2011](#); [Wheeler Hegland et al, 2011](#); [Yagi et al, 2017](#)). Dans l'ensemble, cinq types de déglutitions ont été proposés (**Figure 17**) :

- Les déglutitions apparaissant pendant la post-inspiration (I-Sw-Exp)
- Les déglutitions apparaissant pendant la phase expiratoire (Exp-Sw-Exp)
- Les déglutitions apparaissant pendant la phase inspiratoire sans l'interrompre (I-Sw)
- Les déglutitions apparaissant avant l'inspiration (Exp-Sw-I)
- Les déglutitions interrompant l'inspiration (interrupt-I ou I-Sw-I)

Il est important de noter que les deux derniers types de déglutition, celles survenant juste avant l'inspiration (Exp-Sw-I) ou pendant l'inspiration (interrupt-I ou I-Sw-I) sont associées à un risque élevé d'aspiration trachéale et sont fréquemment rencontrées chez les patients atteints de dysphagie ([Terzi et al, 2007](#); [2010](#); [Nishino 2012](#)).

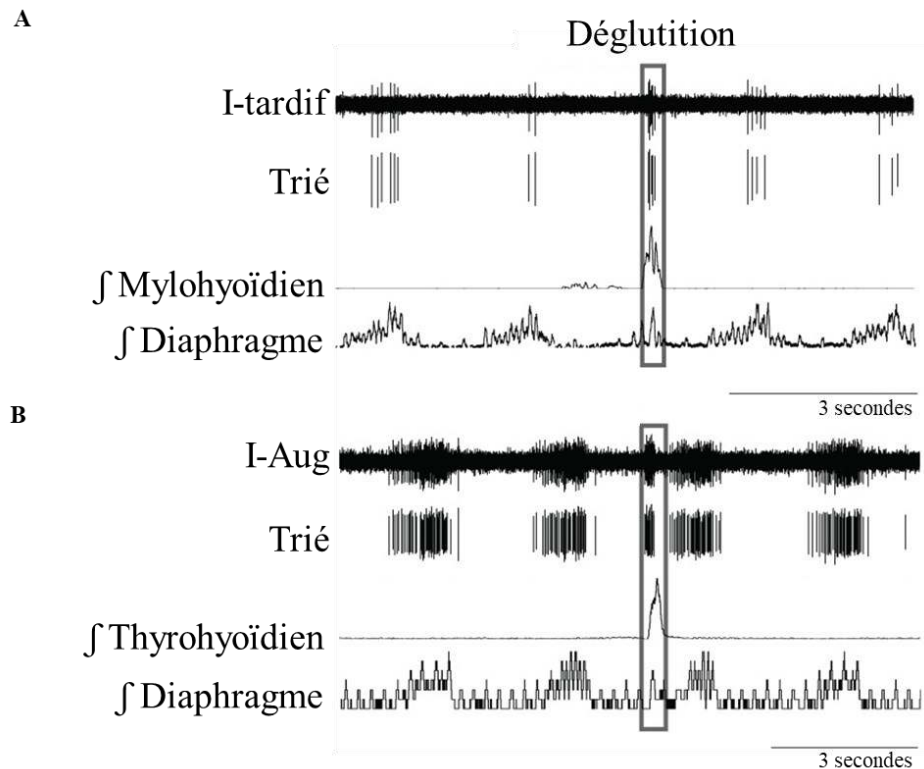


Figure 18 : Exemple de deux neurones du NTS actifs pendant la respiration et la déglutition. Signal brut et seuillé (trié) issus de l'enregistrement extracellulaire de deux types de neurones inspiratoires situés dans le noyau du tractus solitaire (NTS) actifs pendant la respiration et la déglutition (encadré). **(A)** Neurone inspiratoire tardif (I-tardif). **(B)** Neurone inspiratoire croissant (I-Aug). Les signaux intégrés (∫) représentent l'activité EMG du muscle mylohyoïdien (élevateur de l'os hyoïde) et thyrohyoïdien (élevateur laryngé) témoins de l'activité déglutitrice. L'activité EMG intégrée du diaphragme montre des bouffées croissantes qui correspondent à la phase inspiratoire et une activité résiduelle lors de la déglutition (également appelée « Schluckatmung ». (*Adaptée de Pitts et al, 2018*).

Nous avons vu dans les chapitres précédents dédiés aux CPGr et au CPGd que le NTS contenait à la fois des neurones respiratoires et des neurones déglutiteurs. Le NTS est le premier relais d'intégration des afférences du nerf laryngé supérieur (plus particulièrement le noyau interstitiel du NTS) ([Berger 1977](#); [Bellingham et Lipski 1992](#)). Nous supposons donc que le NTS représente une structure clé impliquée dans l'interaction entre la respiration et la déglutition. Des enregistrements intracellulaires de neurones inspiratoires du NTS ventro-latéral réalisés chez le chat *in vivo* ont montré qu'environ 80% d'entre-eux sont dépolarisés et actifs pendant l'inspiration et la déglutition ([Gestreau et al, 1996](#)). D'autres études ont confirmé que les neurones du NTS sont impliqués dans l'intégration des informations afférentes liées à la déglutition, la genèse de la déglutition dont la propagation bilatérale de l'excitation, et les interactions respiration-déglutition ([Saito et al, 2002](#); [Hashimoto et al, 2019](#); [Fuse et al, 2020](#); [Yamamoto et al, 2021](#); [Kinoshita et al, 2021](#)). Des neurones actifs pendant l'expiration et la déglutition, ainsi que d'autres qui sont actifs pendant l'expiration et inhibés pendant la déglutition ont aussi été enregistrés dans le NTS et ces derniers ne semblent pas nécessaires à l'expression de la déglutition ([Sugiyama et al, 2011](#)). Ces résultats indiquent que les CPGr et CPGd partagent certains éléments neuronaux ([Oku et al, 1994](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Saito et al, 2002](#); [Sugiyama et al, 2011](#)) (**Figure 18**).

L'activité des divers neurones du NTS, activés ou inhibés pendant la déglutition, pourrait agir comme un filtre pour faciliter ou inhiber l'initiation des déglutitions à différentes phases du cycle respiratoire.

Les afférences vagales semblent participer à ce rôle de filtre car elles jouent un rôle important dans le contrôle de l'occurrence de la déglutition. En effet, la mise en jeu des récepteurs sensibles à l'étirement pulmonaire (en augmentant le volume des poumons ou en appliquant une pression d'air positive) affecte la coordination entre la respiration et la déglutition et réduit l'apparition de déglutitions spontanées ([Kijima et al, 2000](#); [Samson et al,](#)

[2005](#); [2008](#)). Chez le chat décérébré, paralysé et ventilé artificiellement, la manipulation des afférences vagales, en imposant différents types de ventilation pulmonaire synchronisée ou non avec la phase inspiratoire centrale, a permis de démontrer que l'inflation pulmonaire exerce une modulation négative sur le déclenchement de la déglutition ([Horton et al, 2018](#)). Ces observations sont en faveur d'une inhibition du CPGd par les afférences vagales pulmonaires, un phénomène encore appelé « gating périphérique » de la déglutition. Cependant, les mécanismes responsables de la coordination entre la respiration et la déglutition sont encore mal définis. En plus des mécanismes périphériques, d'autres mécanismes d'origine centrale permettent certainement d'empêcher le développement de la déglutition pendant la phase inspiratoire et de permettre le meilleur couplage entre ces deux fonctions.

Nous avons déjà souligné que la déglutition s'accompagne d'une apnée. La fermeture du larynx bloque le flux respiratoire et empêche également le bol alimentaire de pénétrer dans la trachée. Une apnée de longue durée peut également être induite par la stimulation du nerf laryngé supérieur, laquelle est capable de déclencher la déglutition rythmique. Il existerait donc plusieurs composantes à cette apnée. On doit cependant considérer que l'apnée de courte durée qui accompagne chaque déglutition est d'origine centrale.

En effet, des études en vidéo-fluoroscopie ont pu attester que le flux d'air était nul plusieurs millisecondes avant la fermeture laryngée ([Martin-Harris et al, 2003](#)). De plus, cette apnée de courte durée est toujours présente chez des patients laryngectomisés ([Hiss et al, 2003](#)). Concernant l'apnée de plus longue durée observée lors de la stimulation du nerf laryngé supérieur, l'étude de Sun et collaborateurs ([2011](#)) a montré que l'inhibition des neurones du BotC (ou de la voie allant du NTS au BotC) supprimait cette apnée mais n'affectait pas le déclenchement des déglutitions (**Figure 19**). Il découle de ces résultats que la stimulation de la voie périphérique permettant de déclencher la déglutition contribue à

l'arrêt des décharges inspiratoires via le NTS et le BotC. Cependant, il est intéressant de souligner que dans ces

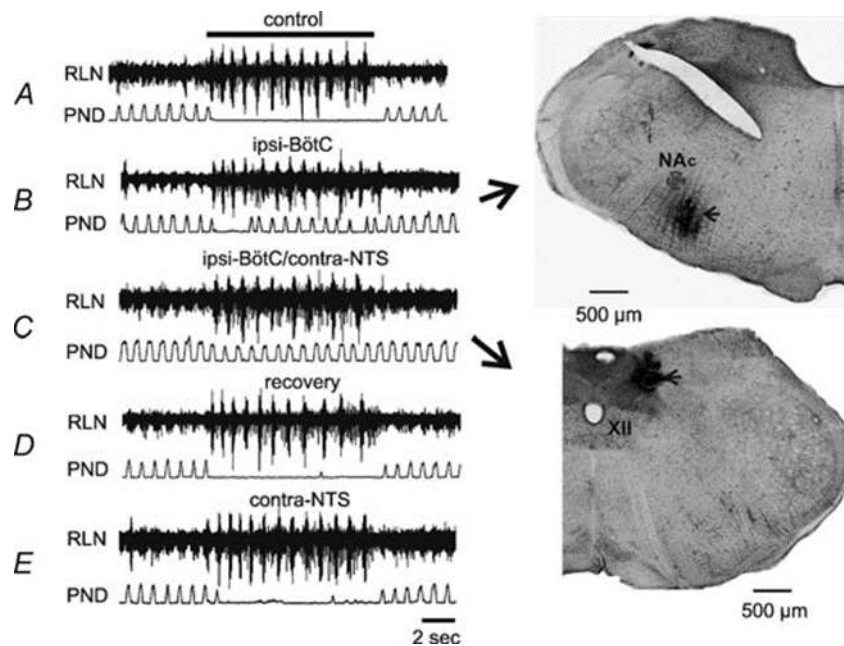


Figure 19 : Effet de microinjections d'isoguvacine sur l'activité du nerf phrénique et du nerf laryngé récurrent pendant la respiration et la déglutition induite par la stimulation unilatérale du nerf laryngé supérieur. (A) Activités des nerfs phrénique (PHR) et laryngé récurrent (NLR) lors de la stimulation du nerf laryngé supérieur (NLS) en condition contrôle. On note que la stimulation du NLS provoque une apnée en plus de la déglutition rythmique. (B) Effet d'une microinjection d'isoguvacine dans le complexe de bötzinger (BotC) ipsi-latéral. On note que l'apnée est réduite. (C) Microinjection d'isoguvacine dans le NTS contra-latéral et le BotC ipsi-latéral. On note la disparition de l'apnée et la persistance de la déglutition rythmique. (D) Effet initial de la stimulation du NLS retrouvé après 60 minutes de récupération. (E) Microinjection unique d'isoguvacine dans le NTS contra-latéral montrant aucun effet sur l'apnée induite par la stimulation du NLS. Les sites d'injection d'isoguvacine ont été marqués au bleu de pontamine (indiqués par les flèches sur les coupes d'anatomie). NAc = formation compacte du noyau ambiguu ; XII = noyau hypoglosse. (*Adaptée de Sun et al, 2011*).

expériences, la coordination entre la respiration et la déglutition n'est pas perturbée de façon majeure. En effet, on note une succession de cycles « inspiration-déglutition-expiration » témoignant de la persistance d'un fort couplage entre ces deux fonctions (**Figure 19-C**). Ce couplage pourrait être lié à l'existence de connexions réciproques inhibitrices entre les neurones du CPGd du NTS et les neurones inspiratoires du PreBotC suggérées dans un travail récent ([Horton et al, 2018](#)). Ces connexions n'ont cependant jamais été démontrées.

De manière intéressante, il existe des connections réciproques entre plusieurs sous-noyaux du NTS et les structures respiratoires pontiques ([Herbert et al, 1990](#); [Papap et Ferguson 1990](#)). Fonctionnellement, le groupe respiratoire pontique, dont le noyau KF intègre les informations vagales pulmonaires via le NTS, est indispensable à l'expression de la phase post-inspiratoire ; il contrôle l'adduction des cordes vocales pendant la respiration et participerait aussi au contrôle nerveux hypoglosse afin de régler le diamètre des voies aériennes supérieures ([Roda et al, 2004](#); [Gestreau et al, 2005](#); [Dutschmann et Dick 2012](#); [Bautista et Dutschmann 2014](#); [Dutschmann et al, 2021](#)). Ces arguments laissent penser que les structures pontiques pourraient jouer un rôle important dans la coordination respiration-déglutition et dans le contrôle nerveux des bouffées motrices hypoglosse et vagale lors de la déglutition.

Certaines études ont déjà tenté de répondre à ces questions. Des lésions unilatérales du KF chez le rat décérébré *in vivo* ont montré des modifications bilatérales des bouffées de déglutition recueillies sur le nerf hypoglosse ([Gestreau et al, 2005](#)). Deux études, dont une rétrospective, effectuées chez la chèvre éveillée ont montré que la destruction des noyaux pontiques dorso-latéraux à l'aide d'acide iboténique perturbait la prédominance normale de la déglutition sur la respiration ([Bonis et al, 2011](#)) et pouvait même supprimer la prolongation réflexe de l'expiration normalement associée aux déglutitions qui apparaissent vers la fin de la phase d'expiration tardive ([Bonis et al, 2013](#)).

Soulignons que dans ces études la perte des neurones pontique a été estimée à 50% environ et la présence des canules d'injection situées bilatéralement dans le KF a suffi à perturber la coordination respiration-déglutition. Dans une autre étude, l'inactivation du KF par l'isoguvacine a entraîné la perte d'une activité laryngée tonique tandis que les bouffées laryngées phasiques persistaient pendant la déglutition rythmique induite par la stimulation de l'oropharynx avec de l'eau ([Bautista et Dutschmann 2014](#)). A la suite de cette étude, les auteurs suggèrent que le KF exerce un rôle protecteur des voies aériennes supérieures pendant la déglutition, en raison de l'activité tonique observée. On peut cependant noter que dans cette dernière étude 1) la commande motrice hypoglosse n'a pas été enregistrée, 2) la commande motrice laryngée n'a pas fait l'objet de mesure quantitative, et 3) la coordination respiration-déglutition n'a pas été analysée. De plus, l'activité tonique dont il est question pourrait être liée à la stimulation périphérique d'un grand nombre de récepteurs mécaniques entraînée par le stimulus hydrique plutôt qu'à une activité centrale générée par le KF.

Dans ce travail de thèse, l'un des objectifs a donc été de **ré-évaluer l'importance de la phase post-inspiratoire et des structures pontiques dans la coordination entre l'activité respiratoire et la déglutition, et dans la commande motrice hypoglosse et laryngée.**

Chapitre 6 : Aspects physiopathologiques de la déglutition

I. La dysphagie

Le terme "dysphagie" signifie littéralement "difficulté à manger". Il est composé des segments du mot grec "dys" : désordonné ou anormal et "phagia" : manger ([Cinocco 2007](#)). Cinocco définit la dysphagie comme "une sensation de difficulté dans le passage des solides ou des liquides de la bouche à l'estomac". La dysphagie peut également être considérée comme "une difficulté à avaler, une toux, un étouffement ou une incapacité à manipuler en toute sécurité les aliments ou même sa propre salive" ([Cinocco 2007](#)). La dysphagie peut résulter d'une diminution des fonctions sensorimotrices associée au vieillissement et à des troubles congénitaux, et/ou de lésions du SNC ou du SNP, comme dans le cas de lésions cérébrales traumatiques, d'affections neurologiques, de cancer de la tête et du cou ou d'interventions neurochirurgicales ([Clave et Shaker 2015](#)). Le degré de déficience et les complications peuvent aller d'une légère gêne lors de la déglutition à des conséquences graves comme la pneumonie par aspiration. Chez le nouveau-né, en particulier prématuré, les complications à type d'événements cardiorespiratoires aigus (apnées, bradycardies, désaturations en oxygène, laryngospasme), tous réflexes de type vagal, peuvent mettre en jeu la vie du nouveau-né ou entraîner des séquelles à la suite d'une hypoxie cérébrale quand ils sont importants. En néonatalogie, il est considéré que ce sont les conséquences les plus graves. Ce large éventail de complications sanitaires associées à la dysphagie peut entraîner une diminution de la qualité de vie et une augmentation des taux de morbidité ([Eslick et Talley 2008](#); [Leow et al, 2010](#); [Martino et al, 2005](#)). En outre, elle peut entraîner des coûts financiers élevés pour les systèmes de soins de santé ([Attrill et al, 2018](#)). Ainsi, le développement de stratégies efficaces de gestion de la dysphagie est impératif.

II. Prévalence, pathophysiologie et conséquences

Selon la Société australienne et néo-zélandaise de médecine gériatrique (2011), la prévalence de la dysphagie est estimée de 7 à 22 % et son incidence atteindrait 40 à 50 % de la population âgée vivant dans des établissements de soins de longue durée ([Chan et al, 2011](#)). Sura et collaborateurs ([2012](#)) ont examiné les taux de prévalence de la dysphagie dans la population âgée aux États-Unis et ont rapporté des chiffres légèrement plus élevés allant de 13 % à 38 % des personnes âgées qui vivent de manière indépendante et jusqu'à 68 % des résidents âgés des maisons de soins. Les variations de ces estimations de prévalence pourraient s'expliquer par des méthodes d'évaluation différentes ou encore des critères d'inclusion différents dans les études examinées.

Avec l'âge, l'anatomie et la physiologie de la déglutition se modifient, par exemple par la réduction de la force et de la masse musculaire (sarcopénie), la sécheresse buccale (xérostomie) ou la diminution des sensations oropharyngées ([Britton et al, 2016](#)). Par rapport aux jeunes individus en bonne santé, ces changements liés à l'âge se traduisent par un mécanisme de déglutition plus faible, plus lent et moins coordonné ([Britton et al, 2016](#)). Par exemple, une réduction de la force de propulsion du bolus et des résidus oropharyngés associés ([Rofes et al, 2010](#)), un ralentissement de la déglutition orale ([Cook et al, 1994](#); [Shaw et al, 1995](#); [Yoshikawa et al, 2006](#)) et oro-pharyngé ([Yokoyama et al, 2000](#)) et une réduction de l'élévation du larynx et de l'hyoïde entraînant un résidu pharyngé et augmentant ainsi le risque de pénétration et d'aspiration ont été rapportés chez les personnes âgées ([Britton et al, 2016](#)). Différentes drogues peuvent participer ou aggraver la dysphagie. Cet effet généralement dose-dépendant est souvent réversible en arrêtant la prise. Les mécanismes impliqués dans la dysphagie causée par les drogues incluent un niveau réduit de conscience, interférant avec la phase oropharyngée de la déglutition ou via une action directe sur les réseaux centraux. L'initiation de la déglutition est retardée par la prise d'agents

neuroleptiques bloquant l'action de la dopamine. Les drogues dopaminergiques peuvent causer des dyskinésies orofaciales, impactant la phase orale de la déglutition ainsi que la propulsion du bolus dans le pharynx. Les substances anticholinergiques causent un assèchement buccal, empêchant la formation optimale du bolus, et les benzodiazépines peuvent inhiber les neurones du tronc régulant la déglutition ([Wyllie et al, 1986](#); [Hockman et al, 1979](#)). La toxine botulique de type A est utilisée afin de traiter la dystonie cervicale, cependant ce traitement entraîne des dysphagies à environ 20% des patients à cause de son action inhibitrice sur les jonctions neuro-musculaires.

La principale cause de dysphagie est d'origine neurologique ([Dray et al, 1998](#)). S'ils sont identifiés, ces troubles peuvent être traités afin d'améliorer la déglutition ([Sura et al, 2012](#)). L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la première cause de dysphagie chez les personnes âgées. Il est estimé qu'environ 50 000 personnes ayant eu un AVC meurent de pneumonie causée par l'aspiration due à une dysphagie aux États Unis ([Dray et al, 1998](#)). Les maladies neurodégénératives jouent aussi un rôle important dans les causes de dysphagie. La maladie de Parkinson, causée par la dégénérescence des cellules dopaminergiques, provoque des difficultés motrices et des tremblements. Plus les symptômes de cette maladie avancent, plus les risques d'aspirations trachéales augmentent, résultant notamment d'une élongation de durée de phase oropharyngée ([Shulman et al, 2011](#)). Des désordres structuraux oropharyngés peuvent aussi représenter une cause de dysphagie chez les personnes âgées. Ces anomalies, telles que le diverticule pharyngo-œsophagien de Zenker, l'achalasie cricopharyngée primitive ou les tumeurs nécessitent des traitements spéciaux. Le diverticule de Zenker est une poche qui se forme au-dessus du sphincter œsophagien supérieur, entre le faisceau thyroïdien du muscle constricteur inférieur et le faisceau cricoïdien du muscle constricteur inférieur. Son risque de formation augmente avec l'âge et augmente les risques de dysphagie ([Watemberg et al, 1996](#)). Les tumeurs du carrefour aérodigestif peuvent être dues au

tabagisme et à l'alcool, et causent d'importants risques de dysphagie. Les patients souffrant de ces tumeurs peuvent être traités par un otolaryngologue, un oncologue et via des radiations. Chez ces patients, la dysphagie s'accompagne de graves problèmes de malnutrition ([Veenker et al, 2003](#)). Cependant, même après intervention chirurgicale, la dysphagie ne disparaît pas pour 50% de ces patients ([Grobbelaar et al, 2004](#)).

III. Evaluation clinique et expérimentale de la déglutition

Chez l'Homme, l'examen clinique standard de la déglutition, tel que proposé par Daniels et Huckabee ([2014](#)), consiste en un examen des antécédents médicaux ainsi qu'en la collecte d'informations sur l'état médical actuel du patient à partir des dossiers et du patient. Cela inclut la collecte d'informations concernant l'état cognitif et les capacités de communication ([Daniels et Huckabee 2014](#)). Les données quantitatives peuvent être collectées. Les protocoles de déglutition d'eau, principalement développés pour dépister la dysphagie, varient dans leur administration et leur interprétation ([Martino et al, 2005](#)). En plus d'une interprétation dichotomique de type réussite ou échec utilisée par la plupart de ces tests, le Timed Water Swallowing Test (TWST) de Hughes et Wiles ([1996](#)) est chronométré et normé pour quantifier objectivement l'efficacité de la déglutition de liquides (150 ml d'eau). D'autres évaluations peuvent être utilisées en complément de l'examen comportemental de la déglutition, comme l'oxymétrie de pouls (pour une revue, voir [Britton et al, 2018](#)), l'auscultation cervicale ([Borr et al, 2007](#); [Leslie et al, 2004](#); [2007](#)) ou le test du réflexe de la toux ([Addington et al, 1999](#); [Sato et al, 2012](#); [Miles et al, 2013](#)). Les techniques instrumentales peuvent être classées en méthodes d'imagerie et en méthodes physiologiques. Les deux méthodes d'imagerie clinique les plus fréquemment utilisées sont l'évaluation vidéo-fluoroscopique de la déglutition (VFSS) utilisant des bolus de densité différentes ([Logemann 1995](#)), et l'évaluation vidéo-endoscopique de la déglutition ([Langmore et al, 1988](#); [Lim et al, 2001](#); [Bax et al, 2014](#); VEES) ; l'échographie a été décrite mais n'est pas largement utilisée

([Peng et al, 2000](#); [Kuhl et al, 2003](#); [Yabunaka et al, 2011](#); [Macrae et al, 2013](#)). Les mesures physiologiques de la déglutition peuvent inclure une analyse manométrique pharyngo-œsophagienne. Bien qu'historiquement plus utilisée pour les évaluations du péristaltisme œsophagien, la manométrie émerge lentement dans la pratique clinique pour obtenir des informations quantitatives sur les fonctions physiologiques de la phase pharyngée de la déglutition, telles que l'intégrité du sphincter œsophagien supérieur (UES), le péristaltisme pharyngé et les pressions intrabolus (par exemple, [Dantas et al, 1990](#); [Brasseur et Dodds 1991](#); [Ravich 1995](#); [Hila et al, 2001](#); [Omari et al, 2012](#); [2014](#); [2016](#); [Bhatia et Shah 2013](#)). De plus, la manométrie pharyngée peut être utilisée comme outil de biofeedback pour réentraîner le contrôle de l'activation séquentielle des muscles pharyngés chez les patients souffrant de dysphagie après un accident vasculaire cérébral ([Huckabee et al, 2014](#)).

L'approche expérimentale permet d'enregistrer l'activité déglutitrice de manière plus invasive chez l'animal. En effet, en fonction des besoins expérimentaux, il est possible d'enregistrer directement l'activité musculaire, l'activité nerveuse (afférences et/ou efférences) ou encore l'activité unitaire des neurones situés dans les réseaux du tronc cérébral. En plus d'un électromyogramme des muscles du pharynx et de l'oesophage, on peut enregistrer la pression œsophagienne lors de la déglutition ([Kessler et Jean 1985](#); [Hashim et Bieger 1987](#); [McConnel 1988](#); [Feroah et al, 2002a](#)). Compte-tenu de leur rôle dans la déglutition (voir chapitres précédents de l'Introduction), les nerfs crâniens hypoglosse et vague ont fait l'objet d'une attention particulière ([Dick et al, 1993](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Sugiyama et al, 2013](#); [2015](#); [Horton et al, 2018](#)).

Sur un plan expérimental, l'enregistrement des signaux de déglutition n'est pas le plus difficile, en revanche le choix de la méthode pour évoquer la déglutition l'est davantage. Dans la littérature, différentes méthodes d'induction ont été utilisées selon les besoins de l'étude et selon le modèle animal. Par exemple, il est difficilement envisageable de stimuler le nerf

laryngé supérieur chez le modèle primate non humain. Ainsi, les observations peuvent reposer sur la déglutition spontanée ou un mode de déclenchement simple, tel que la stimulation de l'oropharynx avec de l'eau ([Martin et al, 1997](#); [Feroah et al, 2002b](#); [Bonis et al, 2011](#); [Yagi et al, 2017](#)). La stimulation électrique du NLS reste la méthode la plus robuste pour induire la déglutition et aussi la plus utilisée chez le modèle moyen et petit animal (ex., rongeur, chat, chien) ([Oku et al, 1994](#); [Budzinska et Wojtal 2001](#); [Saito et al, 2002](#); [Harada et al, 2005](#); [Ambalavanar et al, 2004](#); [Shiba et al, 2007](#); [Yamanishi et al, 2010](#); [Sun et al, 2011](#); [Ota et al, 2013](#); [Oka et al, 2013](#); [Sugiyama et al, 2013](#); [2015](#); [Horton et al, 2018](#); [Toor et al, 2019](#)). Nous savons que les fibres sensibles du NLS sont glutamatergiques et déclenchent l'excitation du CPGd situé dans le NTS ([Jean 2001](#)). Aussi, l'injection directe de glutamate dans le centre déglutiteur du NTS est une méthode fiable pour déclencher la déglutition ([Kessler et Jean 1991](#); [Jean 2001](#); [Feroah et al, 2002b](#)). La déglutition peut aussi être déclenchée par une stimulation mécanique simulant l'arrivée d'un bolus. Cette stimulation peut être appliquée dans la cavité oropharyngée ([Ouahchi et al, 2011](#); [Cullen et al, 2018](#); [Haney et al, 2019](#)) ou au niveau du larynx ([Davis et Nail 1984](#); [Tsujiura et al, 2019](#)). L'injection d'un liquide dans l'oropharynx est également une méthode très utilisée ([Spearman et al, 2014](#); [Bautista et al, 2014](#); [Humbert et McLaren 2014](#); [Horton et al, 2018](#); [Huff et al, 2020](#)). En dehors du glutamate, peu d'études se sont intéressées à un mode de déclenchement pharmacologique de la déglutition. Cependant, nous avons dirigé notre attention vers une étude assez ancienne réalisée par Bieger ([1981](#)) chez le rat *in vivo* anesthésié, montrant qu'il était possible de déclencher la déglutition à l'aide d'agonistes sérotoninergiques.

Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle certains composés comme la quipazine pouvaient être utilisés sur la préparation perfusée *in situ* de rat juvénile afin de déclencher la déglutition sur une période de temps assez longue.

L'idée était donc de disposer d'une alternative intéressante aux méthodes d'induction citées plus haut. Ce travail a été entrepris dès le début de ma thèse et correspond donc aux deux premiers objectifs spécifiques (voir la partie objectifs à la fin de l'Introduction).

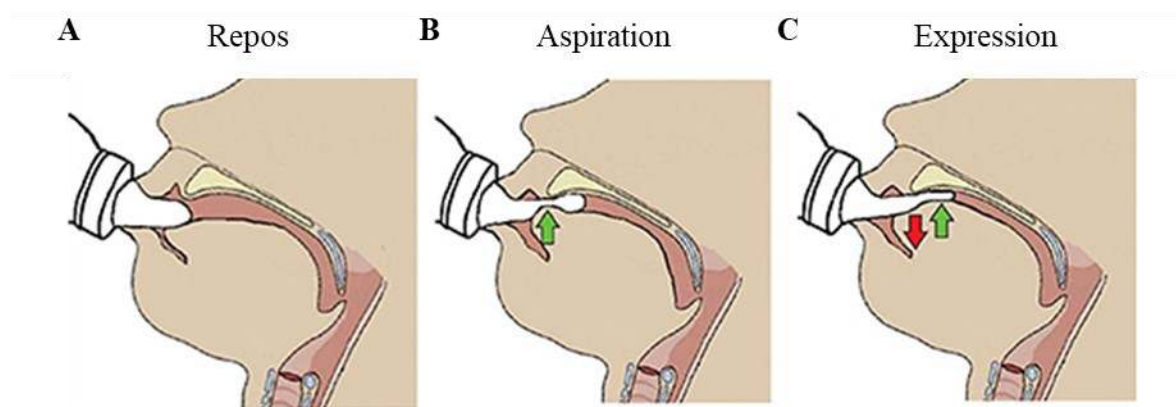


Figure 20 : Principales composantes de la succion chez le nouveau-né. (A) Cavité buccale au repos avec la tétine positionnée dans la bouche. (B) L'aspiration permet de créer une pression négative intrabuccale en fermant les lèvres, en abaissant la cavité buccale et en fermant le passage nasal par le palais mou (ce qui empêche l'entrée d'air et augmente le volume intrabuccal). (C) La phase d'expression permet d'extraire le contenu de la tétine grâce à une alternance d'activité de la langue et la pression négative générée pendant l'aspiration. La flèche verte correspond à la pression que la langue exerce sur la tétine et la flèche rouge correspond au relâchement de la pression de langue sur la tétine. (*Adaptée de Uysal et al, 2022*).

Chapitre 7 : Sucction et mastication

I. Sucction nutritive et non-nutritive

Chez le nouveau-né, la sucction peut être nutritive ou non, c'est-à-dire qu'elle implique ou non le transport de liquide. Elle se caractérise par deux composantes que sont l'aspiration et « l'expression » ([Sameroff 1968](#); [Wolff 1968](#)) (**Figure 20**). L'aspiration correspond à la pression intrabuccale négative générée par la fermeture des voies nasales par le palais mou, le resserrement des lèvres autour du mamelon ou du biberon et l'abaissement de la mâchoire inférieure ([Wolf et Glass 1992](#)). Sans pénétration d'air dans un volume de la cavité buccale qui augmente, le lait ne peut être qu'aspiré dans la bouche, comme c'est le cas lorsqu'on boit avec une paille. L'expression correspond à la compression du mamelon du sein ou de la tétine du biberon par la langue contre le palais dur pour éjecter le lait dans la bouche, une action similaire à la traite d'une vache à la main ([Lau et al, 1997](#)). Il existe une échelle descriptive de la maturation de la sucction nutritive chez le nouveau-né prématuré ([Lau et al, 2000](#)). Plusieurs niveaux de maturité ont été définis : tout d'abord l'apparition de la composante « expression », suivie de celle de l'aspiration, différents degrés d'activité rythmique de ces deux composantes, jusqu'au pattern rythmique mature alterné caractéristique des nouveau-nés à terme. Ainsi, la maturation de la composante d'aspiration est retardée par rapport à celle de l'expression.

La sucction nutritive implique l'ingestion de liquide et, à maturité, la sucction se produit à une fréquence d'un cycle ou d'une sucction par seconde. La sucction non nutritive, par exemple la sucction du pouce ou d'une sucette, se produit à 2 cycles ou succions par seconde ([Wolff 1968](#)). La différence de fréquence provient probablement du fait que pendant la sucction nutritive, le passage du bolus de lait et de l'air doit suivre un chemin pharyngé commun, ce qui nécessite une coordination importante entre la sucction, la déglutition et la

respiration afin d'empêcher l'entrée simultanée de lait dans la trachée et l'œsophage ([Lau et al, 2003](#)).

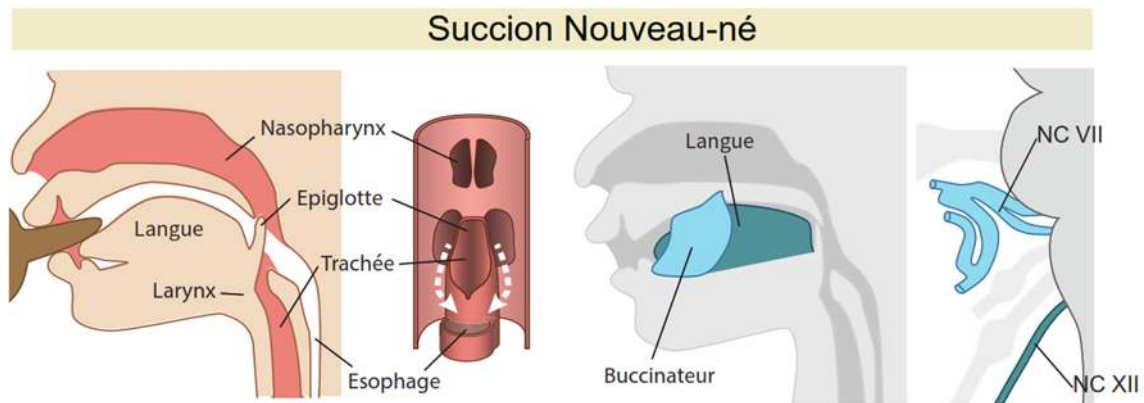


Figure 21 : Musculature et innervation principale permettant la succion chez le nouveau-né. Les deux figures de gauche représentent les différentes structures impliqués dans l'acte de succion-déglutition chez le nouveau-né, ainsi qu'une vue de face du pharynx permettant d'illustrer le trajet du bolus liquide (lignes blanches pointillées) pendant la tétée. Chez le nouveau-né (à terme et non prématuré), la triade succion-déglutition-respiration se fait de manière continue sans besoin de pause respiratoire grâce à la position haute du larynx. Cette position relève l'épiglotte contre le palais mou pendant la succion-déglutition-respiration créant des passages séparés, permettant d'avaler un bolus liquide tout en respirant par le nez. Les deux figures de droite représentent les deux principaux muscles de la succion ainsi que leur innervation. (*Adaptée de Maynard et al, 2020*).

Comme la déglutition est peu exprimée pendant la succion non nutritive, la phase pharyngée de la déglutition n'est pas activée, ce qui permet à la succion et à la respiration de fonctionner indépendamment les unes des autres à un rythme plus rapide. La maturité de la succion non nutritive a été et est encore utilisée comme marqueur de la préparation à l'alimentation orale chez le nouveau-né prématuré ([Wolf et Glass 1992](#); [Kish 2014](#)). Cependant cela ne fait pas consensus car la succion non nutritive mature apparaît plus tôt que la succion nutritive ([Lau et Kusnierczyk 2001](#)). Par conséquent, on peut avancer que la succion non nutritive est un bon marqueur pour la succion en soi, mais ne peut pas prédire la coordination entre la succion, la déglutition pharyngée, la respiration et la fonction œsophagienne.

La succion nutritive mature se définit par l'alternance rythmique des deux composantes aspiration/expression. Cette dernière n'est pas nécessaire pour l'alimentation au biberon. En effet, les nourrissons utilisant seulement la composante « expression » peuvent boire au biberon en toute sécurité, mais pas aussi efficacement que des bébés utilisant une alternance rythmique d'aspiration/expression ([Lau et al, 1997](#)). Cependant, il n'est pas sûr qu'un nourrisson qui n'utilise que la composante expression puisse s'allaiter avec succès dans la mesure où le mamelon maternel n'est pas aussi ferme qu'une tétine de biberon et que l'aspiration semble nécessaire pour que les nourrissons s'accrochent au mamelon maternel et le retiennent pendant l'allaitement.

Le mouvement de la succion se fait grâce à des muscles attachés au crâne, à la mâchoire, à l'os hyoïde et aux cartilages laryngés ([Matsuo et Palmer 2015](#)) (**Figure 21**, [Maynard et al, 2020](#)). Les muscles suprahyoïdiens et le muscle ptérygoidien latéral permettent d'ouvrir la mâchoire, alors que les muscles masseter, temporalis et ptérygoidien median permettent de la fermer. La succion se caractérise par une contraction de la langue afin de s'appliquer sous le mamelon, les muscles des lèvres permettent d'y former un lien étanche, puis les muscles des joues se contractent avec la langue et les muscles du palais afin de

produire un vide intra-buccal ([Tamura et al, 1998](#)). Cette séquence se coordonne directement avec la déglutition décrite dans le chapitre précédent. Ces mouvements sont permis par l'influx nerveux provenant de 5 des 12 NC, soit les nerfs V, VII, IX, X et XII. Les nerfs V et VII sont impliqués dans la phase orale, IX, X et XII permettent les phases orales et pharyngées. Les informations sensorielles provenant du bas du visage, de l'oropharynx, et des mécanorécepteurs de la bouche et des gencives sont transmises par les neurones sensoriels du ganglion trigéminal périphérique vers les noyaux trijumeaux du tronc cérébral. Ce réseau coordonné succion-déglutition évolue et mature en parallèle avec le perfectionnement du SNC pour ensuite devenir le réseau masticateur ([Al Ain et al, 2013](#); [Muscatelli et Bouret 2018](#); [Loos et al, 2019](#); [Zimmer et al, 2019](#)).

II. De la succion à la mastication

Avant la naissance, les organes aérodigestifs importants pour la déglutition se développent pendant la période embryonnaire (semaines 1 à 8 de la gestation) ([Larsen 1998](#)). Pendant la période fœtale (9 à 28 semaines de gestation), on observe une croissance rapide et continue des structures et les premières fonctions liées à la succion et à la déglutition. Les premiers mouvements de la bouche, comme les poussées de la langue et les mouvements des lèvres et de la mâchoire, ont été notés dès 15 semaines de gestation et seraient des mouvements précurseurs des fonctions de succion et de déglutition ([Kurjak et al, 2003](#); [Miller et al, 2005](#)). Ces mouvements se complexifient et de simples mouvements d'ouverture-fermeture deviennent des mouvements répétitifs plus complexes semblables à la succion. La déglutition a été observée dès la 12^e semaine de gestation ; il a en effet été montré que le fœtus avalait du liquide amniotique. Selon Miller ([2003](#)), les déglutitions plus complexes, permettant d'avaler un plus gros contenu sont observées généralement de 15 à 38 semaines d'âge gestationnel (AG), avec la période la plus active de déglutition se produisant entre 17 et 30 semaines AG. Avaler du liquide amniotique permettrait au fœtus de développer

correctement son tractus gastro-intestinal ([Ross et Nijland 1998](#)). Les déglutitions immatures sont caractérisées par le manque de fermeture labiale et vélopharyngée, ainsi que par le manque d'élévation laryngée ([Miller et al, 2003](#); [Petrikovsky et al, 1995](#)). Selon Arvedson ([2006](#)) un nourrisson prématuré en bonne santé peut sucer et avaler suffisamment pour maintenir ses besoins nutritionnels par voie orale à partir de 34 semaines de gestation. Les nouveau-nés à terme en bonne santé peuvent coordonner la succion, la déglutition et la respiration dès la naissance. Selon Kelly et collaborateurs ([Kelly et al, 2007](#)), tout changement ou irrégularité observé dans cette coordination au cours des premières semaines de vie dépend du développement neural ou anatomique et de l'expérience d'alimentation globale.

La transition de la succion à la mastication se fait de manière graduelle lors du développement. Chez le rat, les premiers mouvements de mastication apparaissent environ à 12 jours après la naissance (P12) et la mastication semble être mature entre P18 et P21 ([Westneat et Hall 1992](#)). Chez l'Homme, il est nécessaire d'attendre plusieurs mois avant de voir apparaître un mouvement masticateur et la mastication devient mature après l'apparition complète de la dentition. On ignore si le CPG de la mastication provient du CPG de la succion (une évolution) ou s'il émerge de novo lors de la maturation du tronc cérébral. Le CPG de la succion est peu caractérisé. Nous savons cependant qu'il se situe entièrement dans le tronc cérébral puisque la succion persiste après décérébration chez le rat in vivo ([Thexton et Griffiths 1979](#)). Certaines études ont permis de définir les sorties motrices principales impliquées dans la succion et ont montré qu'une activité motrice rythmique ressemblant à de la succion émane principalement du noyau moteur hypoglosse, facial et trijumeau ([Jia 1997](#); [Nakajima 1999](#); [Nakamura et al, 2004](#); [Barlow et Estep 2006](#); [Koizumi et al, 2009](#)). S'agissant d'études faites sur la préparation tronc cérébral moelle épinière isolée ou « en bloc » de rat nouveau-né, elles ne permettent pas de caractériser fonctionnellement l'activité motrice de succion. Dans quelques études cependant, une mutation génétique de gènes

codants pour des canaux ioniques chez le rat ou la souris a permis de révéler un défaut de succion conduisant à la mort de l'animal associé à une anomalie anatomique et morphologique des terminaisons sensibles trigéminales autour des neurones centraux du noyau spinal du nerf trijumeau (5SP ; [Kutsuwada et al, 1996](#)).

III. Quelques données concernant la mastication

Le CPG masticateur, situé dans le bulbe rachidien et le pont, implique plus particulièrement le noyau trigéminal mésencéphalique, le noyau moteur trigéminal, le noyau sensoriel trigéminal et le noyau trigéminal spinal. Certains neurones situés dans la région antéro-dorsal du noyau sensoriel trigéminal pourraient former le cœur du CPG masticateur ; ils possèdent une activité pacemaker ([Brocard et al, 2006](#)). Les éléments principaux du CPG masticateur se trouvent entre la partie rostrale du noyau moteur V et le noyau moteur VII et peuvent générer un rythme ([Kolta et al, 2000](#); [Lund et Kolta 2006a, 2006b](#)). Les neurones de cette région projettent de manière réciproque vers les motoneurones des noyaux V, du VII et du XII ([Bourque et Kolta 2001](#); [Dal Bo et al, 2005](#); [McDavid et al, 2006](#)) et déchargent en phase avec la mastication fictive ([Westberg et al, 1998](#); [Tsuboi et al, 2003](#)). La majorité de ces neurones masticateurs sont activés par l'aire corticale liée à la mastication. Bien que n'ayant pas besoin de retour sensoriel pour fonctionner, le CPG est modulé par le retour sensoriel des muscles et tissus mou du visage et de la cavité buccale pour son adaptation au bolus alimentaire ([Morquette et al, 2012](#)). La mastication consiste en une ouverture et fermeture successives de la mâchoire permettant de réduire le volume et la densité du bolus alimentaire. La mastication suit un pattern de trois cycles successifs : 1) phase préparatoire, 2) phase de réduction et 3) phase de pré-déglutition ([Lund 1991](#)). L'ouverture de la mâchoire fait appel aux muscles ptérygoïdien latéral et supra-hyoïdien, la fermeture aux muscles masséter, temporal et ptérygoïdien médian, et leur innervation provient des nerfs crâniens V, VII, IX et XII ([Morquette et al, 2012](#)). Sur la préparation « en bloc » ou tronc cérébral moelle épinière

isolés, certains neurones situés dans le noyau spinal trigéminal ont montré une activité rythmique après administration de NMDA ([Tanaka 1999](#)). Ces neurones déchargent également de manière rythmique pendant la mastication fictive ([Tsuboi et al, 2003](#)).

Objectifs spécifiques de la thèse

Le thème principal de cette thèse concerne le contrôle nerveux des muscles des voies aériennes supérieures lors de comportements oromoteurs distincts : la respiration, la déglutition et la succion. Ainsi que cela a été rappelé en Introduction, les réseaux neuronaux du tronc cérébral forment des générateurs centraux d'activité motrice dont le rôle est de produire une séquence motrice adaptée, de moduler cette séquence mais aussi de coordonner plusieurs séquences motrices entre elles. De nombreuses études ont permis de caractériser anatomiquement et fonctionnellement chacun de ces réseaux avec plus ou moins de lacunes dans nos connaissances. Les études antérieures ont indiqué un mode de fonctionnement dynamique de ces réseaux qui n'est pas trivial à appréhender. En effet, chaque réseau dispose de ses propres populations de neurones et de ses propres jeux synaptiques suffisants pour enclencher une séquence motrice rythmique donnée. L'architecture de ces réseaux n'est cependant pas si figée car l'exécution de tâches motrices multiples peut également reposer sur le partage de certains éléments neuronaux (motoneurones et/ou interneurones). L'état de l'art sur cette question fait apparaître que certains mécanismes impliqués dans la genèse de ces fonctions, leur neuromodulation et surtout leur coordination ne sont pas encore élucidés.

Du point de vue de l'expérimentation, l'étude de ces mécanismes neurophysiologiques n'est pas aisée. En particulier, l'étude de la coordination entre la respiration et la déglutition requiert un modèle expérimental complexe puisqu'il doit avant tout préserver les fonctions étudiées, se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, mais aussi permettre d'enregistrer les phénomènes musculaires et/ou nerveux correspondants. L'analyse des mécanismes d'interaction entre la respiration et la déglutition nécessite par exemple d'identifier correctement les 3 phases du cycle respiratoire, de déclencher souvent le réflexe de déglutition et d'obtenir des déglutitions isolées dans le cycle respiratoire.

Objectif 1 : Disposer d'un modèle d'étude efficace de la coordination respiration-déglutition : l'induction pharmacologique de déglutition *in situ* ?

L'un des objectifs de ce travail a été de mettre au point un nouveau modèle pharmacologique d'étude de la coordination respiration-déglutition. Pour ce faire, nous avons utilisé la préparation perfusée *in situ* chez le rat, laquelle représente une bonne alternative au modèle classique *in vivo* (animal décérébré et paralysé artificiellement), moins coûteux et plus rapide à mettre en œuvre. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle l'administration de quipazine, un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2a} testé avec succès *in vivo* ([Bieger 1991](#)), permet d'induire fréquemment des épisodes de déglutitions isolées *in situ*. Nous montrons que la quipazine augmente la fréquence des déglutitions *in situ* pendant plus de 15 minutes. Par ailleurs, les déglutitions induites par la quipazine ont un pattern moteur identique aux déglutitions spontanées et sont coordonnées de manière similaire à la respiration.

Objectif 2 : Comprendre les mécanismes d'action de la quipazine sur la déglutition

Notre second objectif a été de rechercher par quels mécanismes la quipazine modulait la déglutition. Bien qu'une action périphérique ne puisse être totalement exclue, nos résultats suggèrent que la quipazine agit préférentiellement sur les neurones du raphé bulbaire caudal lesquels excitent les neurones du réseau déglutiteur.

Objectif 3 : Quel est le rôle de la phase post-inspiratoire et du groupe respiratoire pontique dans la coordination respiration-déglutition et dans la commande motrice des muscles des voies aériennes supérieures ?

Nous avons vu en Introduction (ce qui est également vérifié dans les 2 premiers chapitres de résultats) que la déglutition est induite préférentiellement lors de la phase post-inspiratoire du cycle respiratoire. Nous savons également qu'une adduction des cordes

vocales est observée pendant la post-inspiration ainsi que lors de la phase pharyngée de la déglutition. Enfin, le groupe respiratoire pontique est indispensable à l'expression de la post-inspiration. Nous nous sommes donc posé la question de savoir quel rôle joue la phase post-inspiratoire dans l'exécution de la séquence motrice de déglutition. Plus précisément, nous souhaitons déterminer si la phase post-inspiratoire était indispensable 1) à la genèse de la déglutition, 2) à sa coordination avec l'activité respiratoire et/ou 3) aux patterns moteurs des nerfs hypoglosse et laryngé (vague) lors de la déglutition. Pour cela, nous avons d'abord vérifié qu'une ablation du pont *in situ* supprime la post-inspiration. Dans ses conditions, nous montrons que la déglutition persiste mais la coordination respiration-déglutition est en partie altérée, comme en témoigne la présence de déglutition juste avant l'inspiration. Enfin, l'ablation du pont et la suppression de la phase post-inspiratoire qui en résulte ne modifient pas la décharge motrice vagale lors de la déglutition. En revanche, la décharge motrice hypoglosse est significativement réduite. Ce travail met donc en évidence le rôle des structures pontiques dans la coordination respiration-déglutition et la modulation du pattern moteur hypoglosse. En outre, il révèle l'origine exclusivement bulbaire de la commande laryngée lors de la déglutition.

Objectif 4 : Etudier l'activité de décharges des motoneurones hypoglosses et des neurones de la colonne respiratoire ventrale pendant la déglutition *in situ*

Les données de la littérature obtenues *in vivo* montrent que les réseaux respiratoire et déglutiteur partagent des éléments moteurs (dont les motoneurones hypoglosse et laryngés) ainsi que certains interneurones. Notre objectif a donc été d'utiliser la préparation *in situ* et notre modèle d'induction pharmacologique de la déglutition afin d'étudier l'activité des motoneurones du XII ainsi que des neurones respiratoires de la CVR pendant la respiration et la déglutition. Dans ce travail, nous avons exploité le fait que chez le rat, le nerf hypoglosse moteur de la langue se scinde en deux branches, médiane et latérale, afin d'innerv

respectivement les muscles protruseurs et rétracteurs de la langue. A l'aide de la méthode de spike-trigger averaging, nous avons d'abord étudié l'activité de décharge pendant l'inspiration et la déglutition de motoneurones hypoglosses identifiés fonctionnellement comme des protruseurs. Nous montrons qu'une proportion non négligeable de ces neurones est active lors des 2 comportements. Ces travaux révèlent que la rétraction de la langue pendant la déglutition repose en partie sur une co-contraction de muscles antagonistes. Ensuite, nous avons étudié l'activité d'une centaine de neurones respiratoires de la colonne ventrale de type inspiratoire, post-inspiratoire ou expiratoire tardif. Nous montrons que certains neurones inspiratoires sont actifs lors de la déglutition. La plupart des neurones post-inspiratoires déchargent lors de la respiration et la déglutition. En revanche, nous n'avons trouvé aucun neurone expiratoire tardif activé lors de la déglutition. Ces résultats permettent de discuter des mécanismes sous-jacents qui opèrent au sein des réseaux dans la coordination respiration-déglutition.

Objectif 5 : Pouvoir étudier l'activité oromotrice et son contrôle nerveux à des âges précoces. Déterminer le rôle de l'ocytocine sur la respiration, la déglutition et la succion

Chez le nourrisson, la succion est coordonnée avec la respiration et la déglutition afin d'assurer l'alimentation orale. Des travaux suggèrent un lien entre l'ocytocine et la succion et la déglutition ([Schaller et al, 2010](#); [Yamasue et Domes 2018](#)). Afin de pouvoir étudier ce lien, il était indispensable de disposer d'un modèle expérimental fiable. J'ai donc développé la préparation perfusée *in situ* chez de très jeunes rats (dès P6-P9), ainsi qu'à deux groupes d'âges plus tardifs (P14-P15 et P21). A partir de ce modèle, j'ai pu répondre aux questions suivantes :

- 1) Est-ce que le TGOT, un agoniste des récepteurs à l'ocytocine, a un effet sur la déglutition ou la coordination respiration-déglutition ?
- 2) Peut-on observer de la succion sur la préparation *in situ* ?

Les résultats obtenus ne révèlent pas de rôle marqué du TGOT sur la déglutition ou la respiration. En revanche, une activité de type succion a pu être révélée chez les nouveau-nés âgés de P6 à P9, mais pas à un âge plus tardif. Nous montrons que le TGOT administré par voie systémique augmente significativement la fréquence des épisodes de type succion. De plus, l'effet du TGOT est bloqué par l'ajout préalable d'un antagoniste des récepteurs à l'ocytocine.

Matériels et méthodes

Dans cette partie nous avons choisi de regrouper les matériels et méthodes communs à l'ensemble du travail effectué. Ainsi, seuls les matériels et méthodes spécifiques seront décrits dans les chapitres correspondants des Résultats.

I. Préparation perfusée *in situ*

La préparation perfusée tronc cérébral cœur-poumons isolés *in situ* (ou préparation *in situ*) de jeunes rats Wistar (P15-P21; poids corporel 50-110 g) a été utilisée comme décrit précédemment ([Dutschmann et al, 2007](#); [Wang et al, 2013](#)). Dans cette préparation, le tronc cérébral est oxygéné, possède un pH physiologique et génère un pattern respiratoire moteur eupnéique ([St-John et Paton 2000](#)). Les rats sont profondément anesthésiés avec de l'isoflurane (1-chloro-2,2,2-trifluoroéthyl-difluorométhyléther ; Baxter). Une fois la respiration arrêtée et que l'animal ne répond plus au pincement nocif de la queue ou d'une patte arrière, une section sous-diaphragmatique est effectuée. Puis l'animal est décérébré au niveau précolliculaire. Enfin, l'animal est transféré dans un LCR artificiel glacé (5°C) (voir ci-dessous pour la composition) équilibré avec 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂ afin de retirer la peau, les viscères et les poumons. Le nerf phrénique gauche a été isolé, coupé au niveau du diaphragme et préparé pour l'enregistrement. La préparation a ensuite été transférée dans une cuve d'enregistrement. L'aorte descendante a été canulée et perfusée avec du LCR à 33°C contenant les éléments suivants (en mM) : 125 NaCl, 3 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 25 NaHCO₃ et 10 D-glucose (1.25 % Ficoll) en utilisant une pompe péristaltique (Watson-Marlow). Le perfusât est oxygéné et le pH maintenu à 7.35 en gazant le LCRa avec 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂. Le perfusât est filtré et passé au travers de pièges à bulles afin d'éliminer les bulles de gaz. Le perfusât s'échappant de la préparation est récupéré et remis en circulation après réoxygénation. Après quelques secondes de reperfusion, l'activité cardiaque réapparaît, puis, quelques minutes après réapparaissent les contractions rythmiques des muscles respiratoires. Les mouvements respiratoires ont été bloqués en injectant 250 µl de

solution saline (intraveineuse) contenant du bromure de vécuronium (3-30 µg/ml ; Organon). Après paralysie, le débit de perfusion a été ajusté afin d'obtenir un pattern respiratoire triphasique clairement identifiable. Les préparations étaient jugées stables si un tel pattern respiratoire était maintenu pendant au moins 30 min. Les débits de perfusion variaient de 20 à 28 ml/min ; la pression de perfusion était mesurée par un cathéter à double lumière connecté à la canule de perfusion aortique et à un tensiomètre (WPI, USA) variait entre 70-80 mmHg.

II. Enregistrement des paramètres physiologiques

Les activités nerveuses motrices ont été enregistrées à partir des nerfs phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) à l'aide d'électrodes à succion montées sur des micromanipulateurs. Les signaux bruts et intégrés (constante de temps 100 ms) ont été amplifiés et filtrés (gain 500-10000 ; BP 300-3000Hz) avant d'être numérisés (12KHz, 16bits). Les signaux correspondant à la pression artérielle (PA) et à l'électrocardiogramme (ECG) ont également été enregistrés et numérisés. Les signaux numérisés ont été visualisés puis stockés sur un PC (TDT, USA) pour un traitement ultérieur (logiciel OpenEx, Offline Sorter et NeuroExplorer, Plexon Inc., USA). Pour toutes les expériences, un rythme respiratoire stable comprenant un pattern triphasique clair a été détecté 20 à 30 min après le début de la reperfusion. Ce pattern comprenait : une activité pré-inspiratoire du nerf XII, une activité en rampe du nerf Phr et une décharge décroissante typique du nerf X pendant la phase post-inspiratoire de la respiration. La déglutition nécessite la rétraction de la langue et la fermeture laryngée (ou adduction des cordes vocales), d'où l'activité des nerfs XII et X respectivement ([Gestreau et al, 2005](#); [Horton et al, 2018](#)). Les déglutitions sont caractérisées par de courtes décharges (300-500 ms) des nerfs crâniens, commençant par une décharge XII suivie d'une décharge X en forme de cloche ([Gestreau et al, 2005](#); [Bautista et Dutschmann 2014](#); [Horton et al, 2018](#)).

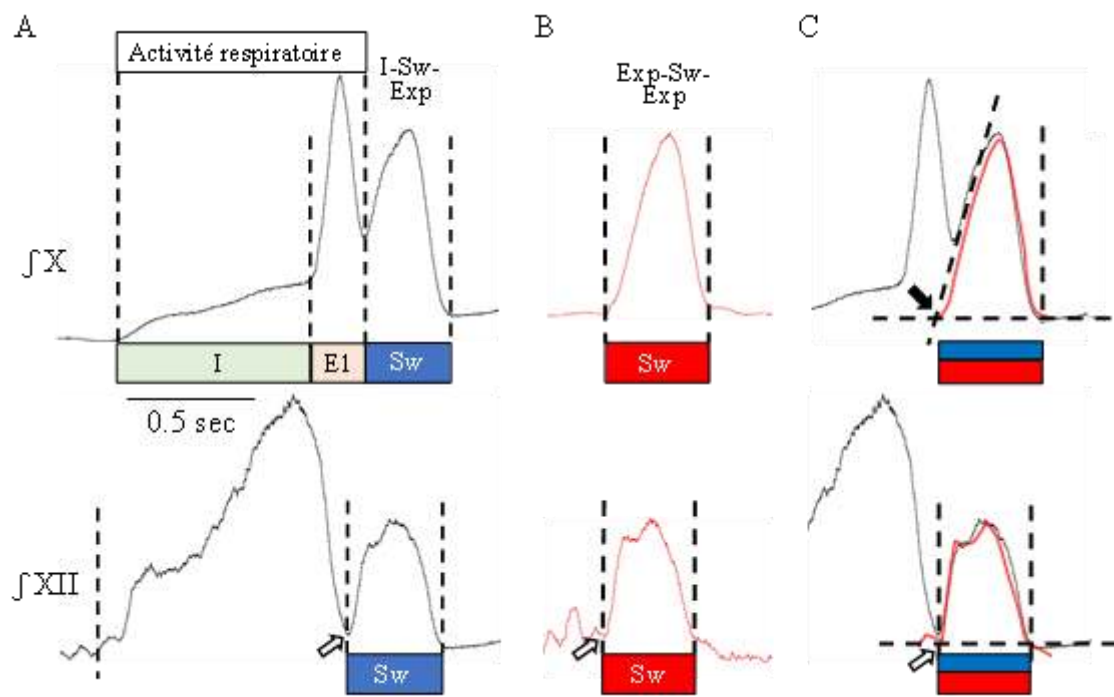


Figure 22 : Représentation schématique de la méthode utilisée pour identifier et quantifier les décharges déglutitrices motrices *in situ*. (A) Enveloppes moyennes des décharges nerveuses vagales (X) et hypoglosses (XII) intégrées pendant les déglutitions post-inspiratoires (I-Sw-Exp, $n = 10$) et, (B) les déglutitions expiratoires (Exp-Sw-Exp) pendant la période contrôle pour chaque conditions. Les lignes pointillées verticales permettent d'identifier les portions correspondants aux traces respiratoires et/ou déglutitrices pendant les déglutitions I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp. Dans tous les cas, les décharges XII inspiratoires et déglutitrices ont été facilement identifiées, permettant de définir le début (flèche creuse) et la fin de la décharge déglutitrices XII. On remarque que les durées des décharges déglutitrices XII en A et B illustrées par un rectangle bleu et rouge (I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp, respectivement) sont identiques. Cependant, l'activité X associée aux déglutitions I-Sw-Exp chevauche partiellement l'activité motrice post-inspiratoire (E1) X. L'utilisation des lignes pointillées verticales entre l'activité motrice X E1 et I-Sw-Exp biaise l'identification du début de la décharge motrice I-Sw-Exp X et produit en une diminution artéfactuelle de la durée de la décharge I-Sw-Exp X. (C) Une méthode graphique a été utilisée afin de mieux estimer le début de la décharge I-Sw-Exp X. La phase montante de la décharge I-Sw-Exp X a été utilisée afin de tracer une tangente (ligne pointillée oblique) jusqu'à la ligne de base de l'enregistrement (ligne pointillée horizontale). Le point de croisement de ces deux lignes a été défini comme point de départ de la décharge I-Sw-Exp X (flèche noire) et utilisé pour reconstruire la décharge I-Sw-Exp X afin de calculer son AUC. Les décharges Exp-Sw-Exp X et XII (tracé rouge) ont été superposées sur les décharges I-Sw-Exp afin de les comparer uniquement. On remarque que la durée des décharges et les AUC sont alors similaires quel que soit le type de déglutition.

Différents critères ont été utilisés afin d'identifier et quantifier précisément les paramètres respiratoires et déglutiteurs depuis les enveloppes intégrées des signaux nerveux. Tout d'abord, les déglutitions étaient caractérisées par les décharges concomitantes des nerfs crâniens, avec une légère précession de la décharge XII, correspondant à la séquence motrice physiologique. Ensuite, les décharges déglutitrices non associées aux décharges Phr, X et XII sont appelées déglutitions expiratoires (Exp-Sw-Exp), les déglutitions immédiatement précédées de la post-inspiration (ou expiration précoce) sont appelées déglutitions post-inspiratoires (I-Sw-Exp), et les déglutitions précédant directement l'activité inspiratoire Phr sont appelées déglutitions pré-inspiratoires (Exp-Sw-I). Le début des décharges I-Sw-Exp est toujours marqué par une indentation claire du signal intégré XII. Une autre indentation était retrouvée sur le signal intégré X au début des déglutitions I-Sw-Exp. Cette indentation est toujours précédée du pic de décharge respiratoire et suivi d'un autre pic correspondant à la décharge déglutitrice. Une méthode semi-automatique de seuillage était appliquée à chaque signal intégré afin de détecter et marquer le signal montant et/ou le pic de chaque décharge respiratoire et déglutitrice (Offline Sorter, Plexon Inc., Dallas, TX, USA Ver2). Ces marques étaient ensuite utilisées afin de calculer les enveloppes moyennes et de mesurer la durée des décharges et cycles (en seconde), l'amplitude et l'aire sous la courbe (AUC) en unité arbitraire (NeuroExplorer, Plexon Inc., Dallas, TX, USA Ver3.266).

La **Figure 22** permet d'illustrer la méthode utilisée pour quantifier les décharges motrices déglutitrices. La durée totale et l'AUC de tous les types de déglutitions (I-Sw-Exp, Exp-Sw-Exp et Exp-Sw-I) sont toujours calculés à l'aide du début de la décharge motrice intégrée XII et la fin de la décharge motrice intégrée X (**Figure 22**). A cause du chevauchement entre l'activité nerveuse respiratoire et déglutitrice du nerf X lors des déglutitions I-Sw-Exp, une méthode originale a été conçue afin d'obtenir une mesure précise de la durée et de l'AUC des décharges nerveuses X pendant les déglutitions I-Sw-Exp

(Figure 22-A). En effet, nous avons observé que si on utilisait le début visible de la décharge motrice déglutitrice X comme marqueur du début de la déglutition X, des réductions d'AUC et de durée des déglutitions étaient obtenus lorsqu'on comparait des déglutitions I-Sw-Exp et les déglutitions Exp-Sw-Exp sur le nerf X (Figure 22-B). Cette différence est considérée comme étant un artefact car la durée et l'AUC des décharges motrices déglutitrices XII et la durée totale des déglutitions étaient similaires en fonction des types de déglutitions. Ainsi, une méthode graphique a été utilisée afin d'estimer le début réel de la décharge motrice déglutitrice X (Figure 22-C). La phase montante de la décharge intégrée X des déglutitions I-Sw-Exp a été utilisée afin de tracer une ligne tangente à celle-ci, allant du pic jusqu'à la ligne de base. Le point où les lignes se croisent (la tangente et la ligne de base) a été utilisé pour définir le début de la décharge motrice déglutitrice X. Le résultat de cette méthode graphique a produit une enveloppe triangulaire délimitant la décharge motrice X d'une déglutition I-Sw-Exp ayant permis des mesures de durée et d'AUC consistantes avec celles faites sur les autres types de déglutitions.

Résultats

Chapitre 1 : Effets d'un agoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2a} sur la déglutition *in situ*

I. Introduction

Malgré de nombreuses études expérimentales et cliniques, la déglutition, qui est l'une des fonctions les plus importantes, reste néanmoins très peu connue ([Altman 2013](#)). Les dysfonctionnements du générateur central de la déglutition du tronc cérébral (CPGd) et d'autres structures bulbaires ou supra-bulbaires peuvent être un facteur important de dysphagie oropharyngée, une maladie grave dont la physiopathologie neuronale reste mal comprise ([Suntrup et al, 2013](#); [Miller 2017](#); [Costa 2018](#)). Des investigations neurophysiologiques ont identifié le noyau du tractus solitaire (NTS) comme une structure clé du tronc cérébral responsable de la phase pharyngée de la déglutition ([Bieger 2001](#); [Jean 2001](#)), mais la localisation exacte des neurones du CPGd n'est pas encore confirmée. De plus, les mécanismes neuronaux précis expliquant le fonctionnement normal du CPGd sont mal connus et les interactions entre le générateur central de la respiration (CPGr) et le CPGd ne sont pas entièrement caractérisées ([Gestreau et al, 2005](#); [Horton et al, 2018](#)). Ce manque de connaissances peut s'expliquer par la complexité des circuits du tronc cérébral, le manque d'informations sur les phénotypes des neurones CPGd et leurs mécanismes neuromodulateurs. De plus, les protocoles expérimentaux et/ou les modèles animaux nécessaires pour étudier la coordination de la déglutition et de la respiration sont généralement complexes, longs et coûteux ([Dick et al, 1993](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Roda et al, 2002](#); [2004](#); [Horton et al, 2018](#)). Dans certaines études, la préparation perfusée cœur-tronc cérébral isolé (ou *in situ*) a été utilisée comme modèle expérimental avantageux pour étudier la déglutition et enregistrer l'activité neuronale du tronc cérébral ([Bautista et al, 2014](#); [Fuse et al, 2020](#)). Cependant, peu de déglutitions spontanées sont produites *in situ* ([Bautista et al, 2014](#)). Plusieurs méthodes ont donc été utilisées pour déclencher la déglutition, telles que la stimulation mécanique de la

cavité oropharyngée ([Paton et al, 1999](#)), l'injection manuelle ou à l'aide d'un système de perfusion d'eau dans la cavité buccale ([Bautista et al, 2014](#); [Tsuji et al, 2020](#); [Yamamoto et al, 2021](#)), ou encore la stimulation électrique des nerfs laryngés supérieurs ([Hashimoto et al, 2019](#); [Fuse et al, 2020](#)). En revanche, aucune méthode pharmacologique n'a été testée *in situ* afin d'augmenter l'apparition de la déglutition sur une période assez longue.

Des études antérieures *in vivo* ont identifié une région précise dans le NTS où l'injection de glutamate, ou d'agonistes glutamatergiques agissant fortement sur les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) ou non-NMDA (kainate ou quisqualate), ont provoqué des déglutitions rythmiques et une apnée centrale ([Jean 2001](#); [Kessler et Jean 1991](#)). Cette région, appelée également « zone de déclenchement » de la déglutition, correspondrait aux terminaisons glutamatergiques des fibres afférentes des voies aériennes supérieures formant des synapses sur les interneurons du CPGd ([Jean 2001](#)). Un déclenchement de la déglutition a également été observé après injection périphérique ou centrale d'agonistes sérotoninergiques ([Bieger 1981](#); [Hashim et Bieger 1987](#)). Il est intéressant de noter que Bieger et collaborateurs avaient suggéré que des composés tels que la quipazine (QPZ), un agoniste sérotoninergique ayant une affinité et une sélectivité principales pour les récepteurs 5-HT_{2a}, exerçait un effet stimulateur central au niveau du NTS ([Bieger 1981](#)). Ces auteurs avaient également montré que contrairement aux effets du glutamate, l'injection de la QPZ *in vivo* produisait des déglutitions uniques ou « isolées » et une augmentation de la fréquence des déglutitions sur une longue période ([Bieger 1981](#); [Hashim et Bieger 1987](#)).

Or ce type de déglutition isolée et cette méthode pharmacologique d'induction de la déglutition représentent une condition optimale pour étudier l'interaction déglutition-respiration et une bonne alternative pour évoquer la déglutition ([Horton et al, 2018](#)). En accord avec un rôle de la 5HT dans le contrôle de la déglutition ([Bieger 1981](#)), des travaux récents ont indiqué que des souris présentant un déficit central en 5-HT avaient un taux de

déglutition inférieur à celui des animaux témoins ([Haney et al. 2019](#)). Cependant, dans d'autres études, des effets inhibiteurs des agonistes sérotoninergiques sur la déglutition, y compris la QPZ, ont été également rapportés ([Kessler et Jean 1985, 1986](#)). Ainsi, des expériences antérieures *in vivo* sur le contrôle sérotoninergique de la déglutition ont conduit à des données contradictoires. Ces effets opposés ont été interprétés comme résultant de variations de concentrations médicamenteuses et de protocoles d'anesthésie entre les différentes études ([Hashim et Bieger 1987](#)). Nous avons émis l'hypothèse que la QPZ, à une dose similaire à celle utilisée *in vivo* ([Bieger 1981](#)), pouvait stimuler la déglutition sur la préparation perfusée *in situ* chez le rat adulte, laquelle ne nécessite aucune anesthésie ([Paton et al. 1999](#); [St-John et Paton 2000](#)). Les objectifs de notre étude étaient 1) d'étudier les effets de la QPZ sur la déglutition et la respiration *in situ*, 2) de comparer les patterns moteurs de la déglutition et la relation de phase entre la déglutition et la respiration, avec les déglutitions spontanées et celles induites par la QPZ, et enfin, 3) d'identifier les noyaux du tronc cérébral médiateurs de l'effet stimulant de la QPZ sur la déglutition.

Identifier à la fois les structures neuronales et les neurotransmetteurs (ou neuromodulateurs) impliqués dans la déglutition représente un défi pour mieux comprendre cette fonction importante et explorer des pistes thérapeutiques potentielles pour traiter les patients souffrant de troubles de la déglutition ([Altman 2013](#); [Benarroch 2014](#); [Miller 2017](#); [Simons 2017](#); [Costa 2018](#); [Do et al. 2020](#)).

II. Matériels et méthodes

A. Modèle expérimental

Toutes les expériences ont été réalisées sur la préparation perfusée *in situ* chez le rat Wistar (P15-21 ; n=42 ; 50-110g ; Janvier Labs, Le Genest St Isle, France). La procédure expérimentale a été décrite en détail dans le chapitre Matériels et Méthodes commun.

B. Induction pharmacologique de la déglutition

Peu de déglutitions spontanées sont observables *in situ* ([Bautista et al, 2014](#)). Pour augmenter le nombre de déglutitions *in situ*, nous avons utilisé une méthode pharmacologique précédemment décrite chez le rat *in vivo* ([Bieger 1981](#)). Celle-ci consiste à administrer par voie systémique un agoniste sérotoninergique : la quipazine (QPZ, maléate de quipazine, Sigma). La concentration de cette drogue a d'abord été évaluée dans des expériences préliminaires en faisant varier la dose de QPZ dissoute dans le LCra (plage de 0,5 à 10 $\mu\text{M/Kg}$). La fréquence de déglutition a été augmentée avec des concentrations variant de 1 et 2 $\mu\text{M/Kg}$, des doses plus élevées n'ont pas produit d'effets plus forts ou plus longs. Par conséquent, nous avons choisi une concentration de 1,5 $\mu\text{M/Kg}$ de QPZ pour nos expériences. Cette concentration optimale trouvée dans notre étude préliminaire correspond également aux doses utilisées *in vivo* ([Bieger 1981](#)).

Afin d'évaluer la faible production de déglutitions spontanées en condition contrôle (c'est-à-dire sans drogue), le nombre de déglutitions a été compté chez chaque rat pendant 10 ou 15 minutes. La fréquence de déglutition moyenne a été calculée par intervalles de 5 min et exprimée en nombre de déglutitions par min. Après cette période contrôle, la QPZ a été ajoutée dans le LCra (injection systémique) et le nombre de déglutitions a été compté sur 15 à 20 min. Comme précédemment, les résultats ont également été exprimés en fréquence moyenne de déglutitions (ou SR pour swallow rate), calculée par intervalles de 5 min.

D'autres expériences (n=5) ont été réalisées afin de tester la capacité du méthysergide (bimaléate de méthysergide, Sigma ; 1 μ M/kg dans LCra), un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, à bloquer la déglutition induite par la QPZ. Dans ces expériences, après une période contrôle initiale de 10 à 15 minutes, la QPZ a été injectée dans la circulation systémique, puis le SR a été calculé sur 5 minutes. Ensuite, le méthysergide a été ajouté au perfusât et le SR a été calculé sur 15 à 20 minutes après l'injection.

Deux séries d'expériences ont été conçues afin d'étudier les effets centraux de la QPZ sur la déglutition. Dans la première série, nous avons effectué des micro-injections de QPZ (3 mM, 50-200 nl) dans le NTS (n=5) à l'aide d'un nano-injecteur (WPI, USA) monté sur un micromanipulateur (nanostepper) connecté à un microcontrôleur permettant d'ajuster le débit et le volume d'injection (5-10 nl/s, WPI, USA). Le bon positionnement de la pipette dans la zone de déclenchement de la déglutition du NTS a d'abord été testé par micro-injection de N-méthyl-D-aspartate (NMDA, 1 mM, 10-50 nl ; n = 5), comme indiqué dans une étude précédente (Kessler et Jean, 1991). Étant donné que le NMDA, mais pas la QPZ, induisait de la déglutition, nous n'avons pas quantifié le SR dans cette série. Dans la deuxième série, nous avons cartographié les effets des micro-injections de QPZ (3 mM, 50-100 nl) dans les noyaux caudaux du raphé bulbaire (n = 15). Dans ces expériences, le contrôle SR a été mesuré pendant 15 min avant le protocole d'injection. Le nano-injecteur a été positionné perpendiculairement au plancher du quatrième ventricule puis déplacé le long de la ligne médiane de 1 à 3 mm rostral à l'obex avec des pas de 0.5mm. Ensuite, la pipette a été insérée à travers l'axe dorso-ventral du bulbe rachidien à des profondeurs comprises entre 1.25 et 2.25-2.75 mm sous la surface, avec des pas de 0.5mm. Pour chaque rat, plusieurs descentes ont été effectuées à différentes positions le long de la ligne médiane. Une seule descente a été réalisée à une position médiane donnée, et 3 à 4 injections ont été réalisées par descente. Une seule injection a été faite à une profondeur donnée, et un délai de 5 min a toujours été respecté

entre 2 injections. Ce délai a été choisi car nous avons remarqué un effet de courte durée au cours des expériences qui a été confirmé par les analyses hors ligne.

Pour chaque site d'injection, les résultats sont rapportés de manière binaire, c'est-à-dire par un « succès » ou un « échec » d'augmentation du SR pendant la première minute post-injection (bien que le SR ait également été mesuré sur la période de 5 minutes post-injection). Ainsi, chaque « succès » ou « échec » a été déterminé sur la base d'une seule micro-injection. Pour les injections réussies, la latence entre la fin de l'injection et l'apparition de la première déglutition a également été déterminée. Toutes les injections « succès » observées chez un individu ont été utilisées pour calculer le SR et la latence moyenne jusqu'à la première déglutition. Afin d'évaluer davantage la capacité de la QPZ à induire la déglutition sur un site donné, le nombre total d'injections faites au même site chez différents rats a été calculé, en prenant en compte le nombre de succès et/ou d'échecs pour ce même site. Chaque site a été représenté « sous forme de camembert » avec une couleur différente pour représenter les succès ou les échecs, et une taille différente pour rendre compte du nombre total d'injections. Pour les sites contenant à la fois des réussites et des échecs, les zones colorées dans les camemberts représentent les pourcentages de réussites et d'échecs.

C. Protocole expérimental

Pour chaque expérience, les paramètres liés à la respiration fictive, la fonction cardiovasculaire (la pression artérielle, PA ; la fréquence cardiaque dérivée de l'ECG) et la déglutition fictive ont été enregistrés environ 45 minutes après le début de la reperfusion. Les paramètres cardiorespiratoires contrôles et le taux de déglutitions spontanées ont été mesurés sur une période d'enregistrement initiale de 15 minutes. Ensuite, les paramètres ont été enregistrés sur une période plus longue (~30-45 min) afin d'analyser les effets des injections de QPZ et les effets du méthysergide sur les fonctions cardiorespiratoires et de déglutitrices.

D. Variables analysées

Les activités intégrées des nerfs Phr, X et XII ont été utilisées afin de mesurer les décharges motrices respiratoires et déglutitrices (durée totale de l'activité de décharge, amplitude du pic, aire sous la courbe, et le délai entre les débuts et les pics des décharges des nerfs XII et X, comme décrit précédemment) ([Roda et al, 2004](#); [Wang et al, 2013](#); [Horton et al, 2018](#)). Dans l'ensemble, les analyses ont été effectuées en utilisant des déglutitions spontanées (n = 233) et induites par la QPZ (n = 307) obtenues chez les mêmes animaux (n = 16). La durée des déglutitions a été définie comme étant l'intervalle entre le début de l'activité de décharge motrice déglutitrice du nerf XII et la fin de l'activité de décharge motrice déglutitrice du nerf X. Pour l'analyse de la coordination respiration-déglutition dans les conditions contrôle et QPZ, la durée du cycle respiratoire normal a d'abord été calculée à partir d'au moins 15 cycles respiratoires successifs sans déglutition. Étant donné que les déglutitions spontanées et induites par la QPZ ont toujours induit des déglutitions isolées et non répétitives (voir les résultats), l'occurrence de chaque déglutition isolée a été marquée dans chaque cycle respiratoire contenant une déglutition (c'est-à-dire un cycle de respiration-déglutition). Les analyses de la relation de phase entre la respiration et la déglutition ont été effectuées comme décrit récemment ([Horton et al, 2018](#)). La durée des phases inspiratoire et expiratoire des cycles respiration-déglutition a été mesurée et normalisée par rapport aux valeurs contrôle. Par conséquent, l'occurrence de chaque déglutition a été exprimée en pourcentage de la durée contrôle normalisée de la phase inspiratoire ou expiratoire de la respiration. Les déglutitions qui apparaissent entre 0 et 20 % de la durée expiratoire normalisée ont été étiquetées déglutitions post-I, tandis que les autres survenant plus tard au cours de la phase expiratoire (c'est-à-dire entre 21 et 100 % de la durée expiratoire normalisée) ont été étiquetées déglutitions Exp, comme précédemment décrit ([Horton et al, 2018](#)).

E. Analyses statistiques

Les résultats ont été moyennés par animal et par groupe. L'amplitude et l'aire sous la courbe (AUC) des activités nerveuses intégrées, ainsi que la durée de l'inspiration et de l'expiration des cycles respiration-déglutition, ont été normalisées. La normalité des valeurs a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les variables à distribution normale ont été analysées à l'aide de t-tests appariés ou d'une analyse de variance (ANOVA), lorsque deux ou trois groupes ont été comparés, respectivement. Lorsque la normalité n'était pas vérifiée, les variables continues étaient comparées à l'aide du test de Wilcoxon apparié non paramétrique ou du test de Kruskal-Wallis (suivi des tests post-hoc de Dunn). Un test du Chi² de Pearson avec la correction de continuité de Yates a été utilisé pour comparer la distribution des déglutitions dans le cycle déglutition-respiration entre les groupes témoins (déglutitions spontanées) et QPZ pour un tableau de contingence 2x2. Les comparaisons des SR obtenues dans les groupes contrôle, QPZ et méthysergide ont été réalisées avec un test ANOVA suivi par les tests post-hoc de Dunnett. Les tests de corrélation de Pearson ont été utilisés pour comparer l'ampleur du changement de SR avec le changement de la Rf ou de la PA provoqué par la QPZ. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type (SD) ; les valeurs étaient considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$.

III. Résultats

A. Effets systémiques de la QPZ sur les paramètres cardiorespiratoires

Les données moyennes des groupes ont montré que l'injection systémique de QPZ (1.5 μ M/kg) augmentait significativement la fréquence respiratoire (Rf) (23 ± 9 vs 30 ± 17 cycles/min, respectivement dans les groupes contrôle vs QPZ ; $p < 0.05$). Cet effet n'était pas cohérent entre les animaux puisqu'aucun changement évident (4/16) ou une diminution de la Rf (4/16) a été observé. Des changements variables de la Rf ont été observés 108 ± 36

secondes après l'injection et ont duré environ 18 minutes. L'augmentation moyenne de la Rf était associée à des diminutions non significatives des durées inspiratoire et expiratoire par rapport aux valeurs contrôle (0.78 ± 0.32 vs 0.76 ± 0.25 s pour l'inspiration, $p = 0.72$ et 1.98 ± 0.9 vs 1.74 ± 0.99 s pour l'expiration, $p = 0.48$). La QPZ systémique a augmenté significativement la pression artérielle (PA) de 25 ± 12 % (87 ± 43 vs 109 ± 61 mmHg respectivement dans les groupes contrôle vs QPZ; $p < 0.001$). Cet effet hypertenseur était constant chez tous les animaux, détecté 69 ± 27 secondes après l'injection et a duré jusqu'à 30 minutes après l'injection. L'injection systémique de QPZ n'a provoqué aucun effet sur la fréquence cardiaque (345 ± 51 vs 341 ± 45 bpm, respectivement dans les groupes contrôle vs QPZ; $p = 0.73$).

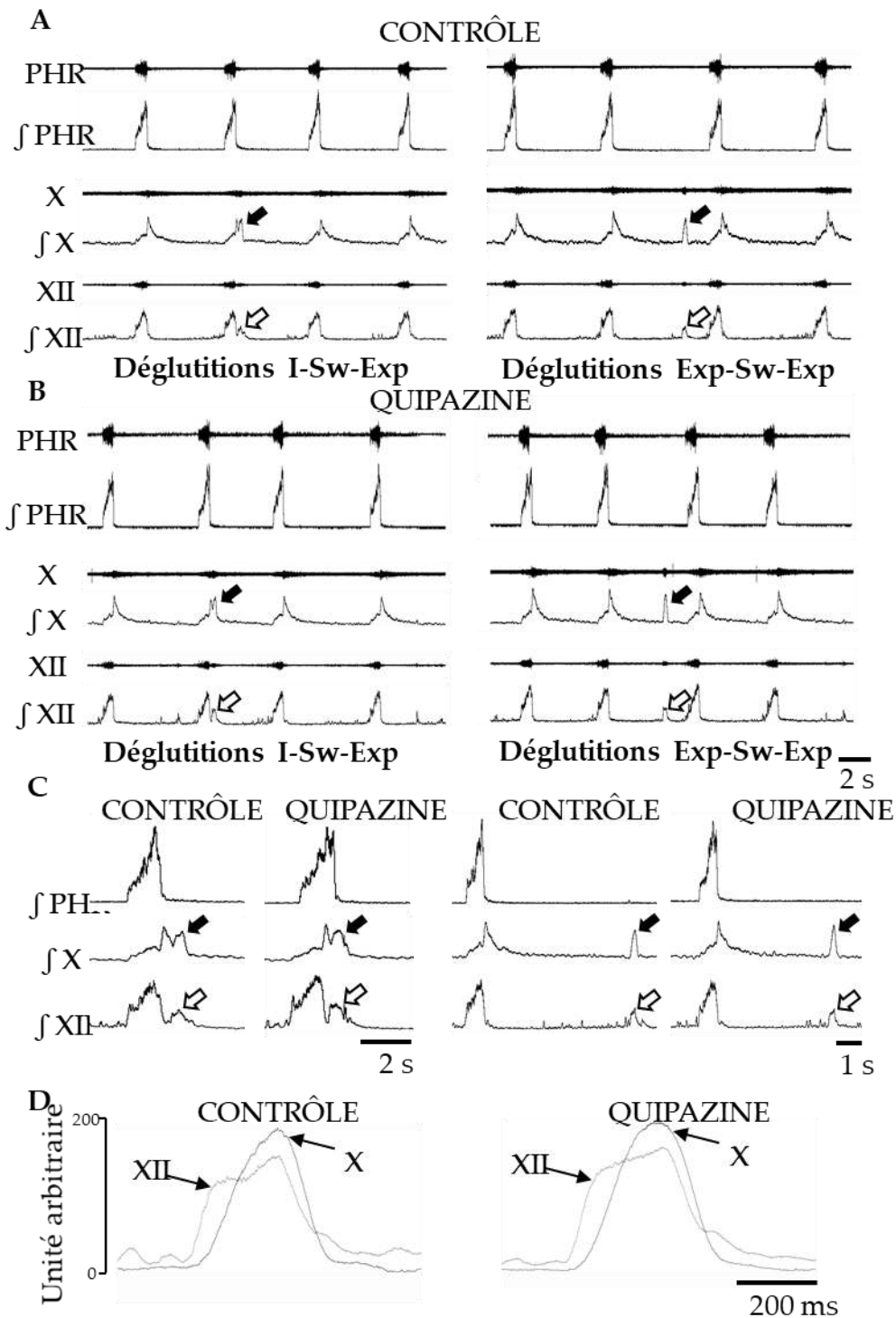


Figure 23 : Caractérisation des déglutitions contrôle et induite après injection systémique de Quipazine (QPZ ; 1.5 μ M/kg dans l'aCSF). (A) Tracés montrant une activité respiratoire et des déglutitions isolées dans les conditions contrôle et QPZ. Deux types de déglutition sont identifiés sur la base des activités nerveuses vagale (X) et hypoglosse (XII) et du moment d'apparition de la déglutition dans le cycle respiratoire : la déglutition de type post-inspiratoire (I-Sw-Exp) et de type expiratoire (Exp-Sw-Exp). (B) Comparaison des déglutitions I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp au cours d'un cycle respiratoire dans les conditions contrôle et QPZ. Notez que les déglutitions Exp-Sw-Exp sont toujours précédées et suivies d'une pause expiratoire. (C) Exemple de décharges moyennes (intégrées) des nerfs X et XII pendant la déglutition de type Exp-Sw-Exp (n = 5) dans les conditions contrôle et QPZ. Les patterns de décharges observés lors de la déglutition sont identiques dans les deux conditions. Aussi, les délais mesurés entre le début de l'activité du nerf XII et celui du nerf X sont les mêmes dans les deux conditions. PHR : activité du nerf phrénique.

B. Caractérisation des déglutitions

Tous les rats analysés dans cette étude présentaient des patterns respiratoires eupnéiques au début des enregistrements et affichaient des déglutitions spontanées pendant toute la période de contrôle qui a duré 15 minutes (**Figure 23-A**). Ces événements spontanés ont toujours été isolés au cours du cycle respiratoire (une seule déglutition s'est produite par cycle) (**Figure 23-AB**) ; ils étaient caractérisés par des décharges motrices déglutitrices typiques sur le nerf hypoglosse (XII) et vague (X), associées à une activité phrénique nulle ou très faible (**Figure 23; Tableau 1**). La déglutition a été constamment observée après l'injection systémique de QPZ à une concentration finale de 1.5 $\mu\text{M/kg}$ dans le LCRA. De manière similaire aux phénomènes spontanés, toutes les déglutitions provoquées après injection de QPZ ont été isolées (**Figure 23-A**). La durée des déglutitions ne différait pas entre les conditions contrôle et QPZ (0.53 ± 0.11 vs 0.52 ± 0.14 , respectivement, $p = 0.43$, tableau S5). Des comparaisons plus détaillées de la durée, de l'amplitude et de l'aire sous la courbe (AUC) des décharges liées à la déglutition hypoglosse (XII) et vague (X), ainsi que du délai entre les débuts des décharges XII et X, ont été effectuées dans toutes les conditions. Tous les paramètres n'ont pas changé de manière significative entre les deux groupes (**Figure 23-C; Tableau 1**).

Tableau 1. Quantification des décharges liées à la déglutition

	Nerf Hypoglosse		Nerf Vague		
	Contrôle	QPZ	Contrôle	QPZ	
Amplitude normalisée (%)	100	101 ± 19	100	97 ± 9	ns
Aire sous la courbe normalisée (%)	100	107 ± 19	100	98 ± 13	ns
Duration (s)	0.56 ± 0.12	0.51 ± 0.14	0.43 ± 0.08	0.43 ± 0.06	ns

Les données sont exprimées en moyenne ± SD, ns : non significatif, test de rang signé par paires appariées de Wilcoxon ou test t apparié pour les données non paramétriques ou paramétriques, respectivement.

C. La QPZ systémique augmente le taux de déglutition *in situ*

Les déglutitions spontanées ont été observées à un rythme lent (0.5 ± 0.4 déglutition par min ou dég/min) sans changement significatif au cours de la période de contrôle de +15 min (**Figure 24**). Le taux de déglutition (SR) a été significativement augmenté 105 ± 28 secondes après l'injection de la QPZ, avec un effet maximal environ 5-6 minutes après l'injection de la drogue (**Figure 24-A**). Cette augmentation a duré 15 min, et le SR moyen sur cette période était de 2.3 ± 0.8 dég/min ($p < 0.001$). L'ampleur de l'augmentation du SR était variable entre les animaux, comme en témoignent les valeurs d'écart-type sur la **Figure 24-A**.

Cela a également été révélé dans les rapports des moyennes individuelles (de 1.1 à 28) ou les moyennes moyennées (8.5 ± 7.6), un autre indice de l'ampleur du changement du SR dans toutes les conditions. Nous avons en plus déterminé si cette variabilité des réponses à la QPZ pouvait être attribuable aux changements de la Rf et/ou de la PA mesurés chez les mêmes animaux. Ce n'était pas le cas, comme l'a révélé l'absence de corrélation significative entre l'ampleur de l'augmentation du SR et les changements de la Rf ($r = 0.358$; $p = 0.20$) ou

de la PA ($r = 0.519$; $p = 0.06$). D'autres expériences ont été menées pour vérifier la spécificité des réponses suscitées par la QPZ ($n=5$). Dans ces expériences, les déglutitions spontanées ont d'abord été enregistrées pendant 15 min (période de contrôle), puis la QPZ (1.5 M/kg) a été ajoutée dans le LCRA et le SR a été mesuré pendant 5 min. Enfin, l'antagoniste des récepteurs 5-HT₂ méthysergide (Methy, 1 μ M/kg) a également été ajouté dans le LCRA et le SR a été mesuré pendant 15 min supplémentaires. Des comparaisons multiples ont montré une différence significative entre les trois conditions ($p < 0.05$; **Figure 24-B**).

Une augmentation significative du SR a été trouvée chez les animaux injectés avec la QPZ seule ($p < 0.05$ pour les deux comparaisons), alors que le SR n'a pas changé entre les conditions de contrôle et de Methy ($p = 0.99$; **Figure 24-B**). Par conséquent, l'effet stimulant observé avec la QPZ seule a été inhibé par le méthysergide.

D. Coordination respiration-déglutition et effet de la déglutition sur l'activité respiratoire centrale

Les analyses de relation de phase entre la déglutition et la respiration ont été effectuées en utilisant des déglutitions isolées spontanées ($n=182$) et induites par la QPZ ($n=229$) (**Figure 25-A**). Dans les deux cas, aucune déglutition n'est survenue lors de l'inspiration centrale. La plupart des déglutitions (~85 %) correspondaient aux déglutitions I-Sw-Exp (**Figure 25-A**). De plus, aucune déglutition Exp-Sw-Exp n'est apparue à la transition de phase expiration-inspiration, comme en témoigne l'absence d'événements dans la dernière partie de la phase expiratoire du cycle respiration-déglutition normalisé (voir la portion 81-100% de ce cycle) (**Figure 25-A**). Ainsi, chaque déglutition expiratoire était précédée et suivie d'une expiration, comme indiqué sur les tracés électrophysiologiques (**Figure 23-AB**). La distribution des déglutitions I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp au cours du cycle respiratoire n'a pas changé selon les conditions ($X^2(1) = 0.79$, $p = 0.38$). *In vivo*, les déglutitions I-Sw-Exp

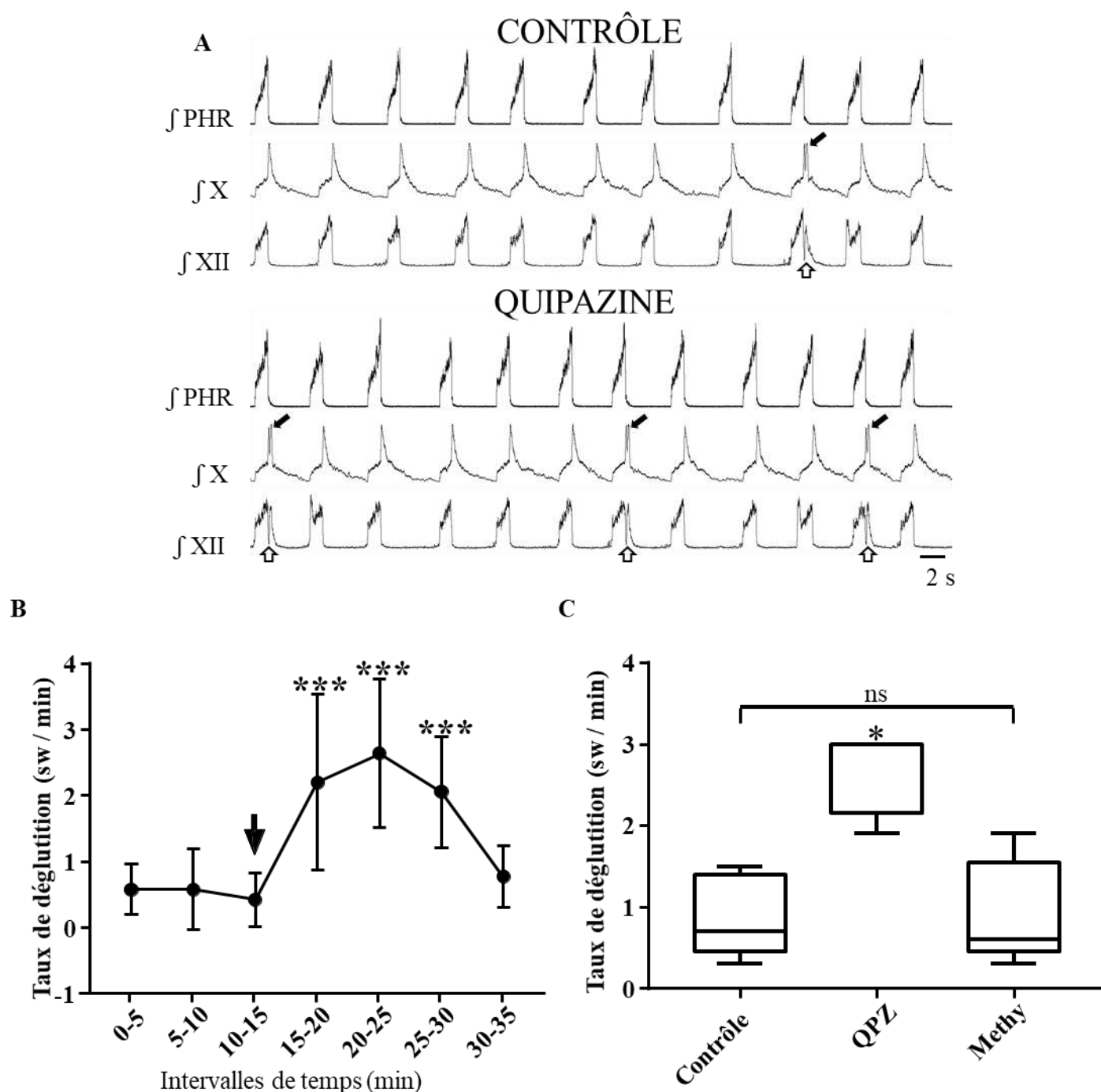


Figure 24 : Effet de la quipazine systémique (QPZ, 1.5 μ M/kg) sur la déglutition et son blocage par le méthysergide (Methy, 1 μ M/kg). (A) Exemple de tracés nerveux d'une minute environ obtenus en condition contrôle et QPZ. Le taux de déglutition, exprimé en déglutitions par min (sw/min) par intervalles de 5 min, a été mesuré 15 min avant (contrôle) et 20 min après l'injection de la quipazine (QPZ ; flèche). La QPZ provoque une augmentation significative de la fréquence de déglutition (test de Kruskal-Wallis, $p < 0.001$). (B) La fréquence de déglutition, d'abord stable au cours des 15 minutes de la période contrôle), augmente significativement pendant 15 minutes après l'injection de QPZ (***) : $p < 0.001$). (C) Le méthysergide bloque l'effet excitateur de la QPZ sur la déglutition. Les taux de déglutition sont d'abord mesurés pendant 15 min en condition contrôle, pendant 5 min après l'injection systémique de la QPZ puis pendant 15 min après l'ajout de Methy dans le LCRA. Une ANOVA à un facteur indique une différence significative entre les conditions ($F = 22.9$, $p < 0.01$). Par rapport aux valeurs contrôle, le taux de déglutition après injection de QPZ est significativement augmenté ($p < 0.05$), tandis que le taux de déglutition mesuré après injection de Methy ne diffère pas ($p = 0.87$).

mettent fin de façon prématurée à la décharge phrénique précédente sans affecter la phase expiratoire centrale, tandis que les déglutitions Exp-Sw-Exp prolongent l'expiration sans affecter la phase inspiratoire centrale ([Saito et al, 2002](#); [Horton et al, 2018](#)).

Pour effectuer des analyses similaires de la relation entre la déglutition et la respiration centrale *in situ*, nous avons mesuré les effets des déglutitions I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp sur les phases inspiratoire et expiratoire des cycles de respiration-déglutition dans toutes les conditions. Contrairement aux études mentionnées ci-dessus, nos résultats ont montré que les déglutitions I-Sw-Exp ou Exp-Sw-Exp ne modifiaient pas significativement la durée de l'inspiration ou de l'expiration, que les déglutitions soient spontanées ou induites par QPZ (**Figure 25-B**).

E. Effets des injections pharmacologiques centrales sur la déglutition

Les expériences de micro-injection ont d'abord ciblé le NTS (n = 6), une structure clé impliquée dans la déglutition et probablement la médiation des effets de la sérotonine ([Bieger 1981](#); [Hashim et Bieger 1987](#)). Pour identifier la zone de déclenchement de la déglutition dans le NTS, de l'aspartate de N-méthyl D (NMDA, 1 mMol, 10-50nl) a d'abord été injecté (**Figure 26**). Ensuite, la pipette contenant le médicament a été retirée et le NMDA a été remplacé par de la QPZ (3mM, 50-200nl). Après repositionnement de la pipette aux mêmes coordonnées, la QPZ a été injectée dans le NTS (n=6 ; **Figure 26-A**). Toutes les micro-injections de NMDA ont entraîné des déglutitions répétitives et une apnée centrale (**Figure 26-B**). En revanche, aucune déglutition n'a pu être observée lorsque la QPZ a été micro-injectée dans la zone de déclenchement de la déglutition du NTS (données non présentées). Cela est resté vrai même après des injections répétées (2 fois) du volume le plus élevé (200nl) à une minute d'intervalle, ou après avoir augmenté la concentration de la drogue à 5mM.

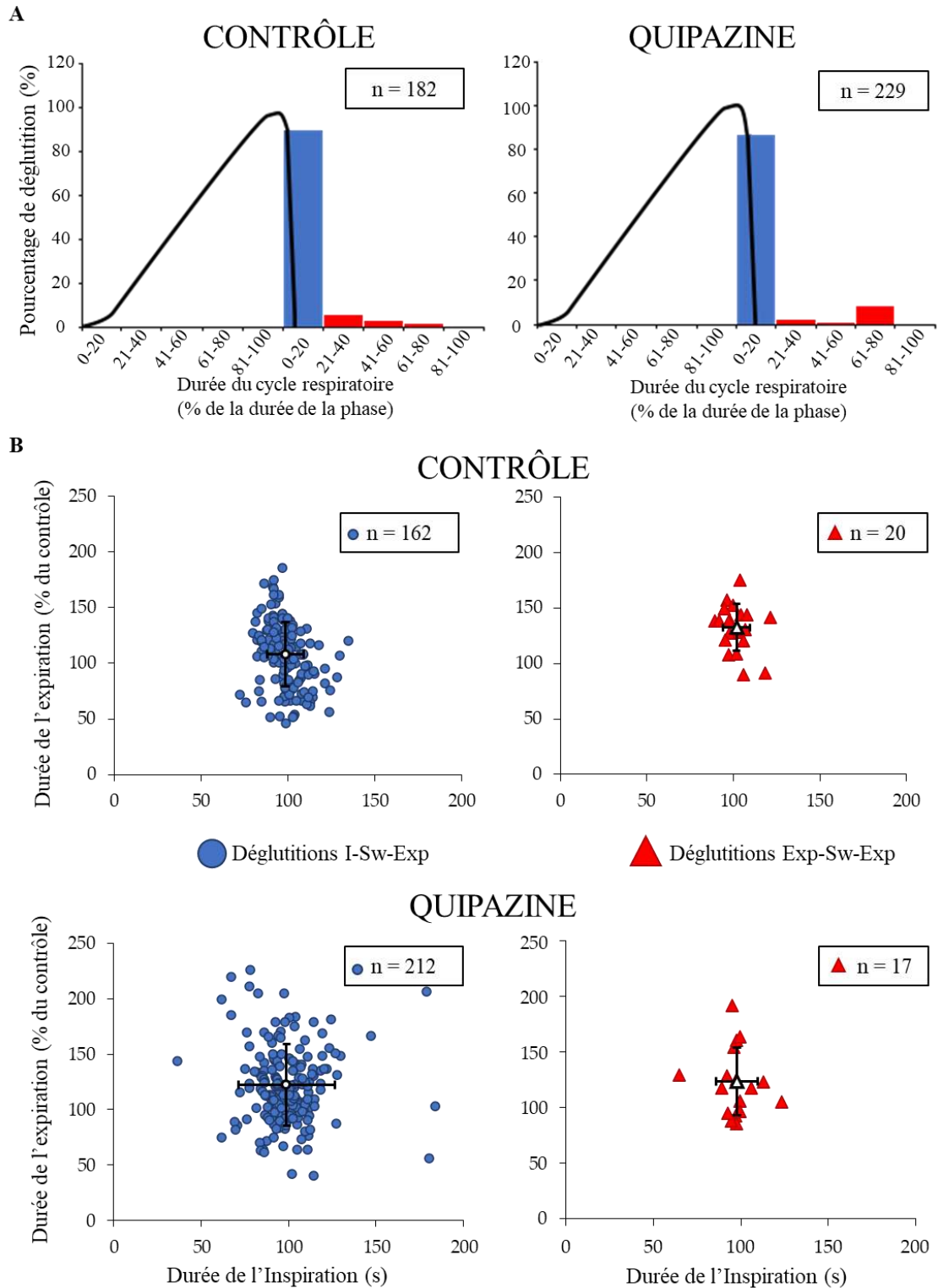


Figure 25 : Répartition des déglutitions dans le cycle respiratoire et effets de la déglutition sur la respiration centrale. (A) Les histogrammes montrent l'occurrence des déglutitions isolées dans des cycles respiratoires normalisés, où les phases inspiratoire et expiratoire sont représentées par centile. Le modèle d'une enveloppe phrénique contrôle dérivé du signal du nerf phrénique intégré moyenné pendant la respiration fictive (ligne grise) a été superposé au graphique pour mieux représenter la partie inspiratoire de l'activité respiratoire centrale. Notez qu'aucune déglutition ne s'est produite pendant l'inspiration. (B) Effets des déglutitions I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp sur la durée du cycle respiratoire pour toutes les conditions. Pour chaque type de déglutition et pour chaque condition (contrôle ou quipazine), les phases inspiratoires et expiratoires des cycles respiratoires contenant une déglutition ont été normalisées et comparées aux valeurs obtenues au cours des cycles respiratoires contrôle. Il n'y avait pas de diminution significative de la durée de la phase inspiratoire précédant une déglutition I-Sw-Exp, et aucun allongement significatif de la durée de la phase expiratoire associée aux déglutitions Exp-Sw-Exp dans les deux conditions. Les nombres dans les cases représentent le nombre de déglutitions analysées par condition.

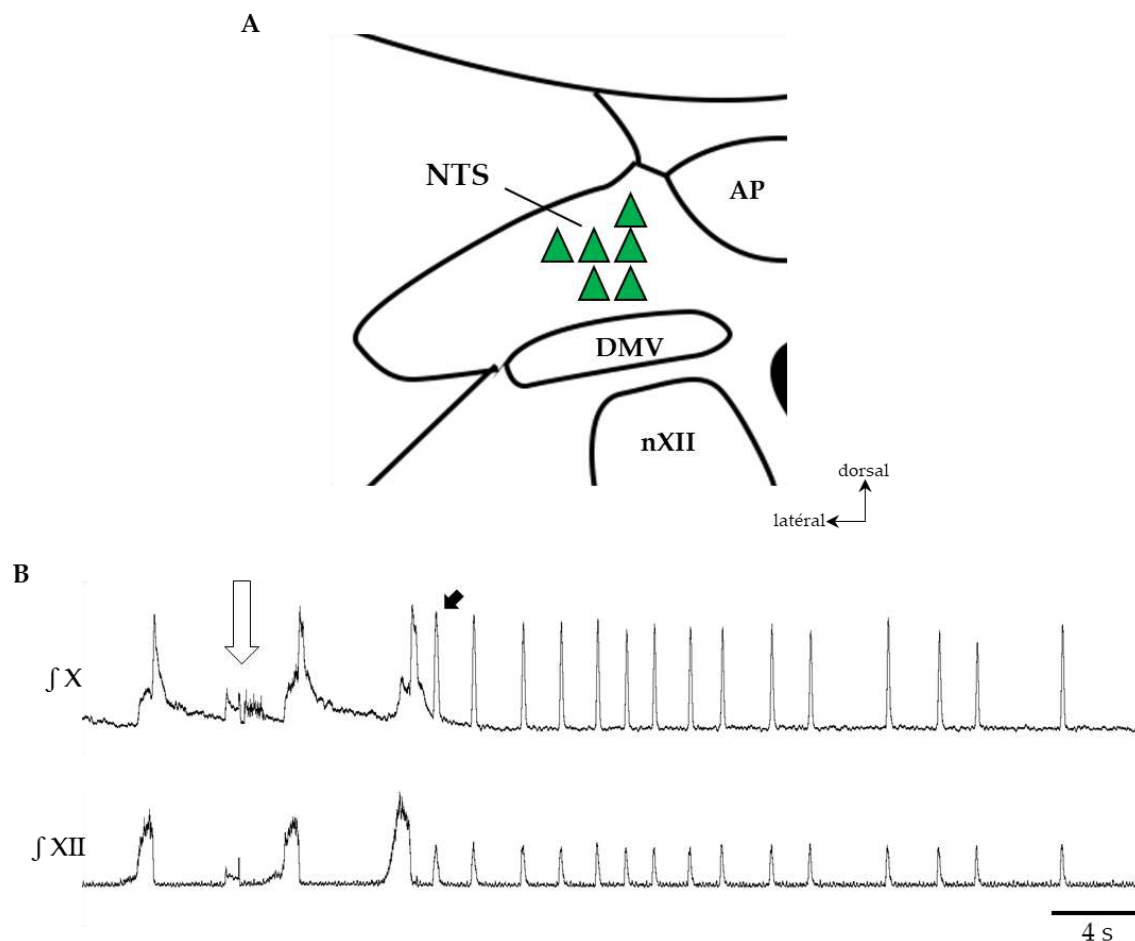


Figure 26. Effets des micro-injections centrales de drogue dans le noyau du tractus solitaire sur la déglutition. (A) Sites d'injection (triangles) dans le noyau du tractus solitaire (NTS) où le N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA, 1 mMol, 10-50 nl) provoque de la déglutition rythmique, alors que l'injection de quipazine (QPZ 3 mM, 50-200 nl) n'a pas d'effet. (B) Exemple de décharges nerveuses vagale (X) et hypoglosse (XII) avant et après l'injection de NMDA dans le NTS (flèche creuse). Quelques secondes après l'injection de NMDA, on note la présence de bouffées rythmiques de déglutition (flèches noires) l'absence de décharges respiratoires (apnée centrale). DMV, noyau moteur dorsal du nerf vague ; AP, area postrema ; nXII, noyau moteur du nerf hypoglosse.

Dans d'autres expériences, la QPZ (3mM, 50-100nl) a été micro-injectée dans les noyaux bulbaires du raphé afin de cartographier ses effets sur la déglutition ([Figure 27](#)). Cette structure a été choisie car elle contient des neurones sérotoninergiques et non-sérotoninergiques exprimant des récepteurs 5HT2A, et innerve de nombreux noyaux bulbaires dont le NTS ([Paterson et Darnall 2009](#)). Au total, 118 injections ont été faites à 18 sites différents dans la partie caudale des noyaux du raphé (n=15). Le nombre moyen de descentes était de 3 ± 1 , et le nombre moyen d'injections par descente était également de 3 ± 1 , par

animal. Ces micro-injections n'ont produit aucun changement (n=86) ou une augmentation (n=32) du SR par rapport à la condition témoin (**tableau 2**).

Tableau 2. Nombre d'injections et effets de la quipazine sur la déglutition par site d'injection dans les noyaux du raphé bulbaire.

Profondeur (mm)	Obex (mm)				
	+1	+1.5	+2	+2.5	+3
1.25	(6)	3 (11)	(11)	(1)	(2)
1.75	(7)	9 (5)	5 (9)	(1)	(2)
2.25	(7)	8 (6)	6 (6)	(1)	(1)
2.75	---	---	1 (8)	(1)	(1)

Les nombres indiqués entre parenthèses ou en gras représentent respectivement les injections associées à l'absence d'effet ou à une augmentation de la vitesse de déglutition.

De manière similaire aux expériences avec la QPZ systémiques, toutes les déglutitions observées après micro-injections de la QPZ dans les noyaux du raphé sont isolées (**Figure 27-A**). Pour évaluer les effets de ces micro-injections sur le SR (et la latence à la première déglutition), nous avons utilisé deux méthodes différentes. Premièrement, quel que soit le site d'injection, toutes les injections réussies conduisant à une augmentation du SR chez un seul animal (plage 1-4) ont été utilisées pour mesurer le SR moyen par rat. Les valeurs moyennes du groupe QPZ ont révélé une augmentation significative du SR par rapport aux valeurs contrôle (0.8 ± 0.7 vs 2.2 ± 0.5 , $p < 0.001$, dans les conditions contrôle vs QPZ, respectivement ; **Figure 27-C**). Le SR a été significativement augmenté durant la première minute post-injection, mais pas au cours de la période post-injection de 5 minutes, par rapport au contrôle.

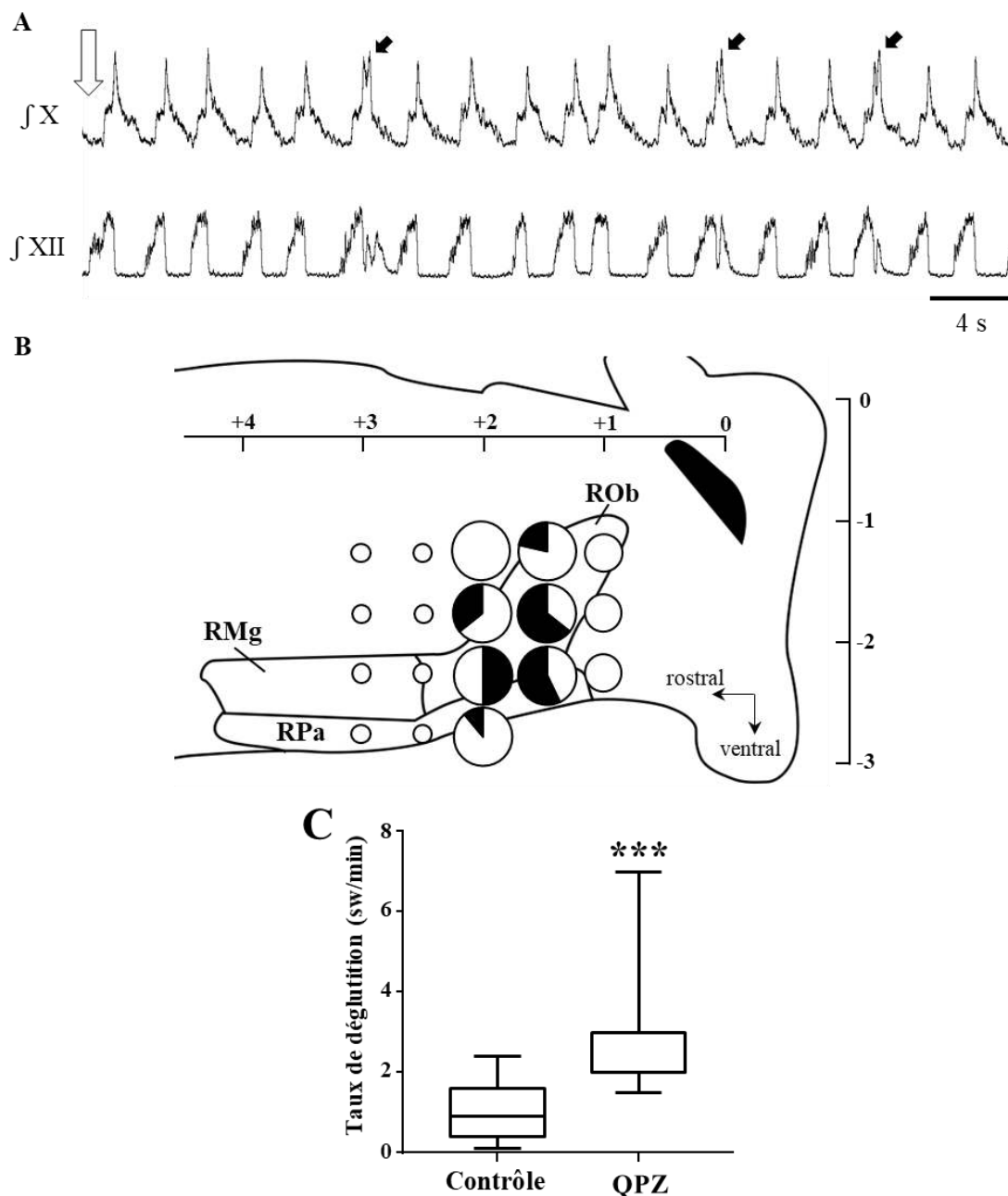


Figure 27 : Effets des micro-injections de quipazine dans les noyaux bulbaires du raphé sur la déglutition. (A) Exemple de déglutition (flèches noires) induites par l'injection de QPZ (flèche creuse) dans le raphé bulbaire Caudal (+1.5 mm de l'obex, -1.75 mm sous la surface). (B) Représentation schématique des noyaux bulbaires du raphé et des 18 sites testés chez 15 animaux pour cartographier les effets de la QPZ sur la déglutition. Les sites sont représentés sous forme de camemberts avec différentes tailles en fonction du nombre total d'injections effectuées chez différents animaux (les petites, moyennes et grandes tailles correspondent respectivement à 1-2, 3-7 et 8-14 injections) et différentes couleurs selon sur l'effet du QPZ (blanc : pas de changement ; noir : augmentation de la déglutition ou « succès »). Les camemberts de couleurs mélangées indiquent les sites où la QPZ a produit les deux effets et affichent les pourcentages des effets observés. Notez que trois sites adjacents ont été identifiés dans les parties caudales du raphé Pallidus et Obscurus où 50% ou plus des injections testées ont provoqué une augmentation du taux de déglutition. (C) Taux de déglutition en condition contrôle et après injections « succès » de QPZ dans les noyaux du raphé. ROb, RPa et RMg : raphé Obscurus, Pallidus et Magnus, respectivement.

La latence moyenne à la première déglutition était de 14 ± 11 secondes. Ensuite, nous avons analysé plus en détail les effets de la QPZ sur la déglutition par site d'injection. Pour ce faire, nous avons compté le nombre total d'injections effectuées à un site donné chez les différents rats et déterminé le nombre d'injections réussies (et non réussies) (**tableau 2**). Une carte représentant les 18 sites d'injections et les différents effets de la QPZ observés à chaque site est illustrée à la **figure 27-B**. Dans la plupart des sites (12/18), les injections de la QPZ n'ont pas modifié le SR. Cependant, des injections réussies ont été observées sur 6 sites adjacents, situés dans la région caudale des noyaux du raphé englobant le raphé Pallidus et le raphé Obscurus. Des données cohérentes ont été obtenues en particulier sur 3 sites, où plus de 8 injections ont été effectuées et 50% d'entre elles (ou plus) ont entraîné une augmentation du SR.

Tableau 3. Modifications de la vitesse de déglutition (SR) après des micro-injections de la quipazine (QPZ) dans les sites les plus réussis dans les noyaux du raphé.

Sites réussis (mm)		Taux de déglutition (déglutition/min)			
Depuis l'Obex	Profondeur	Contrôle	QPZ 0-1 min	QPZ 0-5 min	Latence
+1.5	-1.75	0.8	2.9	2.0	7.8
+1.5	-2.25	0.8	3.0	2.1	6.0
+2	-2.25	1.4	2.3	2.0	13.4
	Mean	1.0	2.7	2.2	9.1
	SD	0.3	0.4	0.1	3.9

Le tableau 3 montre le SR moyen mesuré après injection de la QPZ sur ces sites. Avec cette méthode d'évaluation, la valeur du SR dans chacun des 3 sites variait de 2.3 à 3.0 déglutitions par minute, et les valeurs du groupe ont montré une augmentation significative du SR à une minute, mais pas sur l'ensemble de la période post-injection de 5 minutes (tableau 3). Il convient de noter que la voie systémique ou centrale d'injection de la QPZ a entraîné un SR similaire (2.3 ± 0.8 vs 2.7 ± 0.4 dégl/min, respectivement, $p = 0.19$), bien que la voie systémique produise des effets plus longs que la voie centrale. La latence de la première

déglutition trouvée avec cette méthode était de 9.1 ± 3.9 s. Fait intéressant, les micro-injections de la QPZ dans les noyaux bulbaires du raphé n'ont eu aucun effet sur la Rf (30 ± 10 vs 30 ± 8 cycles/min, respectivement dans les groupes témoins vs QPZ ; $p = 0.34$), ni sur la PA (78 ± 23 mmHg pour les deux groupes).

IV. Discussion

Les résultats obtenus ont démontré que l'agoniste sérotoninergique QPZ induisait de la déglutition *in situ*, et que cet effet était bloqué par l'antagoniste des récepteurs 5-HT₂ méthysergide. Les déglutitions spontanées et induites par la QPZ étaient isolées et avaient des patterns moteurs ainsi qu'une relation avec la respiration centrale similaires. Les micro-injections centrales de QPZ dans le NTS n'ont pas induit de déglutition, alors que les micro-injections dans les noyaux bulbaires du raphé ont augmenté le SR.

Ainsi, nous suggérons que la stimulation pharmacologique de la déglutition par la QPZ *in situ* représente un modèle d'étude prometteur des circuits du CPGd, des mécanismes de la neuromodulation de la déglutition et des interactions respiration-déglutition.

A. Distribution des récepteurs sérotoninergiques centraux

La sérotonine 5-hydroxytryptamine (5-HT) est un neurotransmetteur monoaminergique répandu dans le cerveau, et les noyaux du raphé dans le tronc cérébral représentent la principale source d'innervation 5-HT vers le cerveau et la moëlle épinière. Une grande variété de sous-types de récepteurs 5HT (5-HTR), allant de 5-HTR1 à 5-HTR7, contribuent à l'effet neuromodulateur de la sérotonine. Plusieurs structures du réseau respiratoire et du réseau déglutiteur reçoivent des projections 5-HT denses ([Holtman 1988](#); [1990](#); [Voss et al, 1990](#); [Jacobs et Azmitia 1992](#); [Hodges et Richerson 2008](#); [Descarries et al, 2010](#)) et expriment une majorité de 5-HT1 et 5-HTR2, bien que d'autres sous-types de récepteurs aient été trouvés. Par exemple, le NTS contient des neurones exprimant les sous-

types de récepteurs 5-HTR1a, 5-HTR1b, 5-HTR2a, 5-HTR2c ([Okabe et al, 1997](#); [Paterson et Darnall 2009](#); [Austgen et al, 2012](#)), 5-HTR3 ([Nosjean et al, 2002](#)), 5-HTR4 ([Edwards et Paton 1999](#)) et 5-HTR7 ([Matott et Kline 2016](#)). Un marquage axonal a aussi été observé, notamment dans le tractus solitaire ([Cornea-Hebert et al, 1999](#)). Dans le bulbe rachidien ventral, les neurones du complexe de pré-Bötzinger expriment les récepteurs 5-HTR1a, 5-HTR2a et 5-HTR4a ([Doi et Ramirez 2010](#); [Manzke et al, 2010](#); [Niebert et al, 2011](#)). Dans le pont dorso-latéral, les neurones parabrachiaux expriment les récepteurs 5-HTR1a, 5-HTR2a, 5-HTR2c et 5-HTR3. De plus, les noyaux moteurs crâniens et spinaux impliqués dans la respiration et/ou la déglutition présentent une large densité de terminaisons axonales 5-HT. Les motoneurones hypoglosses expriment les récepteurs 5-HTR1a, 5-HTR1b et 5-HTR2a ([Liu et Wong-Riley 2010](#)). Ces récepteurs sont aussi retrouvés dans le noyau ambigu, où des motoneurones laryngés et pharyngés sont localisés ([Liu et Wong-Riley 2010](#); [Wang et Ramage 2001](#); [Dergacheva et al, 2007](#)). Les motoneurones phréniques sont connus pour exprimer une multitude de récepteurs sérotoninergiques, tels que 5-HTR1b, 5-HTR2a et 5-HTR2c ([Mantilla et al, 2012](#)). Ainsi, un tel nombre de structures exprimant une telle diversité de sous-types de 5-HTR suggère que la 5-HT (ou agonistes sérotoninergiques tel que la QPZ) est probablement impliquée dans de multiples effets fonctionnels.

B. Spécificité et effets fonctionnels de la quipazine

La quipazine est principalement un agoniste 5-HTR2a ([Cohen et Fuller 1983](#); [Glennon et al, 1983](#); [Gorea et Adrien 1988](#)), mais a aussi une activité agoniste faible sur les 5-HTR1b ([Sills et al, 1984](#); [Goodwin et Green 1985](#); [Peroutka 1986](#)). La quipazine agit comme un agoniste puissant sur les récepteurs 5-HTR3 périphériques ([Cohen et Fuller 1983](#); [Ireland et Tyers 1987](#); [Round et Wallis 1987](#)). De manière intéressante, le récepteur 5-HTR2a stimulé par la QPZ a été utilisé pour induire une activité motrice et pour promouvoir la convalescence de cette fonction après des dommages subis à la moëlle épinière ([Courtine et al, 2009](#); [Swann](#)

[et al, 2017](#)). La quipazine induit aussi de la locomotion fictive via stimulation des récepteurs 5-HTR2a sur la préparation de moëlle épinière de rat nouveau-né *in vivo* ([Oueghlani et al, 2020](#)). Au niveau cellulaire, la QPZ excite les interneurons et motoneurons du réseau locomoteur spinal via la stimulation des récepteurs 5-HTR2a ([Chopek et al, 2013](#); [Slawinska et al, 2014](#)). Différentes études suggèrent aussi que la QPZ n'aurait aucune affinité pour les autorécepteurs 5-HTR1a, classiquement couplés aux protéines G inhibitrices ([Gorea et Adrien 1988](#); [Slawinska et al, 2014](#); [Oueghlani et al, 2020](#)). Ainsi, il est raisonnable de penser que l'induction de la déglutition fictive après injection systémique de QPZ *in situ* soit principalement obtenue via la stimulation centrale des récepteurs 5-HTR2a. Le blocage de cet effet stimulant par l'antagoniste aux récepteurs 5-HTR2 (méthysergide) est en accord avec cette hypothèse.

De nombreuses expériences ont démontré le rôle des 5-HTR2a dans le contrôle central de la respiration ([Baker-Herman et al, 2004](#); [Bou-Flores et al, 2000](#); [Cayetanot et al, 2002](#); [Kinkead et al, 2002](#); [Ramirez et al, 2004](#)), ainsi que sur la régulation cardiovasculaire ([Dergacheva et al, 2007](#); [Shen et al, 2007](#); [Villalon et Centurion 2007](#)), ce qui est en accord avec l'expression somatodendritique de 5-HTR2a (allant de modérée à forte) dans les structures bulbaires impliquées dans le contrôle cardiorespiratoire, dont des motoneurons crâniens ([Zhan et al, 2002](#)). L'activation de 5-HTR2a induit une dépolarisation membranaire ainsi qu'une fréquence de décharge augmentée des motoneurons phréniques et hypoglosses ([Morin et al, 1992](#); [Lindsay et Feldman 1993](#); [Bobker 1994](#)), d'interneurons expiratoires de la colonne respiratoire ventrale ([Lalley et al, 1995](#)), ainsi que de neurones préganglionnaires sympathiques ([Pickering et al, 1994](#)). De manière intéressante, l'injection intraveineuse d'agoniste sérotoninergique ayant une action sur les 5-HTR2a (et 2c) améliore la stabilité des voies aériennes supérieures et fait augmenter la pression artérielle (PA) ([Ogasa et al, 2004](#)). Ainsi, les augmentations de Rf et PA observées après injection systémique de QPZ peuvent

résulter d'une large stimulation des 5-HT_{2A} exprimés par les neurones bulbaires du réseau cardiorespiratoire. Nos résultats n'ont pas montré de corrélation significative entre les changements de Rf et PA par rapport aux changements de SR après injection systémique de QPZ. Ainsi, nous pensons que l'augmentation de la déglutition après injection systémique de QPZ n'est pas un effet secondaire lié aux altérations des fonctions cardiovasculaires. Des structures bulbaires distinctes peuvent médier les effets fonctionnels différents de la QPZ. Ceci est renforcé par nos résultats montrant que les micro-injections de QPZ dans les noyaux du raphé bulbaires ont aussi augmenté la SR sans affecter la Rf ou la PA.

C. Effets de la QPZ sur la déglutition

Les études précédentes sur la modulation sérotoninergique de la déglutition montrent des résultats conflictuels chez le rat anesthésié. Les effets stimulants de différents agonistes sérotoninergiques tels que la 5-HT, Cholophénylpiperasine (CPP) et QPZ ont d'abord été rapportés ([Bieger 1981](#)), alors que Kessler et Jean ([Kessler et Jean 1985](#), [1986](#)) ont montré des effets inhibiteurs de différentes monoamines telles que la noradrénaline, 5-HT ainsi que la QPZ, suggérant l'existence dans le NTS d'une inhibition sérotoninergique du réflexe déglutiteur induit par la stimulation des afférences laryngées. Ces différences peuvent être dues à l'utilisation de différentes doses d'agonistes sérotoninergiques, mais aussi à l'utilisation d'anesthésiants différents entre les études ([Hashim et Bieger 1987](#)). L'effet exciteur de la QPZ sur la déglutition retrouvé dans nos expériences dépourvues d'anesthésie confirme ces observations ([Bieger 1981](#)). Cependant, une dose similaire de QPZ (1-2µM/kg) a produit un effet plus court *in situ* (15 min, résultats présentés) qu'*in vivo* (jusqu'à plusieurs heures) ([Bieger 1981](#)). De manière similaire, un SR plus rapide a été rapporté *in vivo* (jusqu'à 7-8 déglutitions par minute). La température corporelle plus basse et/ou une diminution de biodisponibilité de la drogue peut être responsable de l'effet réduit de la QPZ *in situ*.

Toutes les déglutitions spontanées et induites par la QPZ sont isolées et ont montré un pattern moteur déglutiteur de même type, avec un délai similaire entre le début de des décharges déglutitrices du XII et du X. Cette séquence motrice physiologique caractérise la phase pharyngée de la déglutition ([Gestreau et al, 2005](#); [Horton et al, 2018](#)). De manière intéressante, l'antagoniste 5-HTR2 méthysergide bloque de manière efficace l'effet stimulant de la QPZ sur la déglutition sans pour autant supprimer toutes les déglutitions. Ces résultats suggèrent que la QPZ pourrait augmenter l'excitabilité du CPGd via stimulation des 5-HTR2. Ils suggèrent aussi que le blocage des 5-HTR2 n'a pas d'effet sur les mécanismes impliqués dans la production de déglutition spontanée (ou réflexe). Les déglutitions spontanées *in situ* ont été interprétées comme étant dues à un gating inhibiteur incomplet provenant du pont ([Bautista et Dutschmann 2014](#); [Bautista et al, 2014](#)). Nous n'excluons cependant pas la possibilité d'une entrée de fluide (ou de mouvements de fluide) dans les voies aériennes supérieures produisant une excitation tonique sur les afférences périphériques impliquées dans la déglutition, dont résulte un petit nombre de déglutitions réflexes *in situ*.

D. Coordination entre la respiration et la déglutition *in situ*

Toutes les déglutitions induites par la QPZ ont été isolées, ce qui nous a permis d'analyser la coordination respiration-déglutition et les effets d'une déglutition sur l'activité respiratoire centrale *in situ*. Cette méthode d'induction pharmacologique de déglutitions isolées représente un avantage par rapport à la stimulation électrique des nerfs laryngés supérieurs ou à l'injection d'eau dans la cavité pharyngée qui entraînent des déglutitions répétitives ([Gestreau et al, 1996](#); [Bautista et Dutschmann 2014](#); [Horton et al, 2018](#); [Fuse et al, 2020](#)). La plupart des déglutitions ont été produites à proximité de la transition de phase entre l'inspiration et la post-inspiration, en accord avec les données expérimentales précédentes *in vivo* ([Dick et al, 1993](#); [Horton et al, 2018](#)) et *in situ* ([Bautista et Dutschmann 2014](#); [Bautista et al, 2014](#)). Cependant, aucun changement significatif dans la durée de l'inspiration centrale ou

de l'expiration causée par les déglutitions I-Sw-Exp ou Exp, respectivement, n'a été observé. Ceci est en contraste avec les récents résultats obtenus chez les animaux ventilés ([Horton et al, 2018](#)), mais en accord avec une observation précédente lors d'une auto-réanimation de stade 2 *in situ* ([Bautista et al, 2014](#)). La respiration fictive *in situ* n'est pas associée au mouvement de la cage thoracique, au flux de l'air, à la rétroaction vagale des poumons, à la rétroaction musculaire ou aux changements de pression glottique ou sous-glottique. Les présentes données suggèrent une contribution de ces paramètres dans les interactions déglutition-respiration. Ceci est en accord avec les preuves qu'il existe une modulation négative de l'initiation de la déglutition par la rétroaction vagale, ainsi qu'une réinitialisation de la déglutition par l'inflation pulmonaire, soulignant le rôle important de l'activité afférente pulmonaire vagale dans la coordination respiration-déglutition ([Horton et al, 2018](#)). De futures expériences *in situ* utilisant une ventilation artificielle via les voies respiratoires supérieures ou un tube trachéal pourraient aider à explorer davantage le rôle de ces paramètres.

E. Le NTS et la modulation sérotoninergique de la déglutition

Le NTS est censé contenir les neurones sensoriels de second ordre et les circuits centraux formant le générateur de rythme central de la déglutition du tronc cérébral (CPGd) responsable de la phase pharyngée de la déglutition, qui est purement réflexe ([Jean 1984](#); [Bieger 2001](#); [Ertekin et Aydogdu 2003](#); [Costa 2018](#)). La déglutition peut être déclenchée en activant des récepteurs NMDA ou non-NMDA localisés dans le NTS, suggérant que les deux sous-types de récepteurs peuvent être impliqués dans le déclenchement de la déglutition ([Kessler et Jean 1991](#)). Conformément à cette observation, nos résultats ont montré que des déglutitions répétitives avec apnée centrale étaient facilement évoquées après une micro-injection de NMDA dans la zone de déclenchement de la déglutition dans le NTS. Cependant, aucune déglutition n'a pu être induite après micro-injection de QPZ dans les sites actifs du NTS, malgré l'expression connue des récepteurs 5-HT (dont les récepteurs 5-HT_{2a}) dans les

neurones du NTS ([Cornea-Hebert et al, 1999](#); [Paterson et Darnall 2009](#)). Cette absence d'effet de la QPZ suggère que le NTS n'est pas un site central où la neurotransmission sérotoninergique médiée par les récepteurs 5-HT_{2a} initie la déglutition. Cela contraste nettement avec les conclusions des résultats chez les rats anesthésiés, bien que la 5-HT mais pas la QPZ ait été micro-injecté dans le NTS ([Hashim et Bieger 1987](#)). D'autres expériences sont nécessaires pour clarifier cette neuromodulation sérotoninergique complexe apparente de la déglutition, mais nos résultats suggèrent que la sérotonine peut agir sur des récepteurs autres que 5-HT_{2a} pour moduler les déglutitions au niveau du NTS.

F. Les noyaux bulbaires du raphé pourraient moduler la déglutition

Des travaux antérieurs de Kessler et Jean ([1986](#)) ont montré que la stimulation électrique de plusieurs structures du tronc cérébral chevauchant des régions sérotoninergiques, telles que le noyau raphé Magnus et le noyau raphé Pallidus, induisait une inhibition de la déglutition. Des résultats opposés ont été obtenus dans notre étude, puisque les micro-injections de la QPZ dans la région caudale des noyaux bulbaires du raphé, y compris le raphé Obscurus et le Pallidus, ont augmenté le SR. Des différences méthodologiques entre les deux études peuvent expliquer ces résultats contradictoires. Tant chez le rongeur que dans le tronc cérébral humain, les noyaux du raphé contiennent des groupes distincts de neurones, c'est-à-dire des cellules sérotoninergiques et non sérotoninergiques, abritant différents récepteurs sérotoninergiques, et sont censés jouer des rôles fonctionnels distincts ([Paterson et Darnall 2009](#)). Compte tenu de cette hétérogénéité des neurones, l'excitation neuronale globale utilisant la stimulation électrique peut ne pas être la méthode la plus appropriée pour étudier la modulation sérotoninergique de la déglutition. En revanche, il est concevable que la micro-injection de drogue dans les noyaux du raphé ait exercé une stimulation plus sélective des sous-types neuronaux, dévoilant un effet de stimulation sérotoninergique sur la déglutition. De manière intéressante, les noyaux du raphé seraient impliqués dans le contrôle du réflexe de

la toux ([Poliacek et al, 2014](#)). A notre connaissance, la présente étude est la première à suggérer une implication directe des noyaux bulbaires du raphé dans le contrôle de la déglutition.

Les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé bulbaires expriment des autorécepteurs somatodendritiques 5-HTR1a responsables de l'inhibition de la transmission sérotoninergique, alors que les neurones non-sérotoninergiques du raphé qui expriment les 5-HTR2a excitateurs sont impliqués dans certaines fonctions autonomes telles que le contrôle de la respiration ([Sotelo et al, 1990](#); [Paterson et Darnall 2009](#)). De manière intéressante, les neurones sérotoninergiques et non-sérotoninergiques du raphé bulbaire ont montré des propriétés électrophysiologiques distinctes ([Bayliss et al, 1997a, 1997b](#)) et un grand nombre de projections neuronales non-sérotoninergiques du raphé sont glutamatergiques ([Jackson et al, 2009](#)).

Ainsi, différentes informations afférentes au NTS provenant des noyaux du raphé bulbaire pourraient exercer une neuromodulation différentielle sur le réseau respiratoire et le réseau déglutiteur. Nous suggérons que la QPZ pourrait stimuler les récepteurs 5-HTR2a post-synaptiques des neurones sérotoninergiques ou plus probablement des neurones non-sérotoninergiques du raphé, ce qui pourrait en retour exciter les neurones du NTS du CPG déglutiteur. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse, notamment pour démontrer une excitabilité accrue des neurones du raphé lors de la déglutition, et identifier leur phénotype ainsi que les projections afférentes et efférentes.

G. Pertinence des résultats

Les noyaux du raphé jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'excitabilité des motoneurones crâniens et rachidiens et de la fonction autonome, y compris la respiration ([Benarroch 2014](#)). Cette étude propose un rôle des noyaux du raphé bulbaire sur le contrôle

sérotoninergique de la déglutition, bien que les conditions précises permettant de stimuler les noyaux du raphé afin d'induire la déglutition restent à élucider. Nos résultats renforcent l'hypothèse qui inclut les noyaux du raphé comme étant une structure extrinsèque importante au CPG déglutiteur, notamment en agissant comme un lien entre les structures corticales et le réseau déglutiteur du tronc cérébral ([Bieger 2001](#)). Par exemple, si les régions du raphé identifiées dans nos résultats reçoivent des projections provenant des aires corticales impliquées dans la déglutition et ont des projections efférentes vers le CPGd du NTS, alors elles pourraient être impliquées dans le contrôle volontaire de la déglutition. La perte de neurones sérotoninergiques du raphé bulbaire survient dans les atrophies multisystématisée ([Benarroch 2014](#)), ainsi que chez des patients souffrant de dysphagie ([Do et al, 2020](#)). De plus, des difficultés respiratoires et alimentaires sont fréquemment observées dans le syndrome de Prader-Willi (PWS) et de Shaaf-Yang ([Fountain et Schaaf 2016](#)), et plusieurs altérations des noyaux du raphé ont été montrées chez les souris modèle de PWS ([Zanella et al, 2008](#); [Zanella et al, 2009](#); [Matarazzo et al, 2017](#)).

Une meilleure connaissance de la modulation sérotoninergique de la déglutition, incluant les mécanismes d'action et les types de récepteurs sérotoninergiques impliqués, pourrait être particulièrement utile afin de proposer de nouveaux traitements aux patients souffrant de dysphagie.

Chapitre 2 : Effet de l'abolition de la phase post-inspiratoire sur la déglutition et sur la coordination respiration-déglutition

I. Introduction

La cavité oropharyngée représente un passage commun pour l'air et la nourriture solide ou liquide. De ce fait, la respiration et la déglutition doivent être coordonnées de manière précise afin de maintenir la protection des voies aériennes inférieures. Chez l'Homme adulte, les déglutitions apparaissent préférentiellement à des phases définies du cycle respiratoire. La plupart des déglutitions sont observées à la fin de l'inspiration (I), i.e. pendant la transition entre I et la phase post-inspiratoire (Post-I) de la respiration ([Martin-Harris et al, 2003](#); [Nishino 2012](#); [Pitts et al, 2013](#); [Rowe et al, 2021](#)). La déglutition peut aussi apparaître plus tardivement pendant l'expiration (E), particulièrement à la transition de phase entre la Post-I et E. Ces patterns de coordination appelés I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp, sont caractérisés par une pause expiratoire (ou apnée de déglutition) après la déglutition ([Yagi et al, 2017](#)). D'autres types de déglutitions existent aussi mais apparaissent rarement chez l'Homme sain. C'est le cas des déglutitions apparaissant pendant la phase I (I-Sw-I), ou juste avant la phase I (Exp-Sw-I). De manière importante, les troubles de la coordination entre la respiration et la déglutition sont associés à une plus grande incidence d'apparition des patterns I-Sw-I et Exp-Sw-I chez les patients atteints de dysphagie ([Kalia 2003](#); [Troche et al, 2011](#); [Terzi et al, 2010](#); [Nishino 2012](#); [Yagi et al, 2017](#)). La dysphagie est hautement prévalente à la fois chez les personnes âgées et les personnes souffrant de maladies neurologiques, et augmente le risque de pneumonie par aspiration ([Mandell et Niederman 2019](#)). De plus, la mortalité associée à la pneumonie par aspiration est très élevée ([Won et al, 2021](#)).

Les structures corticales contribuent à la déglutition volontaire, en particulier pour la phase orale de la déglutition, mais aussi à l'intégration sensorimotrice pendant la déglutition

([Troche et al, 2014](#)). En revanche, l'occurrence de la déglutition dans le cycle respiratoire semble dépendre d'interactions neuronales propres au tronc cérébral. En effet, des expériences faites chez l'animal décérébré ont montré une coordination et un pattern de déglutition semblables à ceux observés chez l'animal sain, notamment le pattern I-Sw-Exp ([Dick et al, 1993](#); [Bonis et al, 2011](#); [Horton et al, 2018](#) Chapitre 1 des résultats). Ainsi, les interactions cellulaires entre les générateurs de rythme centraux (CPGs) du tronc cérébral responsables de la respiration (CPGr) et de la déglutition (CPGd) sont probablement impliqués dans la protection des voies aériennes ([Bianchi et Gestreau 2009](#); [Horton et al, 2018](#); [Troche et al, 2014](#))

Cependant, les structures neuronales et les circuits responsables du contrôle physiopathologique de la coordination respiration-déglutition sont méconnus.

La phase (bucco) pharyngée de la déglutition est critique pour la protection des voies aériennes. Celle-ci est caractérisée par une rétraction de la langue, une élévation hyolaryngée, une constriction pharyngée et une adduction des cordes vocales (parmi d'autres mouvements coordonnés des voies aériennes supérieures) ([Jean 2001](#); [Gross et Trapani-Hanasewych 2017](#); [Panara et al, 2022](#)). Ces muscles sont principalement commandés par des motoneurones localisés dans le tronc cérébral ([Miller 1982](#); [Tell et al, 1990](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Shaw et Martino 2013](#)), dont les motoneurones hypoglosses et laryngés qui jouent un rôle important ([Shiba et al, 1999](#); [Gestreau et al, 2000](#); [Roda et al, 2002](#); [Sun et al, 2011](#)). Des études antérieures ont suggéré que le CPGr et le CPGd se chevauchent et contiennent des neurones partagés ou multifonctionnels qui peuvent influencer la commande motrice de la langue et/ou des muscles laryngés pendant différents comportements ([Gestreau et al, 1996](#); [Saito et al, 2002](#); [2003](#); [Gestreau et al, 2005](#); [Roda et al, 2004](#); [Shiba et al, 2007](#); [Sugiyama et al, 2014](#)). On ignore cependant si des pré-motoneurones communs commandent les motoneurones

hypoglosses ou laryngés pendant la respiration et la déglutition ([Gestreau et al, 2005](#); [Shiba et al, 2007](#); [Bianchi et Gestreau 2009](#)).

La protection des poumons contre l'aspiration pendant la déglutition est principalement réalisée grâce à une pause inspiratoire (apnée de déglutition), une fermeture laryngée (adduction des cordes vocales) et une prolongation réflexe de l'expiration ([Jean 2001](#); [Bianchi et Gestreau 2009](#)). De manière intéressante, la Post-I générée par le CPGr est caractérisée par une inhibition des neurones I et E-tardifs et par une décharge décroissante du nerf laryngé récurrent dont résulte une fermeture glottique ([Bautista et al, 2010](#); [Janczewski et al, 2013](#)). Ainsi, les neurones activés pendant la Post-I peuvent jouer un rôle important dans la coordination respiration-déglutition et/ou dans l'adduction des cordes vocales pendant la déglutition. Les neurones Post-I sont localisés dans le complexe de Bötzinger (BotC) ([Smith et al, 2007](#)). Nous avons rappelé en Introduction que l'inhibition du BotC supprime l'apnée de longue durée associée à la stimulation des nerfs laryngés supérieurs, mais n'altère pas la déglutition ni le pattern préférentiel I-Sw-Exp ([Sun et al, 2011](#)). Ces résultats suggèrent que des cellules prémotrices différentes commandent les muscles adducteurs laryngés pendant la déglutition et la respiration, en accord avec d'autres résultats ([Shiba et al, 2007](#)).

Une autre structure clé jouant un rôle important pour l'expression de la phase Post-I est le noyau de Kolliker-Fuse (KF) ([Dutschmann et Herbert 2006](#); [Smith et al, 2007](#)). Le KF est localisé dans le pont dorso-latéral et fait partie du groupe respiratoire pontique (GRP) ([Dutschmann et Herbert 2006](#); [Dhingra et al, 2020](#)). Le KF a de multiples connections avec les neurones du tronc cérébral comprenant ceux du noyau du tractus solitaire (NTS), de la colonne respiratoire ventrale (CRV) et des motoneurones du noyau ambigu (NA) ([Dutschmann et al, 2004](#); [Ezure et Tanaka 2006](#); [Yokota et al, 2007](#)). Le KF pourrait contrôler l'activation des neurones Post-I pendant la respiration, ainsi que l'activité prémotrice inspiratoire hypoglosse, et jouer un rôle dans différents comportements respiratoires

orofaciaux ([Dutschmann et Herbert 2006](#); [Bautista et Dutschmann 2014](#); [Dutschmann et al, 2021](#)). De plus, des neurones prémoteurs hypoglosses ont été identifiés dans et autour du KF ([Roda et al, 2004](#)). L'inactivation pharmacologique du KF à l'aide d'isoguvacine provoque une suppression de l'activité tonique mais pas de l'activité phasique des motoneurones laryngés pendant la déglutition induite par injection buccale d'eau chez le rat *in situ* ([Bautista et Dutschmann 2014](#)). Cependant, aucune mesure quantitative des commandes motrices laryngée et hypoglosse n'a été effectuée dans ce dernier travail. De plus, la coordination respiration-déglutition n'a pas pu être mesurée car l'injection d'eau provoquait des déglutitions répétitives et non isolées.

En dehors du KF, le PiCo (ou complexe post-inspiratoire) pourrait être impliqué dans le contrôle de la post-inspiration ([Anderson et al, 2016](#)). En effet, en l'absence du pont, le PiCo décharge de manière erratique en phase avec l'activité post-inspiratoire vagale, mais une activité stable est restaurée après injection de norépinéphrine, une substance neuromodulatrice de la respiration libérée par les structures pontiques ([Hilaire et al, 2004](#)). *In vivo*, la stimulation de cette région résulte en une production d'activité ressemblant à de la Post-I sur le nerf vague cervical. De plus, l'équipe de McMullan a montré que cette région serait importante pour la phase laryngée de la déglutition, mais pas pour l'apnée liée à la déglutition, suggérant que cette région analogue au PiCo pourrait être un relais de la commande motrice vagale ([Toor et al, 2019](#)).

Au total, notre étude vise à clarifier le rôle de la phase post-inspiratoire et des structures pontiques dans la coordination respiration-déglutition et dans la commande motrice laryngée et hypoglosse lors de la déglutition. Dans ce travail, nous avons utilisé la préparation perfusée *in situ* chez le rat et la déglutition a été induite par injection de quipazine, de façon similaire à notre étude précédente ([Berge-Laval et Gestreau 2020](#) ; voir le premier chapitre des résultats). Les activités motrices hypoglosse, vagale et phrénique ont été mesurées en

condition contrôle (c'est-à-dire avec le tronc cérébral intact) et après transection ponto-bulbaire (TP). Nous avons vérifié les trois hypothèses suivantes : 1) La commande prémotrice laryngée a une origine pontique pour le contrôle nerveux de la respiration, tandis que cette origine est bulbaire pour la déglutition. 2) Le pont contribue à la commande motrice hypoglosse lors de la déglutition. 3) Le pont joue un rôle clé dans la protection des voies aériennes inférieures et intervient dans la coordination entre la respiration et la déglutition.

II. Matériels et méthodes

A. Modèle expérimental

Toutes les expériences ont été faites sur la préparation perfusée cœur-tronc cérébral isolés *in situ* chez le rat Wistar (P15-20 ; n=18 ; 50-110g ; Janvier Labs, Le Genest St Isle, France). La procédure a été détaillée dans le chapitre « Matériels et Méthodes » commun.

B. Induction pharmacologique de la déglutition

Nous avons utilisé le modèle d'induction pharmacologique de la déglutition tel que décrit dans le Chapitre 1 des résultats, où l'agoniste sérotoninergique quipazine (QPZ, quipazine maleate, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) a été ajouté dans le LCRA (1,5µM/kg) toutes les 20 minutes.

C. Recueil et analyse des paramètres physiologiques

Les activités brutes et intégrées des nerfs ont été utilisées pour identifier et mesurer la durée, l'amplitude et l'aire sous la courbe des phases de la respiration et des décharges déglutitrices (X et XII). Les méthodes employées ont été détaillées dans les matériels et méthodes, ainsi que dans le chapitre 1 des résultats. Pour rappel, une méthode de seuillage semi-automatique appliquée aux activités nerveuses intégrées permet de marquer individuellement les bouffées de décharges respiratoires et déglutitrices (Offline Sorter, Plexon Inc., Dallas, TX, USA Ver2). A partir de ces bouffées marquées individuellement, la

durée (secondes), l'enveloppe moyenne et l'amplitude des décharges (unité arbitraire) ont été ensuite quantifiées (Offline Sorter, Plexon Inc., Dallas, TX, USA Ver3.266). L'enveloppe moyenne des décharges a été utilisée pour mesurer l'aire sous la courbe (AUC, arbitrary unit). La durée de la séquence motrice de déglutition a été mesurée entre le début de la décharge déglutitrice du nerf XII et la fin de la décharge déglutitrice du nerf X. L'amplitude et l'AUC des activités motrices nerveuses respiratoire et déglutitrice ont été normalisées par rapport à la période contrôle. Pour analyser la coordination respiration-déglutition, la durée des cycles respiratoires sans déglutition a d'abord été mesurée en condition contrôle et après TP en utilisant au moins 20 cycles respiratoires. Lorsque la déglutition était présente, la durée des cycles a été mesurée de nouveau. En condition contrôle, chaque déglutition observée était isolée, c'est-à-dire qu'une seule déglutition était associée à un cycle respiratoire. Après TP, étant donné que la phase expiratoire était significativement plus longue (voir résultats), plusieurs déglutitions pouvaient parfois être observées au sein d'un cycle respiratoire. Dans ce cas, les cycles en question ont été retirés de l'analyse. La durée des phases respiratoires (inspiration et expiration) a été normalisée par rapport aux valeurs contrôles mesurées dans chaque condition (échelle de 0 à 100% de la durée de chaque phase respiratoire). Puisqu'aucune déglutition n'a été observée pendant la phase inspiratoire, la position de chaque déglutition a ensuite été rapportée en pourcentage de la durée normalisée de la phase expiratoire. Les déglutitions qui apparaissaient entre 0 et 20% de la durée normalisée de la phase expiratoire ont été considérées comme des déglutitions de type I-Sw-Exp, celles apparaissant entre 21 et 90% ont été classées comme Exp-Sw-Exp et celles apparaissant entre 91 et 100% ont été considérées comme Exp-Sw-I ([Horton et al, 2018](#)).

D. Protocole expérimental

Toutes les variables ont été mesurées pendant une période contrôle de 15 minutes. La QPZ (1,5 μ M/kg) a été ajoutée pour augmenter le taux d'apparition des déglutitions 100 secondes avant le début de la période contrôle afin de prendre en compte la latence d'effet (voir chapitre 1 des résultats). Après la période contrôle, le pont a été coupé à l'aide d'une lame de scalpel fixée à un microdescendeur et présentée perpendiculairement à la jonction ponto-bulbaire. La transection a été pratiquée, au plan dorsal, au niveau du pôle caudal des colliculi inférieurs. En accord avec les résultats de Smith et Collaborateurs ([Smith et al, 2007](#)) sur la préparation *in situ* chez le rat, cette TP a permis d'obtenir une activité respiratoire de type apneustique, avec une phase inspiratoire prolongée, un pattern phrénique sans rampe, et la perte quasi complète d'activité post-inspiratoire vagale. Une fois la TP effectuée (condition TP), les variables physiologiques ont été enregistrées pendant 30 minutes.

E. Vérification histologique de la transection ponto-bulbaire

A la fin de chaque expérience, le bulbe rachidien a été systématiquement récupéré pour la vérification histologique de la transection. Le tissu nerveux a été fixé pendant quelques jours dans du paraformaldéhyde 4%, puis transféré dans une solution à 30% de sucrose pendant 24h. Les bulbes ont été congelés dans l'isopentane, enrobés dans l'OCT, puis coupés à l'aide d'un cryostat afin d'obtenir des coupes frontales sériées d'une épaisseur de 50 μ m. Les sections les plus rostrales ont été sélectionnées pour vérifier le niveau de transection. Les coupes sélectionnées ont été colorées au crésyl-violet, déshydratées dans l'alcool, plongées dans le xylène et montées entre lames et lamelles. Le niveau des coupes et donc de transection a été estimé en utilisant un atlas de cerveau de rat ([Paxinos et Watson 1998](#)) (voir **Figure 28**).

F. Analyses statistiques

La comparaison statistique des données a été effectuée en utilisant des tests t appariés pour des variables de distribution normale, et avec un test de classement signé par paires de Wilcoxon pour les mesures non paramétriques. La normalité de la distribution a été testée à l'aide d'un test de normalité Shapiro–Wilk. L'indépendance de la table de contingence a été testée à l'aide du test du χ^2 de Pearson avec la correction de continuité de Yates. Les résultats sont exprimés en écart-type moyen (SD). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$.

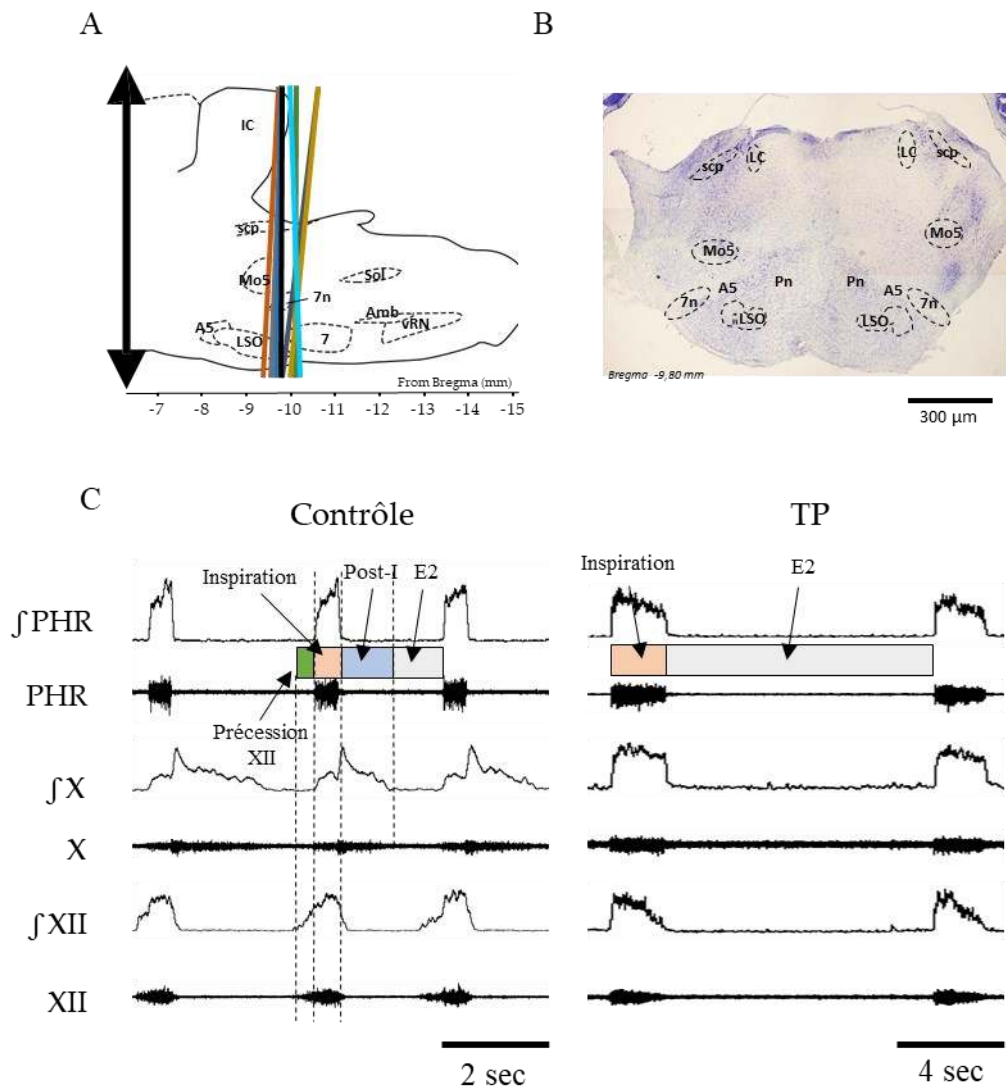


Figure 28 : Effet de la transection pontobulbaire sur les paramètres respiratoires. (A) Schéma représentant les niveaux de transection (n=10) du tronc cérébral. Chaque barre colorée correspond au niveau de transection d'une préparation. L'axe de la transection, ainsi que ses limites dorsale et ventrale, ont été reproduits grâce à l'examen anatomo-histologique des dernières coupes de bulbe rachidien rostral ou de pont caudal encore entières (B) et situées juste avant la transection (TP). (C) Activité brute et intégrée ($\int$) de l'activité respiratoire motrice enregistrée sur le nerf phrénique (PHR), vague (X) et hypoglosse (XII) avant (contrôle) et après TP. On remarque l'allongement du cycle respiratoire, la perte d'activité motrice post-inspiratoire vagale et le changement de pattern de décharge phrénique et hypoglosse après TP. IC : colliculi inférieurs; scp : pédoncule cérébelleux supérieur; Mo5 : noyau moteur du nerf trijumeau; 7n : nerf facial; Sol : tractus solitaire; A5 : groupe noradrénergique; Pn : noyau pontique; LSO : noyau de l'olive latérale supérieure; 7 : noyau moteur facial; Amb : noyau ambigu; vRN : noyau réticulaire ventrolatéral.

III. Résultats

A. Variables et pattern respiratoire en condition contrôle

L'activité nerveuse respiratoire en condition contrôle (n=18) a montré un pattern respiratoire triphasique physiologique (**Figure 28**). L'inspiration (I) a été caractérisée par l'activité en rampe du nerf phrénique (Phr). L'activité du Phr atteint un pic à la fin de I, puis décline de manière abrupte (off-switch inspiratoire). La post-inspiration (Post-I) est reconnue par un pic d'activité vagale (X) initial, suivi par un pattern de décharge décroissant. L'expiration tardive (E2) est définie par la période de silence entre la fin de la Post-I visible sur le nerf X et le début de l'activité I suivante observée sur le nerf PHR. De plus, une activité pré-inspiratoire est observée sur le nerf hypoglosse (XII). La fréquence respiratoire moyenne (Rf) en condition contrôle était de 29 ± 13 cycles/min. La fréquence cardiaque (HR) et pression de perfusion était de 293 ± 82 bpm et 101 ± 41 mmHg, respectivement.

B. Effets de la transection sur le pattern et la fréquence respiratoire

Pour l'ensemble des transections pratiquées, les observations faites en fin d'expérience ainsi que l'analyse histologique ont permis de vérifier que les noyaux bulbaires rostraux étaient totalement séparés des structures pontiques et que le niveau de transection a peu varié d'un animal à l'autre (**Figure 28-AB**). Dans chaque cas, la TP a induit de profonds changements du pattern respiratoire caractérisés par l'absence de la rampe phrénique lors de la phase inspiratoire et l'absence de phase Post-I vagale (**Figure 28-C**). Le pattern respiratoire contrôle à 3 phases s'est donc transformé en un pattern à 2 phases à la suite de la transection (**Figure 28-C**). En outre, l'alternance de phases I-E observée après TP était également accompagnée par la perte d'activité pré-I sur le nerf XII. Une décharge I synchrone a donc été observée sur les trois nerfs moteurs. En plus de ces changements de pattern moteur, une

diminution significative de la Rf a été observée après TP (29 ± 13 en contrôle vs 5 ± 2 cycles/min après TP ; $p < 0,001$).

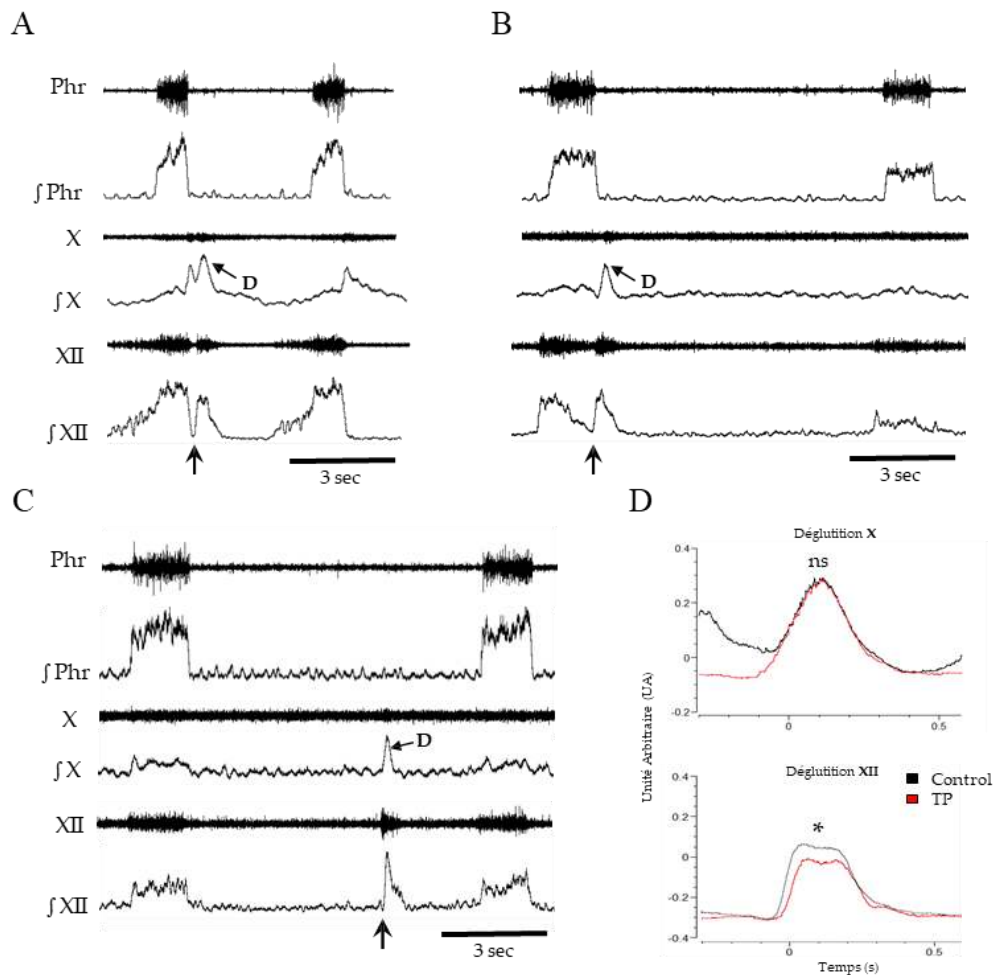


Figure 29 : Identification et caractérisation des déglutitions avant et après transsection pontobulbaire. Activités motrices brutes et intégrées du nerf phrénique (PHR), vague (X) et hypoglosse (XII) pendant la respiration et la déglutition en condition contrôle (A) et après transsection pontobulbaire (TP, B-C). Les déglutitions ont été identifiées et caractérisées grâce aux brèves décharges motrices vagales (flèche diagonale) et hypoglosses (flèche verticale) et respectant l'alternance physiologique XII-X (dans l'ordre), apparaissant pendant la phase post-inspiratoire (I-Sw-Exp, A-B) ou la phase expiratoire tardive (Exp-Sw-Exp, C). (D) Activité motrice déglutitrice intégrée moyenne du nerf vague (trace du haut) et du nerf hypoglosse (tracé du bas) avant et après TP (tracés noir et rouge, respectivement, $n=10$). On note que l'activité vagale qui précède la décharge déglutitrice en condition contrôle correspond à l'activité post-inspiratoire et que celle-ci est absente en condition TP. L'amplitude de décharge hypoglosse diffère significativement avant et après TP (*, $p < 0,05$), tandis qu'aucune modification significative de la décharge déglutitrice vagale n'est observée (Test des rangs signés de Wilcoxon).

Cette réduction de la Rf est due à l'augmentation de la durée de I ($0,64 \pm 0,17$ vs $2,33 \pm 0,91$ sec, contrôle vs TP, $p < 0,001$) et de l'expiration ($1,91 \pm 1,02$ vs $11,79 \pm 5,4$ sec, contrôle vs TP, $p < 0,001$) (**Figure 28-C**). Contrairement aux variables respiratoires, les variables cardiovasculaires sont restées identiques aux valeurs contrôles (99 ± 41 mmHg pour la BP, $p = 0,123$; 290 ± 83 bpm pour le HR, $p = 0,116$).

C. Effet de la transection sur l'activité motrice de déglutition

Dans cette étude, nous n'avons pas distingué les déglutitions spontanées de celles induites par la QPZ car elles possèdent toutes deux des caractéristiques similaires (voir chapitre 1 des résultats). Les déglutitions contrôles sont caractérisées par une décharge brève et quasi concomitante du nerf X et XII (**Figure 29-A**). Celles-ci sont observées soit immédiatement après l'inspiration (type I-Sw-Exp), soit plus tard au cours de l'expiration, auquel cas la déglutition est précédée et suivie par une expiration (type Exp-Sw-Exp) (**Figure 29-BC**). La TP n'a pas modifié de manière significative la fréquence de déglutition (SR) ($1,39 \pm 1$ vs. $0,99 \pm 0,52$ sw/min, pour la condition contrôle vs. TP, respectivement, $p = 0,07$). De même, la durée totale de la séquence motrice de déglutition n'a pas varié de manière significative ($0,50 \pm 0,14$ vs. $0,52 \pm 0,17$ secs pour contrôle vs. TP, respectivement, $p = 0,48$).

Cependant, l'aire sous la courbe (AUC) de la décharge motrice hypoglosse observée lors de la déglutition a significativement diminué après TP (-21 ± 31 % comparé à la condition contrôle, $p < 0,01$) (**Figure 29-D**). Aucune modification n'a été observée pour la décharge motrice du nerf X lors de la déglutition (3 ± 23 % comparé au contrôle après TP, $p = 0,87$) (**Figure 29-D**). Plus précisément, la durée des décharges motrices déglutitrices X et XII n'a pas changé après TP (X = $0,43 \pm 0,08$ vs. $0,46 \pm 0,11$ sec, contrôle vs. TP respectivement, $p = 0,09$; XII = $0,55 \pm 0,14$ vs. $0,55 \pm 0,19$ sec, contrôle vs. TP respectivement, $p = 0,87$, **Figure 29-D**). Toutefois, l'amplitude de la décharge motrice déglutitrice du XII a

significativement diminué après TP ($-15 \pm 28 \%$ comparé au contrôle après TP, $p < 0,05$,

Figure 29-D), tandis que celle

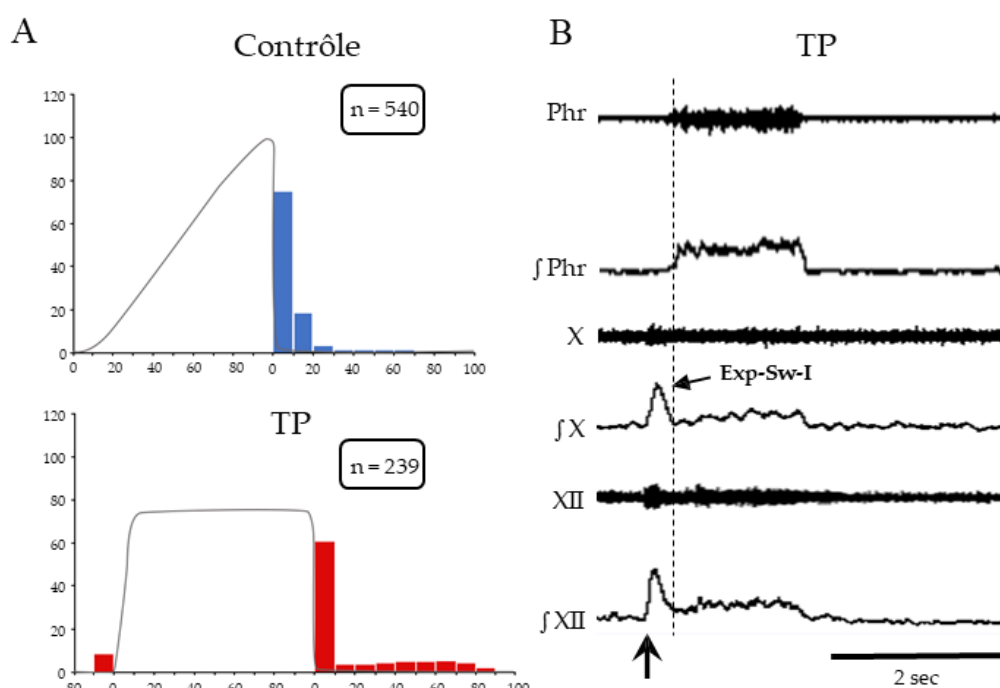


Figure 30 : Analyses de la coordination respiration-déglutition après transsection pontobulbaire. (A) Distribution des déglutitions spontanées isolées dans le cycle respiratoire normalisé en condition contrôle (graphe du haut) et après transsection pontobulbaire (TP, graphe du bas). Les barres d'histogramme bleues représentent la proportion de déglutitions isolées en condition contrôle (tracé du haut), et en rouge la proportion des déglutitions après TP (tracé du bas) par percentile. Dans les deux graphes et dans les deux conditions, la ligne grise représente l'activité normalisée de l'activité phrénique, permettant de démarquer la phase inspiratoire de la phase expiratoire. Dans chaque condition, la plupart des déglutitions apparaissent dans l'intervalle 0-10% de l'activité expiratoire normalisée, bien qu'après TP les déglutitions sont davantage distribuées pendant la phase expiratoire. En outre, 8% des déglutitions apparaissent juste avant la phase inspiratoire (Exp-Sw-I). (B) Activité brute et intégrée du nerf phrénique (PHR), vague (X) et hypoglosse (XII) représentant un cycle respiratoire après TP. On note que ce cycle est précédé d'une déglutition de type Exp-Sw-I. La flèche verticale représente le début de la décharge déglutitrice hypoglosse et la ligne pointillée le début de l'inspiration. On note que la fin de la déglutition coïncide avec le début de la phase inspiratoire.

de la décharge motrice vagale lors de la déglutition n'a pas changé (3 ± 20 % comparé au contrôle après TP, $p = 0,958$, **Figure 29-D**).

D. La transection altère la coordination respiration-déglutition

Nous rappelons ici que la durée des cycles respiratoires a été normalisée pour l'analyse de la coordination respiration-déglutition. Au total, $n=540$ déglutition contrôle et $n=239$ déglutition après TP ont été analysées. Aucune déglutition de type Interrupt-I ou I-Sw-I n'a été observée quelle que soit la condition. En condition contrôle, la majeure partie des déglutitions étaient de type I-Sw-Exp, tandis que les autres correspondaient à des déglutitions de type Exp-Sw-Exp (**Figure 30**). En revanche, après la transection, trois patterns de coordination respiration-déglutition ont été observés. (**Figure 30**). On peut noter que la majorité des déglutitions observées après TP étaient de type I-Sw-Exp, en dépit du fait que la durée de l'expiration était six fois supérieure à celle mesurée en condition contrôle (**Figure 30-A**). Pour les déglutitions de type I-Sw-Exp, la TP n'a pas changé la durée de l'intervalle entre la fin de l'inspiration et le début de la déglutition ($0,17 \pm 0,12$ vs. $0,19 \pm 0,15$ sec, contrôle vs. TP respectivement, $p = 0,77$). D'autres déglutitions de type Exp-Sw-Exp ont été observées après TP. En outre, environ 8% des déglutitions observées après TP étaient des déglutitions de type Exp-Sw-I, un pattern de coordination jamais observé en condition contrôle (**Figure 30-B**). Afin de comparer la distribution des déglutitions dans la phase expiratoire entre les conditions contrôle et TP, nous avons analysé le pourcentage du nombre total de déglutitions obtenu dans chacun des 3 intervalles de la phase expiratoire : de 0-20%, de 20-60% et de 60-100%. Les résultats (exprimés en Control vs TP) indiquent : pour le premier intervalle (0-20%), 93 vs 64% ; pour le second intervalle (20-60%), 6 vs 18% ; et pour le troisième intervalle (60-100%) : 1 vs 18%. L'analyse statistique de ces données par un test de Chi2 montre que la distribution des déglutitions dans le cycle respiratoire est significativement modifiée après TP ($\chi^2 (1) = 26,57$, $p < 0,005$). Cette modification

significative est liée à l'augmentation du nombre de déglutitions de type Exp-Sw-I dans le groupe TP.

IV. Discussion

Dans cette étude, nous avons employé une méthode de transection ponto-bulbaire afin d'éliminer la phase post-inspiratoire et d'analyser les conséquences sur la commande motrice des nerfs X et XII lors de la déglutition et sur la coordination entre la déglutition et la respiration. Comme cela était attendu, les résultats montrent très clairement que l'ablation du pont entraîne un pattern respiratoire apneustique et biphasique, notamment marqué par la perte de l'activité post-inspiratoire vagale. Dans ces conditions cependant, nos résultats montrent que la commande motrice vagale permettant l'adduction des cordes vocales pendant la déglutition reste inchangée. En revanche, nous avons observé une diminution significative de l'amplitude et de l'aire sous la courbe de la bouffée nerveuse hypoglosse associée à la déglutition. Enfin, la transection a altéré la coordination entre la respiration et la déglutition. En effet, des déglutitions de type Exp-Sw-I, c'est-à-dire des déglutitions qui ont lieu juste avant l'inspiration, ont été observées après la transection mais jamais en condition contrôle. Ce travail indique que les structures respiratoires pontiques participent non seulement à la protection des voies aériennes pendant la déglutition, mais contribuent aussi à la commande motrice destinée aux muscles de la langue.

A. La commande laryngée lors de la déglutition est d'origine bulbaire

La phase laryngée de la déglutition est marquée par une forte adduction des cordes vocales qui permet de protéger les voies aériennes inférieures en évitant l'aspiration trachéale de tout ou partie du bol alimentaire. Cette fermeture de la glotte est accompagnée d'une constriction pharyngée afin d'augmenter la pression intraluminaire du pharynx et propulser le bol vers l'œsophage, ainsi que du basculement de l'épiglotte dont le rôle est d'empêcher la

pénétration laryngée ([Bosma 1957](#); [Shaker et al, 1990](#); [Bautista et al, 2014](#)). Nous avons vu en Introduction que les muscles responsables des mouvements effectués lors de la phase laryngée de la déglutition sont innervés par le nerf vague ([Matsuo et al, 2008](#)). Les motoneurones innervant ces muscles sont localisés dans le NA ([Doty 1968](#); [Miller 1982](#)). Des enregistrements intracellulaires des motoneurones adducteurs des cordes vocales réalisés *in vivo* pendant la respiration et la déglutition ont révélé qu'une très large proportion de motoneurones est activée au cours des 2 tâches motrices ([Gestreau et al, 2000](#)). Ces résultats peuvent être interprétés de 2 manières différentes. Soit des influx excitateurs provenant de neurones prémoteurs distincts convergent sur les mêmes motoneurones, soit ces neurones moteurs font l'objet d'une commande prémotrice commune lors de la respiration et la déglutition. Nos résultats indiquent que la commande laryngée observée lors de la post-inspiration est totalement abolie après la transection ponto-bulbaire, tandis que la décharge vagale destinée aux muscles du larynx pendant la déglutition n'est pas modifiée. Ces observations corroborent d'autres résultats obtenus par Bautista et Dutschmann ([2014](#)) après inactivation du noyau KF par l'injection d'isoguvacine et indiquent donc que la commande laryngée n'émane pas des mêmes neurones prémoteurs pendant la respiration et la déglutition. Les éléments indispensables à la commande motrice vagale lors de la déglutition sont donc entièrement localisés dans le bulbe rachidien, alors que l'adduction des cordes vocales en post-inspiration dépend des neurones localisés dans le GRP ([Dutschmann et Herbert 2006](#); [Smith et al, 2013](#); [Bautista et Dutschmann 2014](#)).

Dès lors, on peut se demander de quelle(s) structure(s) bulbaire(s) pourrait provenir la commande motrice laryngée observée lors de la déglutition.

Nous avons vu en Introduction que le CPGd se situe dans le NTS au niveau du bulbe rachidien dorso-médian ([Jean 2001](#)). Récemment, une étude élégante sur le contrôle nerveux

de la vocalisation a montré que certains neurones du NTS projetaient directement sur le noyau moteur ambigu ([Hernandez-Miranda et al, 2017](#)). Le NTS pourrait donc à la fois générer la

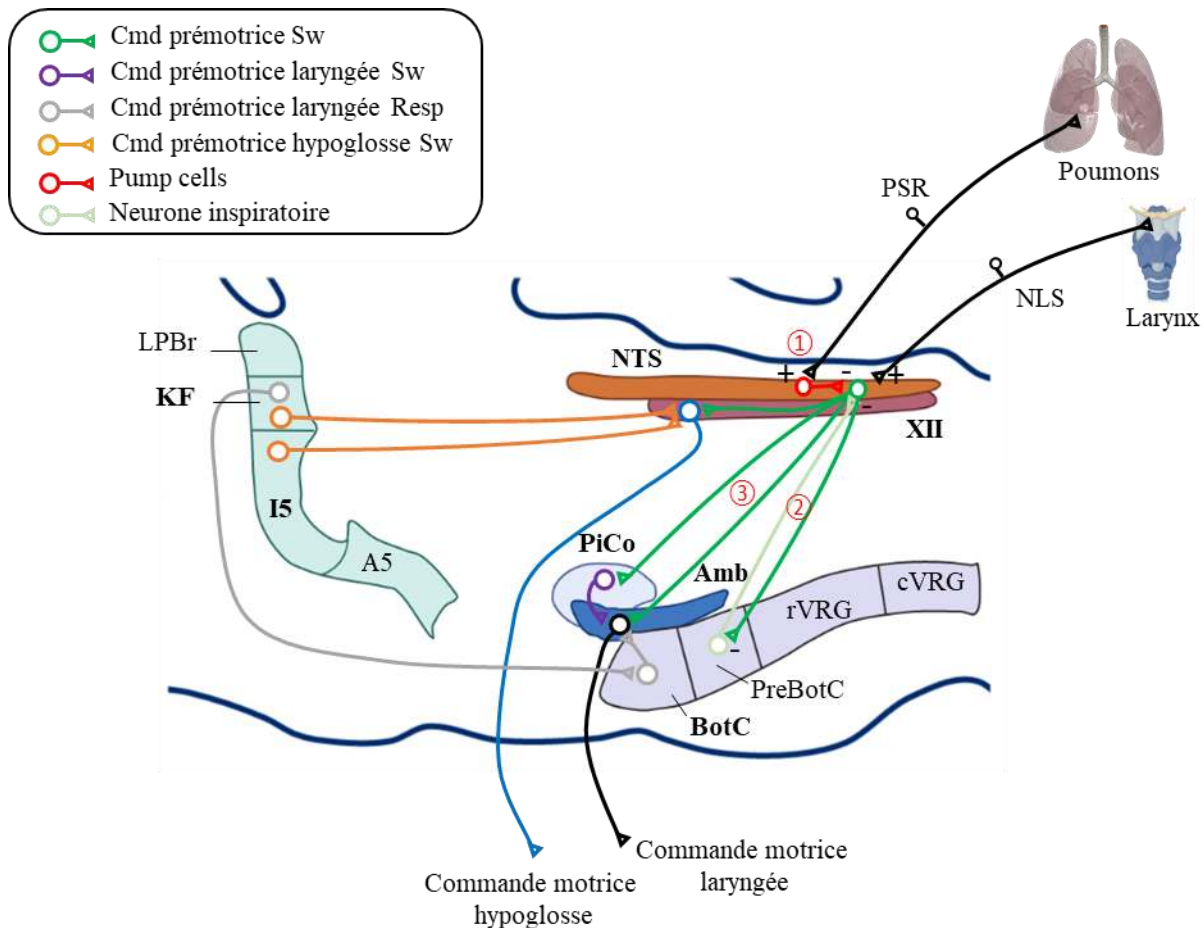


Figure 31 : Schéma général des connexions avérées ou supposées dans la commande prémotrice hypoglosse (pendant la déglutition) et laryngée (pendant la déglutition et la respiration). Illustration des différents noyaux importants pour la respiration et la déglutition sur une coupe sagittale de bulbe rachidien. La commande prémotrice laryngée est entièrement bulbaire pour la déglutition mais nécessite les structures pontiques pour la phase post-inspiratoire de la respiration. La déglutition peut être déclenchée via stimulation du nerf laryngé supérieur (+, NLS) innervant le larynx qui excite les neurones du groupe déglutiteur dorsal (DSG) situé dans le noyau du tractus solitaire (NTS). Les neurones du DSG envoient la commande déglutitrice vers les noyaux effecteurs correspondants. La majeure partie de la commande prémotrice hypoglosse est bulbaire mais nécessite aussi une commande prémotrice provenant du noyau de Kolliker-Fuse (KF) et l'aire intertrigémale (I5). Les chiffres entourés rouges représentent trois niveaux d'incertitudes concernant différents mécanismes nécessitant de plus amples investigations. Le ① représente l'incertitude concernant la modulation périphérique de la déglutition : les Pump cells pourraient exercer une action inhibitrice sur les neurones du DSG pendant l'inflation pulmonaire. Le ② désigne l'incertitude concernant l'interaction inhibitrice entre les neurones inspiratoires du PreBotC : est-elle directe ou indirecte ? Le ③ indique l'incertitude concernant la commande prémotrice laryngée pendant la déglutition : elle pourrait provenir d'une connexion directe entre le NTS et le noyau ambigu (Amb) ou d'une voie indirecte passant par des neurones de la rétículo intermédiaire (complexe post-inspiratoire, PiCo) avant d'atteindre les motoneurones Amb. LPBr : région parabrachiale latérale; A5 : groupe neuronal noradrénergique; BotC : complexe de Bötzing; PreBotC : complexe de préBötzinger; rVRG : groupe respiratoire ventral rostral; cVRG : groupe respiratoire ventral caudal; XII : noyau moteur hypoglosse ; PSR : Récepteurs sensibles à l'étirement pulmonaire.

séquence motrice de déglutition et transmettre la commande prémotrice laryngée. Cette hypothèse reste néanmoins à prouver. En dehors du NTS, nous avons vu que le noyau réticulaire intermédiaire avait été impliqué récemment dans la phase laryngée de la déglutition, cette dernière étant supprimée après inactivation pharmacologique de ce noyau ([Toor et al, 2019](#)). Il est donc plausible que la commande motrice soit élaborée dans le NTS lors de la déglutition puis transmise à des neurones pré moteurs laryngés du noyau réticulaire intermédiaire. Cette hypothèse est compatible avec les spéculations faites par les auteurs de l'article princeps sur le PiCo ([Anderson et al, 2016](#)), mais elle reste à prouver (**Figure 31**).

B. Le pont contient des neurones pré moteurs hypoglosses impliqués dans la déglutition

Nos résultats ont indiqué que la transection ponto-bulbaire avait significativement diminué l'amplitude et l'aire sous la courbe de l'activité motrice hypoglosse pendant la déglutition. En revanche, la durée de la bouffée motrice hypoglosse n'a pas été modifiée par la transection. Fonctionnellement, l'effet constaté après la lésion du pont pourrait se traduire par une propulsion moins puissante du bol alimentaire par la langue vers la cavité pharyngée. Une autre cause d'affaiblissement du coup de piston lingual au moment de la déglutition se rencontre chez des patients souffrant de paralysie nerveuse hypoglosse, cette dernière pouvant être associée à la dysphagie ([Watanabe et al, 2019](#)). Il est donc possible que le risque de dysphagie soit accru en l'absence des structures pontiques. Cette hypothèse rejoint donc l'idée détaillée dans le chapitre suivant postulant que le pont joue un rôle crucial dans la coordination respiration-déglutition et la protection des poumons.

Le noyau moteur hypoglosse reçoit de multiples connections issues de plusieurs noyaux du tronc cérébral, en particulier les régions associés à la respiration tel que le PreBotC, le NTS, le noyau parabrachial et le KF ([Borke et al, 1983](#); [Fay et Norgren 1997](#); [Chamberlin 2004](#)). Des neurones pré moteurs hypoglosses ont été identifiés dans le KF et la région

intertrigéminale après injection de fluorogold dans le noyau moteur du XII chez le rat ([Roda et al, 2004](#)). Le caractère monosynaptique de ces projections a été confirmé dans une étude récente utilisant un virus trans-synaptique modifié permettant d'infecter uniquement les prémotoneurones hypoglosses mais pas les interneurones d'ordre supérieur ([Guo et al, 2020](#)). L'ensemble de ces données anatomiques indique que des neurones prémoteurs hypoglosses sont présents dans le pont dorso-latéral (KF et région intertrigéminale). Nos résultats suggèrent que certains de ces neurones participent à la rétraction de la langue pendant la déglutition (**Figure 31**).

Pendant la respiration, il a été montré que les neurones du KF exerçaient une commande prémotrice sur les motoneurones hypoglosses afin de contrôler la protrusion de la langue pendant l'inspiration chez le chat décérébré ([Kuna et Remmers 1999](#)). Toujours *in vivo*, l'anesthésie volatile provoque une augmentation de l'activité inspiratoire du nerf hypoglosse corrélée à une augmentation de l'expression de c-Fos dans les neurones prémoteurs hypoglosses du KF. *In situ*, l'activation des récepteurs orexinergiques du KF modifie l'activité pré-inspiratoire du nerf hypoglosse ([Dutschmann et al, 2007](#)). De plus, la stimulation du KF par du glutamate altère la décharge respiratoire hypoglosse ([Gestreau et al, 2005](#)). Ces résultats étayent le rôle des motoneurones hypoglosses du KF dans le contrôle de l'activité respiratoire et de la résistance au flux d'air au travers des voies aériennes supérieures. Les neurones prémoteurs hypoglosses localisés dans la région pontique péririgéminale et parabrachiale sont modulés par la norépinéphrine qui facilite leur excitabilité ([Boyle et al, 2019](#)). En revanche, peu d'études corroborent l'implication des prémotoneurones hypoglosses du pont dans d'autres comportements moteurs ([Jakus et al, 2004](#); [Gestreau et al, 2005](#); [Roda et al, 2004](#)). Chez le rat, la destruction unilatérale du KF par lésion électrolytique altère cependant la décharge bilatérale des nerfs hypoglosses pendant la déglutition. Ainsi, nos

résultats confirment l'implication du pont dans la commande motrice hypoglosse lors de la déglutition.

C. Le pont est essentiel pour la protection des voies aériennes inférieures

La coordination entre la respiration et la déglutition est un phénomène complexe qui se traduit par l'apparition des déglutitions à certains moments préférentiels dans le cycle respiratoire chez l'Homme comme chez l'animal ([Shaker et al, 1992](#); [Dick et al, 1993](#); [Saito et al, 2002](#); [Bonis et al, 2011](#); [Martin-Harris et McFarland 2013](#); [Pitts et al, 2015](#)). Nous avons étudié les effets de la transection ponto-bulbaire sur la coordination entre la respiration et la déglutition. Les résultats montrent que la coordination est significativement altérée après transection. En effet, un nouveau type de déglutition (Exp-Sw-I) a été observé dans 8% des cas, le moment de déclenchement intervenait juste avant l'inspiration et ces déglutitions n'étaient donc pas suivies par une période d'expiration. Il est important de noter que chez le rat, le chat et l'Homme ce type de déglutition est associé à un fort risque d'aspiration ([Terzi et al, 2007](#); [Nishino 2012](#)). Le cas est un peu différent chez la chèvre puisque de nombreuses déglutitions peuvent se produire vers la fin de l'expiration, ce qui semble être normal chez les ruminants ([Bonis et al, 2011](#)). Néanmoins, une courte période d'expiration suit ce type de déglutition en fin d'expiration tardive. De manière intéressante, l'équipe de Forster et collaborateurs ont pu déceler des anomalies de la coordination respiration-déglutition chez la chèvre éveillée après destruction des noyaux pontiques dorso-latéraux à l'aide d'acide iboténique ([Bonis et al, 2011](#)). Concernant les déglutitions qui apparaissent vers la fin de la phase d'expiration tardive, les auteurs ont rapporté que la lésion provoquait la suppression de la prolongation réflexe de l'expiration ([Bonis et al, 2013](#)). Ainsi, nos résultats chez le rat corroborent ceux obtenus chez la chèvre et montrent un dérèglement sévère de la coordination respiration-déglutition en l'absence des structures pontiques.

Dans l'étude de Bautista et Dutschmann ([2014](#)) mentionnée plus haut, l'inactivation du KF par l'isoguvacine a entraîné la perte d'une activité laryngée tonique tandis que les bouffées laryngées phasiques persistaient pendant la déglutition rythmique induite par la stimulation de l'oropharynx avec de l'eau ([Bautista et Dutschmann 2014](#)). En raison de l'activité tonique observée en condition contrôle et perdue après lésion, les auteurs suggèrent que le KF exerce un rôle protecteur des voies aériennes inférieures pendant la déglutition. Même si notre travail aboutit à la même conclusion, nous n'avons pas observé d'activité tonique sur le nerf vague lorsque la déglutition est induite (de manière isolée et non rythmique) par la quipazine.

Nous émettons l'hypothèse que l'activité tonique observée par Bautista et Dutschmann ([2014](#)) est liée à la méthode de stimulation employée (injection manuelle d'un volume d'eau important à l'aide d'une seringue). En effet, ce type de stimulus périphérique provoque certainement l'activation d'un grand nombre de mécanorécepteurs et chémorécepteurs de la cavité oropharyngée et laryngée, ce qui n'est probablement pas le cas lors de l'induction pharmacologique. Nous avons vu dans l'Introduction (Chapitre 5 sur la coordination respiration-déglutition) qu'une telle activité afférente, médiée essentiellement par les fibres du nerf laryngé supérieur, devrait alors activer fortement les neurones du CPGd situés dans le NTS ([Saito et al, 2002](#); [Hashimoto et al, 2019](#); [Fuse et al, 2020](#); [Kinoshita et al, 2021](#); [Yamamoto et al, 2021](#)). On ne peut pas exclure que cette excitation soit ensuite relayée du NTS au noyau KF et que ce dernier ajuste la commande motrice. Si cette spéculation est correcte, cela voudrait dire que le KF participe à ce qu'on pourrait appeler « la composante tonique de la commande laryngée » selon le niveau d'activité périphérique. Notons que le bénéfice réel de cette composante tonique sur la protection des voies aériennes supérieures ne nous apparaît pas clairement.

D. Circuits bulbares et protection des voies aériennes inférieures

Nous avons montré qu'en l'absence des structures pontiques de très nombreuses déglutitions continuaient d'être évoquées immédiatement après l'activité inspiratoire, avec un délai identique par rapport aux déglutitions contrôles. En condition contrôle, nous pourrions dire que de telles déglutitions se produisent en post-inspiration et peuvent être nommées déglutitions de type « Post-I » ([Horton et al, 2018](#)). Or en dépit de la disparition de la phase post-inspiratoire à la suite de la transection bulbopontique, ce type de déglutition se produit toujours. Ces faits nous permettent de tirer trois conclusions.

La première est que la phase post-inspiratoire n'est pas, en soi, une phase indispensable pour la déglutition, même si cette phase est permissive et peut représenter un avantage mécanique (voir Introduction). La seconde est qu'il est probablement beaucoup plus juste de nommer ce type de déglutition « I-Sw-Exp » plutôt que déglutition Post-I, comme nous l'avons fait la plupart du temps dans ce manuscrit. La troisième est que ce pattern particulier (et privilégié) de coordination entre la respiration et la déglutition témoigne d'un couplage important entre l'inspiration et la déglutition. En termes de mécanismes neurophysiologiques ce couplage pourrait être médié par des connexions inhibitrices réciproques entre le CPGd et les neurones du PreBotC, comme cela a été suggéré récemment (voir Fig.7 dans [Horton et al, 2018](#)). Rappelons ici qu'en plus de ce mécanisme central proposé, un mécanisme d'origine périphérique médié par le nerf vague empêche la déglutition de se produire pendant l'inflation pulmonaire (i.e., pendant l'inspiration). Le NTS intègre non seulement les informations afférentes des NLS mais aussi celles des récepteurs sensibles à l'étirement pulmonaire.

Les « pump cells » du NTS sont connectées aux fibres périphériques vagues et leur activation pourrait permettre de contrôler le moment de déclenchement de la déglutition ([Berger et Dick 1987](#); [Bellingham et Lipski 1992](#); [Kubin et al, 2006](#); [Horton et al, 2018](#)).

En conclusion, le NTS est probablement une structure clé du bulbe rachidien pour garantir une coordination physiologique entre la respiration et la déglutition. De futures expériences doivent être mises en œuvre afin de vérifier l'existence de projections inhibitrices entre le NTS et le PreBotC et/ou entre le PreBotC et le NTS.

Chapitre 3 : Activités de décharge des motoneurones hypoglosses et des neurones de la colonne respiratoire ventrale au cours de la respiration et la déglutition

I. Introduction

Les mécanismes nerveux responsables de la coordination entre la respiration et la déglutition sont mal connus. Bien que le réseau déglutiteur ait fait l'objet de nombreuses études ([Jean 2001](#); [Ertekin et Aydogdu 2003](#); [Martin-Harris et al, 2005](#); [Sasegbon et Hamdy 2017](#)), il persiste de nombreuses zones d'ombre sur son organisation anatomo-fonctionnelle et sur ses interconnexions avec le réseau respiratoire ([Laitman et Reidenberg 2013](#); [Bolser et al, 2013](#)). Nous avons vu dans les chapitres précédents que ces deux activités motrices mettaient en jeu globalement les mêmes muscles des voies aériennes supérieures afin d'effectuer des mouvements antagonistes. Par exemple, la langue se rétracte pendant la déglutition alors qu'elle effectue une protrusion pendant l'inspiration. De plus, de fortes interactions synaptiques inhibitrices existent entre les neurones des réseaux de la déglutition et de la respiration étant donné qu'il est impossible d'inspirer et déglutir en même temps. Aussi, lorsqu'une déglutition est produite au sein du cycle respiratoire, on observe une réinitialisation de l'expiration afin de repousser la phase inspiratoire suivante et éviter ainsi la fausse route alimentaire. Le noyau du tractus solitaire représente le centre intégrateur des informations végétatives le plus important et contient les neurones du groupe respiratoire dorsal ([Bianchi et al, 1995](#)) ainsi que ceux composant le groupe déglutiteur dorsal ([Jean 2001](#)). Le NTS semble donc être une structure de choix pour coordonner la respiration et la déglutition.

Cependant, la vision simpliste basée sur l'hypothèse que le réseau déglutiteur et le réseau respiratoire sont distincts a été remise en question par de nombreux travaux dont certains résultats électrophysiologiques obtenus à Marseille et dans d'autres laboratoires.

Mesurer l'activité de décharge des neurones respiratoires pendant la déglutition est une méthode classique permettant de sonder le fonctionnement des réseaux moteurs du tronc cérébral au cours de tâches motrices différentes ([Grelot et al, 1992](#); [Milano et al, 1992](#); [Dick et al, 1993](#); [Gestreau et al, 1996](#); [2005](#); [Bianchi et Gestreau 2009](#); [Hashimoto et al, 2019](#); [Fuse et al, 2020](#); [Umezaki et al, 2020](#); [Kinoshita et al, 2021](#)). Ces différentes études, ainsi que d'autres, ont montré que le réseau respiratoire possédait des neurones multifonctionnels, c'est-à-dire des neurones capables d'être activés lors de la respiration mais aussi lors de fonctions motrices non respiratoires telles que la toux, l'éternuement, le vomissement, la déglutition ou la phonation ([Gestreau et al, 1996](#); [2000](#); [2005](#); [Shiba et al, 1999](#); [Bolser et al, 2006](#); [Shiba et al, 2007](#); [Bianchi et Gestreau 2009](#); [Umezaki et al, 2020](#)). Ces activités multifonctionnelles observées pour différents éléments du CPGr (motoneurones mais aussi pré-motoneurones et interneurones proprio-bulbaires ou proprio-spinaux) indiquent qu'il ne s'agit probablement pas d'une simple interaction entre deux réseaux moteurs distincts ou dédiés et figés mais d'une véritable plasticité fonctionnelle ou réorganisation des réseaux moteurs du tronc cérébral, qui pourrait être analogue à ce qui a été décrit pour les réseaux moteurs chez les invertébrés ([Marder et Bucher 2007](#); [Marder 2011](#); [Daur et al, 2016](#); [Otopalik et al, 2017](#); [Mantziaris et al, 2020](#); [Northcutt et Schulz 2020](#)). Ainsi, dans ce travail, nous avons souhaité poursuivre l'analyse électrophysiologique de différentes populations de neurones du réseau respiratoire pendant la respiration et la déglutition. Les objectifs étaient d'utiliser la préparation *in situ* et notre modèle d'induction pharmacologique de la déglutition afin, 1) d'enregistrer les activités de décharge de motoneurones hypoglosses identifiés fonctionnellement, puisque ces éléments représentent une sortie motrice importante à la fois pour le CPGr et le CPGd, et 2) d'enregistrer l'activité des neurones I, Post-I et E2 de la colonne respiratoire ventrale pendant la respiration et la déglutition afin d'approfondir nos connaissances sur les interactions neuronales au cours de ces deux tâches motrices distinctes.

II. Matériels et méthodes

A. Modèle expérimental

Toutes les expériences ont été faites sur la préparation perfusée cœur-tronc cérébral isolés *in situ* de rats Wistar (P17-21 ; n=27 ; 80-110g ; Janvier Labs, Le Genest St Isle, France). La procédure a été décrite dans le chapitre Matériel et Méthode commun.

B. Induction pharmacologique de la déglutition

L'apparition des déglutitions isolées a été augmentée à l'aide de la quipazine tel que décrit dans le chapitre 1 des résultats de cette thèse. La quipazine a été administrée dans le LCRA (voie systémique) de la préparation perfusée *in situ* à une concentration de 1,5µM/kg.

C. Recueil et analyse de l'activité extracellulaire neuronale

Les enregistrements extracellulaires ont été effectués à l'aide de multi-électrodes (NeuroNexus, Michigan, USA). Les coordonnées permettant d'atteindre le noyau moteur hypoglosse étaient : 0.1-0.6 mm en latéralité, 0-0.6 mm rostral à l'obex, 0.4-1,1 mm en profondeur. Celles permettant d'atteindre la colonne respiratoire ventrale étaient : 1.8-2.3 mm en latéralité, 0.5-2.5 mm rostral à l'obex, 1,8-2,6 mm en profondeur. A posteriori, les activités brutes sont seuillées afin d'extraire tous les potentiels d'action (PA) émis par les neurones au voisinage de l'électrode (Spike Sorting ; Logiciel OpenEx, Plexon Inc. USA). Selon de multiples critères calculés par ordinateur (amplitude, durée, composantes principales) tous les PA émis par un même neurone sont identifiés et triés afin d'obtenir un train de décharge unitaire. Les PA sont ensuite remplacés par des signaux qui ne conservent que l'aspect temporel de la décharge neuronale, permettant de marquer graphiquement où se produisent les PA (aussi appelé « raster », pour exemple voir [Figure 32-A](#)). Le test d'autocorrélation permet de vérifier la présence de la période réfractaire absolue et la qualité de l'extraction des PA ou « Spike Sorting ». Une méthode de seuillage appliquée à l'activité phrénique intégrée a

permis de détecter chaque bouffée inspiratoire et de calculer le cycle respiratoire moyen. Pour chaque neurone, l'obtention d'un histogramme de décharge calculé lors du cycle respiratoire moyen (« cycle-triggered histogram ») a permis de définir le pattern de décharge. La technique de Spike-Triggered Averaging (STA) a été appliquée pour chaque neurone enregistré au voisinage du noyau du XII afin de rechercher un PA propagé le long du nerf XII, prouvant le statut de motoneurone. Cette technique permet de mesurer la relation entre un signal continue (ici l'activité du nerf XII) et les décharges d'un neurone (ici un neurone enregistré dans le noyau moteur XII). La branche médiane du XII a été enregistrée préférentiellement de façon à identifier les motoneurones qui innervent les muscles protruseurs de la langue (actifs en inspiration). Enfin, le pattern et la fréquence de décharge des neurones ont été analysés au cours de la respiration et la déglutition. Dans ce travail préliminaire, les neurones enregistrés au sein de la colonne respiratoire ventrale n'ont pas été identifiés fonctionnellement par des tests d'activation antidromique ou la technique de STA.

D. Analyses statistiques

La normalité de la distribution a été testée à l'aide d'un test de normalité Shapiro–Wilk. Des analyses ANOVA à un facteur ou à mesures répétées suivies de tests post-hoc de Fisher ont servi à comparer les latences des PA propagés (STA). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SD et les différences sont considérées significatives lorsque $p < 0.05$.

III. Résultats

Dans cette série d'expériences, la fréquence respiratoire moyenne (Rf) des rats était de 21 ± 7 cycles/min et la fréquence des déglutitions (SR) de 3,5 dég/min (induction à l'aide de quipazine). Ces valeurs sont similaires aux données obtenues précédemment avec ce même modèle expérimental *in situ*.

A. Activité des motoneurones hypoglosses

Les enregistrements dans le noyau moteur du XII ont permis de dériver l'activité électrique de 122 cellules, dont 68 (56%) correspondaient à des motoneurones innervant les muscles protruseurs de la langue (test de Spike-Trigger Averaging ou STA positif ; **Figure 32**). Le pattern et la fréquence de décharge de chaque cellule ont été analysés lors de l'activité

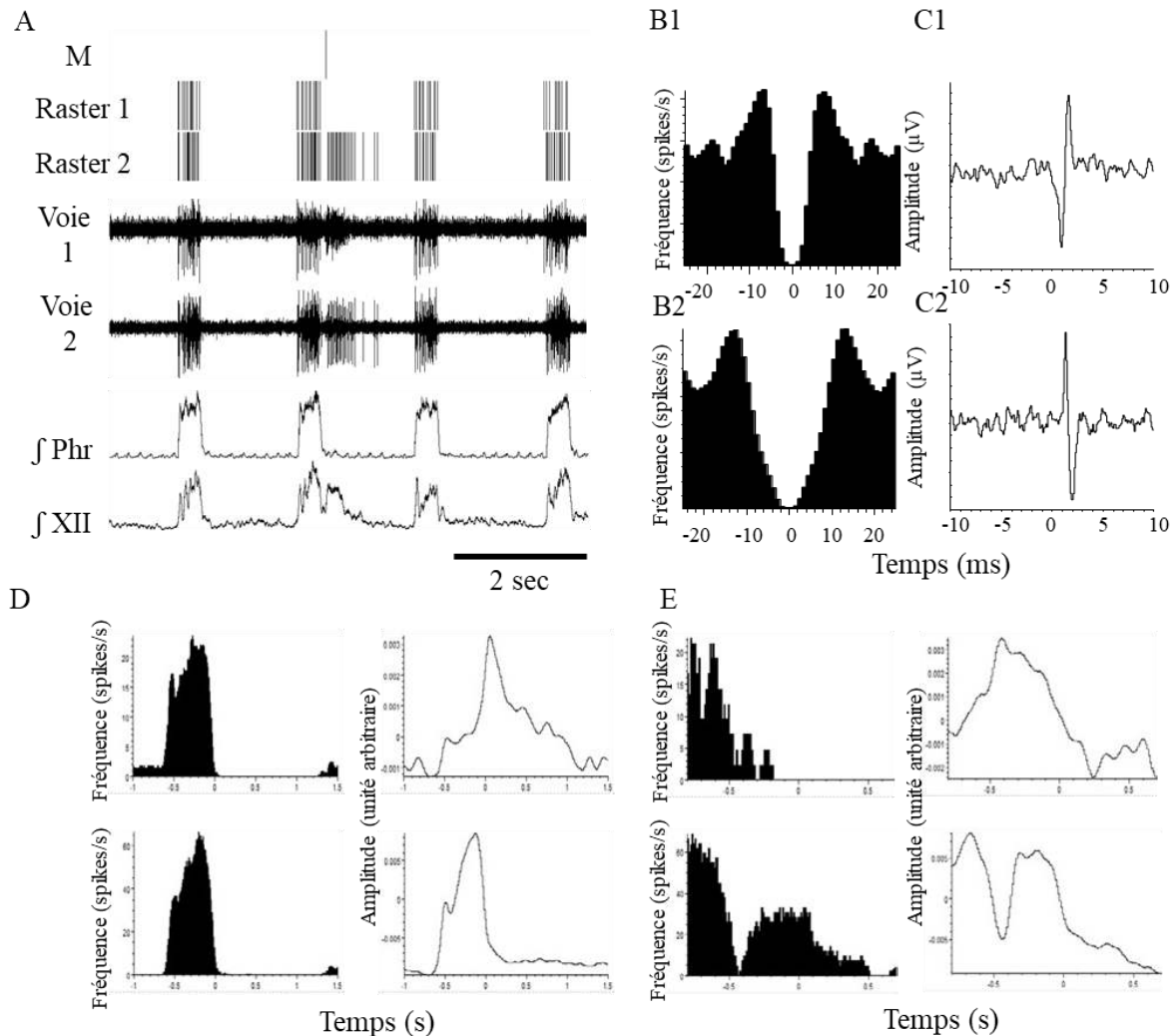


Figure 32 : Activités nerveuses et cellulaires recueillies simultanément pendant la respiration et la déglutition fictives. A) Décharges unitaires (rasters 1 et 2) obtenues après seuillage des activités brutes (voies 1 et 2) et activités intégrées des nerfs phrénique (f Phr) et hypoglosse (f XII) lors de 3 cycles respiratoires et d'une déglutition. Le seuillage de l'activité f XII a permis de marquer le début de la bouffée de déglutition (M) afin de construire l'histogramme illustré en E. B) Autocorrélogrammes des neurones 1 et 2. C) Mise en évidence des motoneurones par spike-trigger averaging de l'activité brute de la branche médiane du XII à partir de la décharge des neurones 1 (n=1477 spikes) et 2 (n=3265 spikes), révélant la présence d'un potentiel d'action propagé dans le nerf avec une latence de 1,0 ms (C1) ou 0,6 ms (C2). Les vitesses de propagation correspondantes sont de 18 et 30 m/s, respectivement. D-E) Histogrammes montrant la décharge moyenne des neurones 1 et 2 ainsi que l'enveloppe moyenne des bouffées de décharge intégrées des nerfs X et XII (B1) lors du cycle respiratoire (n=40; D) et la déglutition (n=17; E). Les 2 motoneurones ont un pattern respiratoire de type I-Aug et innervent les muscles protruseurs de la langue. Seul le motoneurone 2 est actif pendant l'inspiration et la déglutition.

respiratoire spontanée ainsi que lors de la déglutition induite par voie pharmacologique. En dehors de quelques cellules non-respiratoires (NR, n=7), les patterns respiratoires observés étaient de type inspiratoire croissant (I-Aug, n=76) ou décroissant (I-Dec, n=4), inspiratoire ou expiratoire tonique (I-tonic, n=28 ; E-Tonic, n=7).

Lors de la déglutition, 47/122 cellules (37%) étaient actives (I-Aug, n=28 ; I-tonic, n=11 ; E-tonic, n=6 ; NR, n=2), la plupart déchargeant de façon précoce (**Figure 32-A**) tandis que d'autres neurones (n=4) déchargeaient plus tardivement (**Figure 33**). Parmi ces 47 cellules actives lors de la déglutition, 21 étaient des motoneurones caractérisés par STA aussi actifs pendant l'inspiration. La fréquence de décharge des cellules participant à la déglutition était significativement plus élevée pour les neurones E-tonic ($47,3 \pm 3,2$ vs $32,8 \pm 4,2$ et $27,8 \pm 1,1$ PA/s pour E-tonic vs I-Aug et I-tonic, respectivement, $p < 0,05$) dont l'axone empruntait vraisemblablement la branche latérale du XII innervant les muscles rétracteurs de la langue (STA négatif dans la branche médiane). Les latences d'apparition du PA propagé mesurées par STA étaient plus longues ($1,23 \pm 0,08$ ms ; $p < 0,05$) pour les neurones actifs au cours de la déglutition (n=47) que pour les neurones non-actifs ($1,01 \pm 0,06$ ms ; **Figure 32-C**).

B. Activité des neurones de la colonne respiratoire ventrale

L'activité électrique de 119 cellules a été enregistrée dans la colonne respiratoire ventrale rostrale (CVRr), au voisinage du PreBotC et du BotC. Le pattern et la fréquence de décharge de chaque neurone ont été analysés lors de l'activité respiratoire spontanée ainsi que lors de la déglutition induite par voie pharmacologique. Les patterns respiratoires des cellules enregistrées étaient les suivants : I-Aug (n=24), I-Dec (n=2), I-tonic (n=12), E-Dec (n=36), E-Aug (n=16), E-tonic (n=22) et NR (n=7). Au total, ~50% des cellules enregistrées (59/119) étaient actives lors de la déglutition. La répartition des cellules actives a cependant varié considérablement selon le type de pattern respiratoire : I-Aug (8/24) soit 33%, I-Dec (2/2), I-

tonic (8/12) soit 66%, E-Dec (28/36) soit 78%, E-Aug (0/16) soit 0%, E-tonic (10/22) soit 45%

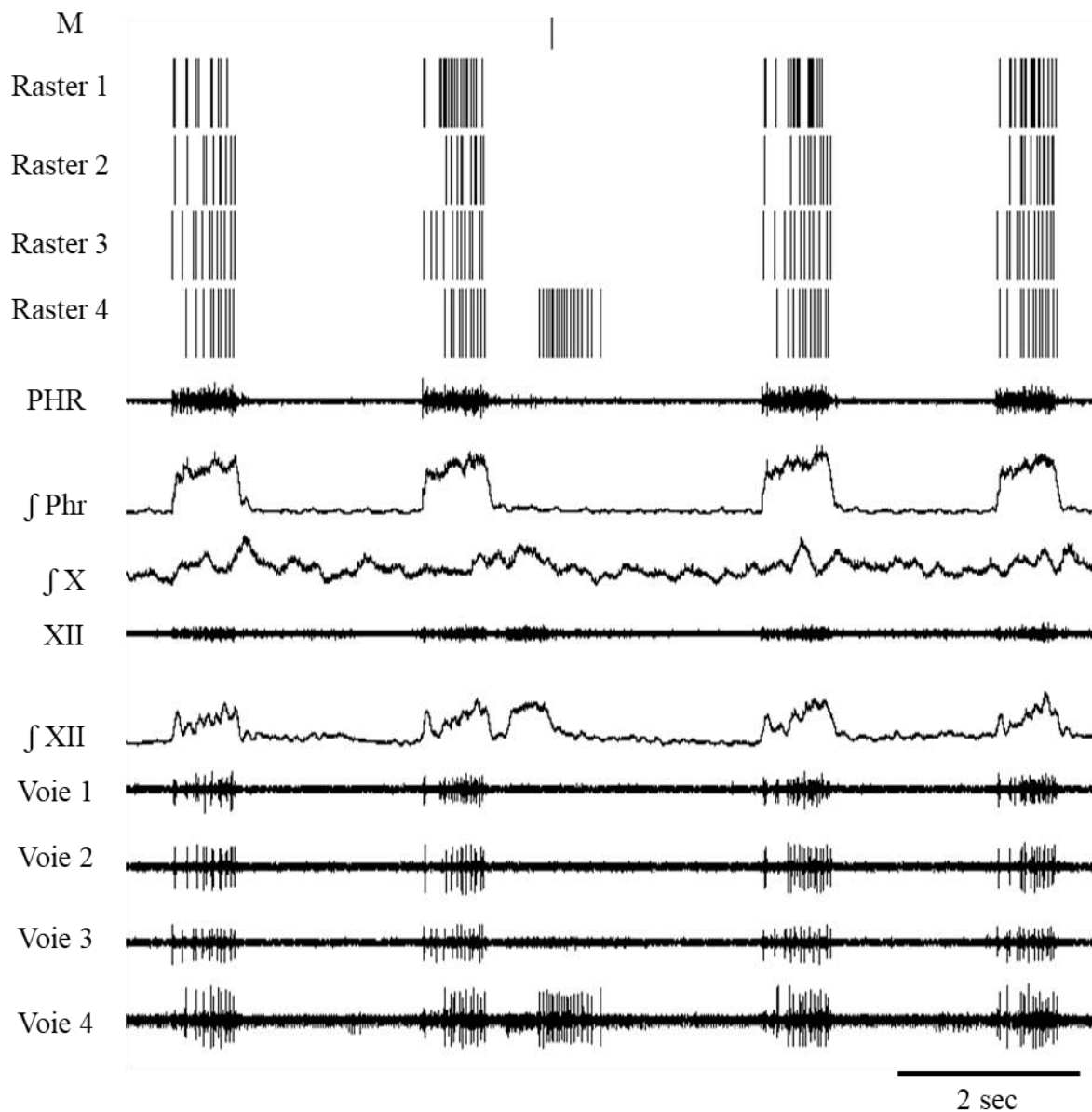


Figure 33 : Activités nerveuses et cellulaires recueillies simultanément pendant la respiration et la déglutition fictives. Décharges unitaires (rasters 1 à 4) obtenues après seuillage des activités brutes (voies 1 à 4) et activités brutes et/ou intégrées ($\int$) des nerfs phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) lors de 4 cycles respiratoire et d’une déglutition. Le seuillage de l’activité $\int$ XII a permis de marquer la fin de la bouffée de déglutition (M). Les tests de “spike-trigger averaging” réalisés à partir de la branche médiane du XII pour les cellules 2 et 4 attestent qu’il s’agit de motoneurones innervant les muscles protruseurs de la langue. Notez l’activité tardive du motoneurone 4 lors de la déglutition en plus de son activité lors de la respiration (pattern I-Aug). Cette activité pourrait servir au repositionnement de la langue après le mouvement principal de rétraction.

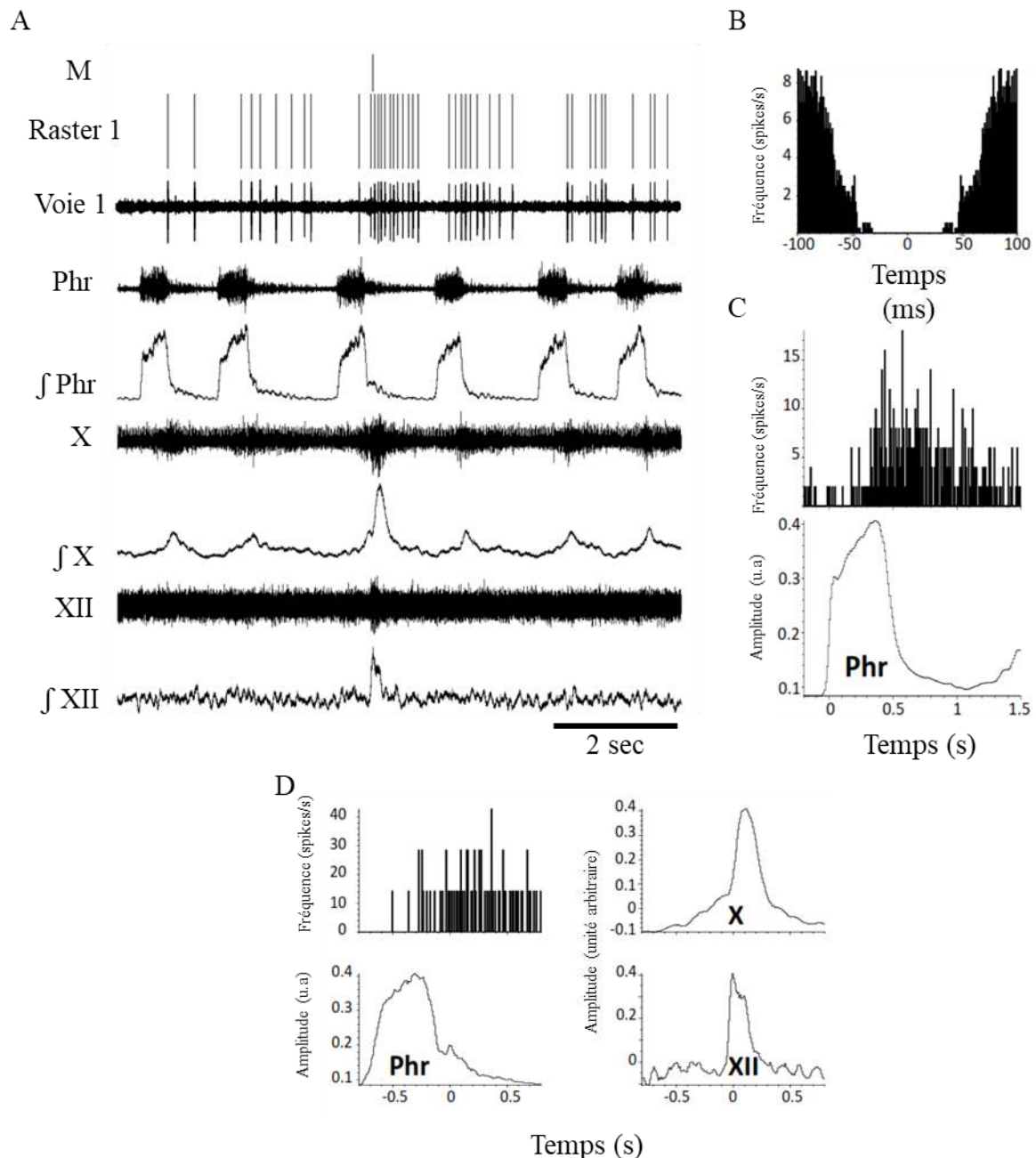


Figure 34 : Activité d'un neurone expiratoire précoce de la colonne respiratoire ventrale lors de la respiration et la déglutition. (A) Décharge unitaire (raster 1, voie 1) et activités des nerfs phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) lors de 6 cycles respiratoire et d'une déglutition en post-inspiration. Le début de la bouffée de déglutition est marqué (M) afin de construire l'histogramme illustré en D. **(B)** Autocorrélogramme. **(C)** Décharge moyenne du neurone et du nerf phrénique lors du cycle respiratoire (n=50) montrant une décharge décroissante lors de l'expiration précoce (pattern E-Dec). **(D)** Décharge moyenne du neurone et des nerfs Phr, X et XII lors de la déglutition (n=7; D). Notez l'activité précoce du neurone lors de la déglutition qui émet une salve de potentiels d'action de fréquence supérieure à celle mesurée pendant la respiration.

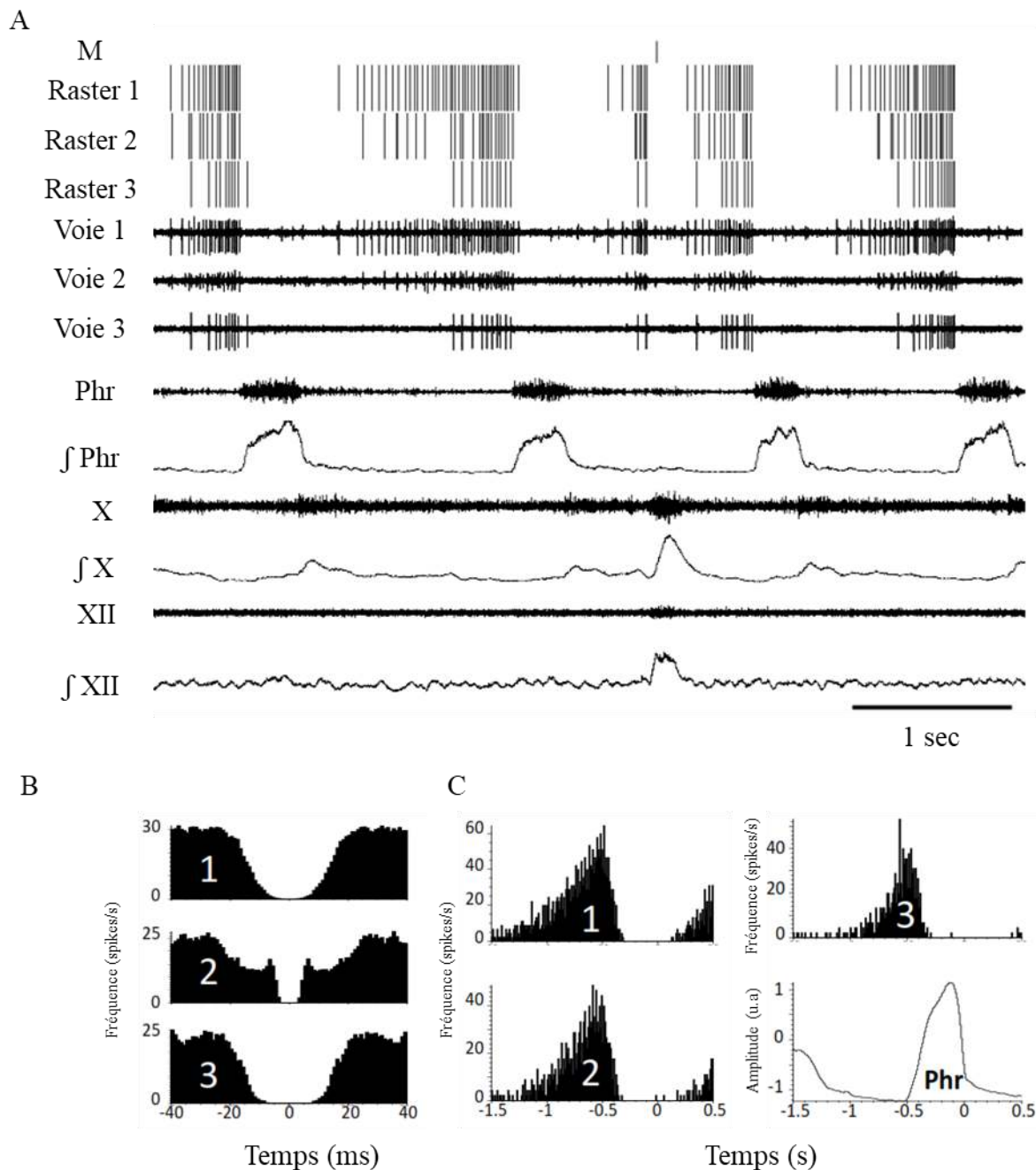


Figure 35 : Activités de 3 neurones expiratoires tardifs de la colonne respiratoire ventrale lors de la respiration et la déglutition. (A) Décharges unitaires (rasters 1-3, voies 1-3) et activités des nerfs phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) lors de 4 cycles respiratoire et d'une déglutition lors de la transition E1-E2 (M). **(B)** Autocorrélogrammes des neurones 1 à 3. **(C)** Activité moyenne des neurones et du nerf phrénique lors du cycle respiratoire (n=50) montrant une décharge croissante lors de l'expiration tardive (pattern E-Aug). Notez que la déglutition s'accompagne d'un arrêt de la décharge des 3 neurones E-Aug puis est suivie par une reprise progressive de l'activité expiratoire neuronale.

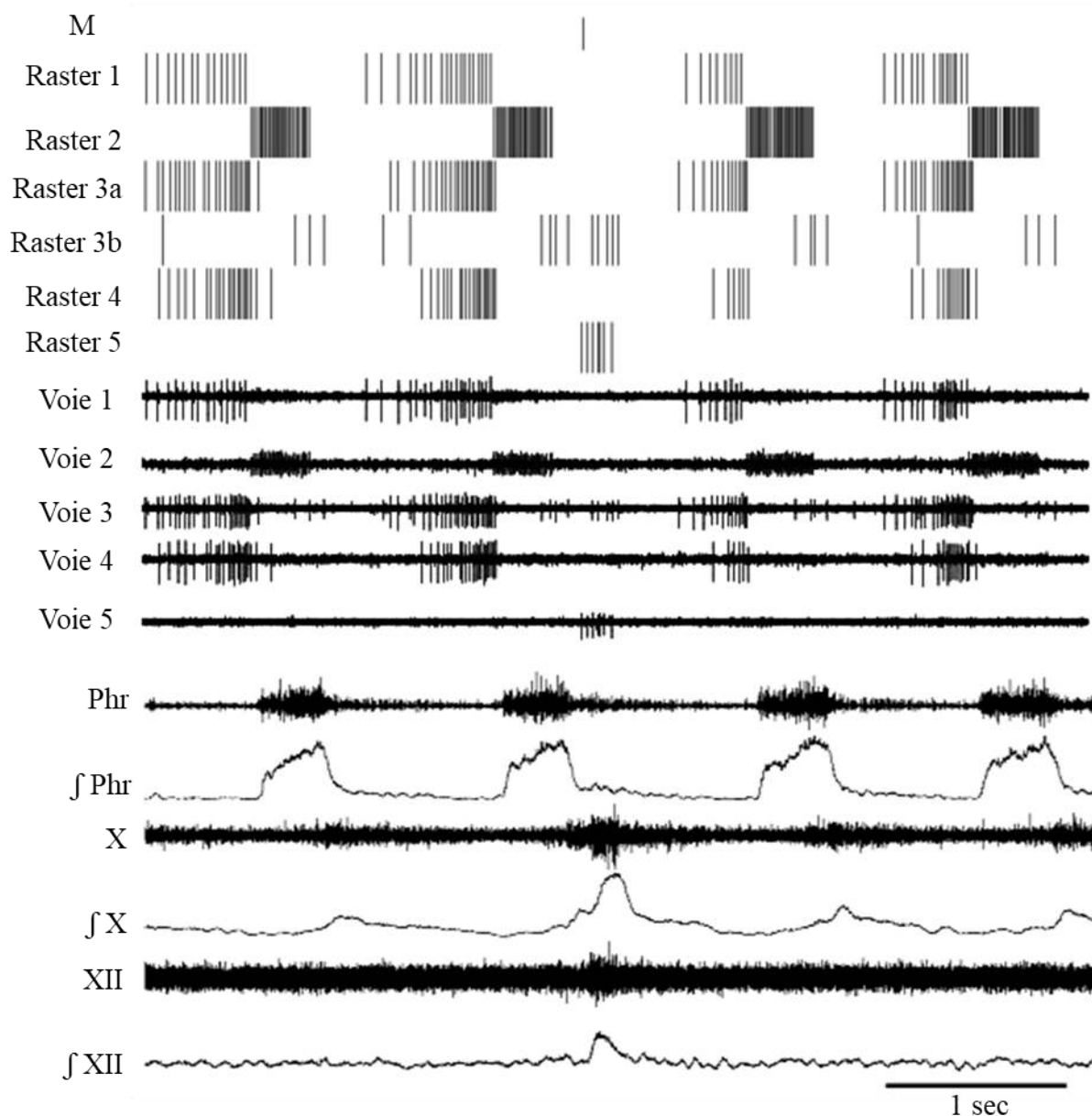


Figure 36 : Activités de 6 neurones de la colonne respiratoire ventrale lors de la respiration et la déglutition. Décharges unitaires (rasters 1-5) obtenues après seuillage et spike-sorting des activités brutes unitaires (voies 1, 2, 4 et 5) ou multi-unitaires (voie 3). L'activité des nerfs phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) est illustrée lors de 4 cycles respiratoires et d'une déglutition en post-inspiration (M). Notez l'absence de décharge lors de la déglutition de 3 neurones E-Aug (voies 1, 3 et 4) et d'un neurone I-Aug (voie 2). Un neurone E-Dec (voie 3, raster 3b) et un neurone non-respiratoire (NR; voie 5) déchargent en phase avec les bouffées du X et du XII émises lors de la déglutition.

et NR (3/7) soit 45%. Les [figures 34](#) et [35](#) et [36](#) illustrent les principaux patterns de décharge recueillis.

IV. Discussion

Notre modèle pharmacologique d'induction de la déglutition à partir de la préparation perfusée *in situ* nous a permis de dériver l'activité neuronale dans plusieurs structures du tronc cérébral pendant la respiration et la déglutition. Les résultats montrent qu'une partie des motoneurones hypoglosses innervant les muscles protruseurs de la langue sont actifs pendant l'inspiration et la déglutition. De plus, de nombreux interneurones respiratoires situés dans le bulbe rachidien ventral sont également recrutés lors de la déglutition. Le fait que les éléments du réseau respiratoire participent à l'élaboration d'une activité motrice non-respiratoire corrobore des résultats antérieurs obtenus *in vivo* et renforce l'hypothèse de flexibilité fonctionnelle du CPG_r. De plus amples analyses, telles que des cross-corrélations entre plusieurs trains de PA permettraient certainement de compléter nos connaissances sur la réorganisation du réseau respiratoire pendant la déglutition.

A l'instar de l'extraordinaire flexibilité fonctionnelle des CPGs démontrée *in vitro* chez les invertébrés ([Marder 2011](#)), des résultats obtenus *in vivo* chez le mammifère suggèrent un fonctionnement dynamique des réseaux du tronc cérébral. En effet, de très nombreux neurones respiratoires sont actifs lors des phases inspiratoire, compressive et expulsive du réflexe toux ([Shannon et al, 1996](#)), ou encore lors de la phonation ([Jurgens 2009](#)). Enfin, d'autres études *in vivo* ont analysé l'activité des éléments du CPG_r lors de la déglutition et ont montré que certains éléments moteurs et prémoteurs participent à l'élaboration de ce réflexe ([Dick et al, 1993](#); [Gestreau et al, 2005](#); [Bonis et al, 2013](#); [Umezaki et al, 2020](#)). Des études récentes réalisées *in situ* ont montré que certains neurones du groupe déglutiteur dorsal situés dans le NTS et dans la formation réticulée étaient aussi actifs pendant la respiration

([Hashimoto et al, 2019](#); [Yamamoto et al, 2021](#)). Bien que la majorité des neurones déglutiteurs enregistrés dans ces études soient non-respiratoires, les auteurs ont identifié une activité respiratoire pour chaque type de neurone enregistrés (précoces, tardifs, relais sensoriels, excités ou inhibés pendant la déglutition). Ceci témoigne du fait que les neurones mis en commun entre le CPGd et le CPGr sont hétérogènes. Nos résultats *in situ* corroborent donc ces observations.

Parmi les résultats saillants de l'étude électrophysiologique, nous montrons pour la première fois que des motoneurones inspiratoires innervant les muscles protruseurs de la langue sont actifs lors de la déglutition, alors que le mouvement principal de la langue lors de la déglutition est une rétraction. Ces résultats sont cohérents avec la théorie de l'hydrostat qui stipule que chaque mouvement de la langue s'accompagne d'une co-activation de muscles antagonistes ([Fregosi 2011](#)). Ils sont également cohérents avec d'autres observations faites chez le chat à l'aide de la technique d'enregistrement intracellulaire ([Roda et al, 2002](#)). Ainsi, la commande motrice hypoglosse lors de la respiration et la déglutition pourrait reposer sur une convergence vers les mêmes motoneurones de synapses provenant de neurones prémoteurs différents (les uns étant respiratoires et appartenant au CPGr, les autres étant déglutiteurs et appartenant donc au CPGd) ou bien de neurones prémoteurs identiques, ce que l'on ignore encore.

De plus, nous montrons que 78% des neurones E-Dec de la CVR déchargent lors de la déglutition alors que 16/16 neurones E-Aug de la CVR sont mis au silence au moment de la déglutition puis déchargent de nouveau après l'accomplissement du réflexe. Nous pensons que l'élaboration de la séquence motrice de déglutition repose en grande partie sur le recrutement des neurones E-Dec, quel que soit le type de déglutition (I-Sw-Exp ou Exp-Sw-Exp).

Cette hypothèse est en adéquation avec l'inhibition connue des neurones E-Dec sur les neurones inspiratoires et sur les neurones E-Aug du CPGr ([Figure 14](#)). Cela permettrait en partie de comprendre pourquoi la déglutition ne se produit pas (physiologiquement) pendant l'inspiration. Cela permet aussi de comprendre le mécanisme de prolongation réflexe de l'expiration qui est décrit dans la littérature et que nous avons observé pour les déglutitions contrôle et QPZ sur notre modèle *in situ*. Cette prolongation réflexe permet de retarder l'apparition du cycle inspiratoire qui suit la déglutition et d'éviter ainsi l'aspiration trachéale de tout ou partie du bol alimentaire, surtout pour les déglutitions de type Exp-Sw-Exp. Enfin, ces hypothèses ne sont pas nécessairement en désaccord avec nos données présentées dans le chapitre 2 des résultats et indiquant qu'une coordination (ou un couplage important) persistait lorsque la phase post-I était abolie par l'ablation du pont. En effet, nous pensons qu'il existe plusieurs mécanismes qui permettent de sécuriser le système en évitant d'inspirer et de déglutir en même temps, comme cela a été résumé dans une étude précédente conduite chez le chat (voir Fig. 8 dans [Horton et al, 2018](#)).

On peut notamment distinguer des mécanismes périphériques et centraux. Tout d'abord, les afférences vagales pulmonaires, actives pendant la phase inspiratoire, modulent négativement le réflexe de déglutition ([Samson et al, 2005](#); [2008](#); [Horton et al, 2018](#); [Alain et al, 2021](#)). De plus, une inhibition probablement réciproque existerait entre certains neurones inspiratoires du PreBotC et les neurones déglutiteurs du NTS. Cette inhibition reste à démontrer. D'après nos résultats, nous pouvons également suggérer que d'autres cellules I-Aug situées dans le PreBotC ou ailleurs dans la CVR (comme le groupe respiratoire ventral rostral, GRVr), également actives lors de la déglutition, fournissent une commande motrice commune aux motoneurones hypoglosses que l'on a vu être co-activés lors de l'inspiration et la déglutition. Lorsque les neurones inspiratoires et les afférences vagales pulmonaires ne sont plus (ou moins) actifs, c'est-à-dire lorsque le réseau respiratoire est en phase expiratoire,

c'est à ce moment que d'autres interactions cellulaires sont probablement nécessaires pour permettre notamment la prolongation réflexe de l'expiration (réinitialisation de la phase expiratoire, encore appelée apnée de déglutition). Dans ce contexte, la mise au silence des neurones E-Aug du réseau respiratoire par les neurones E-Dec prend tout son sens. Enfin, si les neurones E-Dec ne sont plus actifs à la suite de l'ablation du pont (ce qui provoque l'absence de phase post-inspiratoire et un pattern apneustique), cela ne signifie pas que ces neurones, vraisemblablement entièrement situés dans le bulbe (toujours d'après nos résultats précédents), ne soient pas recrutés pendant la déglutition. Ces neurones E-Dec co-activés pendant l'expiration précoce et la déglutition pourraient correspondre soit à des motoneurones adducteurs des cordes vocales soit à des neurones pré moteurs laryngés recrutés lors des deux activités motrices étudiées.

Chapitre 4 : Analyse des décharges motrices chez le raton nouveau-né *in situ* et influence d'un agoniste des récepteurs à l'ocytocine

Le travail présenté ci-dessous s'inscrit dans la continuité des recherches sur les réseaux moteurs présentées dans les chapitres précédents, ainsi que dans le contexte de l'intégration de mon superviseur de thèse le Docteur Christian Gestreau à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), dans l'équipe dirigée par le Docteur Françoise Muscatelli intitulée « Empreintes périnatales et troubles du neurodéveloppement ».

En effet, il s'agit de continuer à exploiter les avantages du modèle expérimental d'étude que je maîtrisais (la préparation perfusée *in situ*) dans l'étude de la coordination motrice des muscles des voies aériennes supérieures et de s'intéresser aux mêmes activités motrices (respiration et déglutition) à des âges plus précoces où les réseaux ne sont pas mûres et où l'ocytocine, une neurohormone sécrétée par l'hypothalamus et faisant l'objet d'un intérêt particulier dans la nouvelle équipe d'accueil, pourrait jouer un rôle dans le contrôle de ces activités.

I. Introduction

La succion fait partie des fonctions de nutrition. Chez le nouveau-né, cette activité motrice doit être fonctionnelle dès la naissance et précisément coordonnée avec la respiration et la déglutition afin d'assurer la bonne ingestion du lait maternel ([McGrath et Braescu 2004](#)). Lorsque le nouveau-né grandit, les dents apparaissent et l'activité de mastication se développe puis remplace progressivement la succion. L'acte de succion-déglutition-respiration se transforme alors en une triade mastication-déglutition-respiration ([Peyreigne 2019](#)). La succion et la mastication sont contrôlées par des générateurs centraux d'activités motrices (CPGs et CPGm, respectivement) situés dans le tronc cérébral. Chez le rat, le réflexe de

succion disparaît à environ 18-25 jours post-natals (P18-25), soit à la même période où la transition succion-mastication s'effectue ([Thexton et Griffiths 1979](#); [Westneat et Hall 1992](#)). Aucune étude à ce jour n'a permis de préciser où se situe le réseau neuronal de la succion ni quels sont les mécanismes centraux qui permettent d'effectuer cette activité rythmique. De même, les mécanismes qui interviennent dans le développement post-natal de ces réseaux et la transition entre la succion et la mastication sont encore mal définis. D'une manière générale, d'importants changements ont été observés au sein des réseaux du tronc cérébral au cours des deux premières semaines post-natales.

En effet, un changement de la balance excitation-inhibition ([Gao et al, 2011](#)) est associé à une recrudescence des terminaisons inhibitrices du noyau du tractus solitaire (terminaison GABAergiques et glycinergiques) ([Dufour et al, 2010](#)). L'étude princeps de Ben-Ari et collaborateurs ([1989](#)) a permis de mettre en lumière un shift développemental de l'action du GABA à la période péri-natale. Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur (hyperpolarisant) à l'âge adulte, mais plus tôt au cours du développement il exercerait au contraire une action dépolarisante sur les neurones immatures. Ce shift du GABA serait dû à la diminution de la concentration intracellulaire de chlore s'expliquant par une différence d'expression des transporteurs du chlore NKCC1 et KCC2 à la membrane ([Yamada et al, 2004](#); [Brumback et Staley 2008](#); [Pfeffer et al, 2009](#); [Hubner et Holthoff 2013](#); [Kaila et al, 2014](#)). Le GABA dépolarisant aurait différents rôles bénéfiques pour le système nerveux en développement, tels que la régulation de la migration, de la différenciation et de la prolifération cellulaire ([Kasyanov et al, 2004](#)). Cette période critique du développement correspond aussi à une période de renforcement de certains réflexes végétatifs vitaux comme le baroréflexe artériel, le réflexe d'Hering-Breuer ou le chémoréflexe respiratoire ([Quigley et al, 2005](#); [Wong-Riley et al, 2013](#); [Dutschmann et al, 2014](#)). Un des acteurs importants de la période péri- et post-natale est l'ocytocine (OT) ([Grinevich et al, 2014](#); [Muscatelli et al, 2018](#)).

L'OT est un neuropeptide synthétisé dans certains noyaux de l'hypothalamus : le noyau paraventriculaire (PVN), supraoptique (SON) et accessoire (AN), il est sécrété à la fois dans la circulation sanguine en tant qu'hormone et dans le système nerveux central en tant que neuromodulateur. L'OT est essentiel à plusieurs comportements qui intéressent la naissance et le développement des nouveau-nés, que ce soit la contraction des muscles utérins lors de l'accouchement ou l'effet stimulant de l'OT sur les glandes mammaires, nécessaire à l'éjection du lait ([Keebaugh et al, 2015](#)), ou encore les comportements sociaux tel que l'attachement mère/enfant ([Lee et al, 2009](#); [Meyer-Lindenberg et al, 2011](#)). De plus, un pic d'OT est observé à la naissance et le niveau d'OT reste élevé au cours des 2 premières semaines de vie, l'OT pouvant être d'origine endogène (comme la sécrétion accrue dans l'hypothalamus du nouveau-né lié au stress de la naissance) mais aussi exogène, via le lait maternel ([Hoffiz et al, 2021](#)). L'OT exercerait un rôle dans la succion et la déglutition. En effet, un déficit de succion a été observé chez les modèles murins de troubles autistiques ainsi que chez l'enfant atteint d'autisme et ce déficit a pu être corrigé grâce à une ou plusieurs injections périphériques d'OT ([Schaller et al, 2010](#); [Yamasue et Domes 2018](#)). Chez le rat adulte, la nesfatine-1 exercerait un effet inhibiteur sur la déglutition et cet effet serait médié par l'OT ([Guillebaud et al, 2019](#)).

Dans le tronc cérébral, les neurones de nombreuses structures, dont le NTS, possèdent des récepteurs à l'ocytocine et font l'objet de connexions avec des fibres OT-ergiques provenant du PVN. De manière intéressante, l'expression des récepteurs à l'OT (OTR) est transitoire dans plusieurs noyaux du tronc cérébral, tels que les noyaux moteurs hypoglosse et facial, tandis qu'elle persiste ailleurs, comme dans le noyau dorsal moteur vagal. La présence des OTR dans certains noyaux moteurs ou le NTS à partir de la naissance jusqu'à 2 semaines post-natal ([Tribollet et al, 1989](#)), correspond justement à la période critique mentionnée précédemment au cours de laquelle les réseaux de la succion et de la mastication font l'objet

d'une maturation. Ainsi, compte-tenu d'une part des effets présumés de l'OT sur le comportement alimentaire des nouveau-nés, et d'autre part, de l'expression des OTR dans les structures du tronc cérébral impliquées dans ce comportement, l'OT pourrait être impliquée dans la maturation des fonctions de nutrition.

Les objectifs de la présente étude étaient 1) de mettre au point la préparation perfusée *in situ* chez de très jeunes rats afin de pouvoir étudier plusieurs activités motrices pendant la période critique de développement des réseaux moteurs du tronc cérébral et 2) d'étudier l'effet d'une injection aiguë d'OT sur les réseaux moteurs du tronc cérébral. Notons ici que dans le laboratoire, la préparation *in situ* se faisait généralement sur le rat juvénile (P21) ou jeune adulte (autour de P30). Mon travail a permis d'obtenir une préparation stable à différents âges encadrant la période critique de maturation des réseaux (P6-P9, P14-P15, P20-P21), ce qui a été possible en contournant de nombreux obstacles. A partir de cette préparation, nous avons pu observer et décrire pour la première fois une activité motrice similaire à la succion.

II. Matériels et méthodes

A. Modèle expérimental

Des rats Wistar (n=35) âgés entre P6-9, P14-15 et P20-21 ont été utilisés. La préparation perfusée *in situ* a été décrite dans le Chapitre Matériels et Méthodes commun.

B. Enregistrement des paramètres cardiorespiratoires

Les activités motrices des nerfs Phr, X, de la branche médiane et latérale du XII (XII-med et XII-lat, respectivement) sont recueillies au moyen d'électrodes en verre (à succion) reliées à des micromanipulateurs. L'activité électromyographique (EMG) du muscle digastrique antérieur (Dig Ant, n=17) ou masséter (n=12) a également été enregistrée. Ces muscles contrôlent le mouvement postéro-inférieur de la langue pendant la déglutition ainsi

que l'ouverture de la mâchoire (Dig Ant) ou la fermeture de la mâchoire (masséter). Les signaux nerveux bruts sont amplifiés et filtrés (gain 500-20000 ; BP 300-3KHz), intégrés (constante de temps 100 ms), avant d'être numérisés (12Khz, 16 bits ; TDT, USA). La pression de perfusion aortique est mesurée par un capteur relié à la canule de perfusion et à un moniteur de pression artérielle. Tous les signaux sont visualisés en temps réel et stockés sur un PC afin de les traiter a posteriori (logiciels OpenEx, Offline Sorter et NeuroExplorer ; Plexon Inc., USA ; Spike 2, CED, USA).

C. Injections pharmacologiques

La préparation perfusée *in situ* génère quelques déglutitions spontanées qui ont tendance à s'estomper au cours du temps. Pour en évoquer davantage, du N-méthyl-D-aspartate (NMDA, 50-100nl à 1mM) a été injecté à l'aide un nano-injecteur dans la région du NTS correspondant au groupe dorsal du CPGd ([Jean 2001](#)). Du TGOT, un agoniste électif des OTR, a été utilisé dans cette étude afin de stimuler spécifiquement les OTR et non les récepteurs à la vasopressine pour lesquels l'OT possède également une certaine affinité. Le TGOT a été injecté par voie systémique, c'est-à-dire dans le LCRA. Une concentration finale de 500nM a été choisie sur la base de résultats antérieurs de l'équipe montrant que l'arythmie sinusale respiratoire *in situ* augmente à partir de 200 nM, est accrue de façon optimale à la concentration de 500 nM, puis décroît à des doses supérieures (1 et 2 mM). Un antagoniste spécifique des OTR, le SSR126767A (ou SSR) a été injecté par voie systémique à une concentration de 47,37 µg/ml de sang (calculé en fonction de la volémie du raton), dans le but de bloquer les OTR ([Schaller et al, 2010](#)) avant d'administrer le TGOT et de vérifier ainsi la sélectivité des effets obtenus.

D. Analyse des variables et de la coordination respiration-déglutition

De nombreuses variables liées à l'activité respiratoire, cardiaque et vasculaire, ainsi qu'à la déglutition ont été mesurés puis comparés entre les 3 classes d'âge pour déceler 1) un éventuel effet de la maturation et 2) les effets induits par l'administration du TGOT. Ces paramètres incluent la fréquence respiratoire, la fréquence cardiaque, la pression artérielle, le nombre et la durée des déglutitions, le délai entre les bouffées motrices du XII^{med} et du X lors de la déglutition (reflétant le délai physiologique entre la rétraction de la langue et la fermeture du larynx), la durée des apnées associées à la déglutition lorsque cette dernière est induite par l'injection de NMDA, ainsi que l'aire sous la courbe des bouffées motrices recueillies pendant la respiration et/ou la déglutition. Notons que l'injection de NMDA a permis de déclencher des épisodes de déglutitions rythmiques et/ou de déglutitions isolées. Seules ces dernières ont été utilisées afin d'étudier la coordination entre respiration et déglutition. Les paramètres ci-dessus ont été mesurés avant injection de TGOT (condition contrôle), de 0 à 5 minutes après administration du TGOT par voie systémique (TGOT 0-5 min), puis de 10 à 15 minutes suivant l'injection de la drogue (TGOT 10-15 min). Ce choix est justifié par des études antérieures réalisées au laboratoire et les données de la littérature montrant que la durée d'action de cette drogue est d'environ 5 minutes ([Dreifuss et al, 1992](#); [Guillebaud et al, 2019](#)). Nous avons donc considéré que les mesures effectuées pendant la période TGOT 10-15 min correspondaient à des valeurs contrôle post-drogue (recovery). Ces valeurs ont servi à apprécier l'évolution des paramètres au cours du temps lors de l'expérience. L'analyse des patterns moteurs obtenus à P6-P9 a révélé dans 8 cas sur 12 la présence d'activités rythmiques spontanées ne correspondant ni à la respiration, ni à la déglutition, mais ressemblant fortement à une activité de succion (voir résultats). Cette activité de type succion a été analysée avant et après injection de TGOT (nombre, fréquence, latence d'apparition).

E. Analyses statistiques

Une ANOVA simple voie suivie du test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisée lorsque les variables ont une distribution normale, tandis qu'un test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn a été utilisé pour les variables n'ayant pas une distribution normale pour comparer les paramètres mesurés entre les 3 classes d'âge avant et après application de TGOT. Ces paramètres étaient la fréquence respiratoire, la durée de l'apnée induite par NMDA, le nombre de déglutitions induites par NMDA et la durée des déglutitions. Un t-test ou un test des rangs signés de Wilcoxon pour les variables paramétriques et non-paramétriques ont été utilisés, respectivement, pour comparer les paramètres mesurés par classe d'âge (Contrôle vs TGOT). Ces paramètres étaient l'aire sous la courbe des décharges motrices respiratoires et déglutitrices, le nombre de déglutitions, la durée des déglutitions et le nombre d'activités de type succion. Un test de Chi2 de Pearson a été utilisé afin de comparer la distribution des déglutitions de type I-Sw-Exp et E en fonction des conditions. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SD et les différences sont considérées significatives lorsque $p < 0.05$.

III. Résultats

A. La préparation perfusée *in situ* chez le très jeune raton

La préparation perfusée *in situ* est initiée à l'aide de variables bien définies au sein de l'équipe chez le rat juvénile âgé d'environ 21 jours (P21). Ces paramètres sont la vitesse de perfusion (~ 28 ml/min), la pression de perfusion (60-70 mmHg) et la taille de la canule aortique (1,2 mm de diamètre). Pour les ratons âgés de P6 à P15, le protocole d'initiation *in situ* a dû être revu et une approche chirurgicale adaptée à la fragilité des tissus à cet âge a dû être mise en place, notamment pour préserver les nerfs d'intérêt qui montraient une détérioration rapide au cours des expériences en raison de leurs faibles diamètres. Aussi, la

canule aortique a dû être parfaitement adaptée à la taille de l'aorte (alors qu'une plus grande flexibilité est possible chez les rats à P21), les meilleurs résultats étant obtenus lorsque le diamètre de la canule dépassait légèrement le diamètre de l'aorte. De plus, le protocole d'auto-réanimation de la préparation (c'est-à-dire le rétablissement d'une circulation systémique de LCRA) devait être plus lent, avec un début de perfusion à 5ml/min, puis un incrément de 3ml/min toutes les 3 minutes, jusqu'à atteindre un débit de perfusion permettant une activité respiratoire fictive stable (23-25 ml/min) (alors qu'une reperfusion rapide est nécessaire chez le rat à P21). Enfin, une pression de perfusion d'environ 60-70 mmHg s'est avérée optimale pour obtenir une préparation stable, comme pour les rats à P21.

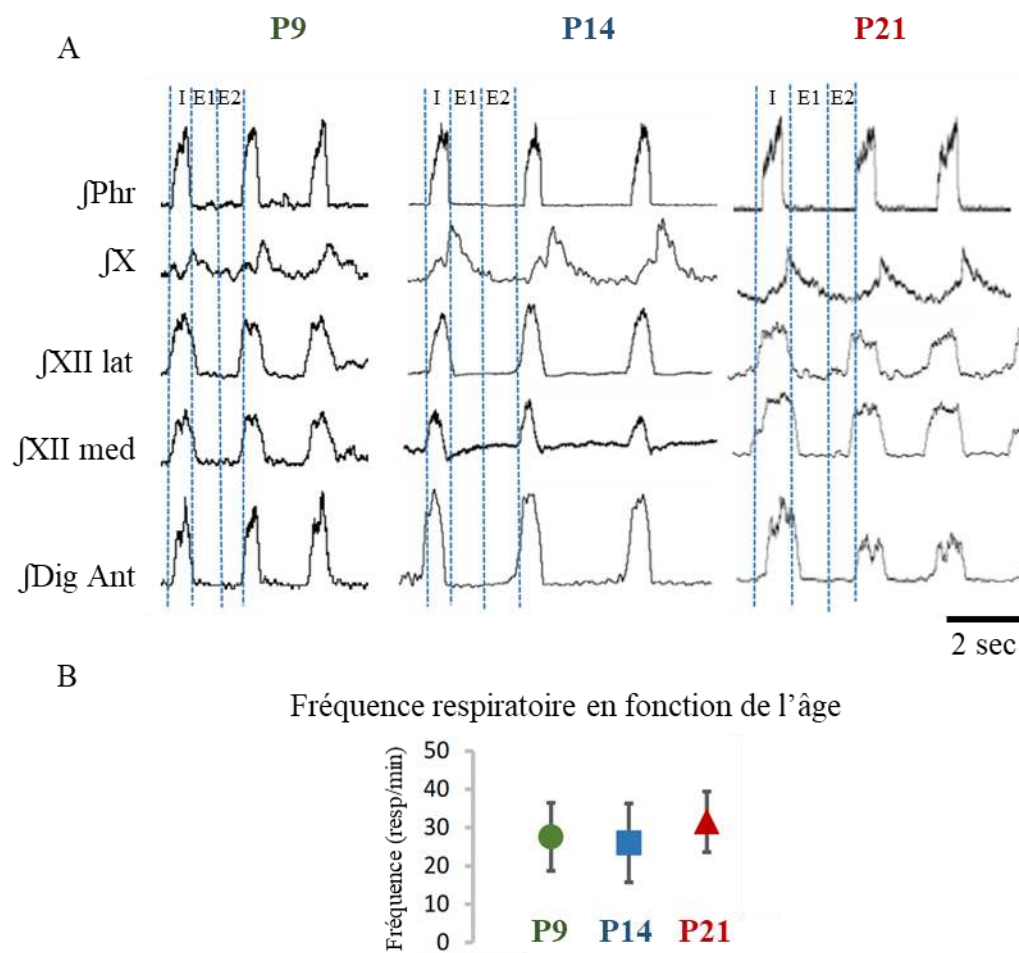


Figure 37 : Activité respiratoire contrôle aux différentes classes d'âge. (A) Exemple de pattern respiratoire chez le raton aux trois classes d'âge étudiées (P9, P14, P21). Les lignes bleues en pointillés séparent les trois phases du cycle respiratoire: inspiration (I), expiration précoce (E1), expiration tardive (E2). (B) Fréquence respiratoire en fonction de l'âge. Abréviations : Phr, nerf phrénique ; X, nerf vague ; XII lat, nerf hypoglosse branche latérale ; XII med, nerf hypoglosse branche médiane ; Dig ant, muscle digastrique antérieur.

B. Activités motrices au cours de la maturation

Pour les trois classes d'âges (P6-9, P14-15, P20-21), une activité motrice respiratoire en 3 phases a pu être obtenue : Phase inspiratoire (I) caractérisée par l'activité croissante du nerf phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII), phase post-inspiratoire (E1) caractérisée par l'activité décroissante du nerf X et l'expiration tardive (E2) marquée par l'absence d'activité de ces trois nerfs. Au cours de ces expériences, nous avons enregistré les deux branches principales du nerf hypoglosse : la branche latérale innervant les muscles rétracteurs de la langue et la branche médiane innervant les muscles protruseurs de la langue. En moyenne, les fréquences respiratoires mesurées aux trois classes d'âge n'ont pas varié significativement ($F= 0,972$, $p=0,395$; **Figure 37**). Des déglutitions spontanées ont été observées chez tous les animaux. Ces déglutitions spontanées étaient toutes isolées au sein d'un cycle respiratoire et avaient lieu pendant les transitions de phases du cycle respiratoire. La plupart étaient observées lors de la transitions I-E1 (déglutition de type I-Sw-Exp), tandis qu'une minorité apparaissait lors de la transition E1-E2 (déglutition de type Exp-Sw-Exp). La **Figure 38-A** illustre des exemples de déglutition I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp chez les rats à P9, P14 et P21. Afin de pouvoir observer diverses déglutitions (spontanées et isolées vs répétées ou rythmiques), des micro-injections de NMDA ont été effectuées dans le NTS aux 3 classes d'âges, comme cela a été décrit dans le chapitre I des résultats.

La durée de l'apnée, le nombre de déglutitions, le délai entre les décharges XII et X ainsi que la durée de la déglutition n'ont pas varié significativement en fonction de l'âge (**Figure 38-B**). De même, la proportion de déglutitions isolées de type I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp n'a pas varié significativement entre les 3 classes d'âge ($P=0,14$). Enfin, quel que soit l'âge, la majorité des déglutitions observées était de type I-Sw-Exp (**Figure 38-C**).

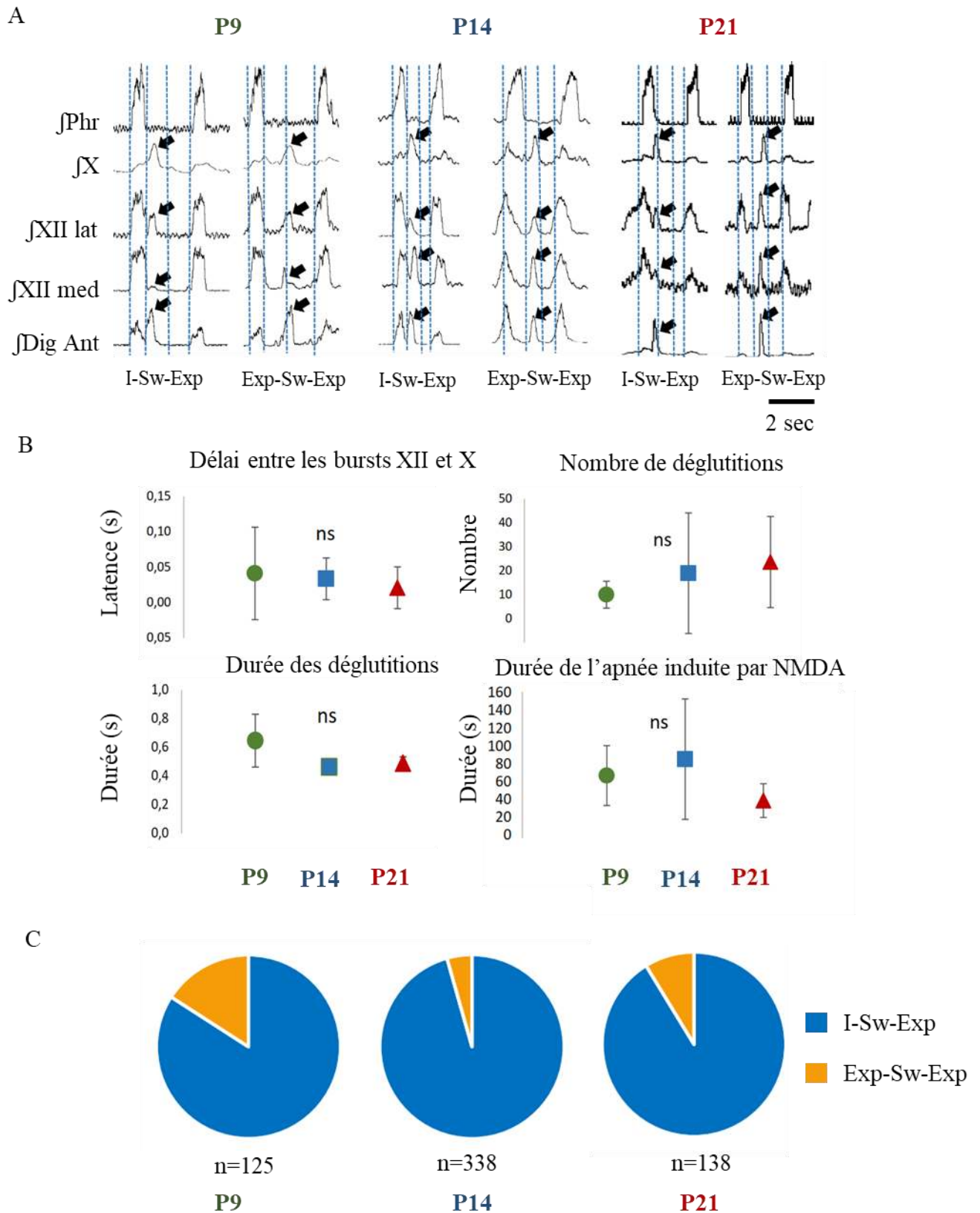


Figure 38 : Analyse du pattern de déglutition aux différentes classes d'âge. (A) Déglutitions de type I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp observées dans les trois classes. Les traits bleus pointillés délimitent les phases respiratoires I, E1 et E2. (B) Nombre de déglutitions, délai entre les décharges des nerfs X et XII, durée de la déglutition et durée de l'apnée induite par le NMDA en fonction de l'âge. (C) Répartition des déglutitions I-Sw-Exp et Exp-Sw-Exp au sein du cycle respiratoire. Abréviations : Phr, nerf phrénique ; X, nerf vague ; XII lat, nerf hypoglosse branche latérale ; XII med, nerf hypoglosse branche médiane ; Dig ant, muscle digastrique antérieur. Les flèches noires désignent l'activité motrice déglutitrice.

C. Effets du TGOT sur les variables mesurées au cours de la maturation

Afin d'étudier l'effet de l'ocytocine sur la déglutition et la respiration, nous avons injecté un agoniste spécifique des récepteurs à l'ocytocine (OTR) dans la circulation systémique de la préparation, le TGOT. Pour chaque injection, la concentration de TGOT était de 0,5µM. La fréquence respiratoire ainsi que l'aire sous la courbe des décharges (AUC) motrices recueillies aux trois classes d'âge ont été mesurées pendant les 5 premières minutes post-injection de TGOT (TGOT 0-5 min) puis pendant 5 autres minutes entre 10 et 15 minutes post-injection (TGOT 10-15 min). Ces paramètres ont été normalisés par rapport aux valeurs contrôles. Pour les trois classes d'âge, aucune différence significative de fréquence (P9 : -3 ± 5 , P14 : -2 ± 11 , P21 : 34 ± 50 , en % de différence par rapport au contrôle, avec $p > 0,05$ pour chaque classe d'âge) ni d'AUC n'a été décelée entre les conditions contrôle et TGOT (**Tableau 4**). Concernant la déglutition, la comparaison du nombre, durée, AUC et délais entre les décharges des nerfs XII et X (caractéristique de l'alternance physiologique langue-larynx pendant la déglutition) avant et après TGOT n'a pas montré de variations significatives (**Tableau 5**). Enfin, aucun effet significatif du TGOT n'a été observé sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle.

Tableau 4. Quantification de l'AUC des décharges motrices respiratoires après injection de TGOT

Age	AUC décharge motrice respiratoire normalisée (%)				
	TGOT				
	PHR	X	XII lat	XII med	Dig Ant
P9	94 ± 36	149 ± 87	103 ± 23	89 ± 33	134 ± 46 ns
P14	109 ± 36	112 ± 27	176 ± 176	136 ± 90	242 ± 316 ns
P21	86 ± 8	166 ± 190	100 ± 29	85 ± 29	169 ± 84 ns

Les données sont exprimées en moyenne ± SD, ns : non significatif

Tableau 5. Quantification de l'AUC des décharges motrices déglutitrices après injection de TGOT

	AUC décharge motrice déglutitrice normalisée (%)			
	TGOT			
Age	X	XII lat	XII med	Dig Ant
P9	108 ± 24	107 ± 39	81 ± 26	79 ± 27 ns
P14	109 ± 39	111 ± 35	124 ± 71	90 ± 38 ns
P21	86 ± 18	82 ± 26	82 ± 7	84 ± 17 ns

Les données sont exprimées en moyenne ± SD, ns : non significatif

D. Effet du TGOT sur une activité motrice similaire à la succion

De manière étonnante, un nouveau pattern moteur spontané a été observé chez certains rats étudiés à P6-9 (n= 8/12) (**Figure 38-A**). Cette activité motrice était totalement absente chez les deux autres classes d'âge (P14-15 et P20-21). Ce nouveau pattern moteur est caractérisé par des bouffées rythmiques des nerfs X, XII (médian et latéral) et est semblable au pattern moteur de succion observé par Thexton et Griffith (1979, **Figure 39-B**) après stimulation du pourtour labial chez le raton décérébré de P2 à P16. Afin de mieux caractériser l'activité motrice correspondante, nous avons enregistré l'EMG du muscle masséter (n= 3) ou du digastrique antérieur (n= 3) en plus des nerfs cités précédemment sur des préparations *in situ* non paralysées. De plus, nous avons enregistré de courtes vidéos permettant d'objectiver des mouvements rythmiques de la mâchoire et de la langue pendant les bouffées nerveuses vagale et hypoglosse. Ces mouvements correspondaient à des cycles d'ouverture et de fermeture de la mâchoire associés à des cycles de protrusion-rétraction de la langue, c'est-à-dire d'une activité motrice ressemblant à la succion.

Du TGOT (0,5µM) a d'abord été injecté par voie systémique chez le raton à P6-P9 (n=6). Parmi les animaux ayant reçu le TGOT, la moitié (n=3/6) présentait déjà une activité spontanée avant l'injection de la drogue dont la fréquence des épisodes rythmiques de type

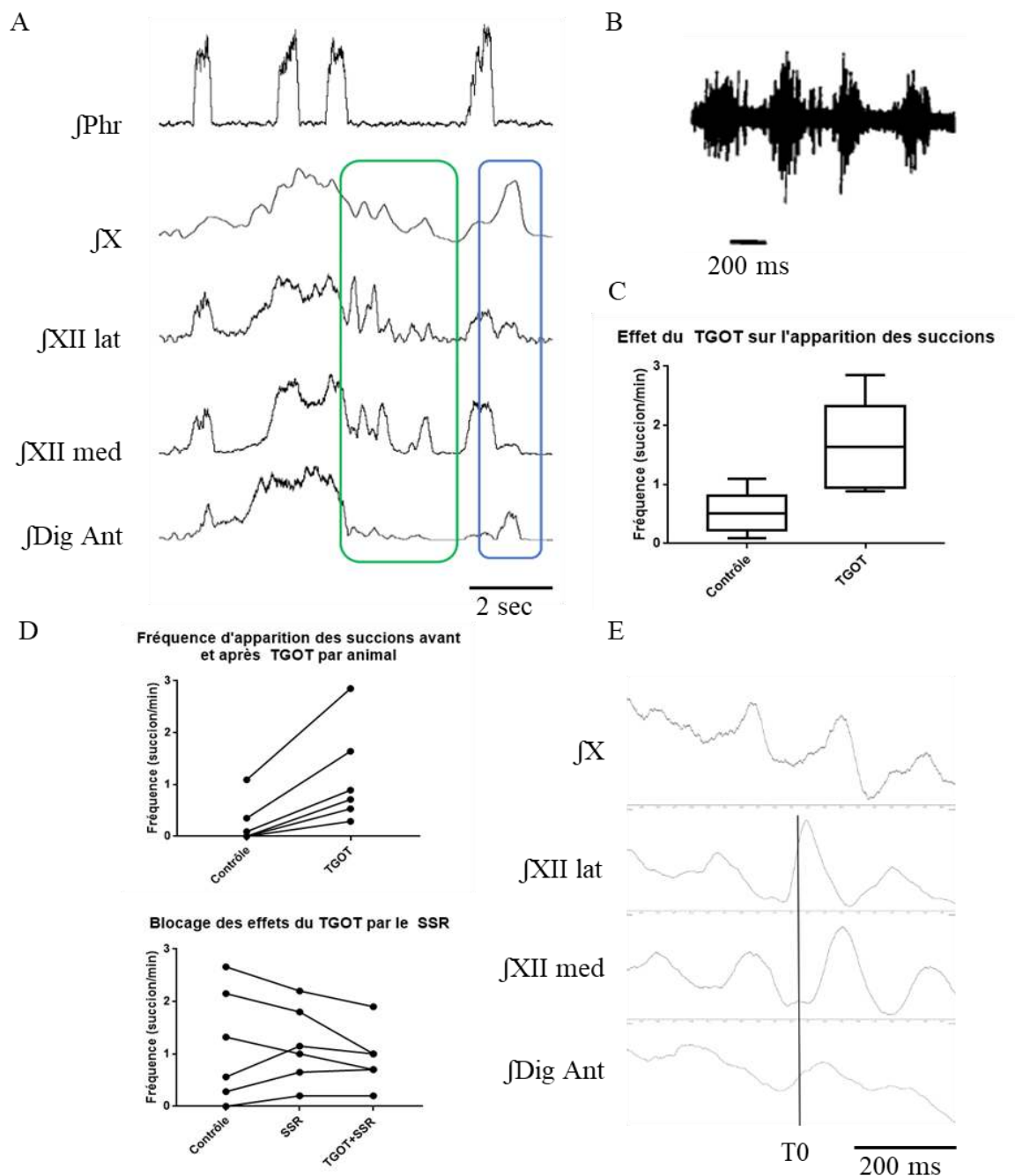


Figure 39 : Le TGOT induit un pattern moteur semblable à la succion à P6-9. (A) Exemple d'une décharge rythmique (en vert) suivit d'une activité de déglutition (en bleu) obtenu dans notre expérience. (B) Activité de succion recueillis à partir de l'enregistrement EMG du muscle digastrique antérieur obtenu par stimulation mécanique de la région labial. Période des décharges : 200-300ms (d'après Thexton and Griffiths, 1979). (C) Fréquence des activités de succion avant et après l'injection de TGOT. (D) Analyse d'appariement du nombre et des fréquences des suctions avant et après l'injection de TGOT, ainsi que l'effet de l'antagoniste spécifique au TGOT : le SSR. (E) Alternance des patterns moteurs recueillis pendant la succion. T0 correspond au seuillage de l'activité de XII med. On remarque que les décharges motrices en E correspondent aux décharges motrices en B. Phr, nerf phrénique ; X, nerf vague ; XII lat, nerf hypoglosse branche latérale ; XII med, nerf hypoglosse branche médiane ; Dig ant, muscle digastrique

succion était de $0,51 \pm 0,52$ succion/min. À la suite de l'injection de TGOT, tous les animaux ($n= 6/6$) ont présenté une activité rythmique de type succion. Chez ces animaux, la fréquence des épisodes rythmiques de type succion était de $1,79 \pm 0,99$ succion/min, ce qui témoigne d'une augmentation significative ($p < 0,05$, contrôle vs TGOT) de la fréquence de succion obtenue après l'injection de TGOT (**Figure 39-D**). La durée moyenne d'un épisode de cette activité rythmique est de $2,20 \pm 0,41$ vs $2,28 \pm 0,33$ secondes (contrôle vs TGOT). Cette durée n'a pas varié significativement après injection de TGOT. Chez tous les animaux, l'effet du TGOT sur ces événements moteurs a persisté pendant plus de 15-20 minutes après injection de la drogue. De manière intéressante, certains mouvements rythmiques se produisaient entre deux cycles respiratoires et étaient associés à un prolongement de la durée de l'expiration et ponctués par une déglutition (**Figure 39-A**). Parfois, ces bouffées s'intercalaient de part et d'autre de l'activité phrénique lorsque celle-ci persistait (non illustré). Enfin, une forte activité tonique nerveuse et musculaire a toujours été observée avant l'activité rythmique proprement dite (**Figure 39-A**).

Nous avons complété l'étude de ce nouveau type de bouffées rythmiques par une analyse de cross-corrélation. Une méthode de seuillage de l'activité intégrée du XII-med a permis de détecter les pics d'activité nerveuse. Les signaux TTL correspondant à chaque pic ont été ensuite utilisés pour déclencher l'analyse de l'activité moyenne des autres signaux nerveux et musculaires (**Figure 39-E**). Les résultats de ces cross-corrélation montrent clairement une alternance des décharges recueillies sur les branches médiane et latérale du nerf XII (c'est-à-dire une opposition de phase entre ces deux décharges nerveuses). Ils montrent également que la branche XII-médiane s'activait en phase avec l'activité du muscle digastrique antérieur tandis que la branche XII-latérale s'activait en phase avec la décharge du nerf X (**Figure 39-E**). La période séparant les bouffées nerveuses d'un même nerf pendant cette activité rythmique (i.e. XII-med ou XII-lat) était d'environ 200 ms, soit une valeur

proche de celle mesurée *in vivo* par Thexton and Griffiths (1979) (Figure 39-E). Cette alternance d'activité motrice corrobore les observations précédentes. Ces résultats suggèrent fortement que ces mouvements alternés de protrusion-rétraction de la langue, associés à des mouvements d'ouverture-fermeture de la mâchoire correspondent à une activité de succion.

Dans une dernière série d'expériences, une injection préalable de SSR, un antagoniste spécifique des OTR, a été faite chez certains animaux âgés de P6 à P9 (n=6) avant l'administration de TGOT. Parmi ces animaux, la plupart présentaient une activité de type succion en condition contrôle (n=5/6). Les paramètres moteurs ont été recueillis lors d'une période contrôle de 15 minutes précédant l'injection de drogue (pré-injection de SSR), puis pendant 10 minutes après l'injection de SSR (post-injection de SSR), et enfin pendant une autre période de 10 minutes suivant l'injection de TGOT. Les résultats de ces analyses n'indiquent aucune différence significative du nombre d'épisode de type succion après injection de SSR ni après injection de TGOT ($F=0,976$, $P=0,376$, Figure 39-D).

IV. Discussion

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent qu'il a été possible d'adapter la préparation *in situ* afin d'étudier l'activité respiratoire et la déglutition chez l'animal très jeune (dès le stade P6), ce qui constitue une avancée expérimentale importante qui permettra sans doute, dans l'avenir, de pousser davantage les investigations fonctionnelles au sein du laboratoire. Ce travail révèle également un nouveau pattern moteur rythmique d'intérêt, semblable à la succion. A notre connaissance, il s'agit de la première identification et caractérisation d'une activité de type succion sur la préparation *in situ*. Enfin, les résultats pharmacologiques obtenus suggèrent que l'ocytocine est capable de moduler l'activité motrice de succion chez le raton âgé de P6 à P9, mais pas plus tard au cours de la maturation, en augmentant probablement l'excitation du réseau de la succion présent dans le tronc

cérébral. En revanche, la stimulation des récepteurs à l'ocytocine n'a pas permis de révéler un effet significatif sur l'activité respiratoire ou la déglutition au cours de la maturation.

A. Activités motrices respiratoire et déglutitrice au cours de la maturation

Dans cette étude, trois classes d'âges ont été définies (P6-9, P14-15, P20-21) afin d'encadrer la période critique des deux semaines post-natales, où s'opèrent d'importants changements moléculaires et cellulaires dans le tronc cérébral, ainsi qu'un important « switch » entre succion et mastication. Il s'agit là, à notre connaissance, de la première étude de la déglutition et de la coordination respiration-déglutition au cours de la maturation sur la préparation *in situ*. Ainsi, une activité respiratoire stable a pu être observée à chaque classe d'âge étudiée, ainsi qu'une activité déglutitrice spontanée ou induite fonctionnelle et coordonnée avec la respiration. Nos résultats ne font pas apparaître de différence significative dans le pattern, la fréquence, la durée ou la coordination de ces deux activités motrices pendant la maturation. Bien qu'il ne soit pas étonnant qu'il n'y ait pas de différence significative majeure de la déglutition et sa coordination avec la respiration au cours de la maturation, du fait de la nécessité que ces réseaux soient fonctionnels dès la naissance, on aurait pu s'attendre à minima à des différences de fréquence respiratoire étant donné la différence de taille et de poids des animaux, leurs besoins métaboliques étant très certainement différents. Il est en effet connu que la fréquence respiratoire est plus élevée chez des individus jeunes que chez des individus âgés, chez l'homme comme chez l'animal ([Wallis et al, 2005](#); [Fleming et al, 2014](#)). Cette absence de différence dans notre étude peut s'expliquer par le modèle expérimental utilisé. En effet, il s'agit surtout d'une activité centrale respiratoire qui est mesurée sur la préparation *in situ*, sans la participation notable des corps carotidiens puisque la teneur en oxygène de la circulation systémique est saturée (LCRa bullé dans le carbogène, soit 95% d'O₂). De plus, la fréquence respiratoire recueillie *in situ* est nettement inférieure à la fréquence physiologique chez l'animal *in vivo* (~30 cycles/min vs

90-100 cycles/min), notamment en raison d'une température plus faible (environ 33°C *in situ* vs 38°C *in vivo*). Les mesures effectuées dans cette étude à l'aide de ce modèle ne permettent donc pas de déceler les changements subtils (ou non) de fonctionnement des réseaux moteurs du tronc cérébral (CPGr et CPGd) ou d'interactions entre ces réseaux qui pourraient se produire au cours de la maturation.

B. Effet du TGOT sur les paramètres cardiorespiratoires et la déglutition

Dans cette étude, l'injection de TGOT par voie systémique *in situ* n'a pas induit de changement significatif de l'activité respiratoire, de la déglutition ni des paramètres cardiovasculaires. Cela peut paraître surprenant au regard des données de la littérature suggérant d'une part que les neurones OT-ergiques du PVN établissent des connections avec le PreBotC, le noyau hypoglosse et le noyau phrénique chez le rat adulte, et d'autre part que la stimulation du PVN module l'activité respiratoire, la fréquence cardiaque et la pression artérielle principalement via le PreBotC ([Mack et al, 2002](#); [2007](#)). Par ailleurs, l'étude de Guillebaud et al ([2019](#)) citée dans l'introduction de ce chapitre suggérait que la micro-injection d'OT (20 nM) dans le groupe déglutiteur dorsal situé dans le NTS chez le rat adulte diminue le nombre de déglutitions réflexes induites par la stimulation électrique du nerf laryngé supérieur.

Cependant, il faut noter que l'OT n'a pas les mêmes effets que le TGOT. Or il n'a pas été précisé dans cette dernière étude si l'effet inhibiteur de l'OT sur la déglutition était lié à une action de la drogue sur les récepteurs de l'OT ou sur les récepteurs de la vasopressine. Dans notre étude, il est donc possible que la voie systémique d'administration du TGOT ne soit pas efficace pour moduler les fonctions étudiées, en dépit de la concentration relativement élevée (0,5µM). Il est également possible que l'activation des récepteurs de l'OT ne soit pas efficace chez l'animal jeune. De plus, l'activation des récepteurs OT est peut-être sans effet sur la déglutition. Cette dernière hypothèse pourrait être vérifiée *in situ* par injection de TGOT

(20 nM ou plus) directement dans le groupe déglutiteur dorsal du NTS. D'autre part, l'implication des récepteurs à la vasopressine dans la modulation du réflexe de déglutition pourrait également être testée *in situ* par des injections dans le NTS d'un agoniste vasopressinergique. Enfin, nous montrons dans notre étude qu'une injection aigüe de TGOT est sans effet sur la respiration, la déglutition ou la coordination respiration-déglutition. Ces expériences n'excluent pas un rôle de l'OT dans le contrôle de ces fonctions au cours de la maturation. En effet, il est possible qu'une stimulation chronique des OTR et/ou des récepteurs vasopressinergiques soit nécessaire pour moduler l'activité respiratoire et/ou déglutitrice. En perspective, des expériences pourront être conduites chez l'animal jeune (par exemple de P0 jusqu'à P7) après injection quotidienne d'antagonistes des OTR afin de tester cette hypothèse.

C. Le TGOT augmente l'activité motrice de type succion à P6-P9

Nos résultats révèlent, pour la première fois, un nouveau pattern moteur identifié à P6-P9 et caractérisé entre autres par une alternance de décharges des branches médiane et latérale du nerf hypoglosse. Ce pattern moteur a pu être observé en condition contrôle chez certains animaux. Cependant, nos résultats montrent clairement que l'activité de type succion est renforcée après une injection de TGOT par voie systémique. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation des OTR est capable de faciliter l'activité de succion, voir même de la déclencher, chez les animaux les plus jeunes (P6-P9) mais pas chez les rats plus âgés (P14-P15 ou P21).

Les mouvements correspondants constatés chez l'animal non paralysé confirment qu'il s'agit de cycles de protrusion et de rétraction de la langue associés à la fermeture et l'ouverture de la mâchoire, similaires à l'activité motrice de succion. De plus, cette activité de type succion était parfois associée à une prolongation de l'expiration, et ponctuée par une déglutition, évoquant ainsi la triade respiration-succion-déglutition.

Nos résultats révèlent également que l'injection d'un antagoniste spécifique des OTR (le SSR) inhibe l'effet facilitateur du TGOT sur la succion mais n'abolit pas cette activité motrice observée en condition contrôle. Il est possible que la stimulation orale et péri-orale de l'animal par la barre de gueule utilisée dans notre poste expérimental soit responsable de cette activité motrice « spontanée ». Il n'est pas exclu non plus que la présence de LCRA dans la cavité oropharyngée puisse constituer un stimulus suffisant pour déclencher ce type d'activité motrice. Néanmoins, nos résultats semblent indiquer que l'ocytocine exercerait une modulation positive sur la succion, mais que la stimulation des OTR n'est pas à l'origine de l'initiation de la succion.

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction de ce chapitre, la localisation précise et le fonctionnement de ce réseau sont inconnus. A notre connaissance, une seule étude *in vitro* basée sur la préparation tronc cérébral-moelle épinière isolée chez des nouveau-nés de souris prétend avoir identifié une activité rythmique de type succion après application de NMDA dans le bain de perfusion ([Ihara et al, 2013](#); voir aussi la revue de [Inoue et al, 2017](#)). Ces chercheurs ont observé des décharges motrices rythmiques synchrones sur les racines hypoglosse et trigéminal droite et gauche dont la fréquence (faible ou élevée) diffère de la fréquence des bouffées respiratoires fictives. Les résultats de transections le long de la ligne médiane de cette préparation indiquent que le réseau générateur de ces activités motrices de type succion est situé des deux côtés du bulbe rachidien et envoie des projections controlatérales sur les motoneurones trigéminaux. Cependant, contrairement à nos résultats, aucune caractérisation fonctionnelle de ces décharges n'a été faite dans leur étude *in vitro*, ce qui remet en cause le fait que ces rythmes correspondent véritablement à de la succion.

A partir d'expériences réalisées sur des tranches isolées de tronc cérébral de jeune rat (P5-9), des travaux ont montré que l'ocytocine avait un effet neuromodulateur sur les neurones du noyau hypoglosse ([Wrobel et al, 2010](#)). En effet, l'ocytocine agirait sur

différents types de récepteurs localisés sur des interneurones et/ou prémotoneurones hypoglosses afin de faciliter les courants post-synaptiques inhibiteurs (glycinergiques et GABAergiques) en agissant sur les OTR seuls, ou au contraire de faciliter les courants synaptiques excitateurs en agissant sur les récepteurs à la vasopressine V1a et les OTR. Ces données étayent l'hypothèse que l'ocytocine aurait, si ce n'est un rôle dans la maturation des réseaux du tronc cérébral, un rôle dans leur neuromodulation à un jeune âge, ces réseaux pouvant être régulés par une large variété de neuromodulateurs ([Marder et Bucher 2001](#)). Notons enfin qu'un effet excitateur de la vasopressine sur l'activité locomotrice a été observé sur une préparation *in vitro* de moelle épinière isolée ([Pearson et al, 2003](#)).

Discussion générale

Les résultats marquants qui découlent de ce travail peuvent être résumés de la façon suivante. L'administration de quipazine *in situ* permet d'augmenter significativement l'activité motrice de déglutition. L'effet de la quipazine semble être médié par l'activation des récepteurs 5-HT_{2a} des noyaux du raphé obscurus et pallidus. Ces noyaux du raphé bulbaire seraient donc impliqués dans la **neuromodulation de la déglutition**. La phase post-inspiratoire est la plus permissive pour l'expression de la déglutition, c'est le pattern de coordination privilégié chez l'homme comme chez l'animal. Nous montrons que la suppression de cette phase à la suite de l'ablation du pont n'empêche pas la séquence motrice de déglutition de se dérouler normalement et n'entraîne pas d'altération de la commande motrice laryngée. **Les circuits bulbaires sont donc cruciaux pour l'élaboration et la distribution de la séquence motrice de déglutition.**

Les structures pontiques, quant à elles, sont importantes pour la coordination entre la respiration et la déglutition. Leur ablation provoque la disparition de l'expiration réflexe qui suit la déglutition lorsque celle-ci se produit juste avant l'inspiration, ce qui augmente le risque de dysphagie. En outre, **le pont contribue significativement à la commande motrice hypoglosse**, vraisemblablement grâce aux neurones prémoteurs situés dans le noyau Kolliker-Fuse et la région intertrigéminal. Les enregistrements de l'activité électrique des motoneurones hypoglosses *in situ* montrent que certains neurones protruseurs de la langue sont actifs lors de la déglutition, ce qui suggère une co-contraction de muscles antagonistes de la langue lors de la déglutition. **D'autres neurones situés dans la colonne respiratoire ventrale peuvent avoir à la fois une activité inspiratoire ou post-inspiratoire et une activité lors de la déglutition.** Ces résultats confirment l'existence de **neurones multifonctionnels** au sein des réseaux moteurs du tronc cérébral et montrent que la préparation *in situ* est un bon modèle d'étude du **fonctionnement dynamique de ces réseaux.**

Enfin, nous avons étudié le rôle d'un agoniste des récepteurs à l'ocytocine (TGOT) sur l'activité motrice des nerfs X et XII au cours de la respiration, la déglutition et la succion. Pour cela, nous avons mis au point la préparation *in situ* chez le très jeune raton (dès P6) et observé, à cet âge mais pas à P15 ni à P21, une activité rythmique qui ressemble à la succion. Nous montrons que **le TGOT n'a pas d'effet significatif sur la respiration ou la déglutition**. En revanche, **le TGOT augmente le nombre d'épisode de succion**, effet bloqué par un antagoniste des récepteurs ocytocinergiques. **L'ocytocine pourrait donc jouer un rôle modulateur sur le CPG de la succion** situé dans le tronc cérébral.

Ces données ont été discutées en détail dans chaque chapitre correspondant des résultats. Nous allons donc ouvrir la discussion sur certains points connexes qui nous paraissent importants.

Le premier concerne les différentes caractéristiques des générateurs centraux qualifiés de multifonctionnels. La reconfiguration ou multifonctionnalité des réseaux existe, mais est-elle nécessaire ? S'agit-il d'une sorte d'économie d'énergie ou une architecture permettant d'optimiser le fonctionnement moteur ? Quelle pourrait être la finalité de l'activité inspiratoire observée lors de la déglutition ? Est-ce réellement une activité respiratoire paradoxale ?

Nous discuterons ensuite plus en détail de la neuromodulation centrale et périphérique de la déglutition. Nous élargirons par exemple notre raisonnement à d'autres substances que la sérotonine. Les différents modèles expérimentaux permettant d'étudier la déglutition seront également discutés en prenant notamment en compte leur incidence sur le pattern moteur et le type de déglutition obtenus. Parallèlement à l'existence d'une neuromodulation, nous analyserons les arguments expérimentaux qui suggèrent une plasticité du réseau neuronal de la déglutition. Enfin, nous discuterons du rôle possible de l'ocytocine dans la succion et la

maturation des réseaux du tronc cérébral. Nous terminerons par quelques perspectives qui découlent de ce travail.

I. Les réseaux multifonctionnels

Les organismes vivants sont capables d'exécuter de multiples tâches, parfois en utilisant les mêmes réseaux neuronaux ou en partageant certains éléments neuronaux. Ces réseaux neuronaux multifonctionnels sont composés de neurones qui contribuent à ces comportements à des degrés différents. Ils sont le résultat d'une organisation dynamique et fortement modulée, très étudiée chez les invertébrés, qui existe aussi très vraisemblablement chez les vertébrés. Différents mécanismes contribuent à cette organisation dynamique, dont le jeu de connections synaptiques, le retour sensoriel et la neuromodulation qui peuvent être responsables de changements de pattern. Nos résultats concernant la commande motrice laryngée et hypoglosse (Chapitre 2) ainsi que l'activité des neurones respiratoires pendant la déglutition (Chapitre 3) peuvent être mis en lumière par rapport aux notions qui définissent ce qu'est un réseau multifonctionnel.

Avant le terme de multifonctionnalité, c'est Peter Getting qui introduisit le terme de « réseau polymorphe » en 1989 afin de décrire des réseaux de neurones qui peuvent fonctionner de manière stable dans différents modes, selon leur modulation et plasticité ([Getting 1989](#)). Ces réseaux polymorphiques ont aussi été appelés « réseau réorganisant » ([Morton et Chiel 1994](#)). Cependant le terme « multifonctionnel » permet de faire ressortir le côté à la fois adaptatif et fonctionnel de ces réseaux qui peuvent commander différents comportements. Une grande variété de fonctions peut être observée sur un même neurone et cela peut dépendre de sa modulation, de ses entrées synaptiques et de sa plasticité ([Guckenheimer et al, 1993](#); [Cymbalyuk et Shilnikov 2005](#); [Frohlich et al, 2006](#); [Kass et Mintz 2006](#)). Lorsqu'on applique ces propriétés à un réseau de neurones, il n'est pas surprenant que les réseaux

puissent également générer de nombreuses sorties motrices différentes. Ce sont les études sur les comportements rythmiques des invertébrés qui ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des réseaux multifonctionnels ([Marder 2000](#); [Marder et Bucher 2001](#); [Grillner 2006](#)). Cette compréhension a été facilitée par la simplicité de leur système nerveux qui permet de corréler aisément une commande neurale à un mouvement relativement simple ([Marder et Calabrese 1996](#); [Marder et al, 2005](#)). Ces études ont montré que la combinaison de connectivité synaptique et de propriété membranaire intrinsèque pouvait générer différents patterns dans un même circuit ([Marder et Calabrese 1996](#); [Kristan et al, 2005](#); [Marder et al, 2005](#)). Ainsi, les réseaux multifonctionnels permettent au système nerveux central de produire une variété de comportements plus ou moins complexes, contribuant grandement à sa capacité d'adaptation face aux différents changements externes ou internes rencontrés par l'animal. Cependant, afin de comprendre et décrire ces réseaux, il est nécessaire de déterminer les paramètres sous-jacents.

Dans un premier temps il est important de considérer ces réseaux comme formant un même système car un même groupe de neurones peut donner différentes sorties que l'on qualifiera de « stables » ou « fonctionnelles » selon l'état de l'animal, les stimuli issus de son environnement interne ou externe, ou encore selon la neuromodulation dont font l'objet ces réseaux. Par exemple, si on étudie en détail un arc réflexe qui à première vue est une voie directe d'un neurone sensoriel vers un interneurone puis un motoneurone, on peut s'apercevoir que des modulations complexes peuvent avoir lieu à différents niveaux ([Hooper 2005](#); [Kelso 2012](#)). Par exemple, si on s'intéresse au niveau pré-moteur, des interactions bien plus distribuées peuvent être observées. Un exemple classique est le réflexe de retrait de la branchie chez l'aplysie, où il a non seulement été montré qu'une large population de neurones différents était capable d'induire ce réflexe ([Wu et al, 1994](#)), mais aussi que ces différents neurones codent pour la position et la vitesse de retrait des branchies ([Zochowski et al, 2000](#)).

Une seconde forme de multifonctionnalité dépend de certains groupes de neurones dédiés au sein de différents réseaux, c'est-à-dire des populations de neurones qui créent des mouvements coordonnés distincts comme la rotation d'une articulation, mais leur coordination dynamique peut générer une large variété de comportements ([Kiehn et Kjaerulff 1998](#); [Buschges 2005](#)). Par exemple, différents

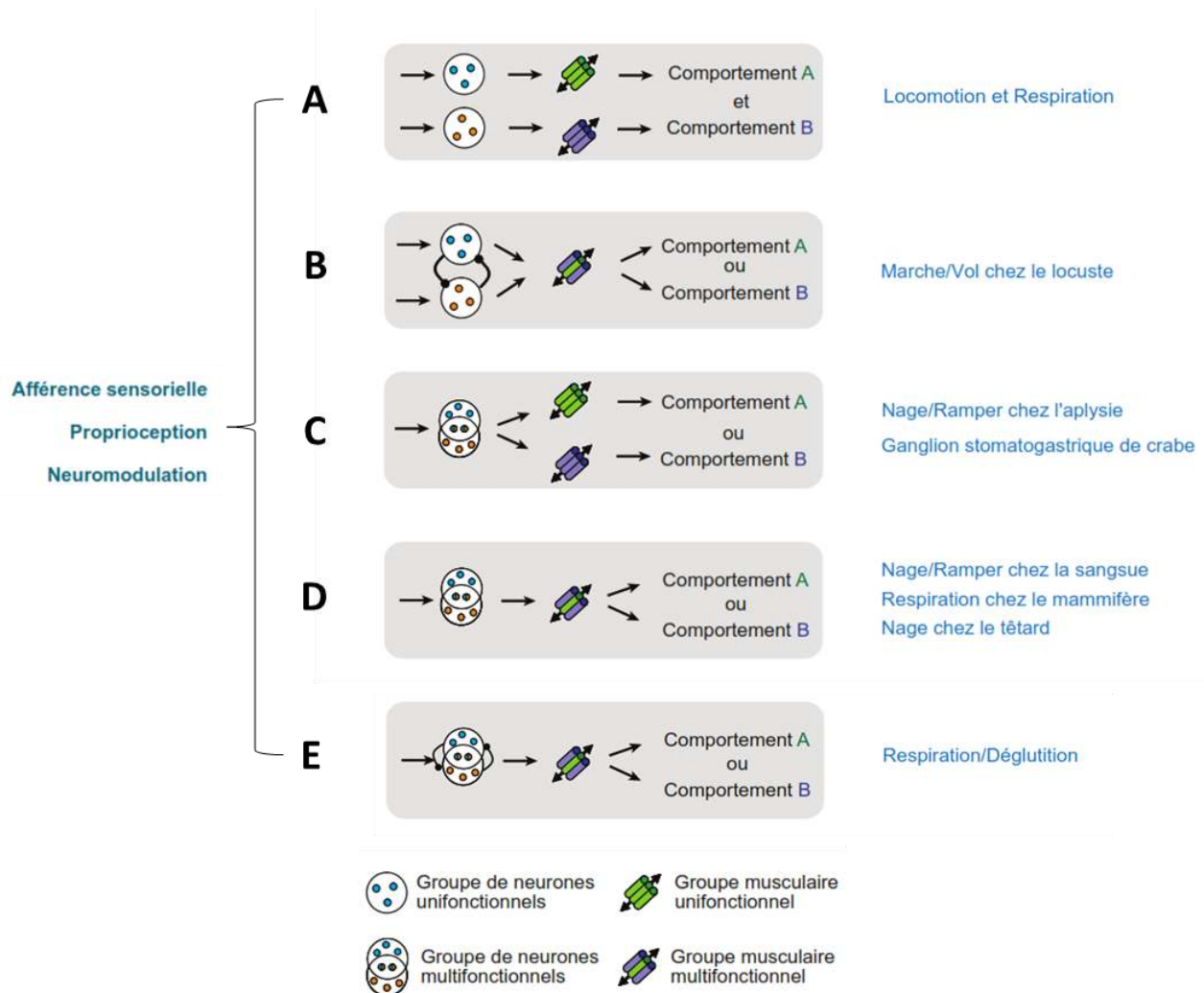


Figure 40 : Schéma représentant différentes configurations de réseaux multifonctionnels. Les informations sensorielles et la neuromodulation permettent la sélection des différents comportements moteurs. La multifonction de ces réseaux peut être assurée par des communications synaptiques entre les neurones au sein d'un ou de plusieurs réseaux ou encore par la « fusion » de plusieurs réseaux (partage d'éléments communs). (A) Deux groupes de neurones dédiés et distincts commandent deux comportements moteurs distincts. (B) Deux groupes de neurones distincts communiquant par des connexions réciproques commandent un groupe musculaire multifonctionnel. (C) Deux groupes de neurones partageant certains éléments forment un groupe de neurones multifonctionnels et permettent l'expression simultanée de deux comportements moteurs distincts. (D) Un groupe de neurones multifonctionnels commande un groupe musculaire multifonctionnel permettant l'expression de comportements moteurs différents utilisant les mêmes muscles. (E) Configuration proposée pour rendre compte de nos résultats lors de la respiration et la déglutition. Deux groupes de neurones en partie distincts, mais comprenant également des éléments communs et communiquant par des connexions réciproques commandent un ou plusieurs groupe(s) musculaire(s) multifonctionnel(s). Ces groupes musculaires comprennent vraisemblablement le diaphragme et les muscles de la langue. (*Adapté de Briggman et Kristan, 2008*)

groupes peuvent être utilisés pour coordonner différents segments du corps de l'animal, comme lors d'un mouvement ondulatoire ([Kristan et al, 2005](#); [Grillner 2006](#)).

Définir un réseau comme multifonctionnel ou dédié est souvent difficile car certains neurones du circuit peuvent contribuer à plus d'un comportement alors que d'autres ne sont utilisés que pour un seul. De plus, le muscle contrôlé par le réseau peut aussi être multifonctionnel ou dédié ([Morton et Chiel 1994](#)). Si l'on prend deux pools de neurones, différentes compositions de réseaux produisant différents comportements peuvent être reportées :

- Un réseau dédié, avec deux pools de neurones qui contrôlent deux comportements distincts tels que la locomotion et la respiration ([Morin et Viala 2002](#)) (**Figure 40-A**),
- Deux pools de neurones dédiés à un comportement musculaire qui lui est multifonctionnel tel le vol ou la marche chez le criquet ([Ramirez et Pearson 1988](#)) (**Figure 40-B**),
- Deux pools de neurones ayant des éléments partagés pour produire deux comportements moteurs différents, tel que le rythme pylorique et le rythme du moulin gastrique générés par les neurones du système nerveux stomatogastrique de homard ([Bucher et al, 2006](#)) (**Figure 40-C**),
- Un circuit multifonctionnel produisant un comportement musculaire multifonctionnel, tel que le réseau respiratoire des mammifères pouvant produire différents comportements respiratoires, soit l'eupnée, le soupir et le « gasping » ([Lieske et al, 2000](#)) (**Figure 40-D**),

Deux comportements différents peuvent être aussi générés en changeant le pattern de décharge des mêmes neurones, tel un changement de relation de phase des mêmes motoneurones, comme ceux utilisés pour la marche avant et arrière chez l'Homme ([Grasso et al, 1998](#)). Des patterns d'activité très distincts peuvent être aussi observés au niveau des

mêmes interneurons pendant des comportements différents. Par exemple, chez la tortue, certains interneurons de la moelle épinière peuvent décharger en phase à différentes fréquences pour donner différentes formes de patterns moteurs pendant le toilettage ([Berkowitz 2001](#)) et ces mêmes neurones peuvent être rythmiques, toniques ou silencieux lors de la nage ([Berkowitz 2002](#)). Chez les Brachyura (aussi appelés « vrai-crabe »), l'estomac est divisé en deux parties : une postérieure pylorique et une antérieure cardiaque aussi appelée sac cardiaque, délimitées par un étranglement. Dans la partie supérieure de l'estomac, on retrouve des pièces calcifiées qui forment le moulin gastrique. En fonction de la progression du bolus alimentaire dans l'estomac on peut retrouver trois types de rythmes différents ([Marder et Bucher 2007](#)). Dans ce système certains neurones sont partagés et les neurones normalement actifs pendant le rythme pylorique en cours peuvent changer pour décharger en phase avec le rythme du moulin gastrique ([Weimann et Marder 1994](#)) ou avec celui du sac cardiaque ([Hooper et al, 1990](#)) lorsque le bolus atteint ces parties. Certains neurones peuvent aussi changer de rôle pour participer à la genèse de différents rythmes simultanés. Par exemple, lors du vol du criquet certains interneurons normalement actifs pendant les mouvements respiratoires abdominaux changent d'activité pour osciller avec le rythme des battements d'ailes ([Ramirez 1998](#)).

Les neurones d'un réseau multifonctionnel peuvent aussi être actifs pendant un comportement rythmique puis activement inhibés pendant un autre. Ces neurones sont alors hyperpolarisés et sont considérés comme inactifs. Cependant, bien qu'une hyperpolarisation d'un neurone soit synonyme d'un arrêt de décharge dans la majorité des cas, cela ne veut pas dire que cela enlève son influence sur le réseau. En effet, hyperpolariser un neurone inhibiteur désinhibe sa cible, provoquant toute une cascade d'effets. Dans ce cas, une vue d'ensemble du réseau est nécessaire pour comprendre son influence sur le comportement généré. Ce type d'interaction inhibitrice est très important pour la mise en place d'un réseau multifonctionnel.

Par exemple, certains interneurons rythmiquement actifs pendant la marche chez le criquet reçoivent une inhibition pendant le vol ([Ramirez et Pearson 1988](#)).

Des interneurons qui établissent des contacts synaptiques directs avec les motoneurons (donc des prémotoneurons) peuvent aussi être à l'origine d'un comportement multifonctionnel. Cela peut s'expliquer par trois mécanismes principaux. Le premier est lié à l'activité intrinsèque des neurones qui constituent ce réseau. Par exemple, le ganglion stomatogastrique du homard peut générer deux rythmes du moulin gastrique distincts en fonction de l'activité de deux neurones (ici on les appellera neurone 1 et neurone 2). Lorsque le neurone 1 est activé mais pas le 2, le rythme du moulin gastrique est inhibé. A l'inverse, lorsque le neurone 2 est activé mais pas le 1, un rythme (a) du moulin gastrique est produit. Lorsqu'ils sont activés en même temps, le neurone 2 désinhibe le neurone 1 produisant un rythme (b) ([Combes et al, 1999](#)).

Le second mécanisme est la neuromodulation. La sécrétion de neuromodulateurs par le système nerveux confère un mécanisme alternatif pour moduler l'activité des réseaux multifonctionnels. La sécrétion et la diffusion de neuromodulateurs permet une altération des propriétés intrinsèques membranaires et de la force synaptique d'une large population de neurones, provoquant des changements sur le court et long terme ([Katz 1998](#); [Dickinson 2006](#); [Yoder et Izquierdo 2018](#)). Ces neuromodulateurs peuvent être libérés localement par les neurones ou de manière plus diffuse de manière hormonale ([Weimann et al, 1997](#)). Ils peuvent altérer un simple rythme, changer de rythme, ou provoquer l'apparition d'un nouveau rythme ([Nusbaum et Marder 1989a](#); [Meyrand et al, 1994](#)). La proctoline, un peptide libéré par des neurones modulateurs, peut démarrer ou accélérer le rythme pylorique lent du ganglion stomatogastrique ([Nusbaum et Marder 1989b, 1989a](#)). Les monoamines peuvent aussi jouer un rôle important sur les réseaux multifonctionnels. Chez la sangsue, la sérotonine favorise la nage en modifiant l'activité des canaux I_h et I_{NaP} des neurones du CPG de la nage ([Angstadt](#)

[et Friesen 1993b, 1993a](#)). D'un autre côté, la dopamine stoppe la nage et favorise l'activité de rampement ([Crisp et Mesce 2004](#); [Miller et Dunkel 2020](#)).

Enfin, le dernier mécanisme implique les contraintes biomécaniques liées au comportement évoqué, ainsi que le retour sensoriel. Les propriétés biochimiques de la musculature et des articulations exercent une forte influence sur le comportement généré. Par exemple, le comportement de prise alimentaire de l'aplysie est généré par des muscles contrôlés par un CPG qui commandent à la fois l'ingestion et la réjection de nourriture ([Jing et Weiss 2005](#); [Cropper et al, 2017](#)). En fonction de la forme que prend sa langue, un comportement sera favorisé par rapport à un autre, i.e. si la forme est sphérique la déglutition sera déclenchée, alors que si elle est ellipsoïdale il y aura une réjection ([Sutton et al, 2004a; 2004b](#)).

D'après Harris-Warrick ([2010](#)), la neuromodulation des CPGs 1) joue un rôle essentiel pour exprimer différentes fonctions du CPG, 2) peut activer des actions opposées d'un réseau, 3) peut permettre de sélectionner le type de neurone actif dans le réseau, et ce indépendamment de son état, et 4) régule l'expression des gènes codant pour des canaux ioniques permettant de déterminer la fonction neuronale. Le CPG de la nage chez le triton contient une neuromodulation intrinsèque sérotoninergique, car un groupe de neurones sérotoninergiques fait partie de son CPG ([McClellan et al, 1994](#); [Tamvacakis et al, 2018](#)). Cette neuromodulation joue un rôle important pour l'expression du pattern moteur de nage, car le blocage de cette transmission empêche la production de cette activité motrice ([Katz et Frost 1995](#)). La dopamine peut jouer un rôle neuromodulateur extrinsèque chez différents gastropodes. Ces espèces présentent des neurones dopaminergiques sous-épithéliaux permettant de réguler les fonctions associées à la recherche de nourriture ([Croll 2001](#); [Wyeth et Croll 2011](#)). Chez l'Aplysie et la Limnée, l'activité des neurones dopaminergiques permet

au réseau buccal d'effectuer un mouvement de réjection plutôt que d'ingestion, alors que ces deux mouvements sont antagonistes ([Jing et Weiss 2001](#); [Crossley et al, 2018](#)).

Chez le vertébré, la neuromodulation est aussi importante pour la génération de patterns moteurs rythmiques. Par exemple, la sérotonine joue un rôle important pour la locomotion chez le rongeur ([Jordan et Slawinska 2011](#); [Ge et al, 2019](#); [Loy et al, 2021](#)). En effet, le blocage de différents récepteurs sérotoninergiques bloque l'activité locomotrice fictive ([Majczynski et al, 2020](#)). La sérotonine est aussi importante pour le CPG de la respiration ([Garcia et al, 2011](#); [Bravo et al, 2017](#); [Wollman et al, 2022](#)). Chez la souris nouveau-née, la perte des neurones sérotoninergiques provoque des épisodes sévères d'apnées prolongées, ainsi qu'une mortalité importante, mais l'activité respiratoire est rétablie par l'injection d'agoniste 5-HT_{2a} ([Hodges et al, 2009](#)).

Enfin, la conservation de l'énergie est primordiale pour les organismes. Il n'est pas impossible que la configuration dynamique des réseaux permette d'atteindre ce but. Par exemple, chez la Limnée, on peut retrouver deux types de mastications : appétitive et consommatoire ([Crossley et al, 2016](#)). Ces deux types se différencient par l'activité de leur motoneurones, où une fréquence de décharge diminuée est observée lorsque la mastication est appétitive, ce qui diminue la dépense énergétique. La différence entre ces deux types de mastication est la nature du bolus alimentaire. Lorsqu'il est sûr qu'il s'agit d'un bolus nutritif, alors la mastication sera consommatoire, et inversement. Ceci est aussi retrouvé chez *C.elegans*, où les réseaux responsables de la prise alimentaire sont plus actifs lorsque l'entrée d'énergie est garantie grâce à une neuromodulation sérotoninergique ([Lee et al, 2017](#)).

Enfin, sur la base des observations faites lors de la respiration et la déglutition dans ce travail, un cinquième type de configuration peut être ajouté à ceux cités précédemment :

- Deux pools de neurones ayant des éléments partagés commandant des muscles multifonctionnels et possédant également des interconnexions inhibitrices afin d'empêcher

leur expression simultanée, permettant de générer la respiration et la déglutition (**Figure 40-E**).

En effet nous avons vu dans le Chapitre 5 de l'introduction et dans le Chapitre 3 des résultats que ces réseaux ont des neurones dédiés et partagés, avec par exemple des neurones pré-I du PreBotC dont certains sont dédiés à la respiration et d'autres actifs pendant la

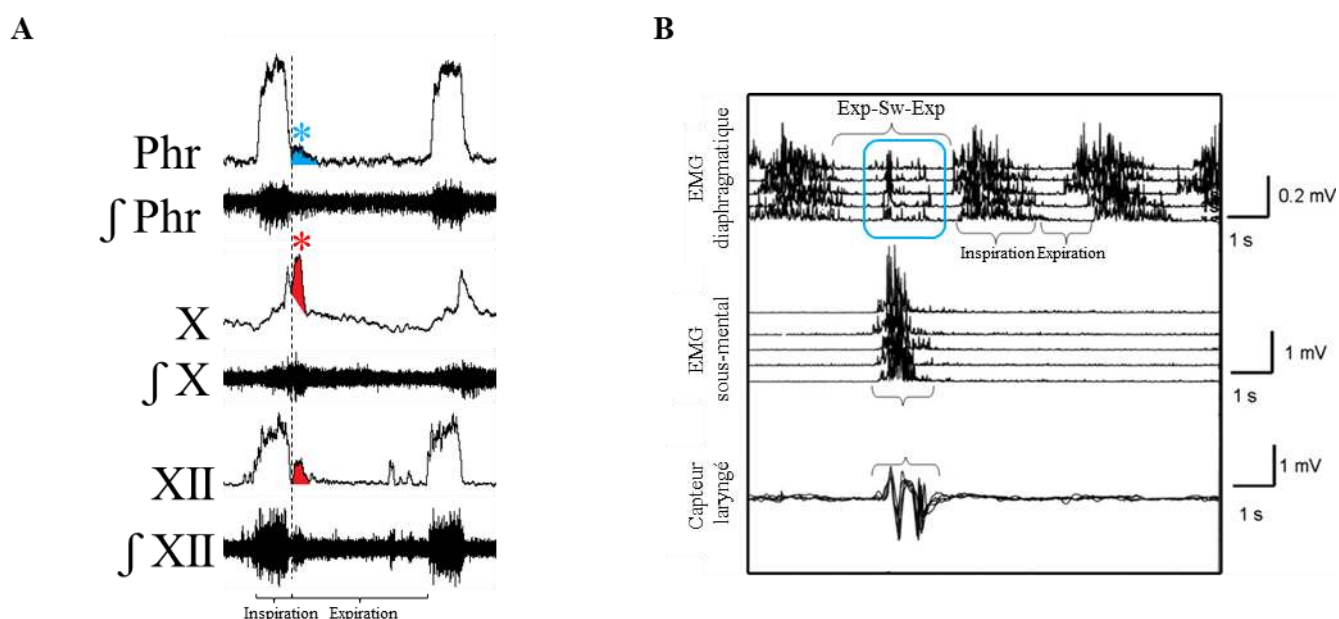


Figure 41 : Exemples d'activité inspiratoire phrénique et diaphragmatique pendant la déglutition.

(A) Tracés électrophysiologiques bruts et intégrés (∫) obtenus au laboratoire sur la préparation perfusée in situ chez le rat juvénile représentant l'activité des nerfs Phr, X et XII au cours d'un cycle respiratoire contenant une déglutition de type I-Sw-Exp. L'astérisque rouge représente l'activité nerveuse déglutitrice et l'astérisque bleu correspond à l'activité phrénique présente pendant la déglutition (ou Schluckatmung). (B) Tracés électrophysiologiques superposés obtenus chez un Homme sain représentant des cycles respiratoires dont un contient une déglutition de type Exp-Sw-Exp (*Adaptée de Uysal et al, 2012*). Les tracés du haut correspondent à un EMG du diaphragme. Les tracés du milieu correspondent à un EMG sub-mental (muscles mylo-hyoïdien). Les tracés du bas représentent les signaux provenant d'un capteur de mouvement du larynx lors de la déglutition. La zone entourée en bleu montre l'activité diaphragmatique concomitante de la déglutition (Schluckatmung). Notez la précocité (ou simultanéité) de l'activité EMG du diaphragme par rapport au signal sus-hyoïdien et au déplacement du larynx lors de la déglutition. Abréviations : Phr, Nerf phrénique ; X, Nerf vague ; XII, Nerf hypoglosse.

respiration et la déglutition, ou encore le NTS qui contient à la fois des neurones inspiratoires et déglutiteurs. Ces comportements font intervenir les mêmes muscles des VAS tels que la langue et les muscles du larynx, mais aussi des VAI avec le diaphragme. L'expression simultanée de la respiration et la déglutition est incompatible avec le maintien de l'intégrité des VAI, et ceci est empêché par un fort couplage central entre le NTS et la CVR, ainsi que par une modulation périphérique médiée par les afférences vagales pulmonaires. Cette dernière n'est cependant pas indispensable puisqu'une coordination respiration-déglutition normale est toujours observée en l'absence de retour sensoriel, comme c'est le cas sur la préparation perfusée *in situ* (nos résultats) ou encore sur la préparation de tronc cérébral isolé *in vitro* (ou préparation en bloc) ([Yamanishi et al, 2010](#)).

II. Signification de l'activité inspiratoire pendant la déglutition : exemple du Schluckatmung

Nous pouvons considérer que la déglutition et l'inspiration sont deux actes moteurs antagonistes puisqu'on ne peut pas inspirer et déglutir en même temps. Dès lors il peut sembler tout à fait paradoxal d'enregistrer une activité inspiratoire pendant la déglutition. Pourtant, une brève activité du diaphragme ou du nerf phrénique, plus réduite qu'une décharge inspiratoire normale, a été observée chez l'animal comme chez l'homme ([Wilson et al, 1981](#); [Grelot et al, 1992](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Hardemark Cedborg et al, 2009](#)). Dans la littérature, cette activité inspiratoire musculaire ou nerveuse pendant la déglutition a été appelée « Schluckatmung » (de l'Allemand signifiant « déglutition-respiration ») ou encore « phrenic breakthrough » (signifiant percée phrénique). Dans notre travail réalisé *in situ*, nous confirmons que la déglutition s'accompagne souvent d'une faible activité inspiratoire phrénique (**Figure 41**). De plus, nous montrons également sur ce modèle qu'il existe des neurones inspiratoires de types différents (motoneurones hypoglosses et interneurones de la colonne respiratoire ventrale) qui sont également actifs lors de la déglutition.

Des enregistrements extracellulaires de l'activité des neurones inspiratoires du NTS avaient été réalisés bien auparavant, chez le chat *in vivo*, par Sumi (1963). Cet auteur montrait pour la première fois une activité de décharge de ces mêmes neurones inspiratoires pendant la phase buccopharyngée de la déglutition. Plus tard, d'autres enregistrements tels que ceux effectués par Dick et collaborateurs (1993) dans la colonne respiratoire ventrale chez le chat décérébré et ventilé artificiellement, montraient que certains neurones inspiratoires de cette région déchargeaient également pendant la déglutition. Nos résultats obtenus *in situ* dans cette même région (et mentionnés plus haut) corroborent donc ces observations. La signification de ces activités respiratoires recueillies par Sumi ou Dick et collaborateurs restait cependant très obscure, sans doute en raison de l'absence de caractérisation fonctionnelle des neurones enregistrés. Quelques années plus tard, l'activité de neurones inspiratoires du NTS était recueillie à l'aide d'enregistrement intracellulaire toujours chez le chat décérébré et ventilé artificiellement (Gestreau et al, 1996). Grâce à la technique de stimulation antidromique de la moelle épinière cervicale et du test de collision d'influx, cette étude a montré que les neurones enregistrés projetaient leurs axones du bulbe vers la moelle épinière en C3-C5, c'est-à-dire là où se situent les motoneurones phréniques. De tels neurones bulbospinaux pouvaient donc être considérés comme prémoteurs phréniques. Les résultats des tests pratiqués pendant la déglutition montraient qu'une large majorité de ces neurones inspiratoires (28/33) étaient actifs lors de la phase pharyngée de la déglutition fictive.

Quelle signification fonctionnelle pouvaient donc avoir ces décharges inspiratoires prémotrices et motrices phrénique ? Dans l'article de Gestreau et collaborateurs (1996), l'hypothèse avancée était 1) que la percée phrénique pouvait être le résultat d'une inhibition incomplète des motoneurones phréniques, néanmoins suffisante pour stopper le flux inspiratoire lors de la déglutition, et 2) que les neurones inspiratoires du NTS pouvaient être multifonctionnels, c'est-à-dire contribuer soit à l'acte moteur inspiratoire, soit à l'activité

motrice de déglutition. Cette dernière hypothèse s'appuyait sur des observations faites dans la littérature après reconstruction de la morphologie cellulaire, montrant que certains neurones du NTS possédaient un axone bifurqué. En postulant que cette bifurcation d'axone pouvait donner lieu à des terminaisons synaptiques sur les motoneurones crâniens (hypoglosse, pharyngé ou laryngé), il était plausible qu'une même cellule appartienne ainsi à deux réseaux distincts en excitant le diaphragme pendant l'inspiration et en contribuant à la commande motrice des voies aériennes supérieures pendant la déglutition. Une autre hypothèse était également discutée au sein du laboratoire marseillais où ces études avaient été réalisées. Et si l'activité de décharge des prémotoneurones inspiratoires phréniques du NTS pendant la déglutition servait à « dilater / relaxer » la partie crurale (péri-œsophagienne) pour faciliter le passage du bol alimentaire lorsque celui-ci franchit le diaphragme avant d'arriver dans l'estomac ? Bien que plausible, cette explication s'accorde mal avec le caractère très précoce de la percée phrénique, celle-ci étant concomitante de la phase pharyngée. De plus, une étude réalisée chez le chat par Altschuler et collaborateurs ([1987](#)) montre qu'une distension provoquée par l'inflation d'un ballon dans la portion thoracique de l'œsophage (afin de mimer le passage du bol lors de la phase œsophagienne de la déglutition) provoquait une inhibition de la partie crurale du diaphragme sans aucune modification de la décharge des prémotoneurones inspiratoires phréniques du NTS (ou même de ceux de la colonne respiratoire ventrale). Au total, cette seconde hypothèse apparaît donc peu probable. Enfin, une troisième explication plus cohérente a fini par émerger des années plus tard.

En effet, si l'on considère que la glotte est fermée au moment où la contraction diaphragmatique est observée lors de la déglutition, l'action mécanique engendrée est une légère distension thoracique capable de provoquer une pression négative œsophagienne. Il est important de préciser ici qu'une telle pression négative avait été observée pendant la déglutition plus d'un siècle auparavant par Arloing ([1877](#)) et considérée par l'auteur comme

une partie intégrante du réflexe de déglutition. Le rôle de cette pression négative observée au moment de

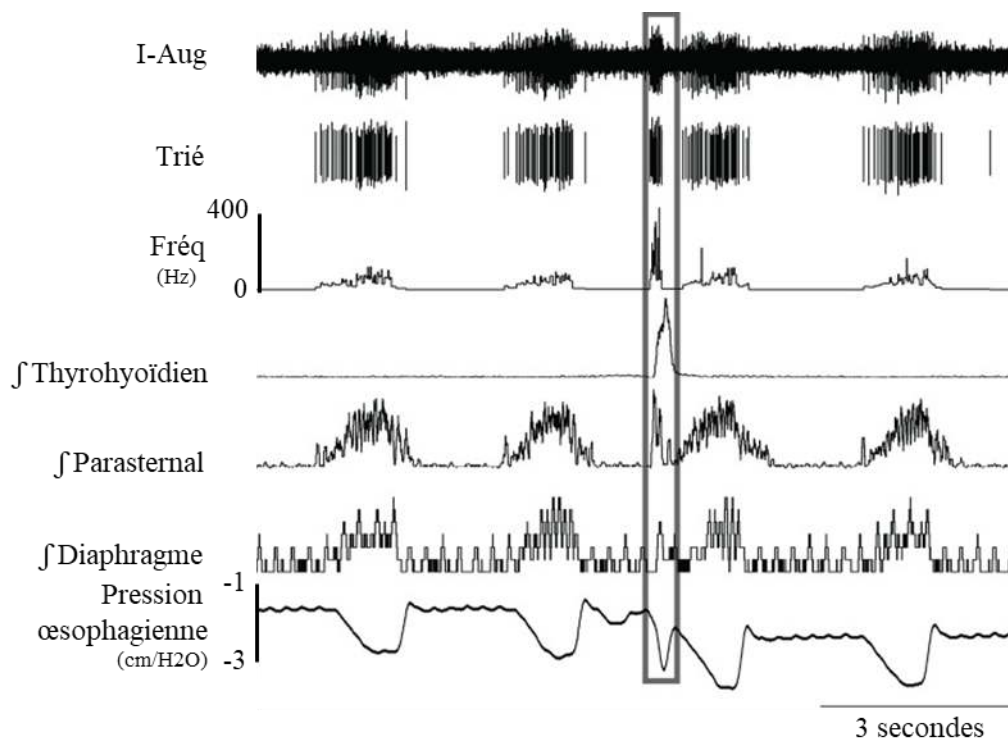


Figure 42 : Activité inspiratoire pendant la déglutition chez le chat anesthésié in vivo. Les tracés du haut indiquent la décharge neuronale brute et seuillée (trié) ainsi que la fréquence de décharge instantanée (FF, Hz) d'un neurone pré-moteur phrénique I-Aug du NTS pendant la respiration et la déglutition (rectangle gris). La fréquence de décharge de ce neurone est supérieure pendant la déglutition par rapport à l'inspiration. On remarque une activité motrice diaphragmatique parasternale (et costale) pendant la déglutition associée à une variation de pression œsophagienne. L'activité intégrée (∫) du muscle thyrohyoïdien témoigne de l'activité déglutitrice et l'activité intégrée parasternale et diaphragmatique de l'activité respiratoire et déglutitrice. (*Adaptée de Pitts et al, 2018*).

la phase pharyngée de la déglutition, donc au moment où le sphincter supérieur de l'œsophage est ouvert, serait littéralement d'aspirer le bolus afin de diminuer son temps de transit dans le carrefour aéro-digestif et ainsi diminuer le risque d'aspiration trachéale ([Pitts et al, 2013](#); [2018](#); [King et al, 2020](#)). Cet avantage mécanique pour le réflexe de déglutition passerait donc par le recrutement d'une partie des neurones du réseau respiratoire ([Pitts et al, 2018](#)). Au total, les neurones inspiratoires pré moteurs phréniques seraient donc responsables du schluckatmung, un évènement moteur important pour la déglutition (**Figure 42**).

III. Réflexions sur la neuromodulation de la déglutition

Au niveau central, différentes substances pharmacologiques peuvent déclencher et/ou de manière plus large moduler la déglutition. Dans ce travail, nous avons par exemple montré que l'injection *in situ* de glutamate dans le NTS provoque le déclenchement de la déglutition, souvent de manière rythmique. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du système nerveux central. L'injection du glutamate dans le NTS mime en quelque sorte le relargage de ce neurotransmetteur excitateur par les terminaisons synaptiques des fibres du nerf laryngé supérieur (NLS) lorsque ce dernier est stimulé de manière répétitive. Des effets similaires ont été observés *in vivo* (e.g. [Gestreau et al, 1996](#); [Grelot et al, 1992](#)). En dehors du glutamate, que nous ne considérons pas ici comme une substance modulatrice, nous montrons également que la sérotonine est capable d'augmenter la fréquence de déglutition *in situ* en agissant sur les récepteurs 5-HT_{2a} du noyau raphé magus et obscurus (voir le Chapitre 1 des résultats ; [Berge-Laval et Gestreau 2020](#)). Les déglutitions évoquées après administration de quipazine sont isolées (un seul évènement par cycle respiratoire). De plus, les résultats présentés dans le Chapitre 1 des résultats sont en accord avec les études réalisées *in vivo* et confirment que la sérotonine exerce un effet neuromodulateur sur la déglutition ([Bieger 1981](#); [Kessler et Jean 1991](#)).

La déglutition étant une étape importante de la prise alimentaire, il est possible que les substances pharmacologiques capables d'influencer la prise alimentaire influencent également la déglutition (et vice-versa). En effet, des substances orexigènes comme la ghréline ([Kobashi et al, 2010](#)) ou anorexigènes comme la leptine ([Felix et al, 2006](#); [Bariohay et al, 2008](#); [Abysique et al, 2015](#); [Kobashi et al, 2017](#)) modulent le réflexe de déglutition. Une étude récente a montré que la nesfatine-1 (agent anorexigène) inhiberait la déglutition en mettant en jeu la signalisation ocytocinergique et par ailleurs, l'ocytocine intervient également dans la modulation de la prise alimentaire ([Guillebaud et al, 2019](#)). Dans cette dernière étude, l'effet inhibiteur lié à l'injection de nesfatine-1 dans le groupe déglutiteur dorsal est bloqué par l'injection d'un antagoniste ocytocinergique. Ces résultats suggèrent donc que l'ocytocine exerce (*in vivo*) un effet neuromodulateur inhibiteur sur la déglutition. Cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre 4 des résultats, nous n'avons pas révélé d'effet neuromodulateur significatif du TGOT, un agoniste ocytocinergique, sur la déglutition *in situ* de P6 à P21. Il est donc possible que l'effet inhibiteur de l'ocytocine révélé *in vivo* ne soit pas médié par les OTR mais plutôt par les récepteurs à la vasopressine. Des expériences supplémentaires pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

La substance P (SP) est un autre exemple de neuromodulateur qui pourrait avoir un effet sur la déglutition. Des patients souffrant de dysphagie oropharyngée ont une concentration en SP réduite et une sensibilité à la SP réduite ([Tomsen et al, 2022](#)). D'ailleurs, le niveau de SP dans la salive pourrait être un biomarqueur de la dysphagie chez les personnes âgées. Les principaux récepteurs retrouvés sur les afférences sensorielles de l'oropharynx sont les canaux «Transient Receptor Potential» (TRP). Ces canaux sont sensibles aux stimuli mécaniques, thermiques et chimiques ([Alvarez-Berdugo et al, 2016](#); [2018](#)). La stimulation des TRP provoque l'expression locale de SP en stimulant les terminaisons nerveuses des fibres sensorielles du nerf trijumeau (V), facial (VII), glossopharyngien (IX) et vague (X) présentes

dans l'oropharynx ([Rodrigo et al, 1985](#); [Yoshida et al, 2000](#); [Clave et Shaker 2015](#); [Tomsen et al, 2022](#)). De plus, la stimulation de l'oropharynx avec de la capsaïcine module la sécrétion de SP. Or la capsaïcine est capable d'améliorer l'efficacité de la déglutition en augmentant la décharge motrice pharyngée ainsi qu'en activant le sphincter œsophagien supérieur. Les capsaïcinoïdes seraient responsables d'une libération dose-dépendante de SP et d'un effet positif sur la biomécanique de la déglutition ([Ebihara et al, 1993](#); [Yamasaki et al, 2010](#); [Suntrup-Krueger et al, 2021](#)). Remarquons toutefois que l'étude de Suntrup-Krueger et collaborateurs ([2021](#)) a été réalisée chez des sujets sains et qu'il conviendrait de vérifier si les résultats sont identiques chez les patients dysphagiques. L'administration de capsaïcine ou de SP sur la préparation *in situ* pourrait être un bon outil pharmacologique pour étudier les effets de ces substances sur les paramètres neurophysiologiques de la déglutition. En périphérie, la SP est retrouvée dans des zones importantes de digestion tel que l'estomac et l'intestin grêle ([Karagiannides et al, 2006](#)), et son rôle sur la motilité et sécrétion gastrointestinale semble bien connu ([Holzer et Holzer-Petsche 1997](#); [Holzer 2011](#); [Holzer et Farzi 2014](#); [Atas et al, 2021](#); [Zhu 2021](#)). Centralement, la SP est retrouvée dans certaines aires hypothalamiques impliquées dans la prise alimentaire telles que le noyau arqué et ventro-médian ([Mantyh et al, 1984](#)). Bien que ses effets soient encore mal compris, la SP jouerait un rôle dans la modulation de la prise alimentaire. Son blocage a même été proposé comme traitement potentiel contre l'obésité ([Karagiannides et al, 2008](#)). Ces derniers auteurs ont montré que l'administration intrapéritonéale d'un antagoniste à la SP provoque une perte de masse adipeuse significative chez des souris obèses, alors que l'injection de SP (en plus de l'antagoniste) provoque une augmentation de prise alimentaire dose dépendante. Cependant, d'autres résultats opposés ont été publiés. Chez le rat, l'injection intrapéritonéale de SP réduit la prise alimentaire ([Hasenohrl et al, 1994](#)). De plus, l'administration intraveineuse ou intraventriculaire de SP provoque une diminution de la prise alimentaire associée à une

diminution d'activité des centres de la prise alimentaire hypothalamique ([Zilov et al, 1986](#)). Chez la caille et le coq l'administration centrale de SP provoque une diminution de prise alimentaire ([Tachibana et al, 2010](#); [Mace et al, 2014](#); [Pauliukonis et al, 2020](#)). Ces résultats différents s'expliquent sans doute par l'usage de modèles animaux différents et/ou de méthodes différentes. Une étude récente chez l'Homme montre qu'un taux élevé de SP est retrouvé chez des patients obèses morbides ; la SP participerait à maintenir cet état en accélérant la vidange gastrique ([Atas et al, 2021](#)).

Si l'on revient à présent sur l'effet facilitateur de la sérotonine sur la déglutition observé *in situ*, existe-t-il des évidences que cette substance soit également impliquée dans la modulation de la prise alimentaire ? Cela semble bien être le cas, notamment chez les invertébrés. Chez le mollusque, la sérotonine active un courant sodique entrant sur les neurones buccaux via un mécanisme AMPc-dépendant, provoquant une dépolarisation membranaire et augmentant la fréquence de décharge de ces neurones ([Price et Goldberg 1993](#)). L'activation du courant I_h est également suspectée. Chez l'aplysie, la sérotonine augmente l'excitabilité de neurones sensoriels et augmente la transmission synaptique de ces neurones vers leurs cibles ce qui facilite le comportement d'ingestion ([Klein et Kandel 1980](#); [Hawkins et al, 1983](#); [Byrne et Kandel 1996](#)). Chez la larve de drosophile, la sérotonine augmente la fréquence du rythme moteur permettant la prise alimentaire ([Schoofs et al, 2014](#)). Ainsi, la sérotonine exercerait un effet excitateur sur les réseaux neuronaux impliqués dans le comportement alimentaire. Malgré les différences évolutives entre les vertébrés et invertébrés, le système sérotoninergique est plutôt conservé au niveau moléculaire, avec des récepteurs 5-HT_R homologues aux sous-types de récepteurs retrouvés chez les mammifères (5-HT_R1-7) ([Tierney 2018](#)). Nous montrons un effet facilitateur de la quipazine sur la déglutition qui s'exerce probablement via les récepteurs 5-HT_R2a. Ces récepteurs sérotoninergiques sont les plus exprimés par les cellules et les plus étudiés ([Willins et al, 1997](#); [McCorvy et Roth 2015](#)),

notamment car ils exercent des effets anti-dépresseurs et qu'ils sont responsables des effets excitateurs de la sérotonine ([Zieba et al, 2021](#)). Ces récepteurs sont couplés aux protéines Gq qui activent la phospholipase C et produisent de l'inositol triphosphate ainsi que du diacylglycerol, ce qui résulte en une augmentation intracellulaire de calcium ([Roth et al, 1984; 1998](#)). Des études conduites sur le cortex de rat ont montré que l'activation de récepteurs 5-HT2a augmente l'activité glutamatergique des neurones cibles ([Marek et Aghajanian 1998; Becamel et al, 2017](#)).

En accord avec ces données de la littérature, nous avons donc émis l'hypothèse que la quipazine active les récepteurs 5-HT2a exprimés par les neurones du raphé bulbaire, ces derniers projetant leurs axones vers le NTS afin d'exciter le réseau déglutiteur dorsal via la libération de glutamate. En conclusion, la sérotonine pourrait donc exercer un effet neuromodulateur à la fois sur la déglutition et la prise alimentaire. De plus, il est possible que cet effet soit conservé dans le phylome.

IV. Réflexions sur le déclenchement expérimental de la déglutition

Différents modèles expérimentaux peuvent être utilisés pour étudier la déglutition et/ou la coordination respiration déglutition. De même, plusieurs protocoles de déclenchement de la déglutition ont été testés dans la littérature. Nous savons que l'activité motrice de déglutition est modulée selon les caractéristiques physicochimiques du bolus, telles que le volume, la texture, la consistance, la température, voire le goût ([Cook et al, 1989; Dantas et Dodds 1990; Dantas et al, 1990; Jean 2001; Kajii et al, 2002](#)). Cette adaptation repose sur la mise en jeu des afférences sensibles (voir Chapitre 4 de l'introduction). Il n'est donc pas surprenant qu'expérimentalement, le type de stimulation et son lieu d'application puissent exercer une influence drastique sur l'activité motrice de déglutition induite. Chez l'Homme

par exemple, une étude faite en IRM fonctionnelle a montré que l'acidification de l'œsophage avait pour effet de diminuer l'activité de déglutition ([Paine et al, 2008](#)). De plus, le pattern moteur déglutiteur

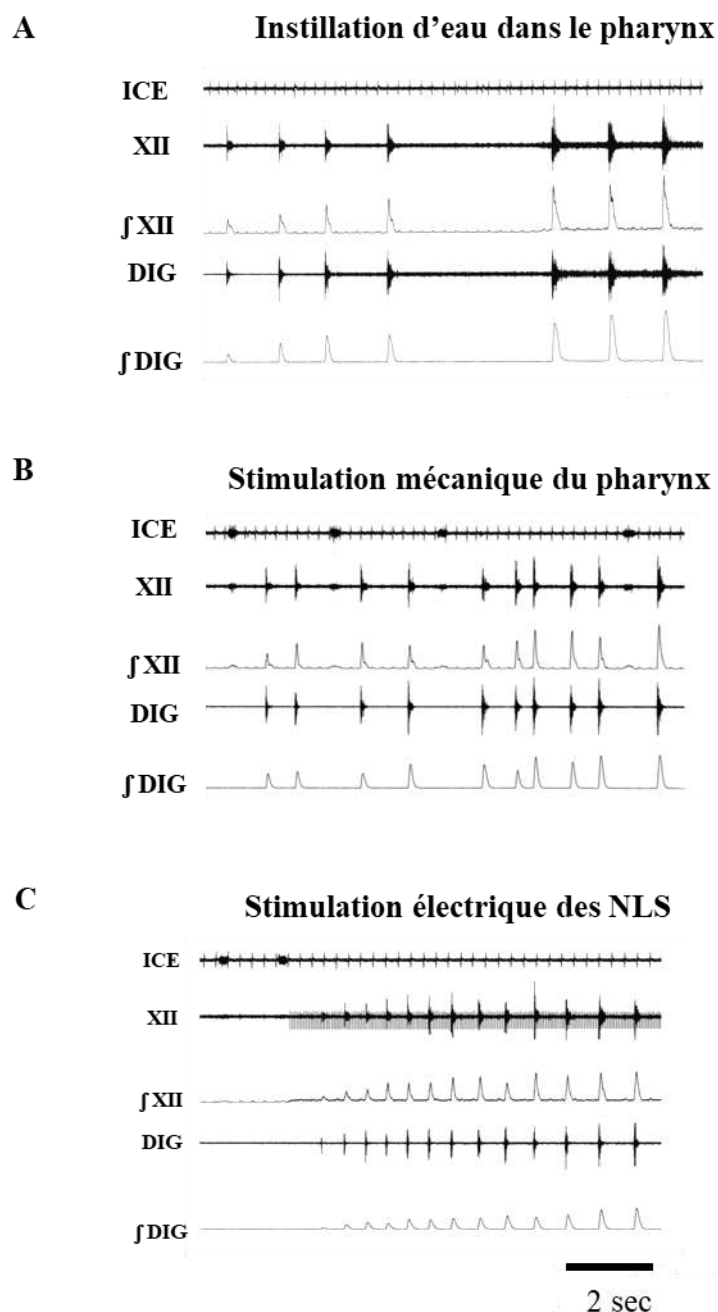


Figure 43 : Facilitation motrice au cours de la déglutition rythmique quel que soit le mode de déclenchement réflexe. (A) Stimulus physiologique (eau dans la cavité buccale). (B) Stimulation mécanique manuelle de la muqueuse de l'oropharynx à l'aide d'un cathéter. (C) Stimulation électrique (20Hz, 250µs, 1V) des fibres sensibles du nerf laryngé supérieur (NLS). Les déglutitions apparaissent pendant une pause inspiratoire (absence de décharge du muscle intercostal externe, ICE) et sont objectivées par l'activité phasique simultanée du nerf moteur hypoglosse (XII) et du muscle digastrique antérieur (DIG). Les activités nerveuses et musculaires peuvent être quantifiées à partir des signaux intégrés (f XII et f DIG). La facilitation se traduit par l'augmentation progressive, quasi linéaire (C), de la force des déglutitions, en fonction de leur position dans la série. (Données chez le rat décérébré).

fait l'objet d'un changement plus important en fonction du volume du bolus plutôt que de sa consistance, la consistance du bolus modifiant seulement la phase buccale de la déglutition ([Ferris et al, 2021](#)).

Chez l'animal, la stimulation électrique répétitive d'un seul ou des deux nerfs laryngés supérieurs (NLS) provoque des déglutitions réflexes rythmiques ([Dick et al, 1993](#); [Gestreau et al, 1996](#); [Jean 2001](#)), tandis que la stimulation électrique de la muqueuse laryngopharyngée déclenche plutôt l'apparition de déglutitions isolées ([Takatsuji et al, 2012](#)). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de nocicepteurs. En effet, les voies aériennes supérieures (et particulièrement la muqueuse laryngopharyngée) contiennent de denses terminaisons nerveuses sensorielles, dont des fibres C non myélinisées sensibles aux stimuli nocifs ([Reix et al, 2007](#)), et la stimulation de ces fibres nociceptives inhiberait l'initiation de la déglutition ([Tsujimura et al, 2009](#); [2011](#)). Récemment, King et collaborateurs ([2020](#)), ont montré que le pattern moteur de la déglutition diffère selon le type de stimulation. Ils rapportent qu'une stimulation électrique des NLS provoque une plus forte activation des muscles des voies aériennes supérieures qu'une instillation d'eau dans la cavité oropharyngée. En revanche, cette stimulation électrique réduit le Schluckatmung ([King et al, 2020](#)). On peut toutefois remarquer que leurs expériences ont été faites chez le chat anesthésié. Des résultats non publiés obtenus dans l'équipe ne semblent pas confirmer les observations de King et collaborateurs. En effet, les déglutitions induites par l'instillation d'eau dans l'oropharynx sont plus robustes que celles induites par la stimulation des NLS chez le rat décérébré (**Figure 43**), mais aussi chez le chat décérébré ([Horton et al, 2018](#)). Il est donc probable que les différences de pattern moteur entre les deux études s'expliquent par des différences méthodologiques, notamment la présence ou l'absence d'anesthésique et des structures supra-mésencéphaliques. Il nous semble raisonnable de postuler que la stimulation de la déglutition par injection d'eau dans la cavité buccale provoque une stimulation afférente plus soutenue et

plus dynamique que la stimulation électrique des NLS. Le recrutement de davantage de fibres afférentes lors de la stimulation induirait alors un renforcement de l'activité motrice (augmentation du gain moteur). Les résultats supplémentaires présentés dans le chapitre suivant semblent confirmer cette hypothèse. De plus, les observations soulignées plus haut, montrant que l'application de concentrations croissantes de capsaïcinoïdes dans l'oropharynx provoque une libération dose-dépendante de SP et un renforcement des déglutitions ([Suntrup-Krueger et al, 2021](#)) vont également dans le sens de notre hypothèse.

Physiologiquement, le bol alimentaire peut entraîner la stimulation des NLS seulement lorsqu'il est à proximité immédiate du larynx. La déglutition induite par la stimulation électrique des NLS correspondrait dans ce cas à une situation d'urgence vis-à-vis de la protection réflexe des voies aériennes inférieures. De plus, la stimulation électrique provoque une activité synchrone des fibres sensibles à la fréquence de stimulation imposée par l'expérimentateur. Cela diffère donc des conditions physiologiques dans lesquelles 1) la phase orale précède la phase buccopharyngée, 2) les fibres du nerf glossopharyngien sont également stimulées (en plus du NLS) et 3) l'activation des fibres est modulée par la progression du bol dans la cavité oropharyngée, ce qui implique un mode de décharge plus dynamique des afférences sensibles. Pour ces raisons, on peut considérer que la stimulation électrique des NLS n'est pas la méthode la plus physiologique pour induire la déglutition. Néanmoins, il s'agit d'une technique robuste et facilement contrôlable largement utilisée dans la littérature.

Enfin, nous avons vu que pour étudier la coordination respiration-déglutition il était nécessaire d'utiliser une méthode d'induction de la déglutition qui permette d'obtenir une seule déglutition par cycle respiratoire (ou déglutition isolée). Dans cette optique, la stimulation par injection d'eau dans la cavité oropharyngée et l'administration de la quipazine par voie systémique semblent être les moyens les plus appropriés. Si l'injection d'eau est une méthode d'induction certainement plus physiologique et stimule probablement davantage de

fibres afférentes, elle possède cependant l'inconvénient d'être assez variable. Selon notre expérience, deux injections d'eau rapprochées provoquent souvent des réponses différentes. On note en particulier un phénomène de désensibilisation qui se traduit par l'atténuation du nombre d'évènements évoqués lors du second stimulus ou des stimuli successifs. A cet égard, la méthode pharmacologique proposée dans ce travail (injection de quipazine) a l'avantage de provoquer des déglutitions isolées de manière stable et sur le long terme (15-20 min). Cette méthode paraît propice pour explorer les mécanismes cellulaires de la coordination respiration déglutition, ainsi que les mécanismes de plasticité de la déglutition (voir Chapitre suivant).

V. Plasticité du CPG de la déglutition et rôle des afférences

Le réseau neuronal de la déglutition ferait l'objet d'une plasticité à court terme. En effet, la stimulation répétée des NLS provoque une augmentation de la transmission synaptique, mettant en jeu différents mécanismes modifiant l'activité des neurones déglutiteurs du NTS et de différents neurotransmetteurs tels que le glutamate, la sérotonine ou la nicotine ([Hashim et Bieger 1987](#); [England 1992](#); [Kalappa et al, 2011](#)).

Récemment, une augmentation de la durée et de l'aire sous la courbe des bouffées nerveuses vagale et hypoglosse a été mesurée lors de la déglutition rythmique induite par la stimulation répétitive des NLS chez le chat décérébré, paralysé et ventilé artificiellement ([Horton et al, 2018](#)). Une autre étude récemment publiée par l'équipe de Bolser en Floride montre que la stimulation fixe ou stochastique des afférences laryngées (déclenchée par la stimulation électrique des NLS) provoque une facilitation à court terme, la stimulation stochastique aboutissant en plus à une augmentation de l'excitabilité du réseau de la déglutition ([King et al, 2020](#)).

D'autres études non publiées réalisées au laboratoire ont exploré plus en détail ce phénomène de plasticité et confirment l'existence d'un phénomène de facilitation à court

terme. De manière intéressante, la facilitation des déglutitions peut être déclenchée par la stimulation

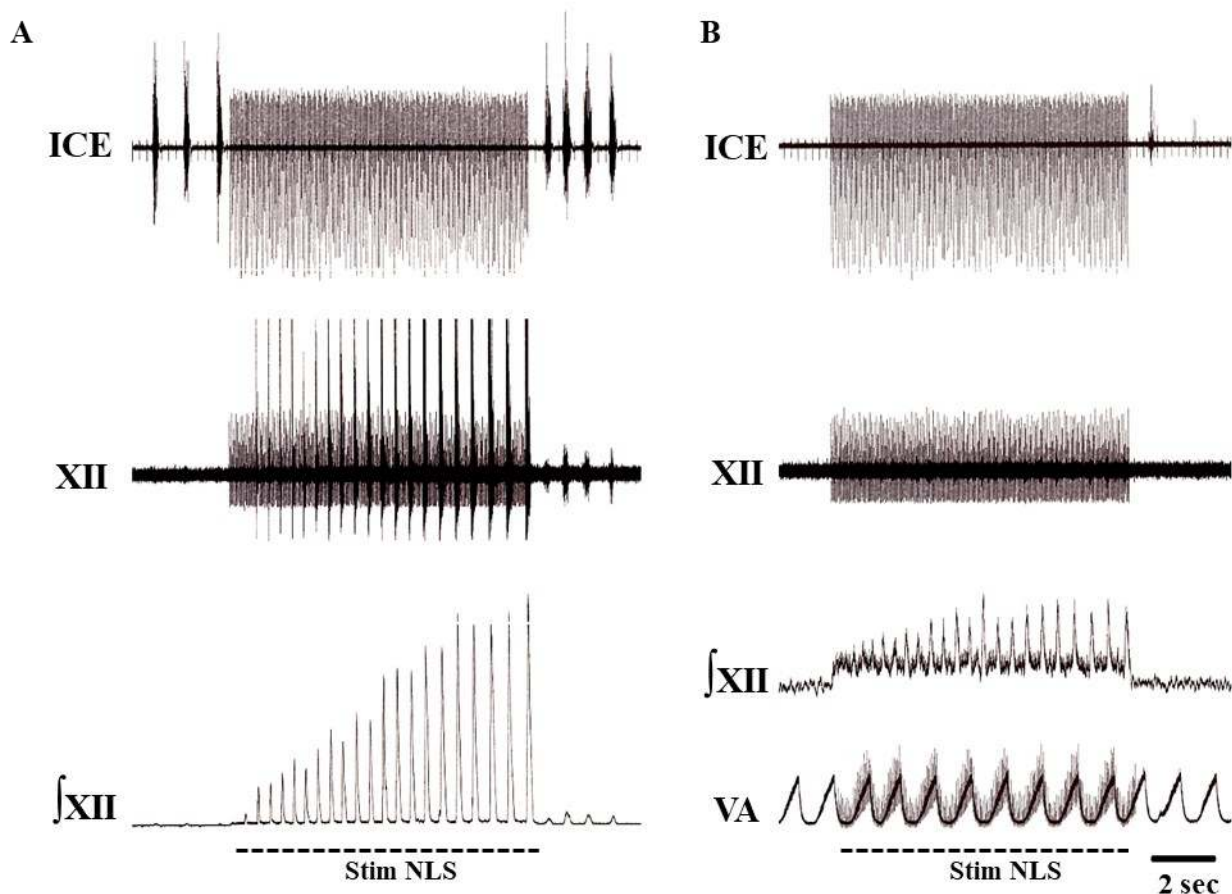


Figure 44 : Effet de la paralysie sur la facilitation des décharges motrices déglutitrices hypoglosses *in vivo*. Facilitation à court terme de la décharge motrice déglutitrice hypoglosse (XII) avant (A) et après (B) paralysie. On remarque que la facilitation est très réduite après paralysie mais persiste tout de même. ICE : Electromyogramme du muscle intercostal externe; $\int$ XII : activité intégrée du nerf hypoglosse; VA : ventilation artificielle. La ligne pointillée horizontale représente la durée de la stimulation du nerf laryngé supérieur (NLS, 20Hz, 250 μ s, 1V). (Données obtenues chez le rat décérébré).

mécanique de la muqueuse du pharynx, par l'injection d'eau dans la cavité buccale ou par la stimulation électrique des NLS chez le rat décérébré non paralysé (**Figure 43**). Elle se traduit par une augmentation de la force de déglutition lorsque celles-ci sont consécutives, comme le montre l'EMG des muscles sus-hyoïdiens (e.g. muscle Digastrique antérieur) et l'enregistrement simultané des bouffées nerveuses du X (ou du nerf laryngé récurrent, NLR) et du XII.

Le rôle des afférences sensibles a été testé en analysant la facilitation avant et après paralysie et ventilation artificielle chez les mêmes animaux. Les résultats montrent clairement un effondrement marqué de la facilitation après paralysie (**Figure 44**). Il persiste cependant une petite potentialisation d'origine centrale, consistant notamment en une augmentation de la durée (mais très peu de l'amplitude) des bouffées nerveuses, comme c'est le cas dans l'étude de Horton et collaborateurs ([2018](#)) où la déglutition est fictive. Il en découle que la mise en jeu des afférences lors de la contraction musculaire (ou feedback sensitif) est en grande partie à l'origine de la facilitation à court terme de la déglutition. Des expériences électrophysiologiques supplémentaires pourront être réalisées afin de révéler les mécanismes cellulaires impliqués dans cette plasticité.

VI. L'ocytocine est-elle impliquée dans la succion ?

Nous avons vu dans le chapitre 4 des Résultats que l'ocytocine (OT) est considérée comme une neurohormone importante pour la période péri- et post-natale ([Lee et al, 2009](#); [Meyer-Lindenberg et al, 2011](#); [Grinevich et al, 2014](#); [Keebaugh et al, 2015](#); [Muscatelli et al, 2018](#)). L'OT est en effet synthétisée par les noyaux PVN, SON et AN de l'hypothalamus, sécrétée dans la circulation sanguine et libérée dans le système nerveux central. Des concentrations importantes d'OT sont observées dès la naissance (pic d'OT) et restent élevées lors des 2 premières semaines de vie chez le rat et la souris ([Hoffiz et al, 2021](#)). De

nombreuses fibres OT-ergiques provenant du PVN sont observées dans le tronc cérébral et les neurones de nombreuses structures bulbaires et pontiques expriment le récepteur à l'ocytocine (OTR). De manière intéressante, l'expression d'OTR peut être transitoire dans plusieurs noyaux du tronc cérébral, tels que les noyaux moteur hypoglosse et facial, tandis qu'elle persiste ailleurs, comme dans le noyau dorsal moteur vagal adulte ou dans le NTS ([Tribollet et al, 1989](#)). Dès lors, l'OT pourrait être impliquée dans la maturation des fonctions de nutrition et/ou le contrôle des noyaux moteurs crâniens.

Le rôle de l'OT a été mis en lumière par des études s'intéressant au syndrome de Prader-Willi (PWS) et à l'autisme. Le PWS est une maladie génétique rare, qui se caractérise par un dysfonctionnement hypothalamo-hypophysaire associé à une hypotonie majeure pendant la période néonatale et les deux premières années de vie. Ce syndrome serait lié à la perte d'expression de l'allèle paternel de la région chromosomique 15q11-q13 ou une délétion du gène *Magel2*. De l'enfance à l'âge adulte, les problèmes principaux sont l'apparition d'une hyperphagie avec le risque d'obésité morbide, des difficultés d'apprentissage et des troubles du comportement, voire des troubles psychiatriques majeurs ([Juriaans et al, 2022](#)). Des études portant sur les souris *Magel2* KO, un modèle murin des troubles du spectre autistique et du PWS ont montré de nombreux déficits sociaux et cognitifs, ainsi qu'un défaut de succion à la naissance ([Schaller et al, 2010](#); [Meziane et al, 2015](#); [Bertoni et al, 2021](#)). En ce qui concerne le déficit de succion chez ces souris, une seule injection d'OT 3-5h après la naissance a permis de restaurer l'activité de succion et une alimentation normale ([Schaller et al, 2010](#)). À la suite de cette découverte importante, l'administration intranasale d'OT a été testée chez des enfants atteints du PWS âgés de moins de 6 mois. Chez ces enfants, l'administration d'OT pendant 7 jours consécutifs a amélioré les activités de succion et de déglutition ainsi que les compétences sociales ([Tauber et al, 2017](#); [Yamasue et Domes 2018](#)).

L'OT pourrait donc exercer un rôle dans la succion et la déglutition mais les mécanismes neuronaux impliqués n'ont pas encore été élucidés. Peu d'études ont été réalisées chez l'animal normal. Nous avons déjà évoqué que chez le rat adulte, la nesfatine-1 exercerait un effet inhibiteur sur la déglutition et que cet effet serait médié par l'OT ([Guillebaud et al, 2019](#)). Dans notre travail, nous avons utilisé un agoniste des OTR (le TGOT) et nous n'avons pas retrouvé d'effet sur la déglutition. En revanche, l'administration du TGOT *in situ* a augmenté le nombre d'épisodes rythmiques qui ressemblent à la succion. Cet effet étant bloqué par l'administration d'un antagoniste spécifique des OTR, il semble donc bien que l'OT puisse moduler l'activité de succion via ces récepteurs. Notre travail ne permet pas, en revanche, de préciser quels noyaux du tronc cérébral sont impliqués dans cet effet modulateur de la succion.

L'analyse des données de la littérature étaye l'hypothèse selon laquelle l'OT pourrait moduler l'activité motrice de succion en contrôlant la transmission synaptique entre les terminaisons des fibres nerveuses sensibles périphériques et les neurones centraux qui intègrent ces afférences. En effet Rinaman ([1998](#)) avait observé que les neurones OT du noyau paraventriculaire (PVN) projetaient abondamment vers le NTS qui est une structure majeure d'intégration des informations viscérales. Il est donc possible que les neurones du PVN libèrent de l'OT afin de moduler les afférences vagale ou glossopharyngienne qui font synapse dans le NTS, dans le contexte de la succion. Cela est étayé par le fait que l'injection d'OT modifie l'expression de cFos dans le NTS et dépolarise les afférences vagues ([Iwasaki et al, 2015](#)). Les fibres trigéminales expriment les OTR et l'activation de ces récepteurs a un effet sur la nociception ([Huang et al, 2021](#)). De plus, la mutation de la sous-unité epsilon du récepteur NMDA chez la souris aboutit à une désorganisation anatomique des fibres et des neurones de second ordre dans la région ventrale du noyau spinal trigéminale et est associée à la perte du réflexe de succion ([Kutsuwada et al, 1996](#)). Il est donc possible que l'OT module

l'activité des synapses entre les fibres sensibles trigéminales et les neurones du noyau spinal trigéminal (5SP). Pour le démontrer, des injections d'OT pourrait être réalisées dans cette région du 5SP afin d'étudier l'activité des neurones trigéminaux en réponse à la stimulation des afférences trigéminales. Enfin, dans le but de distinguer le rôle des OTR périphériques et centraux, il serait utile de réaliser d'autres expériences sur la succion *in vivo* ou *in situ* en utilisant des antagonistes des OTR comme l'Atosiban qui ne passe pas la barrière hémato-méningée et le L368,899 qui est un antagoniste non peptidique sélectif des OTR centraux ([Boccia et al, 2007](#)).

VII. Optogénétique et traceurs neuronaux : une révolution dans la compréhension des réseaux neuronaux

Tout au long de l'histoire des sciences, l'évolution de la technologie a souvent été à l'origine d'avancées majeures du savoir. Le développement d'outils innovants permettant d'étudier les mécanismes du vivant aux niveaux moléculaire et cellulaire, comme le séquençage génomique, la transgénèse ou l'enregistrement des cellules en patch-clamp, mais aussi l'évolution des modèles d'études (e.g. *in vitro*, *in vivo* ou *in situ*), ont permis d'améliorer et d'accélérer notre compréhension de la neurophysiologie. Cependant, l'un des problèmes les plus difficiles à résoudre dans le domaine des neurosciences intégratives est la description systématique de la connectivité neuronale dans le cerveau intact des mammifères. De nombreux types de neurones différents, ayant chacun une connectivité et une fonction distinctes, peuvent coexister dans la même région du cerveau. Grâce à des études minutieuses utilisant des techniques de microscopie électronique et d'électrophysiologie, il est possible de comprendre comment la connectivité d'un neurone contribue à sa fonction dans le circuit au sein duquel il est intégré, mais nous manquons de moyens efficaces pour effectuer des analyses au niveau du circuit *in vivo*. En particulier dans les régions du cerveau présentant une

hétérogénéité neuronale considérable, nous sommes encore très limités dans notre capacité à étudier comment les groupes de cellules forment leurs connexions à petite échelle, comment ces connexions évoluent dans le temps et comment cette plasticité affecte le rôle d'un type de cellule dans un circuit dynamique. Les traceurs neuronaux antérogrades et rétrogrades standard peuvent révéler l'emplacement des neurones qui se projettent vers ou depuis des régions cérébrales particulières, mais ne permettent pas d'identifier les types de cellules qui reçoivent effectivement les connexions synaptiques. Or cette dernière décennie a été marquée par l'avènement des techniques dites d'optogénétique et les outils de traçage viraux. Qualifiées de « game-changer » ces techniques sont particulièrement utiles et puissantes pour identifier et cibler des neurones impliqués dans des réseaux neuronaux complexes ([Pastrana 2011](#); [Prestori et al, 2020](#)).

L'optogénétique consiste à faire exprimer des canaux activés par la lumière, les « opsines », à des cellules d'intérêt, afin d'exciter ou inhiber ces cellules lorsqu'elles sont stimulées à une longueur d'onde spécifique (laser ou LED). Ces opsines ont été trouvées chez une espèce d'algue pour celles dépolarisant la cellule (channelrhodopsine 2 ou ChR2), et chez des archéobactéries pour celles hyperpolarisant la cellule (halorhodopsine ou NpHR). La transfection des opsines aux cellules d'intérêts peut se faire de plusieurs manières. Par exemple, il est possible de combiner l'utilisation d'animaux transgéniques exprimant la Cre-recombinase dans une certaine population de cellules, avec l'injection locale d'un adénovirus, pour n'exprimer les opsines que sur les neurones exprimant la Cre au site d'injection ([Atasoy et al, 2008](#)). Cette technique permet une haute précision à la fois dans le ciblage des populations cellulaires et dans les délais de réponse des cellules modifiées (quelques millisecondes).

Les traceurs neuronaux viraux bénéficient de la caractéristique principale des virus neurotrophiques, celle qui consiste à se transmettre de neurones en neurones en suivant les

connections établies. Par exemple, le virus de la rage est capable de se propager exclusivement de manière rétrograde, permettant un suivi étape par étape de l'infection, chaque étape correspondant à un « étage neuronal ». L'ajout d'un gène rapporteur codant pour une protéine de fluorescence dans le génome du virus de la rage rend alors possible le fait de marquer les neurones infectés par immunofluorescence et retracer ainsi tel ou tel réseau d'intérêt. Cependant les marquages obtenus après injection du virus de la rage sauvage (ou un virus équivalent comme le virus Herpès) dans un groupe de neurones cibles reflètent la capacité du virus à franchir plusieurs synapses. Il s'agit donc d'un outil puissant pour révéler les voies nerveuses poly-synaptiques liées à la structure d'intérêt. Mais les techniques développées récemment permettent d'aller plus loin. En effet, il est possible d'utiliser un virus auxiliaire (virus adéno-associés ou AAV) dépendant de la Cre pour cibler l'infection par le virus de la rage et limiter sa propagation rétrograde à une seule synapse (propagation monosynaptique). Sans rentrer dans tous les détails de cette technique, l'idée est d'utiliser un virus de la rage dont son propre gène codant pour une glycoprotéine a été supprimé de son génome, ce qui rend le virus incapable de se propager de manière rétrograde en l'absence d'une autre source de glycoprotéine rabique. Le virus auxiliaire complète cette déficience, permettant au virus de la rage de se propager de manière rétrograde dans une synapse. Cette population de neurones présynaptiques n'exprime pas la glycoprotéine rabique, de sorte que le virus de la rage ne peut pas se propager plus loin, limitant l'infection par le virus de la rage à une petite population de cellules exprimant Cre et à leurs partenaires directement présynaptiques ([Wall et al, 2010](#)).

Ces techniques ont été utilisées très récemment dans le but d'étudier les réseaux moteurs du tronc cérébral. Dempsey et collaborateurs ([2021](#)) viennent par exemple de découvrir le CPG responsable du lapement (ou léchage) dans le bulbe rachidien rostral de la souris grâce à une élégante combinaison de construits génétiques et d'infections virales basées

sur le virus de la rage modifié. À la suite de l'injection du virus de la rage dans divers muscles oromoteurs, dont le digastrique postérieur, ils ont pu localiser les neurones prémoteurs orofaciaux avec une résolution inégalée à ce jour. En outre, ils montrent que des prémotoneurones Phox2b positifs situés dans la formation réticulée intermédiaire (ou IRt) et dans la région inter-trigéminal sont capables d'initier une séquence motrice complète de lapement lorsqu'ils sont stimulés de manière tonique. Ces neurones seraient à la fois prémoteurs et générateurs de rythme. Ces neurones sont connectés à des motoneurones protruseurs ainsi qu'à des motoneurones rétracteurs de la langue ce qui permettrait l'alternance des mouvements de la langue lors du lapement. Aussi, l'équipe de Yackle, Dempsey et Fortin vient de découvrir chez la souris nouveau-née un autre CPG responsable cette fois de la vocalisation (qualifiée d'instinctive), ce CPG serait situé dans la formation réticulée intermédiaire ventrale rostrale ([Wei et al, 2022](#)). Dans ce travail, les auteurs ont également utilisé l'injection de virus de la rage modifié en ciblant cette fois les muscles cricothyroïdien et thyroaryténoïdien du larynx, afin d'identifier de manière sélective les prémotoneurones laryngés. Ces prémotoneurones bulbaires formeraient le CPG appelé « Oscillateur Réticulaire Intermédiaire » (ou ORi) lequel permettrait l'expression de cris brefs et successifs ou « pleurs instinctifs » couplés à la respiration. Ces neurones sont glutamatergiques (vglut2 positifs) et expriment la proenkephaline (penk positifs). Ils possèdent une activité oscillatoire qui persiste en l'absence de neurotransmission synaptique et ces cellules seraient couplées électriquement grâce à des jonctions GAP. L'activation optogénétique de ces neurones in vivo provoque l'apparition des pleurs. De plus, pendant une séquence de pleurs, l'activation de l'ORi est capable d'exciter les neurones du preBotC et d'initier un cycle respiratoire, provoquant une alternance I-E1 physiologique.

La liste des découvertes faites grâce à ces techniques est ici loin d'être exhaustive. Ce qui semble certain, c'est que l'utilisation de ces techniques pour l'étude des réseaux du tronc

cérébral est en pleine expansion. De ce fait, ces techniques de manipulations génétiques ouvrent une voie prometteuse pour analyser la connectivité fonctionnelle au sein des CPG de la déglutition et de la succion. L'optogénétique et les outils viraux pourraient aussi permettre d'investiguer les interactions entre les différents réseaux du tronc cérébral, en ciblant de manière spécifique une population de neurones au sein du NTS et/ou du PréBötC.

Annexe

Optimisation des électrodes organiques, stimulation nerveuse vagale et mort soudaine liée à l'épilepsie

I. Contexte général de l'étude

J'ai débuté mon Doctorat en février 2018 à la Faculté Nord de Médecine, alors que mon encadrant venait d'obtenir un accord afin de rejoindre l'équipe du Dr Christophe Bernard au sein de l'Institut de Neurosciences des Systèmes (INS) à la Timone. Cependant, faute de place, il n'a pas été possible d'emménager à l'INS et nous sommes donc restés à la Faculté Nord de 2018 à fin 2020. L'INS est un institut de recherche multidisciplinaire qui s'intéresse aux processus dynamiques du cerveau en intégrant des approches expérimentales, théoriques et cliniques afin de comprendre les fonctions et dysfonctions cérébrales telles que l'épilepsie. L'équipe PhysioNet du Dr Bernard s'intéresse particulièrement au codage de l'information et à la dynamique des réseaux neuronaux, chez les animaux témoins et épileptiques. Chez ces derniers, il s'agit notamment d'identifier les biomarqueurs prédictifs des crises et de développer des approches curatives pour les crises et les comorbidités. Enfin, une partie de l'activité de recherche est également consacrée à la conception de nouveaux dispositifs d'enregistrement *in vivo*, en particulier des sondes organiques multimodales.

C'est dans ce contexte qu'un projet de recherche en partenariat avec le Dr Alfredo Hernandez du Laboratoire de Traitement du Signal (LTSI) à Rennes a d'abord été rédigé par les Dr Hernandez, Bernard et Gestreau, puis soumis avant mon arrivée à l'Agence Nationale de la Recherche. Ce projet intitulé « Stimulation adaptative et personnalisée du nerf vague » (AdaptVNS) a été financé et a donc débuté le 1 février 2018, date de démarrage de ma thèse de Doctorat. L'objectif global de ces recherches auxquelles j'ai donc été associé était de développer une nouvelle méthode de stimulation électrique vagale dans le but d'étudier (et potentiellement de contrecarrer) les mécanismes physiopathologiques impliqués dans

l'épilepsie, notamment ceux responsables de la mort soudaine inexpliquée liée à l'épilepsie. Comme je le détaillerai plus loin, l'idée principale était de réaliser à la fois de l'enregistrement de l'activité nerveuse et de la stimulation nerveuse vagale en boucle fermée à l'aide de nouvelles électrodes biocompatibles (les électrodes organiques), dans le but de développer un dispositif implantable permettant à la fois de recueillir des signaux électrophysiologiques (dont les paramètres cardiorespiratoires) et de délivrer des stimulations adaptées et automatisées.

Avant de détailler les objectifs spécifiques de cette étude et surtout d'exposer brièvement le travail que j'ai réalisé dans le cadre de ce projet, je présenterai d'abord un court état de l'art qui permettra au lecteur de comprendre les questions abordées. Seule une partie des objectifs initiaux ont été atteints. C'est la raison pour laquelle j'ai décidé de présenter cette thématique dans ce chapitre annexe, c'est-à-dire en marge du travail principal exposé dans mon manuscrit de thèse.

II. Etat de l'art

A. Epilepsie et taux de mortalité anormalement élevé (SUDEP)

Dans les études de population sur l'épilepsie, le rapport entre le nombre de décès observés dans une population de patients épileptiques et le nombre de décès attendus, sur la base des taux de mortalité par âge et par sexe dans une population de référence (encore appelé « ratio de mortalité standardisé »), varie de 1,6 à 5,3 par rapport à la population générale ([Tomson et al, 2008](#); [Beghi 2020](#)). La cause principale des taux élevés de mortalité chez ces patients est la mort subite et inattendue liée à l'épilepsie (de l'Anglais « sudden unexpected death in epilepsy », SUDEP). La SUDEP est définie comme "le décès soudain, inattendu, non traumatique et non lié à la noyade d'un individu épileptique, avec ou sans preuve de la survenue d'une crise (à l'exclusion de la documentation de l'état épileptique) et où l'autopsie

ne révèle pas de cause anatomique ou toxicologique du décès" ([Tomson et al, 2008](#)). La SUDEP est la première cause de mortalité chez les patients souffrants d'épilepsie ([Massey et al, 2014](#)) et la seconde si on prend en compte tous les troubles neurologiques, avec les accidents vasculaires cérébraux comme première cause ([Thurman et al, 2014](#)). De nombreuses études ont analysé les facteurs de risque et suggéré que dans la plupart des cas, les personnes succombaient d'une SUDEP après une crise (pour revues : [Tellez-Zenteno et al, 2005](#); [Hitiris et al, 2007](#); [Nashef et al, 2007](#); [Tomson et al, 2008](#); [Beghi 2020](#)). Cependant, un tiers des SUDEP aurait lieu sans épisode visible d'épilepsie ([Stecker et al, 2013](#)).

B. Une défaillance des réseaux neuronaux du tronc cérébral à l'origine de la SUDEP ?

Les principaux facteurs précipitants la SUDEP ont été liés aux mécanismes physiopathologiques cardiorespiratoires, notamment l'apnée centrale ou obstructive et les arythmies cardiaques ([Nashef et Sander 1996](#); [Nashef et al, 2007](#); [Ryvlin et al, 2019](#)). Chez les patients souffrant d'une crise d'épilepsie, la plupart présentent de la tachycardie (rarement de la bradycardie) ainsi qu'une dépression respiratoire (ou une activité tonique diaphragmatique), mais ces paramètres cardiorespiratoires reviennent à la normale après l'épisode épileptique ([Cole et al, 2013](#)). Un travail récent mené par Aiba et Noebels ([2015](#)) a montré que les crises d'épilepsie provoquées chez un modèle murin de souris SUDEP (les souris Kv1.1 KO) pouvaient déclencher une dépolarisation propagée (DP) du cortex jusqu'au tronc cérébral, ces dernières étant accompagnées d'une bradycardie, d'une bradypnée puis d'un arrêt complet de l'activité cardiorespiratoire. La dépolarisation propagée (DP) est un phénomène pathologique auto-entretenu consistant en une vague de dépolarisation neuronale faisant également intervenir les cellules gliales, associé à un excès de glutamate et potassium extracellulaire. Les DP se propagent à une vitesse de 2 à 6 millimètres par minute et sont observées lors de traumatismes cérébraux et certaines migraines ([Pietrobon et Moskowitz](#)

[2014](#)). Ainsi, une vague de DP propagée du cortex au tronc cérébral lors de certaines crises d'épilepsie serait la cause de l'arrêt cardiorespiratoire ou SUDEP. De plus, il est possible d'évoquer les DP et de reproduire un arrêt cardiorespiratoire chez la souris KO Kv1.1 en injectant du KCl au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) ([Aiba et Noebels 2015](#)).

C. La stimulation nerveuse vagale : une méthode pour venir à bout de l'épilepsie ?

La stimulation électrique du nerf vague (VNS) est une thérapie approuvée en clinique pour traiter les patients épileptiques qui ne peuvent recevoir de solution médicamenteuse ni chirurgicale. De nos jours, plus de 85 000 patients souffrant d'épilepsie sont traité par VNS ([Panebianco et al, 2016](#)). Certaines études suggèrent que la VNS chronique diminue les risques de mort soudaine inexplicée liée à l'épilepsie (SUDEP) en diminuant le nombre de crises ([Ben-Menachem 2002](#); [Ryvlin et al, 2018](#); [Wheless et al, 2018](#)), mais potentiellement aussi grâce à certains effets protecteurs rapportés permettant de traiter aussi la dépression. En effet, il a été montré que la VNS permettrait de désynchroniser les ondes électroencéphalographiques via une voie nerveuse impliquant le noyau du tractus solitaire et la formation réticulée bulbaire ([Shi et al, 2013](#)). La VNS diminue la neurotransmission excitatrice tout en augmentant la neurotransmission inhibitrice ([Ben-Menachem et al, 1995](#)), augmente l'afflux sanguin cérébral ([Antony et al, 2019](#)) et augmente la concentration corticale de norépinéphrine et sérotonine ([Manta et al, 2009](#); [Grimonprez et al, 2015](#)). Il existe cependant d'autres études (bien moins nombreuses que les premières) qui suggèrent que la VNS augmente le risque de SUDEP ([Granbichler et al, 2015](#)). Plusieurs raisons pourraient expliquer cette discordance. Tout d'abord l'épilepsie est une pathologie variable qui se présente sous différentes formes et implique des régions cérébrales différentes avec une sévérité plus ou moins grande. Les cohortes de patients étudiées sont souvent peu comparables, notamment parce que les facteurs de comorbidité diffèrent. Enfin, il existe de

nombreuses limitations liées à cette technique de VNS, dont l'absence de consensus concernant les paramètres de stimulation ou le type d'électrodes utilisées. En effet, bien que la durée, l'amplitude et la fréquence des chocs électriques soient définies dans une gamme donnée, au final les paramètres appliqués à un patient donné sont ajustés selon les sensations rapportées par le patient ([Wheless et al, 2018](#)).

Le nerf vague étant un nerf multimodal comprenant plusieurs composantes motrices et sensibles, les effets de la VNS aigue et chronique sont difficiles à étudier et sont encore mal compris ; de plus les effets secondaires varient en fonction des patients ([Byku et Mann 2016](#)). La VNS peut causer deux types d'effets secondaires : les effets précoces (période post-opératoire) et tardifs (1 à 2 ans après le début du suivi clinique). Les effets précoces concernent généralement les complications liées à l'opération d'implantation telles qu'une bradycardie et asystole pendant le test d'impédance (1 cas sur 1000), un hématome péri-trachéal, et des infections (~5% des cas), et des dommages au nerf vague causant des symptômes transitoires comme la dysphagie, dyspnée ou paralysie des cordes vocales. Les effets secondaires tardifs sont principalement causés par la stimulation chronique du nerf et se caractérisent par des arythmies cardiaques, des dysfonctionnements de la musculature laryngo-pharyngée (dysphagie, enrouement, dyspnée, toux), un développement d'apnée obstructive du sommeil, des dommages aux cordes vocales ou paralysie dans ~2% des cas ([Tatum et al, 1999](#); [Kalkanis et al, 2002](#); [Smyth et al, 2003](#); [Zalvan et al, 2003](#); [Hatton et al, 2006](#); [Rychlicki et al, 2006](#); [Rijkers et al, 2008](#); [Fahy 2010](#); [Spuck et al, 2010](#); [Tran et al, 2011](#); [Clark et al, 2012](#); [Horowitz et al, 2013](#); [Kahlow et Olivecrona 2013](#); [Couch et al, 2016](#); [Revesz et al, 2016](#)). Chez les enfants, la VNS peut augmenter la salivation et l'hyperactivité ([Helmers et al, 2001](#)).

De ce fait, il est difficile de prodiguer une thérapie efficace tout en limitant les effets secondaires et il serait donc utile et nécessaire de développer une méthode permettant

d'optimiser les paramètres de VNS et si possible de manière spécifique à chaque patient. En ce sens, la stimulation en boucle fermée semble être une approche adéquate.

Il semble cependant possible de modifier spécifiquement certains paramètres cardiaques tels que la fréquence (chronotropisme), la force de contraction cardiaque (inotropisme) et la vitesse de conduction de l'influx nerveux cardiaque (dromotropisme) en fonction des choix des paramètres de VNS chez la chèvre ([Ojeda et al, 2016](#)). Différentes combinaisons de paramètres de VNS ont permis d'obtenir différents effets indiquant que la stimulation pouvait être sélective. Cette sélectivité pourrait donc limiter potentiellement les effets indésirables provoqués par la VNS. En dépit de cette sélectivité, les mêmes paramètres de stimulation peuvent déclencher des effets changeants au cours du temps, ce qui suggère qu'il serait bénéfique de pouvoir monitorer les réponses à la VNS en temps réel (nécessité d'un feedback).

Une autre limitation de la VNS actuelle est la technologie avec laquelle elle est appliquée. En effet, les électrodes utilisées sont généralement faites en silicone avec des sites de contact en métal (le plus souvent en platine), et sont sous forme de spirale ou demi-cylindre afin d'entourer et maintenir le nerf ([Ben-Menachem et al, 2002](#); [Stacey et Litt 2008](#); [Ottestad et Orlovich 2020](#)). Une fois l'électrode mise en place, les sites de contact métalliques forment des anneaux autour du nerf, ce qui limite grandement la résolution spatiale car cette disposition et cette technologie ne permettent pas de stimuler de manière sélective les fibres nerveuses, étant donné que le diamètre du nerf entier est stimulé. De plus, le design de l'électrode est important à prendre en compte afin d'assurer l'intégrité du nerf stimulé. Là où les électrodes en spirale peuvent s'adapter à la morphologie du nerf grâce à leur structure en hélice, les électrodes en demi-cylindre doivent correspondre parfaitement au nerf à cause de leur structure semi-rigide et leur diamètre fixe. En effet, des électrodes trop serrées vont provoquer des compressions du nerf et des électrodes trop larges auront de mauvais contacts.

Bien que les électrodes en spirale semblent être une meilleure solution, celles-ci impliquent une pose chirurgicale plus délicate, augmentant les risques d'abimer le nerf. Réduire le nombre de spirales permettrait de réduire les risques, mais cela impliquerait un maintien du nerf moindre et un risque accru de détachement post-opératoire ([Mackinnon et al, 1984](#); [Mortimer et Bhadra](#) ; [Giordano et al, 2017](#)). Il s'avère donc nécessaire d'améliorer les matériaux utilisés mais aussi le design et la méthode d'implantation autour du nerf afin de mieux adapter les électrodes à la morphologie du nerf et éviter au maximum les effets secondaires.

D. Les électrodes organiques, une technologie prometteuse pour la VNS ?

Une technologie récente d'électrode biocompatible a été développée et a fait ses preuves en termes de qualité ([Khodagholy et al, 2011](#); [2016](#)). Ces électrodes sont faites en substrat biocompatible appelé parylène C, un polymère organique. Ce polymère est particulièrement flexible, ce qui permet une grande liberté d'approche morphologique pouvant potentiellement faciliter les chirurgies d'implantation ([Takeuchi et al, 2005](#); [Rodger et al, 2008](#)). De plus, le parylène C a témoigné d'une importante biocompatibilité comparé à d'autres polymères biocompatibles utilisés en laboratoire, car il limite grandement la réaction inflammatoire créée par l'implantation et la stimulation en aigu comme en chronique ([Lee et al, 2013](#)). Les sites de contact de ces électrodes sont en or recouvert de polymères conjugués, c'est-à-dire des polymères qui ont la particularité d'être très conducteurs. Ici, les polymères utilisés sont le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) ou PEDOT et le poly(styrène sulfonate) ou PSS, formant le PEDOT:PSS, qui est un polymère conjugué très conducteur, chimiquement stable et biocompatible ([Khodagholy et al, 2011](#)). Cette technologie d'électrode présente des sites de contact capable de stimuler mais aussi d'enregistrer de manière efficace les neurones ([Williamson et al, 2015](#)). Pour un même volume, le PEDOT:PSS permet d'obtenir une impédance bien plus faible que les électrodes en platine, améliorant ainsi le ratio signal sur

bruit ([Dijk et al, 2020](#)). Ces caractéristiques avantageuses permettent d'espérer à une double fonctionnalité simultanée, c'est-à-dire de stimuler le nerf vague tout en enregistrant son activité, ce qui permettrait d'adapter la stimulation aux variations physiologiques spécifiques à l'individu.

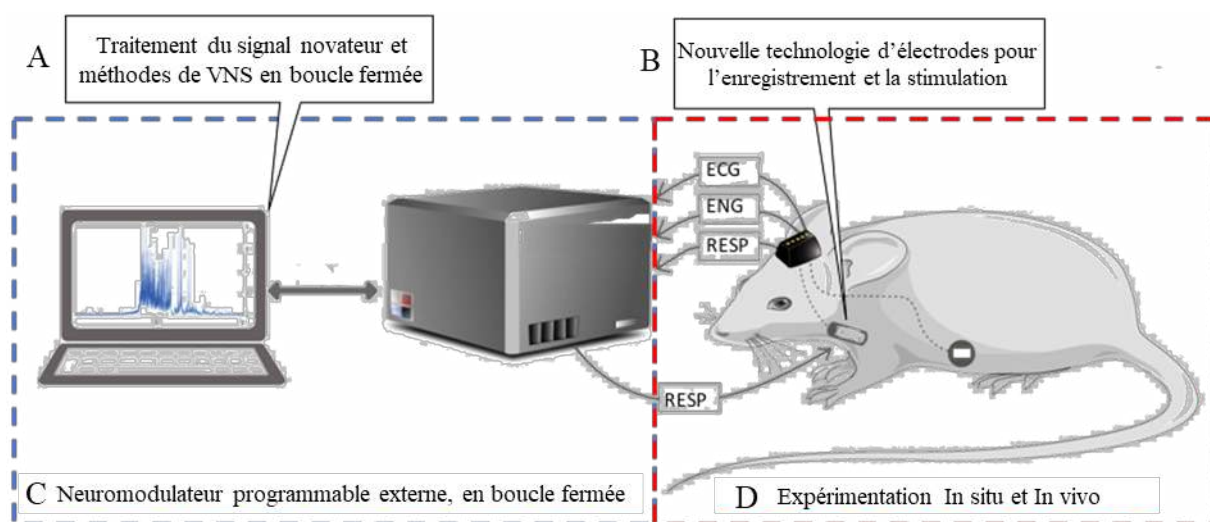


Figure A1 : Présentation générale du projet AdaptVNS. (A) Différentes innovations méthodologiques sur le traitement du signal et la modélisation doivent être intégrées dans une nouvelle application contrôlant la boucle fermée en temps réel, spécifique au patient. (B) Une nouvelle technologie d'électrode doit être testée en implantation aiguë et chronique. (C) L'idée principale est de développer un modulateur externe programmable capable de traiter les signaux en boucle fermée. (D) Différentes expérimentations peuvent être réalisées in situ et in vivo afin de valider le système présenté et tester la possibilité de prévenir la SUDEP via la VNS en boucle fermée. VNS : Stimulation nerveuse vagale; ECG : électrocardiogramme; ENG : électroneurogramme; RESP : signaux respiratoires.

Ainsi, l'application d'une VNS automatisée patient-spécifique en boucle fermée utilisant une nouvelle technologie d'électrode, ainsi qu'une meilleure compréhension des paramètres physiologiques qui sous-tendent les SUDEP, permettrait un meilleur traitement des patients souffrant d'épilepsie réfractaire aux médicaments.

III. Objectifs du travail

A. Objectifs spécifiques du projet AdaptVNS

1) Proposer une nouvelle méthode de VNS en boucle fermée capable d'adapter les paramètres de stimulation afin d'atteindre une cible physiologique spécifique (**Figure A1-A**).

2) Améliorer la technologie d'électrodes organiques afin de permettre un enregistrement et une stimulation efficaces de l'activité nerveuse (**Figure A1-B**).

3) Développer un prototype de système de neuromodulation adaptatif intégrant la VNS en boucle fermée et la nouvelle technologie d'électrodes (**Figure A1-C**).

4) Mettre en œuvre des expériences *in situ* et *in vivo* afin d'évaluer les méthodes et technologies proposées, et de tester leur application pour la prévention des SUDEP (**Figure A1-D**).

B. Objectifs spécifiques de mon travail dans le cadre du projet

- Optimiser la fabrication et tester différents masques d'électrodes organiques afin de les adapter aux nerfs d'intérêt (phrénique et vague),
- Réaliser des enregistrements des nerfs d'intérêt avec ces électrodes,
- Tester la capacité des électrodes à stimuler le nerf vague,
- Analyser les atteintes cardiorespiratoires causées par une crise ou dépolarisation propagée induite chez un modèle murin de SUDEP (la souris Kv1.1 KO),

- Etudier les effets de la VNS sur les souris Kv1.1 KO à l'aide des électrodes organiques.

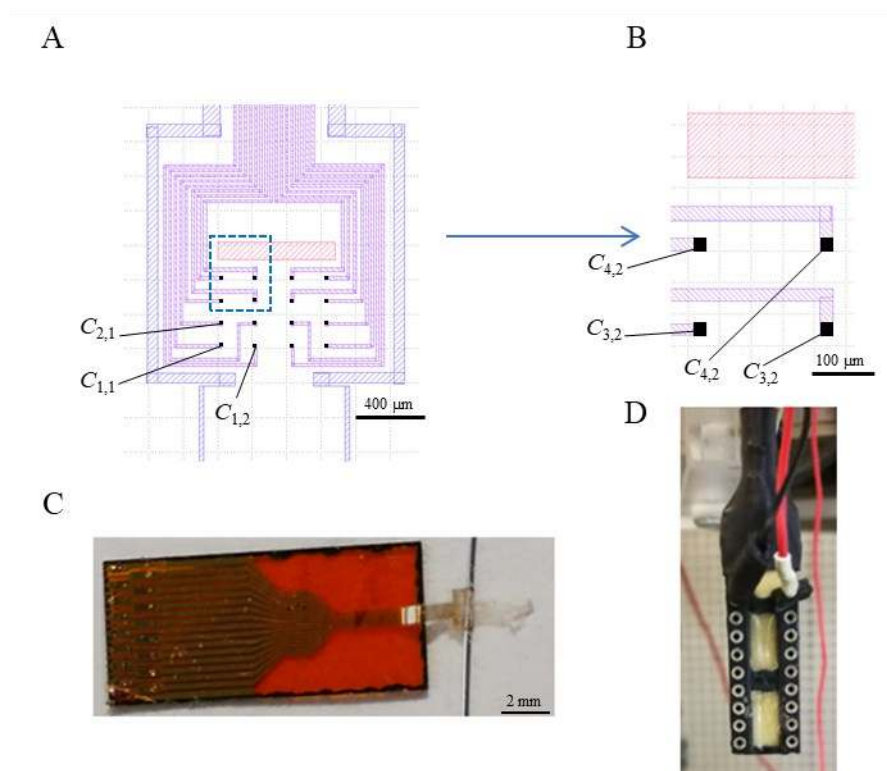


Figure A2 : Représentation des électrodes organiques. (A) Vue schématique des 16 sites d'enregistrement (noir, 4 x 4) connectés aux câblages d'or (fuchsia). Les limites du Parylène C (PaC) sont en violet et la fente d'insertion de la languette est en rouge. La languette de PaC n'est pas entièrement représentée et mesure 4,4 mm. (B) Vue agrandie du carré pointillé bleu en A, représentant 4 sites d'enregistrement en or couverts de PEDOT:PSS (20 x 20 μm). Une notation matricielle de forme $C_{i,j}$ est utilisée afin d'identifier tous les canaux en rangée i et colonne j . (C) Image d'une électrode organique complète disposée sur un support en kapton (orange), avec les sites enroulés autour d'un câble de 250 μm de diamètre. (D) La référence en Ag/Cl disposée sous la cage thoracique de l'animal est connectée au câble noir et le câble rouge représente la terre connectée à une cage de Faraday.

IV. Résumé des résultats obtenus

A. Optimisation des électrodes organiques et enregistrement nerveux

Ce travail a fait l'objet d'une publication en 2021 que je signe en co-premier auteur et d'un article actuellement soumis à l'international Engineering in Medicine and Biology Conference (EMBC) que je signe en troisième auteur.

L'optimisation des électrodes organiques (OE) visait à :

- Disposer le maximum de sites d'enregistrement sur un cylindre correspondant à la taille du nerf d'intérêt chez le rat juvénile (P15-21) *in situ*,
- Trouver une méthode pour que l'électrode reste attachée au nerf sans l'endommager.

Afin de multiplier les sites d'enregistrement et/ou de stimulation, une grille de 4 x 4 sites (plutôt que des anneaux) a été développée. Ainsi, les électrodes sont composées de 16 sites de contact d'une taille de 20 μm x 20 μm chacun, disposés en rectangles de 200 μm x 135 μm (**Figure A2-A**). L'électrode possède une languette permettant de s'attacher à elle-même autour du nerf grâce à un trou de 100 μm x 680 μm situé à 300 μm du centre de la grille des électrodes (**Figure A2-AB**). Le diamètre maximal de l'électrode une fois fermée est de 250 μm (**Figure A2-C**), s'adaptant à la morphologie du nerf d'un rat juvénile (e.g. ~250 μm Ø pour le nerf vague, [Noller et al, 2019](#); ~150 μm Ø pour le nerf phrénique, [Nair et al, 2017b](#)).

Les premiers tests effectués ont d'abord consisté à enregistrer le nerf phrénique, facilement accessible *in situ*. Le nerf phrénique est composé de 30 à 45% de fibres afférentes et de plus de 60% de fibres motrices innervant le diaphragme ([Langford et Schmidt 1983](#)). Un double enregistrement (monopolaire) a été effectué avec une électrode à succion (ES) disposée à l'extrémité coupée du nerf phrénique et les électrodes organiques (OE) enroulées autour de l'épineurium du nerf en son milieu. Ce dispositif a permis de comparer la qualité

des enregistrements obtenus d'une part avec l'électrode à succion (ES), possédant un rapport signal

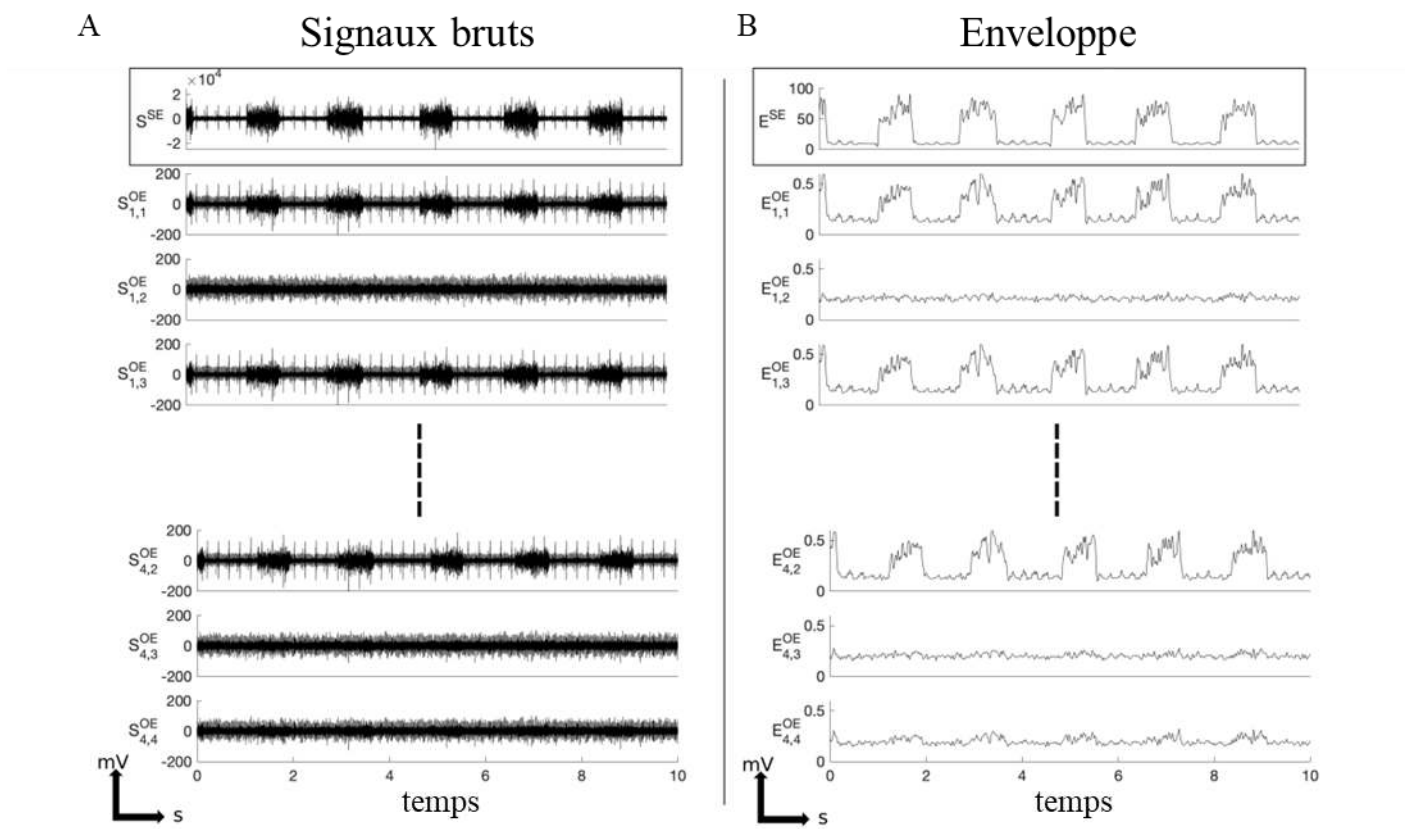


Figure A3 : Exemples d'enregistrements de l'activité phrénique. (A) Signaux bruts captés par l'électrode à succion (SSE, en haut) et par 6 sites d'une électrode organique (SOE) dont 3 montrent une activité respiratoire rythmique évidente et 3 n'ont pas d'activité apparente. (B) Résultats du traitement des signaux recueillis en A. Les signaux entourés d'un rectangle représentent la SSE. On remarque que le traitement du signal permet de faire ressortir une activité respiratoire rythmique du signal SOE 4,3 et 4,4.

sur bruit de grande qualité (activité qualifiée de « gold standard ») ([Domacena et al, 2022](#)), et d'autre part avec les OE. Les signaux recueillis par les électrodes correspondaient donc à l'activité inspiratoire en rampe caractéristique de la préparation perfusée *in situ* ([Paton 1996](#); [Berge-Laval et Gestreau 2020](#)).

La **Figure A3** montre le résultat d'un enregistrement obtenu avec les OE et les ES. La plupart des sites de l'OE ont permis d'obtenir une activité respiratoire phrénique visible, avec un rapport signal sur bruit sensiblement inférieur à l'ES (6,78 vs 11 dB, pour le meilleur site de l'OE vs l'ES respectivement).

Le traitement des données comprend une étape de réduction du bruit, de détection d'enveloppe et de comparaison avec le signal ES. Une différence de capacité de détection du signal a été observée en fonction du site de l'OE. Certains sites présentent une activité phrénique claire, alors que d'autres ne semblent être que du bruit de fond. Le traitement des données a permis d'améliorer la qualité des signaux obtenus par l'OE par rapport aux signaux bruts. Une activité inspiratoire a même pu être décelée sur un site où à première vue le signal brut semblait nul (**Figure A3-B**).

En conclusion, ce nouveau design de l'OE semble adapté à l'implantation aiguë et à l'enregistrement nerveux phrénique. La plupart des sites de l'OE ont permis de dériver l'activité nerveuse inspiratoire. L'absence de signal sur certains sites peut être expliquée par un défaut de fabrication (différence d'impédance trop importante) ou par le faible contact entre certains sites l'OE et le nerf, l'OE étant davantage adaptée au diamètre du nerf vague. L'une des limitations de cette étude est l'absence de calcul d'impédance. Une telle donnée aurait pu expliquer la différence de signal inter-sites de l'OE car une plus haute impédance est en principe associée à une plus faible capacité de détection. Aucune sélectivité spatiale n'a pu être détectée, e.g. les potentiels d'action globaux étaient identiques sur tous les sites. De plus, les signaux recueillis sur chaque site ne présentaient aucune différence temporelle

significative, y compris entre les sites disposés à la partie proximale sur nerf et ceux en contact avec la partie distale (plus proche de l'ES). Ces limitations peuvent s'expliquer par le faible diamètre du nerf phrénique ne pouvant discriminer le signal nerveux dans l'espace, le trop faible écartement entre les sites de l'OE (600 μm pour les sites les plus éloignés) et la vitesse de propagation élevée de l'influx nerveux moteur (55-60 m.s^{-1} , [Fontanesi et al, 2019](#)). Par exemple, nous avons calculé que les sites devraient être espacés d'environ 4600 μm pour observer une différence temporelle à une fréquence d'échantillonnage à 12 KHz.

Dans le travail présenté rapidement ci-dessus, les signaux ont été enregistrés en configuration monopolaire. Cependant, dans une autre étude consistant en un raffinement des méthodes de traitement du signal, nous avons pensé qu'il était certainement possible d'améliorer encore la qualité et la résolution de la détection par les OE. Ce travail supplémentaire d'analyse des signaux a consisté à calculer et optimiser l'activité captée par deux ou trois sites d'enregistrement de l'OE. En tout, la configuration de l'OE a permis de générer a posteriori et à partir des signaux bruts monopolaires 120 combinaisons de dipôles, et 1680 combinaisons tripôles différentes. Ce travail de traitement du signal a montré que la configuration bipolaire et tripolaire semblait améliorer la qualité du signal, avec une amélioration plus marquée pour la configuration tripolaire. En effet, en plus d'un meilleur SNR post-filtration, la configuration tripolaire montre une amélioration significative de la qualité du signal déjà-préfiltré, contrairement à la configuration bipolaire. Cette configuration ainsi que la technique de traitement proposé permettent donc de déceler une meilleure activité nerveuse à partir des signaux recueillis.

Ce travail non illustré ici fait l'objet d'un article accepté pour publication (voir article 3).

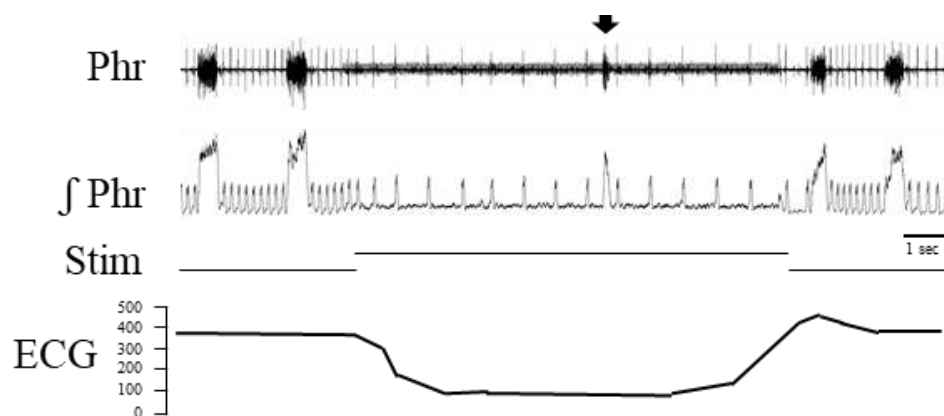


Figure A4 : Effet de la stimulation continue du nerf vague sur l'activité du nerf phrénique. Le panel du haut représente l'activité brute et intégrée du nerf phrénique (Phr). La stimulation du nerf vague ($I = 500 \mu\text{Amp}$; $f = 20 \text{ Hz}$; Pulse Width = $0,5\text{ms}$; durée = 10s) provoque une apnée centrale ainsi qu'une bradycardie. La flèche représente un échappement respiratoire pendant la stimulation vagale. La période où la stimulation (Stim) est appliquée est indiquée par des traits (« stim on », traits vers le haut ; « stim off », traits en bas). Le panel du bas représente la variation de la fréquence cardiaque calculée à partir de l'électrocardiogramme (ECG).

B. Stimulation du nerf vague avec les électrodes organiques

La capacité des électrodes organiques à stimuler les nerfs périphériques a été testée de manière très préliminaire sur le nerf vague. En effet, nous devons réaliser en priorité les expériences sur les souris KO Kv1.1 qui venaient d'arriver au laboratoire. Dans quelques expériences, l'OE a donc été disposée autour du nerf vague de la même manière que dans l'étude précédente sur le nerf phrénique. Différents paramètres de stimulation ont été appliqués. Tout d'abord, une stimulation continue a été testée pendant 10 à 20 secondes, avec une intensité (I) de 20 à 600 μ A, une fréquence (f) de 20 à 500 Hz et durée de choc (ou pulse width, PW) de 0,5 à 1 ms. Une apnée centrale initiale suivie d'un échappement respiratoire en fin de stimulation ainsi qu'une bradycardie ont été obtenues avec les paramètres suivants: I = 500 μ A ; f = 20 Hz ; PW = 0,5ms ; t = 10s. (**Figure A4**). Ces résultats témoignant de l'activation du réflexe d'Hering-Breuer sont en accord avec la littérature ([Siniaia et al, 2000](#); [Vadhan et Tadi 2022](#)).

Bien que ces résultats permettent d'attester que la stimulation du nerf vague par les OE est efficace, les effets obtenus (apnée et bradycardie) ne sont pas souhaitables pour une thérapie VNS. Nous avons donc testé l'hypothèse que la VNS épisodique par trains de stimulation pouvait entraîner l'activité respiratoire. Pour cela, nous avons testé les paramètres de stimulation suivant: Tension (V) = 0,1 à 0,3 volts ; f = 10 à 30 Hz ; PW = 250 μ s à l'aide de trains de stimulation appliqués toutes les secondes (1 stim/1s) ou toutes les 2 secondes (1 stim/2s) sur une période allant de 50 à 100s.

Ce mode de stimulation a permis de révéler un couplage possible entre la fréquence d'application des trains de VNS et l'activité respiratoire de type 1:1, 1:2 (**Figure A5**) ou 1:3.

Cet effet rappelle celui décrit par Wang et collaborateurs ([2005](#)), où la fréquence respiratoire peut être entraînée par la fréquence de la stimulation vagale, jusqu'à l'obtention

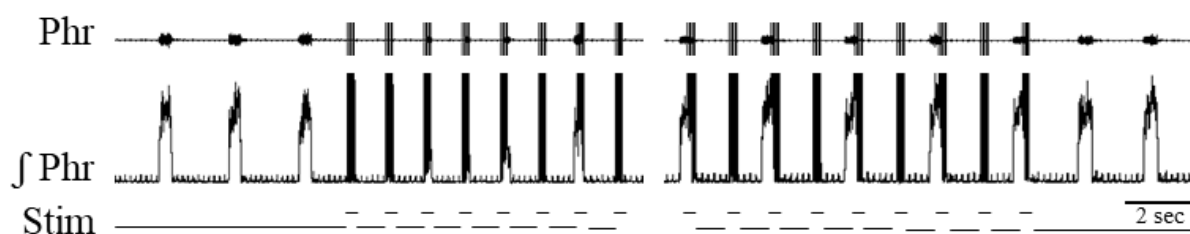


Figure A5. Effet de la stimulation discontinue du nerf vague sur l'activité phrénique. Le panel du haut représente l'activité brute et intégrée du nerf phrénique (Phr). Le panel du bas représente la stimulation (Stim) où les traits noirs en haut indiquent le moment où les trains de stimulation sont appliqués. La stimulation du nerf vague ($V = 0,1$ volts ; $f = 20$ Hz ; Pulse Width = $250 \mu s$; train = $0,1s$; durée = $90s$) provoque une apnée transitoire lors des premiers trains de stimulation, puis un entraînement respiratoire ou couplage de type 1:2 entre la stimulation et l'activité respiratoire.

d'une tachypnée. Bien que cela reste à prouver, il serait donc possible d'utiliser la VNS pour accélérer le rythme respiratoire lorsque celui-ci serait perturbé par une crise d'épilepsie.

C. Expériences *in situ* chez la souris KO Kv1.1

a. Le modèle murin Kv1.1 KO

Le modèle animal utilisé pour ces expériences est la souris knock-out pour le gène KCNA1 codant pour le canal potassique Kv1.1, un modèle murin d'épilepsie conduisant à la SUDEP ([Aiba et Noebels 2015](#)). Le canal potassique Kv1.1 est fortement exprimé à la membrane des neurones du système nerveux central et périphérique, des cellules cardiaques et du muscle squelettique. Ces canaux sont sensibles à la 4-aminopyridine (4-AP), un antagoniste connu pour induire des crises d'épilepsie ([Browne et al, 1994](#); [Scheffer et al, 1998](#); [Gutman et al, 2005](#)). Ils sont responsables d'un courant potassique sortant qui s'inactive lentement et qui est impliqué dans la phase de repolarisation des neurones ([Gonzalez et al, 2017](#)). Ainsi, la délétion des canaux Kv1.1 chez la souris entraîne une hyperexcitabilité et un phénotype épileptique. La souris Kv1.1 KO effectue des crises fréquentes conduisant à la SUDEP (mort prématurée) entre 18 et 25 jours postnataux (P18-P25) dans 50% des cas ([Smart et al, 1998](#); [Glasscock et al, 2010](#)).

b. Objectifs des expériences *in situ*

Les objectifs des expériences réalisées chez la souris Kv1.1 KO *in situ* étaient de provoquer la SUDEP expérimentalement grâce à une injection de KCl dans le NTS, comme l'avaient montré Aiba et Nobels ([2015](#)) dans leurs expériences *in vivo*. En effet, *in vivo*, l'injection de KCl dans le NTS produit une DP qui aboutit à l'arrêt cardiorespiratoire central ([Aiba et Noebels 2015](#)). Ainsi, l'objectif était de déclencher une SUDEP *in situ* afin, dans un premier temps, de **détailler les mécanismes neuronaux impliqués dans l'arrêt cardiorespiratoire** grâce à des enregistrements extra-cellulaires de l'activité des neurones

respiratoires du NTS et de la colonne respiratoire ventrale (dont le pré-Bötzinger complex). Il s'agissait également d'**enregistrer l'activité du nerf vague afin de déceler une éventuelle bouffée nerveuse vagale associée à la SUDEP**, sorte de signature vagale de la SUDEP, suspectée d'être transmise au cœur par le système parasympathique et susceptible de provoquer une forte bradycardie, voire un arrêt cardiaque. Dans un second temps, l'idée était de **stimuler le nerf vague pendant la DP afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la VNS aigue pouvait stopper la SUDEP** et/ou contrecarrer la bouffée nerveuse vagale responsable de la bradycardie.

c. Préparation perfusée *in situ* chez la souris Kv1.1 KO

Ce modèle expérimental a été décrit dans la partie principale du manuscrit de thèse. Ici, nous avons utilisé des souris Kv1.1 contrôle ($^{+/+}$) et KO ($^{-/-}$) obtenues grâce à des couples de souris hétérozygotes (Kv1.1 $^{+/-}$ /C3HeB/FeJ-Kcna1 tm1Tem ; [Smart et al, 1998](#)) mis en reproduction au CEFOS à la Timone. L'activité respiratoire a été enregistrée sur les nerfs phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) via des électrodes à succion. L'activité cardiaque et la pression artérielle ont été recueillies grâce à un électrocardiogramme et à un capteur de pression artérielle disposé au niveau du cathéter aortique. Une électrode placée dans le NTS intermédiaire a permis de délivrer du KCl grâce à un nanoinjecteur. Une électrode permettant d'enregistrer les changements de potentiel (ou DC) a été disposée à 1 mm du site d'injection de KCl dans le NTS et à environ 1mm de profondeur. D'après Aiba et Noebels ([2015](#)) un shift négatif du DC d'environ -4mV est suffisant pour définir l'apparition d'une DP.

d. Résultats et interprétations des effets provoqués par l'injection de KCl *in situ*

In situ, l'injection de KCl (50-200nl, 1M) dans le NTS a provoqué une apnée chez tous les animaux testés (n=11) ([Figure A6-A](#)). Seulement 3 sur 11 ont présenté une apnée

associée à la bradycardie. Cependant, aucune des souris testées n'a présenté d'arrêt cardiorespiratoire

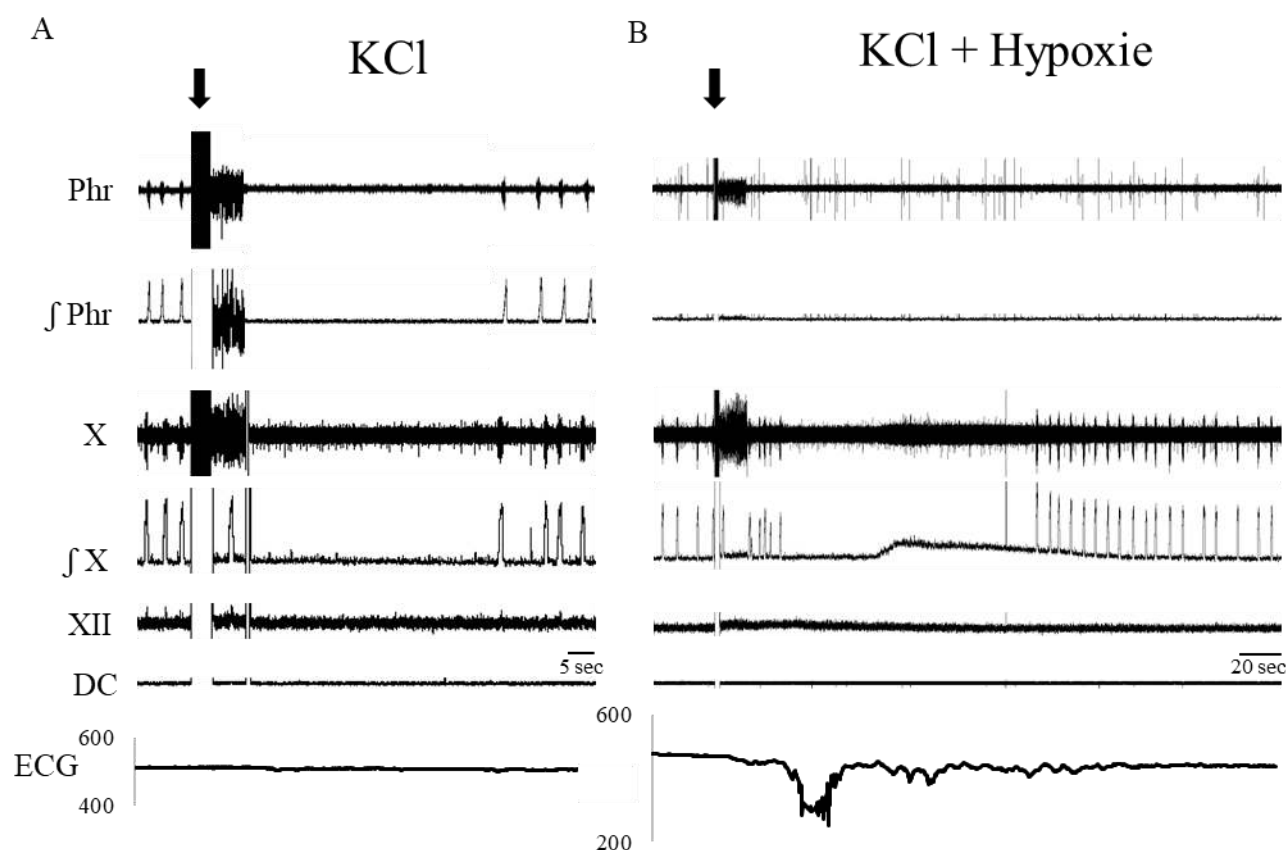


Figure A6 : Effet de l'injection de KCl dans le NTS d'une souris *Kv1.1* KO in situ. L'activité nerveuse phrénique (Phr), vague (X) et hypoglosse (XII) permet d'enregistrer l'activité respiratoire centrale. **A)** Apnée induite par l'injection de 100 nl de KCl dans le noyau du tractus solitaire (NTS) sans provoquer de bradycardie, ni de variation du DC. **B)** Apnée et bradycardie induites par l'injection de 100nl de KCl après qu'une hypoxie préalable ait été déclenchée. Dans ces conditions on remarque la présence d'une activité tonique vagale induite par le KCl pendant l'apnée. Cependant, aucune variation du DC n'est observée.

terminal. De plus, aucune variation du DC pouvant témoigner d'une DP n'a été observée quel que soit le génotype de la souris (WT, n=2 ; Het, n=3, ou KO, n=6).

L'injection de KCl a permis de provoquer une excitation neuronale en augmentant la concentration extracellulaire de potassium. L'apnée induite résulte probablement de l'activation des neurones du NTS impliquée dans le réflexe de Hering-Breuer ([Siniaia et al, 2000](#); [Vadhan et Tadi 2022](#)) et/ou des neurones responsables de l'inhibition de l'inspiration lors de la déglutition ([Sun et al, 2011](#)). La stimulation directe par le KCl des neurones de second ordre du NTS impliqués dans le baroréflexe explique vraisemblablement l'activation parasympathique et donc la bradycardie ([Lanfranchi et Somers 2002](#); [Skrapari et al, 2006](#)). L'une des hypothèses pouvant expliquer l'absence de DP et d'arrêt cardiorespiratoire serait un effet neuroprotecteur de l'oxygène spécifique à la préparation *in situ*. En effet, le LCRA employé *in situ* est équilibré dans du carbogène lequel contient 95% d'oxygène et 5% de CO₂. Il en résulte probablement une hyperoxie *in situ*, tandis qu'une hypoxie tissulaire sévère résulte obligatoirement de la dyspnée et de la bradycardie *in vivo* en l'absence de ventilation artificielle ([Aiba et Noebels 2015](#)).

Afin de tester cette hypothèse, l'oxygénation de la préparation a été transitoirement stoppée afin de dé-saturer le LCRA puis une latence de 1min30 a été respectée avant d'injecter le KCl dans le NTS. Dans ces conditions, l'injection de KCL a provoqué 1) une augmentation de la durée de l'apnée de 1120 % par rapport à la condition contrôle et 2) une bradycardie sévère. En dépit de ces effets cardiorespiratoires, aucun arrêt définitif de l'activité respiratoire ou cardiaque n'a été observé. De même, aucun shift significatif du DC n'a pu être déclenché (**Figure A6-B**). En conclusion, le modèle *in situ* ne semblait pas approprié pour provoquer une DP et une SUDEP.

L'un des écueils les plus importants de ce projet concerne l'adaptation de la préparation perfusée *in situ* sur ce modèle murin. En effet, sur 95 expériences réalisées *in situ*,

seules 11 ont donné des résultats exploitables, dont 3 souris KO Kv1.1, 7 souris hétérozygotes (Het) et 1 souris sauvage. Lorsque nous commençons à mieux maîtriser les paramètres d'initiation et de maintien d'une activité respiratoire stable chez ces souris, le confinement a été annoncé et nous avons dû stopper temporairement nos expériences (voir plus bas). Nous avons émis l'hypothèse que les difficultés rencontrées sur les souris KV1.1 pouvaient provenir du fond génétique de ces souris, plus fragile qu'un autre. Nous avons donc testé un autre fond génétique (C57BL/6J) déjà utilisé au laboratoire avec succès par le passé (e.g. [Wang et al, 2013](#); [Bayliss et al, 2015](#)) et en effet, l'initiation de la préparation *in situ* s'est avérée beaucoup plus facile.

e. Déclenchement d'une d'épilepsie *in vivo*

Nous avons vérifié sur quelques souris Kv1.1 KO en condition *in vivo* (n=3) que l'application de 4-AP (100mM) sur le cortex permettait bien de déclencher une crise d'épilepsie et la SUDEP. Dans ces expériences décrites brièvement ici, les souris étaient anesthésiées par un mélange de kétamine 100mg/kg et de xylazine 10mg/kg et la tête fixée dans un cadre stéréotaxique. Une canule trachéale a été posée et une sonde rectale reliée à un système de tapis chauffant afin de maintenir la température corporelle. La respiration était enregistrée à l'aide d'un électromyogramme des muscles intercostaux externes (EMG thoracique). L'activité vagale était recueillie au moyen d'une électrode bipolaire placée autour du nerf et isolée par de la vaseline et du parafilm. L'ECG était dérivé du signal EMG thoracique. Après une craniotomie pariétale gauche, un électroencéphalogramme (EEG) cortical était enregistré à l'aide d'une électrode plate (0.5mm diamètre) en argent chloruré disposée entre le cortex et le crâne. Un coton imbibé de 4-AP (100mM) a été appliqué via un trou de craniotomie au-dessus du cortex droit. Aucune électrode de DC n'a été implantée.

Chez un animal, nous avons pu observer une crise d'épilepsie environ 1000 secondes après l'application de 4-AP. Pendant la crise, une augmentation de la fréquence cardiaque

ainsi qu'une augmentation de l'activité vagale et respiratoire ont été observées. De plus, un arrêt

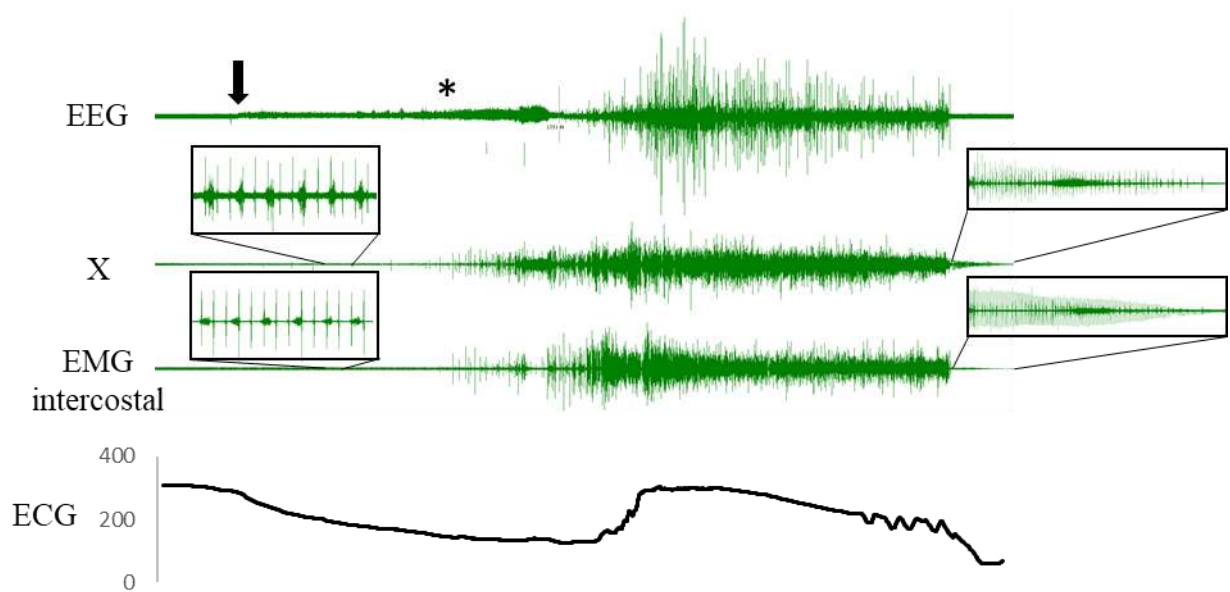


Figure A7 : Effet de la 4-aminopyridine sur le cortex d'une souris Kv1.1 KO in vivo. Les tracés illustrent l'activité électroencéphalographique corticale (EEG), l'activité nerveuse vagale (X), l'activité respiratoire (électromyogramme ou EMG intercostal) et la fréquence cardiaque dérivée de l'électrocardiogramme (ECG). L'administration de 4-aminopyridine (flèche noire) provoque une bradycardie initiale suivie d'une crise d'épilepsie (l'astérisque indique le début de la crise visible sur l'EEG). Lorsque la crise progresse l'activité cardiaque ré-augmente transitoirement puis s'effondre à nouveau. Les portions de tracés encadrées représentent un grossissement des zones concernées. On note que la crise se termine par un arrêt cardiorespiratoire fatal chez cet animal (encadrés de droite).

cardiorespiratoire est apparu environ 1500 secondes après le début de cette crise soutenue (**Figure A7**). Ces expériences préliminaires nous ont permis de reproduire les résultats d'Aïba et Noebels (2015) et de vérifier la faisabilité et la validité du modèle *in vivo*.

Hélas, la crise sanitaire de 2020 nous a obligés à limiter drastiquement notre élevage au CEFOS. Nous n'avons pu garder que deux cages dans lesquelles 2 mâles et 4 femelles ont été placés séparément pendant toute la durée du confinement. Or ces animaux n'ont pas pu permettre de relancer l'élevage à la sortie du confinement et nous avons donc perdu l'élevage entier de souris Kv1.1 ce qui a mis un terme aux expérimentations sur ce modèle de SUDEP.

D. Conclusions

En travaillant sur ce sujet, j'ai eu l'opportunité de développer mes connaissances dans le domaine de la recherche liée à l'épilepsie dont les applications de la VNS, mais aussi dans l'étude et la confection des électrodes organiques, grâce à une collaboration étroite avec l'Ecole des Mines de Saint-Etienne à Gardanne (Campus Georges Charpak Provence). Bien qu'ayant rencontré différents écueils, dont des problèmes de fabrication d'électrodes, des problèmes expérimentaux importants, un retard lié à la crise sanitaire et au déménagement des postes expérimentaux de la Faculté Nord à l'INMED à Luminy, il a été quand même possible de valoriser certains résultats obtenus dans cette thématique.

Bibliographie

- Abyssique, A., C. Tardivel, J. D. Troadec, and B. Felix. 2015. 'The Food Contaminant Mycotoxin Deoxynivalenol Inhibits the Swallowing Reflex in Anaesthetized Rats', *PLoS One*, 10: e0133355.
- Addington, W. R., R. E. Stephens, and K. A. Gilliland. 1999. 'Assessing the laryngeal cough reflex and the risk of developing pneumonia after stroke: an interhospital comparison', *Stroke*, 30: 1203-7.
- Afkari, S. 2007. 'Measuring frequency of spontaneous swallowing', *Australas Phys Eng Sci Med*, 30: 313-7.
- Aiba, I., and J. L. Noebels. 2015. 'Spreading depolarization in the brainstem mediates sudden cardiorespiratory arrest in mouse SUDEP models', *Sci Transl Med*, 7: 282ra46.
- Al Ain, S., L. Belin, B. Schaal, and B. Patris. 2013. 'How does a newly born mouse get to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses', *Dev Psychobiol*, 55: 888-901.
- Alain, C., N. Samson, C. Nadeau, J. F. Beaudoin, C. Lienhart, C. Counil, and J. P. Praud. 2021. 'Nasal respiratory support and tachypnea and oral feeding in full-term newborn lambs', *J Appl Physiol (1985)*, 130: 1436-47.
- Alberts, M. J., J. Horner, L. Gray, and S. R. Brazer. 1992. 'Aspiration after stroke: lesion analysis by brain MRI', *Dysphagia*, 7: 170-3.
- Alheid, G. F., P. A. Gray, M. C. Jiang, J. L. Feldman, and D. R. McCrimmon. 2002. 'Parvalbumin in respiratory neurons of the ventrolateral medulla of the adult rat', *J Neurocytol*, 31: 693-717.
- Alheid, G. F., and D. R. McCrimmon. 2008. 'The chemical neuroanatomy of breathing', *Respir Physiol Neurobiol*, 164: 3-11.
- Allen, G. I., and N. Tsukahara. 1974. 'Cerebrocerebellar communication systems', *Physiol Rev*, 54: 957-1006.
- Altman, K. W. 2013. 'Understanding dysphagia: a rapidly emerging problem', *Otolaryngol Clin North Am*, 46: xiii-xvi.
- Altschuler, S. M., R. O. Davies, and A. I. Pack. 1987. 'Role of medullary inspiratory neurones in the control of the diaphragm during oesophageal stimulation in cats', *J Physiol*, 391: 289-98.
- Alvarez-Berdugo, D., L. Rofes, R. Farre, J. F. Casamitjana, A. Enrique, J. Chamizo, A. Padron, X. Navarro, and P. Clave. 2016. 'Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx', *Neurogastroenterol Motil*, 28: 91-100.
- Alvarez-Berdugo, D., L. Rofes, V. Arreola, A. Martin, L. Molina, and P. Clave. 2018. 'A comparative study on the therapeutic effect of TRPV1, TRPA1, and TRPM8 agonists on swallowing dysfunction associated with aging and neurological diseases', *Neurogastroenterol Motil*, 30.
- Ambalavanar, R., Y. Tanaka, W. S. Selbie, and C. L. Ludlow. 2004. 'Neuronal activation in the medulla oblongata during selective elicitation of the laryngeal adductor response', *J Neurophysiol*, 92: 2920-32.
- Anderson, T. M., A. J. Garcia, 3rd, N. A. Baertsch, J. Pollak, J. C. Bloom, A. D. Wei, K. G. Rai, and J. M. Ramirez. 2016. 'A novel excitatory network for the control of breathing', *Nature*, 536: 76-80.
- Anderson, T. M., and J. M. Ramirez. 2017. 'Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis', *F1000Res*, 6: 139.
- Angstadt, J. D., and W. O. Friesen. 1993a. 'Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. II. Ionic conductances underlying serotonergic modulation of swim-gating cell 204', *J Comp Physiol A*, 172: 235-48.

- Angstadt, J. D., and W. O. Friesen. 1993b. 'Modulation of swimming behavior in the medicinal leech. I. Effects of serotonin on the electrical properties of swim-gating cell 204', *J Comp Physiol A*, 172: 223-34.
- Antony, A. B., A. J. Mazzola, G. S. Dhaliwal, and C. W. Hunter. 2019. 'Neurostimulation for the Treatment of Chronic Head and Facial Pain: A Literature Review', *Pain Physician*, 22: 447-77.
- Antri, M., N. Mellen, and J. R. Cazalets. 2011. 'Functional organization of locomotor interneurons in the ventral lumbar spinal cord of the newborn rat', *PLoS One*, 6: e20529.
- Arata, A., Y. M. Hernandez, B. G. Lindsey, K. F. Morris, and R. Shannon. 2000. 'Transient configurations of baroresponsive respiratory-related brainstem neuronal assemblies in the cat', *J Physiol*, 525 Pt 2: 509-30.
- Arloing, Saturnin. 1877. *Ire thèse: Application de la méthode graphique à l'étude du mécanisme de la déglutition chez les mammifères et les oiseaux: 2e thèse: Recherches anatomiques sur le bouturage des cactées* (G. Masson).
- Arvedson, J. 2006. 'Swallowing and feeding in infants and young children', *GI Motility online*.
- Atas, U., N. Erin, G. Tazegul, G. O. Elpek, and B. Yildirim. 2021. 'Changes in ghrelin, substance P and vasoactive intestinal peptide levels in the gastroduodenal mucosa of patients with morbid obesity', *Neuropeptides*, 89: 102164.
- Atasoy, D., Y. Aponte, H. H. Su, and S. M. Sternson. 2008. 'A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping', *J Neurosci*, 28: 7025-30.
- Attrill, S., S. White, J. Murray, S. Hammond, and S. Doeltgen. 2018. 'Impact of oropharyngeal dysphagia on healthcare cost and length of stay in hospital: a systematic review', *BMC Health Serv Res*, 18: 594.
- Auld, D. S., and R. Robitaille. 2003. 'Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function', *Neuron*, 40: 389-400.
- Austgen, J. R., H. A. Dantzler, B. K. Barger, and D. D. Kline. 2012. '5-hydroxytryptamine 2C receptors tonically augment synaptic currents in the nucleus tractus solitarii', *J Neurophysiol*, 108: 2292-305.
- Ayers, J., G. A. Carpenter, S. Currie, and J. Kinch. 1983. 'Which behavior does the lamprey central motor program mediate?', *Science*, 221: 1312-4.
- Baekey, D. M., K. F. Morris, C. Gestreau, Z. Li, B. G. Lindsey, and R. Shannon. 2001. 'Medullary respiratory neurones and control of laryngeal motoneurons during fictive eupnoea and cough in the cat', *J Physiol*, 534: 565-81.
- Bains, K. N. S., S. Kashyap, and S. L. Lappin. 2022. 'Anatomy, Thorax, Diaphragm.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Baker-Herman, T. L., D. D. Fuller, R. W. Bavis, A. G. Zabka, F. J. Golder, N. J. Doperalski, R. A. Johnson, J. J. Watters, and G. S. Mitchell. 2004. 'BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia', *Nat Neurosci*, 7: 48-55.
- Ball, M., M. Hossain, and D. Padalia. 2022. 'Anatomy, Airway.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Barbeau, H., and S. Rossignol. 1991. 'Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs', *Brain Res*, 546: 250-60.
- Bariohay, B., C. Tardivel, J. Pio, A. Jean, and B. Felix. 2008. 'BDNF-TrkB signaling interacts with the GABAergic system to inhibit rhythmic swallowing in the rat', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295: R1050-9.

- Barlow, S. M., and M. Estep. 2006. 'Central pattern generation and the motor infrastructure for suck, respiration, and speech', *J Commun Disord*, 39: 366-80.
- Bautista, T. G., P. G. Burke, Q. J. Sun, R. G. Berkowitz, and P. M. Pilowsky. 2010. 'The generation of post-inspiratory activity in laryngeal motoneurons: a review', *Adv Exp Med Biol*, 669: 143-9.
- Bautista, T. G., and M. Dutschmann. 2014. 'Ponto-medullary nuclei involved in the generation of sequential pharyngeal swallowing and concomitant protective laryngeal adduction in situ', *J Physiol*, 592: 2605-23.
- Bautista, T. G., A. Y. Fong, and M. Dutschmann. 2014. 'Spontaneous swallowing occurs during autoresuscitation in the in situ brainstem preparation of rat', *Respir Physiol Neurobiol*, 202: 35-43.
- Bax, L., M. McFarlane, E. Green, and A. Miles. 2014. 'Speech-language pathologist-led fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing: functional outcomes for patients after stroke', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 23: e195-200.
- Bayliss, D. A., F. Viana, R. K. Kanter, C. L. Szymeczek-Seay, A. J. Berger, and D. E. Millhorn. 1994. 'Early postnatal development of thyrotropin-releasing hormone (TRH) expression, TRH receptor binding, and TRH responses in neurons of rat brainstem', *J Neurosci*, 14: 821-33.
- Bayliss, D. A., Y. W. Li, and E. M. Talley. 1997a. 'Effects of serotonin on caudal raphe neurons: inhibition of N- and P/Q-type calcium channels and the afterhyperpolarization', *J Neurophysiol*, 77: 1362-74.
- Bayliss, D. A., Y. W. Li, and E. M. Talley. 1997b. 'Effects of serotonin on caudal raphe neurons: activation of an inwardly rectifying potassium conductance', *J Neurophysiol*, 77: 1349-61.
- Bayliss, D. A., J. Barhanin, C. Gestreau, and P. G. Guyenet. 2015. 'The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception', *Pflugers Arch*, 467: 917-29.
- Becamel, C., C. Berthoux, A. Barre, and P. Marin. 2017. 'Growing Evidence for Heterogeneous Synaptic Localization of 5-HT_{2A} Receptors', *ACS Chem Neurosci*, 8: 897-99.
- Beghi, E. 2020. 'The Epidemiology of Epilepsy', *Neuroepidemiology*, 54: 185-91.
- Bellen, H. J., C. Tong, and H. Tsuda. 2010. '100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future', *Nat Rev Neurosci*, 11: 514-22.
- Bellingham, M. C., and J. Lipski. 1992. 'Morphology and electrophysiology of superior laryngeal nerve afferents and postsynaptic neurons in the medulla oblongata of the cat', *Neuroscience*, 48: 205-16.
- Ben-Ari, Y., E. Cherubini, R. Corradetti, and J. L. Gaiarsa. 1989. 'Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones', *J Physiol*, 416: 303-25.
- Ben-Menachem, E., A. Hamberger, T. Hedner, E. J. Hammond, B. M. Uthman, J. Slater, T. Treig, H. Stefan, R. E. Ramsay, J. F. Wernicke, and et al. 1995. 'Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures', *Epilepsy Res*, 20: 221-7.
- Ben-Menachem, E. 2002. 'Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy', *Lancet Neurol*, 1: 477-82.
- Ben-Menachem, E., K. Hellstrom, and D. Verstappen. 2002. 'Analysis of direct hospital costs before and 18 months after treatment with vagus nerve stimulation therapy in 43 patients', *Neurology*, 59: S44-7.
- Benarroch, E. E. 2014. 'Medullary serotonergic system: organization, effects, and clinical correlations', *Neurology*, 83: 1104-11.

- Berg, R. W. 2018. 'Commentary: Synaptic Excitation in Spinal Motoneurons Alternates with Synaptic Inhibition and Is Balanced by Outward Rectification during Rhythmic Motor Network Activity', *Front Neural Circuits*, 12: 1.
- Berge-Laval, V., and C. Gestreau. 2020. 'Quipazine Elicits Swallowing in the Arterially Perfused Rat Preparation: A Role for Medullary Raphe Nuclei?', *Int J Mol Sci*, 21.
- Berger, A. J. 1977. 'Dorsal respiratory group neurons in the medulla of cat: spinal projections, responses to lung inflation and superior laryngeal nerve stimulation', *Brain Res*, 135: 231-54.
- Berger, A. J., and T. E. Dick. 1987. 'Connectivity of slowly adapting pulmonary stretch receptors with dorsal medullary respiratory neurons', *J Neurophysiol*, 58: 1259-74.
- Berger, A. J. 2000. 'Determinants of respiratory motoneuron output', *Respir Physiol*, 122: 259-69.
- Berkowitz, A. 2001. 'Rhythmicity of spinal neurons activated during each form of fictive scratching in spinal turtles', *J Neurophysiol*, 86: 1026-36.
- Berkowitz, A. 2002. 'Both shared and specialized spinal circuitry for scratching and swimming in turtles', *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 188: 225-34.
- Berman, B. A. 1988. 'Allergic rhinitis: mechanisms and management', *J Allergy Clin Immunol*, 81: 980-4.
- Bernier, A., C. Catelin, M. A. Ahmed, N. Samson, P. Bonneau, and J. P. Praud. 2012. 'Effects of nasal continuous positive-airway pressure on nutritive swallowing in lambs', *J Appl Physiol* (1985), 112: 1984-91.
- Bertoni, A., F. Schaller, R. Tyzio, S. Gaillard, F. Santini, M. Xolin, D. Diabira, R. Vaidyanathan, V. Matarazzo, I. Medina, E. Hammock, J. Zhang, B. Chini, J. L. Gaiarsa, and F. Muscatelli. 2021. 'Oxytocin administration in neonates shapes hippocampal circuitry and restores social behavior in a mouse model of autism', *Mol Psychiatry*, 26: 7582-95.
- Bhatia, S. J., and C. Shah. 2013. 'How to perform and interpret upper esophageal sphincter manometry', *J Neurogastroenterol Motil*, 19: 99-103.
- Bianchi, A. L., M. Denavit-Saubie, and J. Champagnat. 1995. 'Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters', *Physiol Rev*, 75: 1-45.
- Bianchi, A. L., and C. Gestreau. 2009. 'The brainstem respiratory network: an overview of a half century of research', *Respir Physiol Neurobiol*, 168: 4-12.
- Bieger, D. 1981. 'Role of bulbar serotonergic neurotransmission in the initiation of swallowing in the rat', *Neuropharmacology*, 20: 1073-83.
- Bieger, D. 1991. 'Neuropharmacologic correlates of deglutition: lessons from fictive swallowing', *Dysphagia*, 6: 147-64.
- Bieger, D. 2001. 'Rhombencephalic pathways and neurotransmitters controlling deglutition', *Am J Med*, 111 Suppl 8A: 85S-89S.
- Bieger, D., and W. Neuhuber. 2006. 'Neural circuits and mediators regulating swallowing in the brainstem', *GI Motility online*.
- Blanchi, B., L. M. Kelly, J. C. Viemari, I. Lafon, H. Burnet, M. Bevençut, S. Tillmanns, L. Daniel, T. Graf, G. Hilaire, and M. H. Sieweke. 2003. 'MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth', *Nat Neurosci*, 6: 1091-100.
- Blanco, C. E., M. A. Hanson, and H. B. McCooke. 1988. 'Effects on carotid chemoreceptor resetting of pulmonary ventilation in the fetal lamb in utero', *J Dev Physiol*, 10: 167-74.
- Blass, E. M., and M. H. Teicher. 1980. 'Suckling', *Science*, 210: 15-22.

- Bobker, D. H. 1994. 'A slow excitatory postsynaptic potential mediated by 5-HT₂ receptors in nucleus prepositus hypoglossi', *J Neurosci*, 14: 2428-34.
- Boccia, M. L., A. P. Goursaud, J. Bachevalier, K. D. Anderson, and C. A. Pedersen. 2007. 'Peripherally administered non-peptide oxytocin antagonist, L368,899, accumulates in limbic brain areas: a new pharmacological tool for the study of social motivation in non-human primates', *Horm Behav*, 52: 344-51.
- Bochorishvili, G., R. L. Stornetta, M. B. Coates, and P. G. Guyenet. 2012. 'Pre-Botzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons', *J Comp Neurol*, 520: 1047-61.
- Bolser, D. C., I. Poljacek, J. Jakus, D. D. Fuller, and P. W. Davenport. 2006. 'Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: A holarchical system?', *Respir Physiol Neurobiol*, 152: 255-65.
- Bolser, D. C., C. Gestreau, K. F. Morris, P. W. Davenport, and T. E. Pitts. 2013. 'Central neural circuits for coordination of swallowing, breathing, and coughing: predictions from computational modeling and simulation', *Otolaryngol Clin North Am*, 46: 957-64.
- Bonis, J. M., S. E. Neumueller, B. D. Marshall, K. L. Krause, B. Qian, L. G. Pan, M. R. Hodges, and H. V. Forster. 2011. 'The effects of lesions in the dorsolateral pons on the coordination of swallowing and breathing in awake goats', *Respir Physiol Neurobiol*, 175: 272-82.
- Bonis, J. M., S. E. Neumueller, K. L. Krause, L. G. Pan, M. R. Hodges, and H. V. Forster. 2013. 'Contributions of the Kolliker-Fuse nucleus to coordination of breathing and swallowing', *Respir Physiol Neurobiol*, 189: 10-21.
- Borke, R. C., M. E. Nau, and R. L. Ringler, Jr. 1983. 'Brain stem afferents of hypoglossal neurons in the rat', *Brain Res*, 269: 47-55.
- Borr, C., M. Hielscher-Fastabend, and A. Lucking. 2007. 'Reliability and validity of cervical auscultation', *Dysphagia*, 22: 225-34.
- Bosma, James F. 1957. 'Deglutition: Pharyngeal Stage', 37: 561-61.
- Bou-Flores, C., A. M. Lajard, R. Monteau, E. De Maeyer, I. Seif, J. Lanoir, and G. Hilaire. 2000. 'Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of a serotonin excess', *J Neurosci*, 20: 4646-56.
- Bourque, M. J., and A. Kolta. 2001. 'Properties and interconnections of trigeminal interneurons of the lateral pontine reticular formation in the rat', *J Neurophysiol*, 86: 2583-96.
- Bouvier, J., M. Thoby-Brisson, N. Renier, V. Dubreuil, J. Ericson, J. Champagnat, A. Pierani, A. Chedotal, and G. Fortin. 2010. 'Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing', *Nat Neurosci*, 13: 1066-74.
- Boyle, C. E., A. Parkar, A. Barror, and L. Kubin. 2019. 'Noradrenergic terminal density varies among different groups of hypoglossal premotor neurons', *J Chem Neuroanat*, 100: 101651.
- Brasseur, J. G., and W. J. Dodds. 1991. 'Interpretation of intraluminal manometric measurements in terms of swallowing mechanics', *Dysphagia*, 6: 100-19.
- Bravo, K., J. Eugenin, and I. Llona. 2017. 'Neurodevelopmental Effects of Serotonin on the Brainstem Respiratory Network', *Adv Exp Med Biol*, 1015: 193-216.
- Brin-Henry, Frédérique, Catherine Courier, Emmanuelle Lederle, and Véronique Masy. 2018. *Dictionnaire d'Orthophonie* (Ortho-Edition).
- Brisebois, S., N. Samson, P. H. Fortier, A. A. Doueik, A. M. Carreau, and J. P. Praud. 2014. 'Effects of reflux laryngitis on non-nutritive swallowing in newborn lambs', *Respir Physiol Neurobiol*, 200: 57-63.

- Britton, D., J. O. Benditt, and J. D. Hoit. 2016. 'Beyond Tracheostomy: Noninvasive Ventilation and Potential Positive Implications for Speaking and Swallowing', *Semin Speech Lang*, 37: 173-84.
- Britton, D., A. Roeske, S. K. Ennis, J. O. Benditt, C. Quinn, and D. Graville. 2018. 'Utility of Pulse Oximetry to Detect Aspiration: An Evidence-Based Systematic Review', *Dysphagia*, 33: 282-92.
- Brocard, F., D. Verdier, I. Arsenault, J. P. Lund, and A. Kolta. 2006. 'Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats', *J Neurophysiol*, 96: 2410-24.
- Brocard, F., N. A. Shevtsova, M. Bouhadfane, S. Tazerart, U. Heinemann, I. A. Rybak, and L. Vinay. 2013. 'Activity-dependent changes in extracellular Ca^{2+} and K^{+} reveal pacemakers in the spinal locomotor-related network', *Neuron*, 77: 1047-54.
- Brown, T. G. 1914. 'On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system', *J Physiol*, 48: 18-46.
- Brown, Thomas Graham %J Proceedings of the Royal Society of London. Series B, containing papers of a biological character. 1911. 'The intrinsic factors in the act of progression in the mammal', 84: 308-19.
- Browne, D. L., S. T. Ganchar, J. G. Nutt, E. R. Brunt, E. A. Smith, P. Kramer, and M. Litt. 1994. 'Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *KCNA1*', *Nat Genet*, 8: 136-40.
- Brownstone, R. M., and J. M. Wilson. 2008. 'Strategies for delineating spinal locomotor rhythm-generating networks and the possible role of Hb9 interneurons in rhythmogenesis', *Brain Res Rev*, 57: 64-76.
- Brumback, A. C., and K. J. Staley. 2008. 'Thermodynamic regulation of NKCC1-mediated Cl^{-} cotransport underlies plasticity of GABA(A) signaling in neonatal neurons', *J Neurosci*, 28: 1301-12.
- Bucher, D., A. L. Taylor, and E. Marder. 2006. 'Central pattern generating neurons simultaneously express fast and slow rhythmic activities in the stomatogastric ganglion', *J Neurophysiol*, 95: 3617-32.
- Bucher, D., C. D. Johnson, and E. Marder. 2007. 'Neuronal morphology and neuropil structure in the stomatogastric ganglion of the lobster, *Homarus americanus*', *J Comp Neurol*, 501: 185-205.
- Budzinska, K., and E. Wojtal. 2001. 'Changes in short-term potentiation of hypoglossal activity by modulators of nitric oxide production in the rabbit', *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 61: 277-87.
- Buschges, A. 2005. 'Sensory control and organization of neural networks mediating coordination of multisegmental organs for locomotion', *J Neurophysiol*, 93: 1127-35.
- Byku, M., and D. L. Mann. 2016. 'Neuromodulation of the Failing Heart: Lost in Translation?', *JACC Basic Transl Sci*, 1: 95-106.
- Byrne, J. H., and E. R. Kandel. 1996. 'Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence', *J Neurosci*, 16: 425-35.
- Casale, J., and J. D. Hatcher. 2022. 'Physiology, Eustachian Tube Function.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Caubit, X., M. Thoby-Brisson, N. Voituron, P. Filippi, M. Bevorgut, H. Faralli, S. Zanella, G. Fortin, G. Hilaire, and L. Fasano. 2010. 'Teashirt 3 regulates development of neurons involved in both respiratory rhythm and airflow control', *J Neurosci*, 30: 9465-76.
- Cayetanot, F., F. Gros, and N. Larnicol. 2002. 'Postnatal changes in the respiratory response of the conscious rat to serotonin 2A/2C receptor activation are reflected in the developmental pattern of fos expression in the brainstem', *Brain Res*, 942: 51-7.

- Cazalets, J. R., Y. Sqalli-Houssaini, and R. Magoul. 1999. 'Differential effects of potassium channel blockers on the activity of the locomotor network in neonatal rat', *Brain Res*, 827: 185-97.
- Chamberlin, N. L. 2004. 'Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing', *Respir Physiol Neurobiol*, 143: 115-25.
- Champagnat, J., M. P. Morin-Surun, J. Bouvier, M. Thoby-Brisson, and G. Fortin. 2011. 'Prenatal development of central rhythm generation', *Respir Physiol Neurobiol*, 178: 146-55.
- Chan, E., H. W. Steenland, H. Liu, and R. L. Horner. 2006. 'Endogenous excitatory drive modulating respiratory muscle activity across sleep-wake states', *Am J Respir Crit Care Med*, 174: 1264-73.
- Chan, J. Y., L. L. Lua, H. H. Starmer, D. Q. Sun, E. S. Rosenblatt, and C. G. Gourin. 2011. 'The relationship between depressive symptoms and initial quality of life and function in head and neck cancer', *Laryngoscope*, 121: 1212-8.
- Charbonneau, I., J. P. Lund, and D. H. McFarland. 2005. 'Persistence of respiratory-swallowing coordination after laryngectomy', *J Speech Lang Hear Res*, 48: 34-44.
- Chitravanshi, V. C., and H. N. Sapru. 1999. 'Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary respiratory neuronal group in the rat', *Brain Res*, 821: 443-60.
- Chopek, J. W., C. W. MacDonell, K. E. Power, K. Gardiner, and P. F. Gardiner. 2013. 'Removal of supraspinal input reveals a difference in the flexor and extensor monosynaptic reflex response to quipazine independent of motoneuron excitation', *J Neurophysiol*, 109: 2056-63.
- Chrachri, A., and F. Clarac. 1989. 'Synaptic connections between motor neurons and interneurons in the fourth thoracic ganglion of the crayfish, *Procambarus clarkii*', *J Neurophysiol*, 62: 1237-50.
- Cinocco, D. 2007. 'The difficulties of swallowing at the end of life', *J Palliat Med*, 10: 506-8.
- Clark, A. J., R. A. Kuperman, K. I. Auguste, and P. P. Sun. 2012. 'Intractable episodic bradycardia resulting from progressive lead traction in an epileptic child with a vagus nerve stimulator: a delayed complication', *J Neurosurg Pediatr*, 9: 389-93.
- Clave, P., and R. Shaker. 2015. 'Dysphagia: current reality and scope of the problem', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12: 259-70.
- Cohen, M. L., and R. W. Fuller. 1983. 'Antagonism of vascular serotonin receptors by m-chlorophenylpiperazine and m-trifluoromethylphenylpiperazine', *Life Sci*, 32: 711-8.
- Cole, A. J., E. Eskandar, T. Mela, J. L. Noebels, R. G. Gonzalez, and D. McGuone. 2013. 'Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 18-2013: a 32-year-old woman with recurrent episodes of altered consciousness', *N Engl J Med*, 368: 2304-12.
- Combes, D., P. Meyrand, and J. Simmers. 1999. 'Motor pattern specification by dual descending pathways to a lobster rhythm-generating network', *J Neurosci*, 19: 3610-9.
- Cook, I. J., W. J. Dodds, R. O. Dantas, M. K. Kern, B. T. Massey, R. Shaker, and W. J. Hogan. 1989. 'Timing of videofluoroscopic, manometric events, and bolus transit during the oral and pharyngeal phases of swallowing', *Dysphagia*, 4: 8-15.
- Cook, I. J., M. D. Weltman, K. Wallace, D. W. Shaw, E. McKay, R. C. Smart, and S. P. Butler. 1994. 'Influence of aging on oral-pharyngeal bolus transit and clearance during swallowing: scintigraphic study', *Am J Physiol*, 266: G972-7.
- Cornea-Hebert, V., M. Riad, C. Wu, S. K. Singh, and L. Descarries. 1999. 'Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat', *J Comp Neurol*, 409: 187-209.

- Cosmi, E. V., M. M. Anceschi, E. Cosmi, J. J. Piazze, and R. La Torre. 2003. 'Ultrasonographic patterns of fetal breathing movements in normal pregnancy', *Int J Gynaecol Obstet*, 80: 285-90.
- Costa, M. M. B. 2018. 'Neural Control of Swallowing', *Arq Gastroenterol*, 55Suppl 1: 61-75.
- Couch, J. D., A. M. Gilman, and W. K. Doyle. 2016. 'Long-term Expectations of Vagus Nerve Stimulation: A Look at Battery Replacement and Revision Surgery', *Neurosurgery*, 78: 42-6.
- Courtine, G., Y. Gerasimenko, R. van den Brand, A. Yew, P. Musienko, H. Zhong, B. Song, Y. Ao, R. M. Ichiyama, I. Lavrov, R. R. Roy, M. V. Sofroniew, and V. R. Edgerton. 2009. 'Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input', *Nat Neurosci*, 12: 1333-42.
- Crisp, K. M., and K. A. Mesce. 2004. 'A cephalic projection neuron involved in locomotion is dye coupled to the dopaminergic neural network in the medicinal leech', *J Exp Biol*, 207: 4535-42.
- Croll, R. P. 2001. 'Catecholamine-containing cells in the central nervous system and periphery of *Aplysia californica*', *J Comp Neurol*, 441: 91-105.
- Crone, S. A., K. A. Quinlan, L. Zagoraïou, S. Droho, C. E. Restrepo, L. Lundfald, T. Endo, J. Setlak, T. M. Jessell, O. Kiehn, and K. Sharma. 2008. 'Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord', *Neuron*, 60: 70-83.
- Crone, S. A., G. Zhong, R. Harris-Warrick, and K. Sharma. 2009. 'In mice lacking V2a interneurons, gait depends on speed of locomotion', *J Neurosci*, 29: 7098-109.
- Cropper, E. C., J. Jing, M. H. Perkins, and K. R. Weiss. 2017. 'Use of the *Aplysia* feeding network to study repetition priming of an episodic behavior', *J Neurophysiol*, 118: 1861-70.
- Crossley, M., K. Staras, and G. Kemenes. 2016. 'A two-neuron system for adaptive goal-directed decision-making in *Lymnaea*', *Nat Commun*, 7: 11793.
- Crossley, M., K. Staras, and G. Kemenes. 2018. 'A central control circuit for encoding perceived food value', *Sci Adv*, 4: eaau9180.
- Cullen, K. P., L. M. Grant, C. A. Kelm-Nelson, A. F. L. Brauer, L. B. Bickelhaupt, J. A. Russell, and M. R. Ciucci. 2018. 'Pink1 ^{-/-} Rats Show Early-Onset Swallowing Deficits and Correlative Brainstem Pathology', *Dysphagia*, 33: 749-58.
- Cymbalyuk, G., and A. Shilnikov. 2005. 'Coexistence of tonic spiking oscillations in a leech neuron model', *J Comput Neurosci*, 18: 255-63.
- Dal Bo, G., J. P. Lund, D. Verdier, and A. Kolta. 2005. 'Inputs to nucleus pontis caudalis from adjacent trigeminal areas', *European Journal of Neuroscience*, 22: 1987-96.
- Daniels, S. K., M. F. Schroeder, P. C. DeGeorge, D. M. Corey, and J. C. Rosenbek. 2007. 'Effects of verbal cue on bolus flow during swallowing', *Am J Speech Lang Pathol*, 16: 140-7.
- Daniels, S. K., and M. L. Huckabee. 2014. 'Dysphagia following stroke', *Clinical dysphagia series Second edition*: 442.
- Dantas, R. O., and W. J. Dodds. 1990. '[Influence of the viscosity of the swallowed food bolus on the motility of the pharynx]', *Arq Gastroenterol*, 27: 164-8.
- Dantas, R. O., M. K. Kern, B. T. Massey, W. J. Dodds, P. J. Kahrilas, J. G. Brasseur, I. J. Cook, and I. M. Lang. 1990. 'Effect of swallowed bolus variables on oral and pharyngeal phases of swallowing', *Am J Physiol*, 258: G675-81.
- Daur, N., F. Nadim, and D. Bucher. 2016. 'The complexity of small circuits: the stomatogastric nervous system', *Curr Opin Neurobiol*, 41: 1-7.
- Davenport, P. W., D. C. Bolser, and K. F. Morris. 2011. 'Swallow remodeling of respiratory neural networks', *Head Neck*, 33 Suppl 1: S8-13.

- Davis, P. J., and B. S. Nail. 1984. 'On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit', *J Comp Neurol*, 230: 13-32.
- Del Negro, C. A., C. F. Hsiao, and S. H. Chandler. 1999. 'Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons', *J Neurophysiol*, 81: 1478-85.
- Del Negro, C. A., N. Koshiya, R. J. Butera, Jr., and J. C. Smith. 2002. 'Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-botzinger complex inspiratory neurons in vitro', *J Neurophysiol*, 88: 2242-50.
- Del Negro, C. A., C. Morgado-Valle, J. A. Hayes, D. D. Mackay, R. W. Pace, E. A. Crowder, and J. L. Feldman. 2005. 'Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation', *J Neurosci*, 25: 446-53.
- Delcomyn, F. 1977. 'Coordination of invertebrate locomotion', *Mechanics and Energetics of Locomotion*: 82-114.
- Dempsey, B., S. Sungeelee, P. Bokinić, Z. Chettouh, S. Diem, S. Autran, E. R. Harrell, J. F. A. Poulet, C. Birchmeier, H. Carey, A. Genovesio, S. McMullan, C. Goridis, G. Fortin, and J. F. Brunet. 2021. 'A medullary centre for lapping in mice', *Nat Commun*, 12: 6307.
- Dergacheva, O., K. J. Griffioen, X. Wang, H. Kamendi, C. Gorini, and D. Mendelowitz. 2007. '5-HT(2) receptor subtypes mediate different long-term changes in GABAergic activity to parasympathetic cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus', *Neuroscience*, 149: 696-705.
- Descarries, L., M. Riad, and M. Parent. 2010. *CHAPTER 1.4 - Ultrastructure of the Serotonin Innervation in the Mammalian Central Nervous System* (Elsevier).
- Dhingra, R. R., T. E. Dick, W. I. Furuya, R. F. Galan, and M. Dutschmann. 2020. 'Volumetric mapping of the functional neuroanatomy of the respiratory network in the perfused brainstem preparation of rats', *J Physiol*, 598: 2061-79.
- Dick, T. E., Y. Oku, J. R. Romaniuk, and N. S. Cherniack. 1993. 'Interaction between central pattern generators for breathing and swallowing in the cat', *J Physiol*, 465: 715-30.
- Dick, T. E., M. C. Bellingham, and D. W. Richter. 1994. 'Pontine respiratory neurons in anesthetized cats', *Brain Res*, 636: 259-69.
- Dickinson, P. S. 2006. 'Neuromodulation of central pattern generators in invertebrates and vertebrates', *Curr Opin Neurobiol*, 16: 604-14.
- Dijk, Gerwin, Alexandra L. Rutz, and George G. Malliaras. 2020. 'Stability of PEDOT:PSS-Coated Gold Electrodes in Cell Culture Conditions', 5: 1900662.
- Do, H. J., H. G. Seo, H. H. Lee, B. M. Oh, Y. Kim, A. Kim, H. J. Kim, B. Jeon, and T. R. Han. 2020. 'Progression of Oropharyngeal Dysphagia in Patients with Multiple System Atrophy', *Dysphagia*, 35: 24-31.
- Dobbins, E. G., and J. L. Feldman. 1994. 'Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat', *J Comp Neurol*, 347: 64-86.
- Dodds, W. J., W. J. Hogan, D. P. Reid, E. T. Stewart, and R. C. Arndorfer. 1973. 'A comparison between primary esophageal peristalsis following wet and dry swallows', *J Appl Physiol*, 35: 851-7.
- Dodds, W. J., E. T. Stewart, and J. A. Logemann. 1990. 'Physiology and radiology of the normal oral and pharyngeal phases of swallowing', *AJR Am J Roentgenol*, 154: 953-63.
- Doi, A., and J. M. Ramirez. 2010. 'State-dependent interactions between excitatory neuromodulators in the neuronal control of breathing', *J Neurosci*, 30: 8251-62.
- Domacena, J., J. Ruan, and H. Ye. 2022. 'Improving suction technology for nerve activity recording', *J Neurosci Methods*, 365: 109401.
- Dotiwala, A. K., and N. S. Samra. 2022. 'Anatomy, Head and Neck, Tongue.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).

- Doty, R. W., and J. F. Bosma. 1956. 'An electromyographic analysis of reflex deglutition', *J Neurophysiol*, 19: 44-60.
- Doty, RW. 1968. 'Neural organization of deglutition', 1861.
- Dougherty, K. J., L. Zagoraïou, D. Satoh, I. Rozani, S. Doobar, S. Arber, T. M. Jessell, and O. Kiehn. 2013. 'Locomotor rhythm generation linked to the output of spinal shox2 excitatory interneurons', *Neuron*, 80: 920-33.
- Dozier, T. S., M. B. Brodsky, Y. Michel, B. C. Walters, Jr., and B. Martin-Harris. 2006. 'Coordination of swallowing and respiration in normal sequential cup swallows', *Laryngoscope*, 116: 1489-93.
- Dray, T. G., A. D. Hillel, and R. M. Miller. 1998. 'Dysphagia caused by neurologic deficits', *Otolaryngol Clin North Am*, 31: 507-24.
- Dreifuss, J. J., M. Dubois-Dauphin, H. Widmer, and M. Raggenbass. 1992. 'Electrophysiology of oxytocin actions on central neurons', *Ann N Y Acad Sci*, 652: 46-57.
- Dubreuil, V., N. Ramanantsoa, D. Trochet, V. Vaubourg, J. Amiel, J. Gallego, J. F. Brunet, and C. Goridis. 2008. 'A human mutation in Phox2b causes lack of CO2 chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 1067-72.
- Dubreuil, V., J. Barhanin, C. Goridis, and J. F. Brunet. 2009a. 'Breathing with phox2b', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364: 2477-83.
- Dubreuil, V., M. Thoby-Brisson, M. Rallu, K. Persson, A. Pattyn, C. Birchmeier, J. F. Brunet, G. Fortin, and C. Goridis. 2009b. 'Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons', *J Neurosci*, 29: 14836-46.
- Duffin, J., K. Ezure, and J. Lipski. 1995. 'Breathing Rhythm Generation: Focus on the Rostral Ventrolateral Medulla', *Physiology*, 10: 133-40.
- Dufour, A., F. Tell, and A. Baude. 2010. 'Perinatal development of inhibitory synapses in the nucleus tractus solitarii of the rat', *Eur J Neurosci*, 32: 538-49.
- Duron, B., and D. Marlot. 1980. 'Intercostal and diaphragmatic electrical activity during wakefulness and sleep in normal unrestrained adult cats', *Sleep*, 3: 269-80.
- Dutschmann, M., M. Morschel, M. Kron, and H. Herbert. 2004. 'Development of adaptive behaviour of the respiratory network: implications for the pontine Kolliker-Fuse nucleus', *Respir Physiol Neurobiol*, 143: 155-65.
- Dutschmann, M., and H. Herbert. 2006. 'The Kolliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat', *Eur J Neurosci*, 24: 1071-84.
- Dutschmann, M., M. Kron, M. Morschel, and C. Gestreau. 2007. 'Activation of Orexin B receptors in the pontine Kolliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat', *Respir Physiol Neurobiol*, 159: 232-5.
- Dutschmann, M., and T. E. Dick. 2012. 'Pontine mechanisms of respiratory control', *Compr Physiol*, 2: 2443-69.
- Dutschmann, M., S. E. Jones, H. H. Subramanian, D. Stanic, and T. G. Bautista. 2014. 'The physiological significance of postinspiration in respiratory control', *Prog Brain Res*, 212: 113-30.
- Dutschmann, M., T. G. Bautista, P. Trevizan-Bau, R. R. Dhingra, and W. I. Furuya. 2021. 'The pontine Kolliker-Fuse nucleus gates facial, hypoglossal, and vagal upper airway related motor activity', *Respir Physiol Neurobiol*, 284: 103563.
- Duvareille, C., N. Samson, M. St-Hilaire, P. Micheau, V. Bournival, and J. P. Praud. 2008. 'Effects of hypercapnia on non-nutritive swallowing in newborn lambs', *Adv Exp Med Biol*, 605: 413-7.

- Dziewas, R., P. Soros, R. Ishii, W. Chau, H. Henningsen, E. B. Ringelstein, S. Knecht, and C. Pantev. 2003. 'Neuroimaging evidence for cortical involvement in the preparation and in the act of swallowing', *Neuroimage*, 20: 135-44.
- Ebihara, T., K. Sekizawa, H. Nakazawa, and H. Sasaki. 1993. 'Capsaicin and swallowing reflex', *Lancet*, 341: 432.
- Ebihara, T., S. Ebihara, A. Watando, T. Okazaki, M. Asada, T. Ohru, M. Yamaya, and H. Arai. 2006. 'Effects of menthol on the triggering of the swallowing reflex in elderly patients with dysphagia', *Br J Clin Pharmacol*, 62: 369-71.
- Eden, G. J., and M. A. Hanson. 1987. 'Effects of chronic hypoxia from birth on the ventilatory response to acute hypoxia in the newborn rat', *J Physiol*, 392: 11-9.
- Edwards, E., and J. F. Paton. 1999. '5-HT(4) receptors in nucleus tractus solitarii attenuate cardiopulmonary reflex in anesthetized rats', *Am J Physiol*, 277: H1914-23.
- El Manira, A., J. Tegner, and S. Grillner. 1994. 'Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey', *J Neurophysiol*, 72: 1852-61.
- Ellenberger, H. H., and J. L. Feldman. 1990. 'Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat', *Brain Res*, 513: 35-42.
- England, SJ %J FASEB J. 1992. 'NMDA receptors mediate respiratory short-term potentiation in the nucleus tractus solitarius', 6: A1826.
- Ertekin, C., N. Kiylioglu, S. Tarlaci, A. B. Turman, Y. Secil, and I. Aydogdu. 2001. 'Voluntary and reflex influences on the initiation of swallowing reflex in man', *Dysphagia*, 16: 40-7.
- Ertekin, C., and I. Aydogdu. 2003. 'Neurophysiology of swallowing', *Clin Neurophysiol*, 114: 2226-44.
- Eslick, G. D., and N. J. Talley. 2008. 'Dysphagia: epidemiology, risk factors and impact on quality of life--a population-based study', *Aliment Pharmacol Ther*, 27: 971-9.
- Ezure, K., and M. Manabe. 1988. 'Decrementing expiratory neurons of the Botzinger complex. II. Direct inhibitory synaptic linkage with ventral respiratory group neurons', *Exp Brain Res*, 72: 159-66.
- Ezure, K. 1990. 'Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm', *Prog Neurobiol*, 35: 429-50.
- Ezure, K., I. Tanaka, and M. Miyazaki. 1998a. 'Inspiratory inhibition of pulmonary rapidly adapting receptor relay neurons in the rat', *Neurosci Lett*, 258: 49-52.
- Ezure, K., I. Tanaka, and M. Miyazaki. 1998b. 'Pontine projections of pulmonary slowly adapting receptor relay neurons in the cat', *Neuroreport*, 9: 411-4.
- Ezure, K., I. Tanaka, and Y. Saito. 2003. 'Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat', *Neurosci Res*, 45: 41-51.
- Ezure, K., and I. Tanaka. 2006. 'Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat', *Neuroscience*, 141: 1011-23.
- Fahy, B. G. 2010. 'Intraoperative and perioperative complications with a vagus nerve stimulation device', *J Clin Anesth*, 22: 213-22.
- Fay, R. A., and R. Norgren. 1997. 'Identification of rat brainstem multisynaptic connections to the oral motor nuclei in the rat using pseudorabies virus. II. Facial muscle motor systems', *Brain Res Brain Res Rev*, 25: 276-90.
- Feil, K., and H. Herbert. 1995. 'Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei', *J Comp Neurol*, 353: 506-28.
- Feldman, J. L., and C. A. Del Negro. 2006. 'Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm', *Nat Rev Neurosci*, 7: 232-42.

- Felix, B., A. Jean, and C. Roman. 2006. 'Leptin inhibits swallowing in rats', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291: R657-63.
- Fellin, T., M. Gomez-Gonzalo, S. Gobbo, G. Carmignoto, and P. G. Haydon. 2006. 'Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices', *J Neurosci*, 26: 9312-22.
- Felton, S. M., T. A. Gaige, T. G. Reese, V. J. Wedeen, and R. J. Gilbert. 2007. 'Mechanical basis for lingual deformation during the propulsive phase of swallowing as determined by phase-contrast magnetic resonance imaging', *J Appl Physiol* (1985), 103: 255-65.
- Feroah, T. R., H. V. Forster, C. G. Fuentes, J. Wenninger, P. Martino, M. Hodges, L. Pan, and T. Rice. 2002a. 'Contributions from rostral medullary nuclei to coordination of swallowing and breathing in awake goats', *J Appl Physiol* (1985), 93: 581-91.
- Feroah, TR., HV. Forster, CG. Fuentes, IM. Lang, D. Beste, P. Martino, L. Pan, and T. Rice. 2002b. 'Effects of spontaneous swallows on breathing in awake goats', *J Appl Physiol* (1985), 92: 1923-35.
- Ferris, L., S. Doeltgen, C. Cock, N. Rommel, M. Schar, S. Carrion, I. Scholten, and T. Omari. 2021. 'Modulation of pharyngeal swallowing by bolus volume and viscosity', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 320: G43-G53.
- Finsterer, J., and W. Grisold. 2015. 'Disorders of the lower cranial nerves', *J Neurosci Rural Pract*, 6: 377-91.
- Fleming, J., J. Conway, C. Majoral, M. Bennett, G. Caillibotte, S. Montesantos, and I. Katz. 2014. 'A technique for determination of lung outline and regional lung air volume distribution from computed tomography', *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 27: 35-42.
- Fontanesi, L. B., F. S. Fazan, F. J. Dias, M. C. L. Schiavoni, W. Marques, Jr., and V. P. S. Fazan. 2019. 'Sensory and Motor Conduction Velocity in Spontaneously Hypertensive Rats: Sex and Aging Investigation', *Front Syst Neurosci*, 13: 62.
- Fountain, M. D., and C. P. Schaaf. 2016. 'Prader-Willi Syndrome and Schaaf-Yang Syndrome: Neurodevelopmental Diseases Intersecting at the MAGEL2 Gene', *Diseases*, 4.
- Fregosi, R. F. 2011. 'Influence of tongue muscle contraction and transmural pressure on nasopharyngeal geometry in the rat', *J Appl Physiol* (1985), 111: 766-74.
- Frohlich, F., M. Bazhenov, I. Timofeev, M. Steriade, and T. J. Sejnowski. 2006. 'Slow state transitions of sustained neural oscillations by activity-dependent modulation of intrinsic excitability', *J Neurosci*, 26: 6153-62.
- Fulwiler, C. E., and C. B. Saper. 1984. 'Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat', *Brain Res*, 319: 229-59.
- Furlong, P. L., A. R. Hobson, Q. Aziz, G. R. Barnes, K. D. Singh, A. Hillebrand, D. G. Thompson, and S. Hamdy. 2004. 'Dissociating the spatio-temporal characteristics of cortical neuronal activity associated with human volitional swallowing in the healthy adult brain', *Neuroimage*, 22: 1447-55.
- Fuse, S., Y. Sugiyama, K. Hashimoto, T. Umezaki, Y. Oku, M. Dutschmann, and S. Hirano. 2020. 'Laryngeal afferent modulation of swallowing interneurons in the dorsal medulla in perfused rats', *Laryngoscope*, 130: 1885-93.
- Gao, X. P., Q. S. Liu, Q. Liu, and M. T. Wong-Riley. 2011. 'Excitatory-inhibitory imbalance in hypoglossal neurons during the critical period of postnatal development in the rat', *J Physiol*, 589: 1991-2006.
- Garcia, A. J., 3rd, S. Zanella, H. Koch, A. Doi, and J. M. Ramirez. 2011. 'Chapter 3-- networks within networks: the neuronal control of breathing', *Prog Brain Res*, 188: 31-50.
- Gay, T., J. K. Rendell, J. Spiro, K. Mosier, and A. G. Lurie. 1994. 'Coordination of oral cavity and laryngeal movements during swallowing', *J Appl Physiol* (1985), 77: 357-65.

- Ge, R., K. Chen, Y. Cheng, and Y. Dai. 2019. 'Morphological and electrophysiological properties of serotonin neurons with NMDA modulation in the mesencephalic locomotor region of neonatal ePet-EYFP mice', *Exp Brain Res*, 237: 3333-50.
- Gestreau, C., S. Milano, A. L. Bianchi, and L. Grelot. 1996. 'Activity of dorsal respiratory group inspiratory neurons during laryngeal-induced fictive coughing and swallowing in decerebrate cats', *Exp Brain Res*, 108: 247-56.
- Gestreau, C., L. Grelot, and A. L. Bianchi. 2000. 'Activity of respiratory laryngeal motoneurons during fictive coughing and swallowing', *Exp Brain Res*, 130: 27-34.
- Gestreau, C., M. Dutschmann, S. Obled, and A. L. Bianchi. 2005. 'Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors', *Respir Physiol Neurobiol*, 147: 159-76.
- Getting, P. A. 1989. 'Emerging principles governing the operation of neural networks', *Annu Rev Neurosci*, 12: 185-204.
- Geurkink, N. 1983. 'Nasal anatomy, physiology, and function', *J Allergy Clin Immunol*, 72: 123-8.
- Ghali, M. G. Z. 2017. 'The bulbospinal network controlling the phrenic motor system: Laterality and course of descending projections', *Neurosci Res*, 121: 7-17.
- Giordano, F., A. Zicca, C. Barba, R. Guerrini, and L. Genitori. 2017. 'Vagus nerve stimulation: Surgical technique of implantation and revision and related morbidity', *Epilepsia*, 58 Suppl 1: 85-90.
- Glasscock, E., J. W. Yoo, T. T. Chen, T. L. Klassen, and J. L. Noebels. 2010. 'Kv1.1 potassium channel deficiency reveals brain-driven cardiac dysfunction as a candidate mechanism for sudden unexplained death in epilepsy', *J Neurosci*, 30: 5167-75.
- Glennon, R. A., R. Young, and J. A. Rosecrans. 1983. 'Antagonism of the effects of the hallucinogen DOM and the purported 5-HT agonist quipazine by 5-HT₂ antagonists', *Eur J Pharmacol*, 91: 189-96.
- Gonzalez, A., G. Herrera, G. Ugarte, C. Restrepo, R. Pina, M. Pertusa, P. Orio, and R. Madrid. 2017. 'IKD Current in Cold Transduction and Damage-Triggered Cold Hypersensitivity', *Adv Exp Med Biol*, 1015: 265-77.
- Goodwin, G. M., and A. R. Green. 1985. 'A behavioural and biochemical study in mice and rats of putative selective agonists and antagonists for 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors', *Br J Pharmacol*, 84: 743-53.
- Gorea, E., and J. Adrién. 1988. 'Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT₂ receptors', *Eur J Pharmacol*, 154: 285-91.
- Gottschall, J. 1981. 'The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fiber composition; perikarya and axons of efferent and afferent neurons', *Anat Embryol (Berl)*, 161: 405-17.
- Goulding, M. 2009. 'Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction', *Nat Rev Neurosci*, 10: 507-18.
- Grabowska, M., T. I. Toth, C. Smarandache-Wellmann, and S. Daun-Gruhn. 2015. 'A network model comprising 4 segmental, interconnected ganglia, and its application to simulate multi-legged locomotion in crustaceans', *J Comput Neurosci*, 38: 601-16.
- Granbichler, C. A., L. Nashef, R. Selway, and C. E. Polkey. 2015. 'Mortality and SUDEP in epilepsy patients treated with vagus nerve stimulation', *Epilepsia*, 56: 291-6.
- Grasso, R., L. Bianchi, and F. Lacquaniti. 1998. 'Motor patterns for human gait: backward versus forward locomotion', *J Neurophysiol*, 80: 1868-85.
- Gray, A. M., D. M. Pache, and R. D. Sewell. 1999a. 'Do alpha₂-adrenoceptors play an integral role in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds?', *Eur J Pharmacol*, 378: 161-8.

- Gray, P. A., J. C. Rekling, C. M. Bocchiario, and J. L. Feldman. 1999b. 'Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex', *Science*, 286: 1566-8.
- Gray, P. A., J. A. Hayes, G. Y. Ling, I. Llona, S. Tupal, M. C. Picardo, S. E. Ross, T. Hirata, J. G. Corbin, J. Eugenin, and C. A. Del Negro. 2010. 'Developmental origin of preBotzinger complex respiratory neurons', *J Neurosci*, 30: 14883-95.
- Greene, Z., C. P. O'Donnell, and M. Walshe. 2016. 'Oral stimulation for promoting oral feeding in preterm infants', *Cochrane Database Syst Rev*, 9: CD009720.
- Grelot, L., S. Milano, F. Portillo, A. D. Miller, and A. L. Bianchi. 1992. 'Membrane potential changes of phrenic motoneurons during fictive vomiting, coughing, and swallowing in the decerebrate cat', *J Neurophysiol*, 68: 2110-9.
- Grillner, S. 1981. 'Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish', *Handbook of Physiology – The Nervous System II*: 1179–236.
- Grillner, S. 2006. 'Neuronal networks in motion from ion channels to behaviour', *An R Acad Nac Med (Madr)*, 123: 297-8.
- Grillner, S., and A. Kozlov. 2021. 'The CPGs for Limbed Locomotion-Facts and Fiction', *Int J Mol Sci*, 22.
- Grimonprez, A., R. Raedt, J. Portelli, I. Dauwe, L. E. Larsen, C. Bouckaert, J. Delbeke, E. Carrette, A. Meurs, V. De Herdt, P. Boon, and K. Vonck. 2015. 'The antidepressant-like effect of vagus nerve stimulation is mediated through the locus coeruleus', *J Psychiatr Res*, 68: 1-7.
- Grinevich, V., M. G. Desarmenien, B. Chini, M. Tauber, and F. Muscatelli. 2014. 'Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders', *Front Neuroanat*, 8: 164.
- Grobbelaar, E. J., S. Owen, A. D. Torrance, and J. A. Wilson. 2004. 'Nutritional challenges in head and neck cancer', *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 29: 307-13.
- Gross, R. D., and M. Trapani-Hanasewych. 2017. 'Breathing and Swallowing: The Next Frontier', *Semin Speech Lang*, 38: 87-95.
- Guckenheimer, J., S. Gueron, and R. M. Harris-Warrick. 1993. 'Mapping the dynamics of a bursting neuron', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 341: 345-59.
- Guertin, P. A. 2009. 'The mammalian central pattern generator for locomotion', *Brain Res Rev*, 62: 45-56.
- Guillebaud, F., G. Roussel, B. Felix, J. D. Troadec, M. Dallaporta, and A. Abysique. 2019. 'Interaction between nesfatin-1 and oxytocin in the modulation of the swallowing reflex', *Brain Res*, 1711: 173-82.
- Guo, H., X. S. Yuan, J. C. Zhou, H. Chen, S. Q. Li, W. M. Qu, and Z. L. Huang. 2020. 'Whole-Brain Monosynaptic Inputs to Hypoglossal Motor Neurons in Mice', *Neurosci Bull*, 36: 585-97.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stuhmer, and X. Wang. 2005. 'International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels', *Pharmacol Rev*, 57: 473-508.
- Guyenet, P. G., C. P. Seigny, M. C. Weston, and R. L. Stornetta. 2002. 'Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic', *J Neurosci*, 22: 3806-16.
- Guyenet, P. G., and D. K. Mulkey. 2010. 'Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group', *Respir Physiol Neurobiol*, 173: 244-55.
- Guyenet, P. G., R. L. Stornetta, Gmpr Souza, S. B. G. Abbott, Y. Shi, and D. A. Bayliss. 2019. 'The Retrotrapezoid Nucleus: Central Chemoreceptor and Regulator of Breathing Automaticity', *Trends Neurosci*, 42: 807-24.

- Hagglund, M., L. Borgius, K. J. Dougherty, and O. Kiehn. 2010. 'Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion', *Nat Neurosci*, 13: 246-52.
- Hagglund, M., K. J. Dougherty, L. Borgius, S. Itohara, T. Iwasato, and O. Kiehn. 2013. 'Optogenetic dissection reveals multiple rhythmogenic modules underlying locomotion', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 11589-94.
- Hamdy, S., J. C. Rothwell, D. J. Brooks, D. Bailey, Q. Aziz, and D. G. Thompson. 1999. 'Identification of the cerebral loci processing human swallowing with H2(15)O PET activation', *J Neurophysiol*, 81: 1917-26.
- Hamdy, S., S. Jilani, V. Price, C. Parker, N. Hall, and M. Power. 2003. 'Modulation of human swallowing behaviour by thermal and chemical stimulation in health and after brain injury', *Neurogastroenterol Motil*, 15: 69-77.
- Haney, M. M., J. Sinnott, K. L. Osman, I. Deninger, E. Andel, V. Caywood, A. Mok, B. Ballenger, K. Cummings, L. Thombs, and T. E. Lever. 2019. 'Mice Lacking Brain-Derived Serotonin Have Altered Swallowing Function', *Otolaryngol Head Neck Surg*, 161: 468-71.
- Harada, H., K. Takakusaki, S. Kita, M. Matsuda, S. Nonaka, and T. Sakamoto. 2005. 'Effects of injecting GABAergic agents into the medullary reticular formation upon swallowing induced by the superior laryngeal nerve stimulation in decerebrate cats', *Neurosci Res*, 51: 395-404.
- Hardemark Cedborg, A. I., E. Sundman, K. Boden, H. W. Hedstrom, R. Kuylenskierna, O. Ekberg, and L. I. Eriksson. 2009. 'Co-ordination of spontaneous swallowing with respiratory airflow and diaphragmatic and abdominal muscle activity in healthy adult humans', *Exp Physiol*, 94: 459-68.
- Harris-Warrick, R. M. 2010. 'General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks', *Prog Brain Res*, 187: 213-22.
- Hasenohrl, R. U., R. K. Schwarting, P. Gerhardt, C. Privou, and J. P. Huston. 1994. 'Comparison of neurokinin substance P with morphine in effects on food-reinforced operant behavior and feeding', *Physiol Behav*, 55: 541-6.
- Hashim, M. A., and D. Bieger. 1987. 'Excitatory action of 5-HT on deglutitive substrates in the rat solitary complex', *Brain Res Bull*, 18: 355-63.
- Hashimoto, K., Y. Sugiyama, S. Fuse, T. Umezaki, Y. Oku, M. Dutschmann, and S. Hirano. 2019. 'Activity of swallowing-related neurons in the medulla in the perfused brainstem preparation in rats', *Laryngoscope*, 129: E72-E79.
- Hatton, K. W., J. T. McLarney, T. Pittman, and B. G. Fahy. 2006. 'Vagal nerve stimulation: overview and implications for anesthesiologists', *Anesth Analg*, 103: 1241-9.
- Hawkins, R. D., T. W. Abrams, T. J. Carew, and E. R. Kandel. 1983. 'A cellular mechanism of classical conditioning in Aplysia: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation', *Science*, 219: 400-5.
- Hayakawa, T., A. Takanaga, K. Tanaka, S. Maeda, and M. Seki. 2004. 'Ultrastructure of the rostral ventral respiratory group neurons in the ventrolateral medulla of the rat', *Brain Res*, 1027: 94-102.
- Hayashi, F., S. K. Coles, and D. R. McCrimmon. 1996. 'Respiratory neurons mediating the Breuer-Hering reflex prolongation of expiration in rat', *J Neurosci*, 16: 6526-36.
- Helmers, S. L., J. W. Wheless, M. Frost, J. Gates, P. Levisohn, C. Tardo, J. A. Conry, D. Yalnizoglu, and J. R. Madsen. 2001. 'Vagus nerve stimulation therapy in pediatric patients with refractory epilepsy: retrospective study', *J Child Neurol*, 16: 843-8.
- Herbert, H., M. M. Moga, and C. B. Saper. 1990. 'Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat', *J Comp Neurol*, 293: 540-80.

- Hernandez-Miranda, L. R., P. L. Ruffault, J. C. Bouvier, A. J. Murray, M. P. Morin-Surun, N. Zampieri, J. B. Cholewa-Waclaw, E. Ey, J. F. Brunet, J. Champagnat, G. Fortin, and C. Birchmeier. 2017. 'Genetic identification of a hindbrain nucleus essential for innate vocalization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 8095-100.
- Hertzberg, T., S. Hellstrom, H. Holgert, H. Lagercrantz, and J. M. Pequignot. 1992. 'Ventilatory response to hyperoxia in newborn rats born in hypoxia--possible relationship to carotid body dopamine', *J Physiol*, 456: 645-54.
- Heyd, C., and R. Yellon. 2022. 'Anatomy, Head and Neck, Pharynx Muscles.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Hila, A., J. A. Castell, and D. O. Castell. 2001. 'Pharyngeal and upper esophageal sphincter manometry in the evaluation of dysphagia', *J Clin Gastroenterol*, 33: 355-61.
- Hilaire, G., J. C. Viemari, P. Coulon, M. Simonneau, and M. Bevençut. 2004. 'Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents', *Respir Physiol Neurobiol*, 143: 187-97.
- Hiss, S. G., M. Strauss, K. Treole, A. Stuart, and S. Boutilier. 2003. 'Swallowing apnea as a function of airway closure', *Dysphagia*, 18: 293-300.
- Hitiris, N., S. Suratman, K. Kelly, L. J. Stephen, G. J. Sills, and M. J. Brodie. 2007. 'Sudden unexpected death in epilepsy: a search for risk factors', *Epilepsy Behav*, 10: 138-41.
- Hockman, C. H., D. Bieger, and A. Weerasuriya. 1979. 'Supranuclear pathways of swallowing', *Prog Neurobiol*, 12: 15-32.
- Hodges, M. R., and G. B. Richerson. 2008. 'Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects', *Respir Physiol Neurobiol*, 164: 222-32.
- Hodges, M. R., M. Wehner, J. Aungst, J. C. Smith, and G. B. Richerson. 2009. 'Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development', *J Neurosci*, 29: 10341-9.
- Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. 1952. 'A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve', *J Physiol*, 117: 500-44.
- Hoffiz, Y. C., A. Castillo-Ruiz, M. A. L. Hall, T. A. Hite, J. M. Gray, C. D. Cisternas, L. R. Cortes, A. J. Jacobs, and N. G. Forger. 2021. 'Birth elicits a conserved neuroendocrine response with implications for perinatal osmoregulation and neuronal cell death', *Sci Rep*, 11: 2335.
- Holtman, J. R., Jr. 1988. 'Immunohistochemical localization of serotonin- and substance P-containing fibers around respiratory muscle motoneurons in the nucleus ambiguus of the cat', *Neuroscience*, 26: 169-78.
- Holtman, J. R., Jr., L. J. Marion, and D. F. Speck. 1990. 'Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat', *Neuroscience*, 37: 541-52.
- Holzer, P., and U. Holzer-Petsche. 1997. 'Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function', *Pharmacol Ther*, 73: 173-217.
- Holzer, P. 2011. 'TRP channels in the digestive system', *Curr Pharm Biotechnol*, 12: 24-34.
- Holzer, P., and A. Farzi. 2014. 'Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis', *Adv Exp Med Biol*, 817: 195-219.
- Hooper, S. L., M. Moulins, and L. Nonnotte. 1990. 'Sensory input induces long-lasting changes in the output of the lobster pyloric network', *J Neurophysiol*, 64: 1555-73.
- Hooper, S. L. 2005. 'Movement control: dedicated or distributed?', *Curr Biol*, 15: R878-80.
- Horowitz, G., M. Amit, I. Fried, M. Y. Neufeld, L. Sharf, U. Kramer, and D. M. Fliss. 2013. 'Vagal nerve stimulation for refractory epilepsy: the surgical procedure and complications in 100 implantations by a single medical center', *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270: 355-8.
- Horton, K. K., L. S. Segers, S. C. Nuding, R. O'Connor, P. A. Alencar, P. W. Davenport, D. C. Bolser, T. Pitts, B. G. Lindsey, K. F. Morris, and C. Gestreau. 2018. 'Central

- Respiration and Mechanical Ventilation in the Gating of Swallow With Breathing', *Front Physiol*, 9: 785.
- Huang, C. L., F. Liu, Y. Y. Zhang, J. Lin, M. Fu, Y. L. Li, C. Zhou, C. J. Li, and J. F. Shen. 2021. 'Activation of oxytocin receptor in the trigeminal ganglion attenuates orofacial ectopic pain attributed to inferior alveolar nerve injury', *J Neurophysiol*, 125: 223-31.
- Hubner, C. A., and K. Holthoff. 2013. 'Anion transport and GABA signaling', *Front Cell Neurosci*, 7: 177.
- Huckabee, M. L., and S. Doeltgen. 2012. 'The Neurophysiology of Swallowing', *Plural Publishing, Videofluoroscopy: A Multidisciplinary Team Approach*: 81-106.
- Huckabee, M. L., K. Lamvik, and R. Jones. 2014. 'Pharyngeal mis-sequencing in dysphagia: characteristics, rehabilitative response, and etiological speculation', *J Neurol Sci*, 343: 153-8.
- Huff, A., M. D. Reed, K. E. Iceman, D. R. Howland, and T. Pitts. 2020. 'Sex-specific vagal and spinal modulation of swallow and its coordination with breathing', *PLoS One*, 15: e0234194.
- Hughes, T. A., and C. M. Wiles. 1996. 'Clinical measurement of swallowing in health and in neurogenic dysphagia', *QJM*, 89: 109-16.
- Humbert, I. A., and J. Robbins. 2007. 'Normal swallowing and functional magnetic resonance imaging: a systematic review', *Dysphagia*, 22: 266-75.
- Humbert, I. A., and D. G. McLaren. 2014. 'Differential psychophysiological interactions of insular subdivisions during varied oropharyngeal swallowing tasks', *Physiol Rep*, 2: e00239.
- Huxley, E. J., J. Viroslav, W. R. Gray, and A. K. Pierce. 1978. 'Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness', *Am J Med*, 64: 564-8.
- Ihara, Y., K. Nakayama, S. Nakamura, A. Mochizuki, K. Takahashi, and T. Inoue. 2013. 'Coordination of NMDA-induced rhythmic activity in the trigeminal and hypoglossal nerves of neonatal mice in vitro', *Neurosci Res*, 75: 138-49.
- Inokuchi, H., M. Gonzalez-Fernandez, K. Matsuo, M. B. Brodsky, M. Yoda, H. Taniguchi, H. Okazaki, T. Hiraoka, and J. B. Palmer. 2014. 'Electromyography of swallowing with fine wire intramuscular electrodes in healthy human: activation sequence of selected hyoid muscles', *Dysphagia*, 29: 713-21.
- Inoue, T., K. Nakayama, Y. Ihara, S. Tachikawa, S. Nakamura, A. Mochizuki, K. Takahashi, and T. Iijima. 2017. 'Coordinated control of the tongue during suckling-like activity and respiration', *J Oral Sci*, 59: 183-88.
- Ireland, S. J., and M. B. Tyers. 1987. 'Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced depolarization of the rat isolated vagus nerve', *Br J Pharmacol*, 90: 229-38.
- Iscue, S. 1998. 'Control of abdominal muscles', *Prog Neurobiol*, 56: 433-506.
- Iwasaki, Y., Y. Maejima, S. Suyama, M. Yoshida, T. Arai, K. Katsurada, P. Kumari, H. Nakabayashi, M. Kakei, and T. Yada. 2015. 'Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308: R360-9.
- Jackson, J., B. H. Bland, and M. C. Antle. 2009. 'Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3', *Synapse*, 63: 31-41.
- Jacobs, B. L., and E. C. Azmitia. 1992. 'Structure and function of the brain serotonin system', *Physiol Rev*, 72: 165-229.
- Jacobsen, B., N. VanKampen, and J. V. Ashurst. 2022. 'Anatomy, Head and Neck, Thyroid Membrane.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).

- Jakus, J., E. Halasova, I. Poliacek, Z. Tomori, and A. Stransky. 2004. 'Brainstem areas involved in the aspiration reflex: c-Fos study in anesthetized cats', *Physiol Res*, 53: 703-17.
- Janczewski, W. A., A. Tashima, P. Hsu, Y. Cui, and J. L. Feldman. 2013. 'Role of inhibition in respiratory pattern generation', *J Neurosci*, 33: 5454-65.
- Jayasekeran, V., J. Rothwell, and S. Hamdy. 2011. 'Non-invasive magnetic stimulation of the human cerebellum facilitates cortico-bulbar projections in the swallowing motor system', *Neurogastroenterol Motil*, 23: 831-e341.
- Jean, A., M. Amri, and A. Calas. 1983. 'Connections between the ventral medullary swallowing area and the trigeminal motor nucleus of the sheep studied by tracing techniques', *J Auton Nerv Syst*, 7: 87-96.
- Jean, A. 1984. 'Brainstem organization of the swallowing network', *Brain Behav Evol*, 25: 109-16.
- Jean, A. 2001. 'Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms', *Physiol Rev*, 81: 929-69.
- Jeri, A. Logemann. 1994. 'Evaluation and Treatment of Swallowing Disorders', *American Journal of Speech-Language Pathology*, 3: 41-44.
- Jia, L. 1997. '[Localization of central rhythm generator for tongue movements in sucking--analysis of isolated brainstem-spinal cord preparation from newborn rats]', *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 64: 499-511.
- Jiang, C., and J. Lipski. 1990. 'Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Botzinger complex in the cat', *Exp Brain Res*, 81: 639-48.
- Jing, J., and K. R. Weiss. 2001. 'Neural mechanisms of motor program switching in Aplysia', *J Neurosci*, 21: 7349-62.
- Jing, J., and K. R. Weiss. 2005. 'Generation of variants of a motor act in a modular and hierarchical motor network', *Curr Biol*, 15: 1712-21.
- Johnson, S. M., J. C. Smith, G. D. Funk, and J. L. Feldman. 1994. 'Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat', *J Neurophysiol*, 72: 2598-608.
- Jordan, L. M., and U. Slawinska. 2011. 'Chapter 12--modulation of rhythmic movement: control of coordination', *Prog Brain Res*, 188: 181-95.
- Jurgens, U. 2009. 'The neural control of vocalization in mammals: a review', *J Voice*, 23: 1-10.
- Juriaans, A. F., G. F. Kerkhof, and A. C. S. Hokken-Koelega. 2022. 'The Spectrum of the Prader-Willi-like Pheno- and Genotype: A Review of the Literature', *Endocr Rev*, 43: 1-18.
- Kadala, A., D. Verdier, P. Morquette, and A. Kolta. 2015. 'Ion Homeostasis in Rhythmogenesis: The Interplay Between Neurons and Astroglia', *Physiology (Bethesda)*, 30: 371-88.
- Kagaya, H., M. Yokoyama, E. Saitoh, D. Kanamori, C. Susa, R. Z. German, and J. B. Palmer. 2015. 'Isolated pharyngeal swallow exists during normal human feeding', *Tohoku J Exp Med*, 236: 39-43.
- Kahlow, H., and M. Olivecrona. 2013. 'Complications of vagal nerve stimulation for drug-resistant epilepsy: a single center longitudinal study of 143 patients', *Seizure*, 22: 827-33.
- Kahrilas, P. J. 1993. 'Pharyngeal structure and function', *Dysphagia*, 8: 303-7.
- Kaila, K., E. Ruusuvuori, P. Seja, J. Voipio, and M. Puskarjov. 2014. 'GABA actions and ionic plasticity in epilepsy', *Curr Opin Neurobiol*, 26: 34-41.

- Kajii, Y., T. Shingai, J. Kitagawa, Y. Takahashi, Y. Taguchi, T. Noda, and Y. Yamada. 2002. 'Sour taste stimulation facilitates reflex swallowing from the pharynx and larynx in the rat', *Physiol Behav*, 77: 321-5.
- Kalappa, B. I., L. Feng, W. R. Kem, A. G. Gusev, and V. V. Uteshev. 2011. 'Mechanisms of facilitation of synaptic glutamate release by nicotinic agonists in the nucleus of the solitary tract', *Am J Physiol Cell Physiol*, 301: C347-61.
- Kalia, M. 2003. 'Dysphagia and aspiration pneumonia in patients with Alzheimer's disease', *Metabolism*, 52: 36-8.
- Kalkanis, J. G., P. Krishna, J. A. Espinosa, and D. K. Naritoku. 2002. 'Self-inflicted vocal cord paralysis in patients with vagus nerve stimulators. Report of two cases', *J Neurosurg*, 96: 949-51.
- Kandel, ER., JH. Schwartz, TM. Jessell, SA. Siegelbaum, AJ. Hudspeth, and S. Mack. 2012. 'Principles of neural science (Fifth edition.)'.
- Kandel, ER., Y. Dudai, and MR. Mayford. 2014. 'The molecular and systems biology of memory', *Cell* 157: 163–86.
- Kapila, Y. V., W. J. Dodds, J. F. Helm, and W. J. Hogan. 1984. 'Relationship between swallow rate and salivary flow', *Dig Dis Sci*, 29: 528-33.
- Karagiannides, I., E. Kokkotou, M. Tansky, T. Tchkonja, N. Giorgadze, M. O'Brien, S. E. Leeman, J. L. Kirkland, and C. Pothoulakis. 2006. 'Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5207-12.
- Karagiannides, I., D. Torres, Y. H. Tseng, C. Bowe, E. Carvalho, D. Espinoza, C. Pothoulakis, and E. Kokkotou. 2008. 'Substance P as a novel anti-obesity target', *Gastroenterology*, 134: 747-55.
- Kass, J. I., and I. M. Mintz. 2006. 'Silent plateau potentials, rhythmic bursts, and pacemaker firing: three patterns of activity that coexist in quadristable subthalamic neurons', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 183-8.
- Kasyanov, A. M., V. F. Safiulina, L. L. Voronin, and E. Cherubini. 2004. 'GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 3967-72.
- Katz, P. S., and W. N. Frost. 1995. 'Intrinsic neuromodulation in the Tritonia swim CPG: serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons', *J Neurophysiol*, 74: 2281-94.
- Katz, P. S. 1998. 'Comparison of extrinsic and intrinsic neuromodulation in two central pattern generator circuits in invertebrates', *Exp Physiol*, 83: 281-92.
- Keebaugh, A. C., C. E. Barrett, J. L. Laprairie, J. J. Jenkins, and L. J. Young. 2015. 'RNAi knockdown of oxytocin receptor in the nucleus accumbens inhibits social attachment and parental care in monogamous female prairie voles', *Soc Neurosci*, 10: 561-70.
- Kelly, B. N., M. L. Huckabee, R. D. Jones, and C. M. Frampton. 2007. 'The early impact of feeding on infant breathing-swallowing coordination', *Respir Physiol Neurobiol*, 156: 147-53.
- Kelso, J. A. 2012. 'Multistability and metastability: understanding dynamic coordination in the brain', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367: 906-18.
- Kessler, J. P., and A. Jean. 1985. 'Identification of the medullary swallowing regions in the rat', *Exp Brain Res*, 57: 256-63.
- Kessler, J. P., and A. Jean. 1986. 'Inhibitory influence of monoamines and brainstem monoaminergic regions on the medullary swallowing reflex', *Neurosci Lett*, 65: 41-6.
- Kessler, J. P., and A. Jean. 1991. 'Evidence that activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors within the nucleus tractus solitarius triggers swallowing', *Eur J Pharmacol*, 201: 59-67.

- Khodagholy, D., T. Doublet, M. Gurfinkel, P. Quilichini, E. Ismailova, P. Leleux, T. Herve, S. Sanaur, C. Bernard, and G. G. Malliaras. 2011. 'Highly conformable conducting polymer electrodes for in vivo recordings', *Adv Mater*, 23: H268-72.
- Khodagholy, D., J. N. Gelinas, Z. Zhao, M. Yeh, M. Long, J. D. Greenlee, W. Doyle, O. Devinsky, and G. Buzsaki. 2016. 'Organic electronics for high-resolution electrocorticography of the human brain', *Sci Adv*, 2: e1601027.
- Kiehn, O., and O. Kjaerulff. 1998. 'Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates', *Ann N Y Acad Sci*, 860: 110-29.
- Kijima, M., S. Isono, and T. Nishino. 2000. 'Modulation of swallowing reflex by lung volume changes', *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 1855-8.
- King, S. N., T. Y. Shen, M. N. Musselwhite, A. Huff, M. D. Reed, I. Poliacsek, D. R. Howland, W. Dixon, K. F. Morris, D. C. Bolser, K. E. Iceman, and T. Pitts. 2020. 'Swallow Motor Pattern Is Modulated by Fixed or Stochastic Alterations in Afferent Feedback', *Front Hum Neurosci*, 14: 112.
- Kinkead, R., O. Belzile, and R. Gulemetova. 2002. 'Serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development', *J Appl Physiol (1985)*, 93: 936-46.
- Kinoshita, S., Y. Sugiyama, K. Hashimoto, S. Fuse, S. Mukudai, T. Umezaki, M. Dutschmann, and S. Hirano. 2021. 'Influences of GABAergic Inhibition in the Dorsal Medulla on Contralateral Swallowing Neurons in Rats', *Laryngoscope*, 131: 2187-98.
- Kirchner, J. A. 1993. 'Joseph H. Ogura Memorial Lecture. The vertebrate larynx: adaptations and aberrations', *Laryngoscope*, 103: 1197-201.
- Kish, M. Z. 2014. 'Improving preterm infant outcomes: implementing an evidence-based oral feeding advancement protocol in the neonatal intensive care unit', *Adv Neonatal Care*, 14: 346-53.
- Klahn, M. S., and A. L. Perlman. 1999. 'Temporal and durational patterns associating respiration and swallowing', *Dysphagia*, 14: 131-8.
- Klein, M., and E. R. Kandel. 1980. 'Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 6912-6.
- Kobashi, M., S. Y. Xuan, M. Fujita, Y. Mitoh, and R. Matsuo. 2010. 'Central ghrelin inhibits reflex swallowing elicited by activation of the superior laryngeal nerve in the rat', *Regul Pept*, 160: 19-25.
- Kobashi, M., S. Mizutani, M. Fujita, Y. Mitoh, Y. Shimatani, and R. Matsuo. 2017. 'Central glucagon like peptide-1 inhibits reflex swallowing elicited by the superior laryngeal nerve via caudal brainstem in the rat', *Brain Res*, 1671: 26-32.
- Koizumi, H., and J. C. Smith. 2008. 'Persistent Na⁺ and K⁺-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex in vitro', *J Neurosci*, 28: 1773-85.
- Koizumi, H., K. Nomura, Y. Yokota, A. Enomoto, T. Yamanishi, S. Iida, K. Ishihama, and M. Kogo. 2009. 'Regulation of trigeminal respiratory motor activity in the brainstem', *J Dent Res*, 88: 1048-53.
- Kolta, A., K. G. Westberg, and J. P. Lund. 2000. 'Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit', *J Chem Neuroanat*, 19: 175-95.
- Kolta, A., P. Morquette, R. Lavoie, I. Arsenault, and D. Verdier. 2010. 'Modulation of rhythmogenic properties of trigeminal neurons contributing to the masticatory CPG', *Prog Brain Res*, 187: 137-48.
- Koshiya, N., and J. C. Smith. 1999. 'Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro', *Nature*, 400: 360-3.

- Kristan, W. B., Jr., R. L. Calabrese, and W. O. Friesen. 2005. 'Neuronal control of leech behavior', *Prog Neurobiol*, 76: 279-327.
- Krupinski, M., M. Irzyk, Z. Moczulski, R. Banys, I. Dwojak, and M. Urbanczyk-Zawadzka. 2019. 'CT evaluation of aberrant right subclavian artery: anatomy and clinical implications', *Cardiol Young*, 29: 128-32.
- Kubin, L., G. F. Alheid, E. J. Zuperku, and D. R. McCrimmon. 2006. 'Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents', *J Appl Physiol (1985)*, 101: 618-27.
- Kuhl, V., B. M. Eicke, M. Dieterich, and P. P. Urban. 2003. 'Sonographic analysis of laryngeal elevation during swallowing', *J Neurol*, 250: 333-7.
- Kuna, S. T., and J. E. Remmers. 1999. 'Premotor input to hypoglossal motoneurons from Kolliker-Fuse neurons in decerebrate cats', *Respir Physiol*, 117: 85-95.
- Kuo, J. J., R. H. Lee, L. Zhang, and C. J. Heckman. 2006. 'Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones', *J Physiol*, 574: 819-34.
- Kurjak, A., G. Azumendi, N. Vecek, S. Kupesic, M. Solak, D. Varga, and F. Chervenak. 2003. 'Fetal hand movements and facial expression in normal pregnancy studied by four-dimensional sonography', *J Perinat Med*, 31: 496-508.
- Kutsuwada, T., K. Sakimura, T. Manabe, C. Takayama, N. Katakura, E. Kushiya, R. Natsume, M. Watanabe, Y. Inoue, T. Yagi, S. Aizawa, M. Arakawa, T. Takahashi, Y. Nakamura, H. Mori, and M. Mishina. 1996. 'Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice', *Neuron*, 16: 333-44.
- Kuwana, S., N. Tsunekawa, Y. Yanagawa, Y. Okada, J. Kuribayashi, and K. Obata. 2006. 'Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Botzinger complex', *Eur J Neurosci*, 23: 667-74.
- Laitman, J. T., and J. S. Reidenberg. 1993. 'Specializations of the human upper respiratory and upper digestive systems as seen through comparative and developmental anatomy', *Dysphagia*, 8: 318-25.
- Laitman, J. T., and J. S. Reidenberg. 2013. 'The evolution and development of human swallowing: the most important function we least appreciate', *Otolaryngol Clin North Am*, 46: 923-35.
- Lalley, P. M., A. M. Bischoff, S. W. Schwarzacher, and D. W. Richter. 1995. '5-HT₂ receptor-controlled modulation of medullary respiratory neurones in the cat', *J Physiol*, 487 (Pt 3): 653-61.
- Lamvik, K., R. Jones, S. Sauer, K. Erfmann, and M. L. Huckabee. 2015. 'The capacity for volitional control of pharyngeal swallowing in healthy adults', *Physiol Behav*, 152: 257-63.
- Lane, A. P. 2004. 'Nasal anatomy and physiology', *Facial Plast Surg Clin North Am*, 12: 387-95, v.
- Lanfranchi, P. A., and V. K. Somers. 2002. 'Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283: R815-26.
- Lang, I. M. 2009. 'Brain stem control of the phases of swallowing', *Dysphagia*, 24: 333-48.
- Langford, L. A., and R. F. Schmidt. 1983. 'Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat', *Anat Rec*, 206: 71-8.
- Langmore, S. E., K. Schatz, and N. Olsen. 1988. 'Fiberoptic endoscopic examination of swallowing safety: a new procedure', *Dysphagia*, 2: 216-9.
- Larsen, WJ. 1998. 'Development of the Gastrointestinal Tract', *Essentials of Human Embryology*: 151-72.

- Laskowski, M. B., A. S. Norton, and P. K. Berger. 1991. 'Branching patterns of the rat phrenic nerve during development and reinnervation', *Exp Neurol*, 113: 212-20.
- Lau, C., H. R. Sheena, R. J. Shulman, and R. J. Schanler. 1997. 'Oral feeding in low birth weight infants', *J Pediatr*, 130: 561-9.
- Lau, C., R. Alagugurusamy, R. J. Schanler, E. O. Smith, and R. J. Shulman. 2000. 'Characterization of the developmental stages of sucking in preterm infants during bottle feeding', *Acta Paediatr*, 89: 846-52.
- Lau, C., and I. Kusnierczyk. 2001. 'Quantitative evaluation of infant's nonnutritive and nutritive sucking', *Dysphagia*, 16: 58-67.
- Lau, C., E. O. Smith, and R. J. Schanler. 2003. 'Coordination of suck-swallow and swallow respiration in preterm infants', *Acta Paediatr*, 92: 721-7.
- Lee, Dong Sup, Su Jin Kim, Eun Bi Kwon, Cheol Whee Park, Su Min Jun, Bumkyoo Choi, and Sae Woong Kim. 2013. 'Comparison of in vivo biocompatibilities between parylene-C and polydimethylsiloxane for implantable microelectronic devices', *Bulletin of Materials Science*, 36: 1127-32.
- Lee, H. J., A. H. Macbeth, J. H. Pagani, and W. S. Young, 3rd. 2009. 'Oxytocin: the great facilitator of life', *Prog Neurobiol*, 88: 127-51.
- Lee, K. S., S. Iwanir, R. B. Kopito, M. Scholz, J. A. Calarco, D. Biron, and E. Levine. 2017. 'Serotonin-dependent kinetics of feeding bursts underlie a graded response to food availability in *C. elegans*', *Nat Commun*, 8: 14221.
- Leopold, N. A., and M. C. Kagel. 1997. 'Dysphagia--ingestion or deglutition?: a proposed paradigm', *Dysphagia*, 12: 202-6.
- Leow, L. P., M. L. Huckabee, T. Anderson, and L. Beckert. 2010. 'The impact of dysphagia on quality of life in ageing and Parkinson's disease as measured by the swallowing quality of life (SWAL-QOL) questionnaire', *Dysphagia*, 25: 216-20.
- Leslie, P., M. J. Drinnan, P. Finn, G. A. Ford, and J. A. Wilson. 2004. 'Reliability and validity of cervical auscultation: a controlled comparison using videofluoroscopy', *Dysphagia*, 19: 231-40.
- Leslie, P., M. J. Drinnan, I. Zammit-Maempel, J. L. Coyle, G. A. Ford, and J. A. Wilson. 2007. 'Cervical auscultation synchronized with images from endoscopy swallow evaluations', *Dysphagia*, 22: 290-8.
- Letourneau, A., and R. K. Daniel. 1988. 'The superficial musculoaponeurotic system of the nose', *Plast Reconstr Surg*, 82: 48-57.
- Levring Jaghagen, E., K. A. Franklin, and A. Isberg. 2003. 'Snoring, sleep apnoea and swallowing dysfunction: a videoradiographic study', *Dentomaxillofac Radiol*, 32: 311-6.
- Li, A., M. Randall, and E. E. Nattie. 1999. 'CO(2) microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep', *J Appl Physiol (1985)*, 87: 910-9.
- Liao, J. C., and J. R. Fetcho. 2008. 'Shared versus specialized glycinergic spinal interneurons in axial motor circuits of larval zebrafish', *J Neurosci*, 28: 12982-92.
- Lieske, S. P., M. Thoby-Brisson, P. Telgkamp, and J. M. Ramirez. 2000. 'Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]', *Nat Neurosci*, 3: 600-7.
- Lim, S. H., P. K. Lieu, S. Y. Phua, R. Seshadri, N. Venketasubramanian, S. H. Lee, and P. W. Choo. 2001. 'Accuracy of bedside clinical methods compared with fiberoptic endoscopic examination of swallowing (FEES) in determining the risk of aspiration in acute stroke patients', *Dysphagia*, 16: 1-6.
- Lindsay, A. D., and J. L. Feldman. 1993. 'Modulation of respiratory activity of neonatal rat phrenic motoneurons by serotonin', *J Physiol*, 461: 213-33.

- Lipski, J., H. J. Waldvogel, P. Pilowsky, and C. Jiang. 1990. 'GABA-immunoreactive boutons make synapses with inspiratory neurons of the dorsal respiratory group', *Brain Res*, 529: 309-14.
- Liu, Q., and M. T. Wong-Riley. 2010. 'Postnatal changes in the expressions of serotonin 1A, 1B, and 2A receptors in ten brain stem nuclei of the rat: implication for a sensitive period', *Neuroscience*, 165: 61-78.
- Loewy, A. D., and H. Burton. 1978. 'Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat', *J Comp Neurol*, 181: 421-49.
- Logemann, J. A. 1995. 'Dysphagia: evaluation and treatment', *Folia Phoniatr Logop*, 47: 140-64.
- Loos, H. M., D. Reger, and B. Schaal. 2019. 'The odour of human milk: Its chemical variability and detection by newborns', *Physiol Behav*, 199: 88-99.
- Loy, K., J. Fourneau, N. Meng, C. Denecke, G. Locatelli, and F. M. Bareyre. 2021. 'Semaphorin 7A restricts serotonergic innervation and ensures recovery after spinal cord injury', *Cell Mol Life Sci*, 78: 2911-27.
- Lu, T. Z., and Z. P. Feng. 2012. 'NALCN: a regulator of pacemaker activity', *Mol Neurobiol*, 45: 415-23.
- Lumbroso, D., and V. Joseph. 2009. 'Impaired acclimatization to chronic hypoxia in adult male and female rats following neonatal hypoxia', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297: R421-7.
- Lund, J. P. 1991. 'Mastication and its control by the brain stem', *Crit Rev Oral Biol Med*, 2: 33-64.
- Lund, J. P., and A. Kolta. 2006a. 'Brainstem circuits that control mastication: do they have anything to say during speech?', *J Commun Disord*, 39: 381-90.
- Lund, J. P., and A. Kolta. 2006b. 'Generation of the central masticatory pattern and its modification by sensory feedback', *Dysphagia*, 21: 167-74.
- Lundfald, L., C. E. Restrepo, S. J. Butt, C. Y. Peng, S. Droho, T. Endo, H. U. Zeilhofer, K. Sharma, and O. Kiehn. 2007. 'Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord', *Eur J Neurosci*, 26: 2989-3002.
- Mace, J. D., T. Tachibana, G. Wang, B. A. Newmyer, E. Guillems, E. R. Gilbert, and M. A. Cline. 2014. 'Substance P is associated with hypothalamic paraventricular nucleus activation that coincides with increased urotensin 2 mRNA in chicks', *Neuropeptides*, 48: 305-11.
- Mack, S. O., P. Kc, M. Wu, B. R. Coleman, F. P. Tolentino-Silva, and M. A. Haxhiu. 2002. 'Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing', *J Appl Physiol (1985)*, 92: 826-34.
- Mack, S. O., M. Wu, P. Kc, and M. A. Haxhiu. 2007. 'Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex', *J Appl Physiol (1985)*, 102: 189-99.
- Mackinnon, S. E., A. L. Dellon, A. R. Hudson, and D. A. Hunter. 1984. 'Chronic nerve compression--an experimental model in the rat', *Ann Plast Surg*, 13: 112-20.
- Macrae, P. R., R. D. Jones, D. J. Myall, T. R. Melzer, and M. L. Huckabee. 2013. 'Cross-sectional area of the anterior belly of the digastric muscle: comparison of MRI and ultrasound measures', *Dysphagia*, 28: 375-80.
- Majczynski, H., A. M. Cabaj, L. M. Jordan, and U. Slawinska. 2020. 'Contribution of 5-HT2 Receptors to the Control of the Spinal Locomotor System in Intact Rats', *Front Neural Circuits*, 14: 14.

- Malandraki, G. A., B. P. Sutton, A. L. Perlman, D. C. Karampinos, and C. Conway. 2009. 'Neural activation of swallowing and swallowing-related tasks in healthy young adults: an attempt to separate the components of deglutition', *Hum Brain Mapp*, 30: 3209-26.
- Mandell, L. A., and M. S. Niederman. 2019. 'Aspiration Pneumonia', *N Engl J Med*, 380: 651-63.
- Manta, S., J. Dong, G. Debonnel, and P. Blier. 2009. 'Enhancement of the function of rat serotonin and norepinephrine neurons by sustained vagus nerve stimulation', *J Psychiatry Neurosci*, 34: 272-80.
- Mantilla, C. B., J. P. Bailey, W. Z. Zhan, and G. C. Sieck. 2012. 'Phrenic motoneuron expression of serotonergic and glutamatergic receptors following upper cervical spinal cord injury', *Exp Neurol*, 234: 191-9.
- Mantyh, P. W., S. P. Hunt, and J. E. Maggio. 1984. 'Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand', *Brain Res*, 307: 147-65.
- Mantziaris, C., T. Bockemuhl, and A. Buschges. 2020. 'Central pattern generating networks in insect locomotion', *Dev Neurobiol*, 80: 16-30.
- Manzke, T., M. Niebert, U. R. Koch, A. Caley, S. Vogelgesang, S. Hulsman, E. Ponimaskin, U. Muller, T. G. Smart, R. J. Harvey, and D. W. Richter. 2010. 'Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor alpha3 controls breathing in mice', *J Clin Invest*, 120: 4118-28.
- Marchenko, V., H. Koizumi, B. Mosher, N. Koshiya, M. F. Tariq, T. G. Bezdudnaya, R. Zhang, Y. I. Molkov, I. A. Rybak, and J. C. Smith. 2016. 'Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Botzinger and Botzinger Complexes', *eNeuro*, 3.
- Marder, E., and R. L. Calabrese. 1996. 'Principles of rhythmic motor pattern generation', *Physiol Rev*, 76: 687-717.
- Marder, E. 2000. 'Motor pattern generation', *Curr Opin Neurobiol*, 10: 691-8.
- Marder, E., and D. Bucher. 2001. 'Central pattern generators and the control of rhythmic movements', *Curr Biol*, 11: R986-96.
- Marder, E., D. Bucher, D. J. Schulz, and A. L. Taylor. 2005. 'Invertebrate central pattern generation moves along', *Curr Biol*, 15: R685-99.
- Marder, E., and D. Bucher. 2007. 'Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs', *Annu Rev Physiol*, 69: 291-316.
- Marder, E. 2011. 'Variability, compensation, and modulation in neurons and circuits', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 3: 15542-8.
- Marek, G. J., and G. K. Aghajanian. 1998. '5-Hydroxytryptamine-induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by mu-opiate receptor activation', *Neuroscience*, 86: 485-97.
- Martin-Harris, B., M. B. Brodsky, C. C. Price, Y. Michel, and B. Walters. 2003. 'Temporal coordination of pharyngeal and laryngeal dynamics with breathing during swallowing: single liquid swallows', *J Appl Physiol (1985)*, 94: 1735-43.
- Martin-Harris, B., M. B. Brodsky, Y. Michel, C. L. Ford, B. Walters, and J. Heffner. 2005. 'Breathing and swallowing dynamics across the adult lifespan', *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131: 762-70.
- Martin-Harris, B., M. B. Brodsky, Y. Michel, F. S. Lee, and B. Walters. 2007. 'Delayed initiation of the pharyngeal swallow: normal variability in adult swallows', *J Speech Lang Hear Res*, 50: 585-94.
- Martin-Harris, B., D. McFarland, E. G. Hill, C. B. Strange, K. L. Focht, Z. Wan, J. Blair, and K. McGrattan. 2015. 'Respiratory-swallow training in patients with head and neck cancer', *Arch Phys Med Rehabil*, 96: 885-93.

- Martin-Harris, Bonnie, and David H McFarland. 2013. "Coordination of Deglutition and Respiration." In.
- Martin, R. E., G. M. Murray, P. Kemppainen, Y. Masuda, and B. J. Sessle. 1997. 'Functional properties of neurons in the primate tongue primary motor cortex during swallowing', *J Neurophysiol*, 78: 1516-30.
- Martino, R., N. Foley, S. Bhogal, N. Diamant, M. Speechley, and R. Teasell. 2005. 'Dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and pulmonary complications', *Stroke*, 36: 2756-63.
- Masino, M. A., M. D. Abbinanti, J. Eian, and R. M. Harris-Warrick. 2012. 'TTX-resistant NMDA receptor-mediated membrane potential oscillations in neonatal mouse Hb9 interneurons', *PLoS One*, 7: e47940.
- Massey, C. A., L. P. Sowers, B. J. Dlouhy, and G. B. Richerson. 2014. 'Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention', *Nat Rev Neurol*, 10: 271-82.
- Massey, C. E., T. El Gammal, and B. S. Brooks. 1984. 'Giant posterior inferior cerebellar artery aneurysm with dysphagia', *Surg Neurol*, 22: 467-71.
- Matarazzo, V., L. Caccialupi, F. Schaller, Y. Shvarev, N. Kourdougli, A. Bertoni, C. Menuet, N. Voituren, E. Deneris, P. Gaspar, L. Bezin, P. Durbec, G. Hilaire, and F. Muscatelli. 2017. 'Necdin shapes serotonergic development and SERT activity modulating breathing in a mouse model for Prader-Willi syndrome', *Elife*, 6.
- Matott, M. P., and D. D. Kline. 2016. 'Activation of 5-hydroxytryptamine 7 receptors within the rat nucleus tractus solitarius modulates synaptic properties', *Brain Res*, 1635: 12-26.
- Matsuo, K., K. M. Hiimae, M. Gonzalez-Fernandez, and J. B. Palmer. 2008. 'Respiration during feeding on solid food: alterations in breathing during mastication, pharyngeal bolus aggregation, and swallowing', *J Appl Physiol (1985)*, 104: 674-81.
- Matsuo, K., and J. B. Palmer. 2009. 'Coordination of Mastication, Swallowing and Breathing', *Jpn Dent Sci Rev*, 45: 31-40.
- Matsuo, K., and J. B. Palmer. 2015. 'Coordination of oro-pharyngeal food transport during chewing and respiratory phase', *Physiol Behav*, 142: 52-6.
- Maynard, T. M., I. E. Zohn, S. A. Moody, and A. S. LaMantia. 2020. 'Suckling, Feeding, and Swallowing: Behaviors, Circuits, and Targets for Neurodevelopmental Pathology', *Annu Rev Neurosci*, 43: 315-36.
- McClellan, A. D., G. D. Brown, and P. A. Getting. 1994. 'Modulation of swimming in Tritonia: excitatory and inhibitory effects of serotonin', *J Comp Physiol A*, 174: 257-66.
- McConnel, F. M. 1988. 'Analysis of pressure generation and bolus transit during pharyngeal swallowing', *Laryngoscope*, 98: 71-8.
- McCorvy, J. D., and B. L. Roth. 2015. 'Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors', *Pharmacol Ther*, 150: 129-42.
- McDavid, S., J. P. Lund, F. Auclair, and A. Kolta. 2006. 'Morphological and immunohistochemical characterization of interneurons within the rat trigeminal motor nucleus', *Neuroscience*, 139: 1049-59.
- McFarland, D. H., and J. P. Lund. 1995. 'Modification of mastication and respiration during swallowing in the adult human', *J Neurophysiol*, 74: 1509-17.
- McGrath, J. M., and A. V. Braescu. 2004. 'State of the science: feeding readiness in the preterm infant', *J Perinat Neonatal Nurs*, 18: 353-68; quiz 69-70.
- McLean, D. L., M. A. Masino, I. Y. Koh, W. B. Lindquist, and J. R. Fetcho. 2008. 'Continuous shifts in the active set of spinal interneurons during changes in locomotor speed', *Nat Neurosci*, 11: 1419-29.

- Mellen, N. M., and D. Mishra. 2010. 'Functional anatomical evidence for respiratory rhythmogenic function of endogenous bursters in rat medulla', *J Neurosci*, 30: 8383-92.
- Mendelsohn, A. H., A. Deconde, H. W. Lambert, S. C. Dodson, B. T. Daney, M. E. Stark, G. S. Berke, and J. J. Wisco. 2011. 'Cervical variations of the phrenic nerve', *Laryngoscope*, 121: 1920-3.
- Menetrey, D., and A. I. Basbaum. 1987. 'Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation', *J Comp Neurol*, 255: 439-50.
- Meyer-Lindenberg, A., G. Domes, P. Kirsch, and M. Heinrichs. 2011. 'Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine', *Nat Rev Neurosci*, 12: 524-38.
- Meyrand, P., J. Simmers, and M. Moulins. 1994. 'Dynamic construction of a neural network from multiple pattern generators in the lobster stomatogastric nervous system', *J Neurosci*, 14: 630-44.
- Meziane, H., F. Schaller, S. Bauer, C. Villard, V. Matarazzo, F. Riet, G. Guillon, D. Lafitte, M. G. Desarmenien, M. Tauber, and F. Muscatelli. 2015. 'An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for Magel2, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism', *Biol Psychiatry*, 78: 85-94.
- Milano, S., L. Grelot, A. L. Bianchi, and S. Iscoe. 1992. 'Discharge patterns of phrenic motoneurons during fictive coughing and vomiting in decerebrate cats', *J Appl Physiol* (1985), 73: 1626-36.
- Miles, A., I. S. Zeng, H. McLauchlan, and M. L. Huckabee. 2013. 'Cough reflex testing in Dysphagia following stroke: a randomized controlled trial', *J Clin Med Res*, 5: 222-33.
- Miller, A. J. 1982. 'Deglutition', *Physiol Rev*, 62: 129-84.
- Miller, J. L., B. C. Sonies, and C. Macedonia. 2003. 'Emergence of oropharyngeal, laryngeal and swallowing activity in the developing fetal upper aerodigestive tract: an ultrasound evaluation', *Early Hum Dev*, 71: 61-87.
- Miller, J. L., J. Cheng, and C. Macedonia. 2005. 'A three-dimensional examination of aerodigestive development in the living, human fetus: prenatal perspectives on emerging oral, digestive and respiratory function', *Dysphagia*.
- Miller, N. 2013. 'Oropharyngeal dysphagia in an elderly post-operative hip fracture population', *Age Ageing*, 42: 679-81.
- Miller, N. 2017. 'Swallowing in Parkinson's disease: clinical issues and management', *Neurodegener Dis Manag*, 7: 205-17.
- Miller, P. W., and J. Dunkel. 2020. 'Gait-optimized locomotion of wave-driven soft sheets', *Soft Matter*, 16: 3991-99.
- Min, R., and T. Nevian. 2012. 'Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses', *Nat Neurosci*, 15: 746-53.
- Minnich, D. J., and D. J. Mathisen. 2007. 'Anatomy of the trachea, carina, and bronchi', *Thorac Surg Clin*, 17: 571-85.
- Molkov, Y. I., D. B. Zoccal, D. M. Baekey, A. P. Abdala, B. H. Machado, T. E. Dick, J. F. Paton, and I. A. Rybak. 2014. 'Physiological and pathophysiological interactions between the respiratory central pattern generator and the sympathetic nervous system', *Prog Brain Res*, 212: 1-23.
- Molkov, Y. I., J. E. Rubin, I. A. Rybak, and J. C. Smith. 2017. 'Computational models of the neural control of breathing', *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 9.
- Monnier, A., G. F. Alheid, and D. R. McCrimmon. 2003. 'Defining ventral medullary respiratory compartments with a glutamate receptor agonist in the rat', *J Physiol*, 548: 859-74.

- Morgado-Valle, C., S. M. Baca, and J. L. Feldman. 2010. 'Glycinergic pacemaker neurons in preBotzinger complex of neonatal mouse', *J Neurosci*, 30: 3634-9.
- Morgado-Valle, C., and L. Beltran-Parrazal. 2017. 'Respiratory Rhythm Generation: The Whole Is Greater Than the Sum of the Parts', *Adv Exp Med Biol*, 1015: 147-61.
- Morin, D., R. Monteau, and G. Hilaire. 1992. 'Compared effects of serotonin on cervical and hypoglossal inspiratory activities: an in vitro study in the newborn rat', *J Physiol*, 451: 605-29.
- Morin, D., and D. Viala. 2002. 'Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs', *J Neurosci*, 22: 4756-65.
- Morquette, P., R. Lavoie, M. D. Fhima, X. Lamoureux, D. Verdier, and A. Kolta. 2012. 'Generation of the masticatory central pattern and its modulation by sensory feedback', *Prog Neurobiol*, 96: 340-55.
- Mortimer, J. Thomas, and Narendra Bhadra. 'PERIPHERAL NERVE AND MUSCLE STIMULATION.' in, *Neuroprosthetics*.
- Morton, D. W., and H. J. Chiel. 1994. 'Neural architectures for adaptive behavior', *Trends Neurosci*, 17: 413-20.
- Mosier, K., and I. Bereznaya. 2001. 'Parallel cortical networks for volitional control of swallowing in humans', *Exp Brain Res*, 140: 280-9.
- Mulkey, D. K., D. L. Rosin, G. West, A. C. Takakura, T. S. Moreira, D. A. Bayliss, and P. G. Guyenet. 2007. 'Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism', *J Neurosci*, 27: 14128-38.
- Mulloney, B., L. D. Acevedo, and A. G. Bradbury. 1987. 'Modulation of the crayfish swimmeret rhythm by octopamine and the neuropeptide proctolin', *J Neurophysiol*, 58: 584-97.
- Mulloney, B. 2003. 'During fictive locomotion, graded synaptic currents drive bursts of impulses in swimmeret motor neurons', *J Neurosci*, 23: 5953-62.
- Muscattelli, F., and S. G. Bouret. 2018. 'Wired for eating: how is an active feeding circuitry established in the postnatal brain?', *Curr Opin Neurobiol*, 52: 165-71.
- Muscattelli, F., M. G. Desarmenien, V. Matarazzo, and V. Grinevich. 2018. 'Oxytocin Signaling in the Early Life of Mammals: Link to Neurodevelopmental Disorders Associated with ASD', *Curr Top Behav Neurosci*, 35: 239-68.
- Nagahiro, S., S. Goto, S. Yoshioka, and Y. Ushio. 1993. 'Dissecting aneurysm of the posterior inferior cerebellar artery: case report', *Neurosurgery*, 33: 739-41; discussion 41-2.
- Nair, J., T. Bezudnaya, L. V. Zholudeva, M. R. Detloff, P. J. Reier, M. A. Lane, and D. D. Fuller. 2017a. 'Histological identification of phrenic afferent projections to the spinal cord', *Respir Physiol Neurobiol*, 236: 57-68.
- Nair, J., K. A. Streeter, S. M. F. Turner, M. D. Sunshine, D. C. Bolser, E. J. Fox, P. W. Davenport, and D. D. Fuller. 2017b. 'Anatomy and physiology of phrenic afferent neurons', *J Neurophysiol*, 118: 2975-90.
- Nakajima, M. 1999. '[Brainstem segmental arrangement of sucking rhythm generators for trigeminal, facial and hypoglossal motoneurons]', *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 66: 88-97.
- Nakamura, Y., N. Katakura, M. Nakajima, and J. Liu. 2004. 'Rhythm generation for food-ingestive movements', *Prog Brain Res*, 143: 97-103.
- Nashef, L., and J. W. Sander. 1996. 'Sudden unexpected deaths in epilepsy--where are we now?', *Seizure*, 5: 235-8.
- Nashef, L., N. Hindocha, and A. Makoff. 2007. 'Risk factors in sudden death in epilepsy (SUDEP): the quest for mechanisms', *Epilepsia*, 48: 859-71.
- Niebert, M., S. Vogelgesang, U. R. Koch, A. M. Bischoff, M. Kron, N. Bock, and T. Manzke. 2011. 'Expression and function of serotonin 2A and 2B receptors in the mammalian respiratory network', *PLoS One*, 6: e21395.

- Nishino, T., T. Yonezawa, and Y. Honda. 1985. 'Effects of swallowing on the pattern of continuous respiration in human adults', *Am Rev Respir Dis*, 132: 1219-22.
- Nishino, T., and K. Hiraga. 1991. 'Coordination of swallowing and respiration in unconscious subjects', *J Appl Physiol (1985)*, 70: 988-93.
- Nishino, T. 1993. 'Swallowing as a protective reflex for the upper respiratory tract', *Anesthesiology*, 79: 588-601.
- Nishino, T. 2012. 'The swallowing reflex and its significance as an airway defensive reflex', *Front Physiol*, 3: 489.
- Noller, C. M., Y. A. Levine, T. M. Urakov, J. P. Aronson, and M. S. Nash. 2019. 'Vagus Nerve Stimulation in Rodent Models: An Overview of Technical Considerations', *Front Neurosci*, 13: 911.
- Northcutt, A. J., and D. J. Schulz. 2020. 'Molecular mechanisms of homeostatic plasticity in central pattern generator networks', *Dev Neurobiol*, 80: 58-69.
- Nosjean, A., J. C. Callera, L. Bonagamba, B. Machado, M. Hamon, and R. Laguzzi. 2002. 'Serotonin(3) receptor stimulation in the nucleus tractus solitarii activates non-catecholaminergic neurons in the rat ventrolateral medulla', *Neuroscience*, 112: 935-49.
- Nunez-Abades, P. A., A. M. Morillo, and R. Pasaro. 1993. 'Brainstem connections of the rat ventral respiratory subgroups: afferent projections', *J Auton Nerv Syst*, 42: 99-118.
- Nusbaum, M. P., and E. Marder. 1989a. 'A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). II. State-dependent modulation of rhythmic motor activity', *J Neurosci*, 9: 1600-7.
- Nusbaum, M. P., and E. Marder. 1989b. 'A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). I. Identification and characterization', *J Neurosci*, 9: 1591-9.
- Ogasa, T., A. D. Ray, C. P. Michlin, G. A. Farkas, B. J. Grant, and U. J. Magalang. 2004. 'Systemic administration of serotonin 2A/2C agonist improves upper airway stability in Zucker rats', *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 804-10.
- Ojeda, D., V. Le Rolle, H. M. Romero-Ugalde, C. Gallet, J. L. Bonnet, C. Henry, A. Bel, P. Mabo, G. Carrault, and A. I. Hernandez. 2016. 'Sensitivity Analysis of Vagus Nerve Stimulation Parameters on Acute Cardiac Autonomic Responses: Chronotropic, Inotropic and Dromotropic Effects', *PLoS One*, 11: e0163734.
- Oka, A., M. Yamamoto, R. Takeda, H. Ohara, F. Sato, F. Akhter, T. Haque, T. Kato, B. J. Sessle, K. Takada, and A. Yoshida. 2013. 'Jaw-opening and -closing premotoneurons in the nucleus of the solitary tract making contacts with laryngeal and pharyngeal afferent terminals in rats', *Brain Res*, 1540: 48-63.
- Okabe, S., M. Mackiewicz, and L. Kubin. 1997. 'Serotonin receptor mRNA expression in the hypoglossal motor nucleus', *Respir Physiol*, 110: 151-60.
- Oku, Y., I. Tanaka, and K. Ezure. 1994. 'Activity of bulbar respiratory neurons during fictive coughing and swallowing in the decerebrate cat', *J Physiol*, 480 (Pt 2): 309-24.
- Omari, T. I., E. Dejaeger, J. Tack, D. Vanbeekevoort, and N. Rommel. 2012. 'An impedance-manometry based method for non-radiological detection of pharyngeal postswallow residue', *Neurogastroenterol Motil*, 24: e277-84.
- Omari, T. I., S. Kritas, C. Cock, L. Besanko, C. Burgstad, A. Thompson, N. Rommel, R. Heddle, and R. J. Fraser. 2014. 'Swallowing dysfunction in healthy older people using pharyngeal pressure-flow analysis', *Neurogastroenterol Motil*, 26: 59-68.
- Omari, T. I., M. M. Szczesniak, J. Maclean, J. C. Myers, N. Rommel, C. Cock, and I. J. Cook. 2016. 'Correlation of esophageal pressure-flow analysis findings with bolus transit patterns on videofluoroscopy', *Dis Esophagus*, 29: 166-73.
- Onimaru, H., A. Arata, and I. Homma. 1987. 'Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats', *Neurosci Lett*, 78: 151-5.

- Onimaru, H., A. Arata, and I. Homma. 1988. 'Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat', *Brain Res*, 445: 314-24.
- Onimaru, H., A. Arata, and I. Homma. 1989. 'Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla in vitro', *Exp Brain Res*, 76: 530-6.
- Onimaru, H., K. Ballanyi, and I. Homma. 2003. 'Contribution of Ca^{2+} -dependent conductances to membrane potential fluctuations of medullary respiratory neurons of newborn rats in vitro', *J Physiol*, 552: 727-41.
- Onimaru, H., and I. Homma. 2003. 'A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla', *J Neurosci*, 23: 1478-86.
- Onimaru, H., Y. Kumagawa, and I. Homma. 2006. 'Respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats', *J Neurophysiol*, 96: 55-61.
- Onimaru, H., K. Ikeda, and K. Kawakami. 2009. 'Phox2b, RTN/pFRG neurons and respiratory rhythmogenesis', *Respir Physiol Neurobiol*, 168: 13-8.
- Ono, T., Y. Ishiwata, N. Inaba, T. Kuroda, and Y. Nakamura. 1998. 'Modulation of the inspiratory-related activity of hypoglossal premotor neurons during ingestion and rejection in the decerebrate cat', *J Neurophysiol*, 80: 48-58.
- Orem, J., and L. Kubin. 2000. 'Respiratory physiology: central neural control', *Principles and Practice of Sleep Medicine*. 3rd ed. : 205–20.
- Ota, R., K. Takakusaki, A. Katada, H. Harada, S. Nonaka, and Y. Harabuchi. 2013. 'Contribution of the lateral lemniscus to the control of swallowing in decerebrate cats', *Neuroscience*, 254: 260-74.
- Otopalik, A. G., M. L. Goeritz, A. C. Sutton, T. Brookings, C. Guerini, and E. Marder. 2017. 'Sloppy morphological tuning in identified neurons of the crustacean stomatogastric ganglion', *Elife*, 6.
- Ottestad, E., and D. S. Orlovich. 2020. 'History of Peripheral Nerve Stimulation-Update for the 21st Century', *Pain Med*, 21: S3-S5.
- Ouahchi, Y., N. Bon-Mardion, J. P. Marie, and E. Verin. 2011. 'Involvement of the aerodigestive tract in swallowing-ventilation coordination: an animal study', *Neurogastroenterol Motil*, 23: e136-40.
- Oueghlani, Z., L. Juvin, F. M. Lambert, L. Cardoit, G. Courtand, F. Masméjean, J. R. Cazalets, and G. Barriere. 2020. 'Serotonergic modulation of sacral dorsal root stimulation-induced locomotor output in newborn rat', *Neuropharmacology*, 170: 107815.
- Pagliardini, S., J. Ren, P. A. Gray, C. Vandunk, M. Gross, M. Goulding, and J. J. Greer. 2008. 'Central respiratory rhythmogenesis is abnormal in *lhx1*- deficient mice', *J Neurosci*, 28: 11030-41.
- Pagliardini, S., W. A. Janczewski, W. Tan, C. T. Dickson, K. Deisseroth, and J. L. Feldman. 2011. 'Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats', *J Neurosci*, 31: 2895-905.
- Paine, P. A., S. Hamdy, X. Chitnis, L. J. Gregory, V. Giampietro, M. Brammer, S. Williams, and Q. Aziz. 2008. 'Modulation of activity in swallowing motor cortex following esophageal acidification: a functional magnetic resonance imaging study', *Dysphagia*, 23: 146-54.
- Palmer, J. B. 1998. 'Bolus aggregation in the oropharynx does not depend on gravity', *Arch Phys Med Rehabil*, 79: 691-6.
- Palmer, J. B., and K. M. Hiimae. 2003. 'Eating and breathing: interactions between respiration and feeding on solid food', *Dysphagia*, 18: 169-78.

- Panaiteescu, B., A. Ruangittisakul, and K. Ballanyi. 2009. 'Silencing by raised extracellular Ca^{2+} of pre-Botzinger complex neurons in newborn rat brainstem slices without change of membrane potential or input resistance', *Neurosci Lett*, 456: 25-9.
- Panara, K., E. Ramezanpour Ahangar, and D. Padalia. 2022. 'Physiology, Swallowing.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Panebianco, M., C. Zavanone, S. Dupont, D. A. Restivo, and A. Pavone. 2016. 'Vagus nerve stimulation therapy in partial epilepsy: a review', *Acta Neurol Belg*, 116: 241-8.
- Panneton, W. M., P. F. McCulloch, and W. Sun. 2000. 'Trigemino-autonomic connections in the muskrat: the neural substrate for the diving response', *Brain Res*, 874: 48-65.
- Papas, S., and A. V. Ferguson. 1990. 'Electrophysiological characterization of reciprocal connections between the parabrachial nucleus and the area postrema in the rat', *Brain Res Bull*, 24: 577-82.
- Paraskevas, G., K. Koutsouflianiotis, P. Kitsoulis, and I. Spyridakis. 2016. 'Abnormal Origin and Course of the Accessory Phrenic Nerve: Case Report', *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 59: 70-1.
- Pastrana, Erika. 2011. 'Optogenetics: controlling cell function with light', *Nature Methods*, 8: 24-25.
- Paterson, D. S., and R. Darnall. 2009. '5-HT_{2A} receptors are concentrated in regions of the human infant medulla involved in respiratory and autonomic control', *Auton Neurosci*, 147: 48-55.
- Paton, J. F. 1996. 'A working heart-brainstem preparation of the mouse', *J Neurosci Methods*, 65: 63-8.
- Paton, J. F., Y. W. Li, and S. Kasparov. 1999. 'Reflex response and convergence of pharyngoesophageal and peripheral chemoreceptors in the nucleus of the solitary tract', *Neuroscience*, 93: 143-54.
- Pauliukonis, A. C., C. Buenaventura, M. A. Cline, and E. R. Gilbert. 2020. 'Anorexigenic effects of substance P in *Coturnix japonica*', *Neuropeptides*, 81: 102045.
- Paxinos, G., and C. Watson. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).
- Paydarfar, D., and D. M. Buerkel. 1995. 'Dysrhythmias of the respiratory oscillator', *Chaos*, 5: 18-29.
- Pearson, S. A., A. Mouihate, Q. J. Pittman, and P. J. Whelan. 2003. 'Peptidergic activation of locomotor pattern generators in the neonatal spinal cord', *J Neurosci*, 23: 10154-63.
- Pearson, W. G., Jr., S. E. Langmore, and A. C. Zumwalt. 2011. 'Evaluating the structural properties of suprahyoid muscles and their potential for moving the hyoid', *Dysphagia*, 26: 345-51.
- Pearson, W. G., Jr., S. E. Langmore, L. B. Yu, and A. C. Zumwalt. 2012. 'Structural analysis of muscles elevating the hyolaryngeal complex', *Dysphagia*, 27: 445-51.
- Peck, J. H., E. Gaier, E. Stevens, S. Repicky, and R. M. Harris-Warrick. 2006. 'Amine modulation of I_h in a small neural network', *J Neurophysiol*, 96: 2931-40.
- Pehlivan, M., N. Yuceyar, C. Ertekin, G. Celebi, M. Ertas, T. Kalayci, and I. Aydogdu. 1996. 'An electronic device measuring the frequency of spontaneous swallowing: digital phagometer', *Dysphagia*, 11: 259-64.
- Pena, F., M. A. Parkis, A. K. Tryba, and J. M. Ramirez. 2004. 'Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia', *Neuron*, 43: 105-17.
- Peng, C. L., P. G. Jost-Brinkmann, R. R. Miethke, and C. T. Lin. 2000. 'Ultrasonographic measurement of tongue movement during swallowing', *J Ultrasound Med*, 19: 15-20.

- Perlman, Adrienne L. 1997. 'Deglutition and its disorders, Anatomy, physiology, clinical diagnosis, and management', *Topography and Functional Anatomy of the swallowing Structures*, 18.
- Peroutka, S. J. 1986. 'Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex', *J Neurochem*, 47: 529-40.
- Petrikovsky, B. M., G. P. Kaplan, and H. Pestrak. 1995. 'The application of color Doppler technology to the study of fetal swallowing', *Obstet Gynecol*, 86: 605-8.
- Peyreigne, P. 2019. 'Perception de la déglutition infantile par les chirurgiens-dentistes', Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Pfeffer, C. K., V. Stein, D. J. Keating, H. Maier, I. Rinke, Y. Rudhard, M. Hentschke, G. M. Rune, T. J. Jentsch, and C. A. Hubner. 2009. 'NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development', *J Neurosci*, 29: 3419-30.
- Phillips, R. S., T. T. John, H. Koizumi, Y. I. Molkov, and J. C. Smith. 2019. 'Biophysical mechanisms in the mammalian respiratory oscillator re-examined with a new data-driven computational model', *Elife*, 8.
- Pickering, A. E., D. Spanswick, and S. D. Logan. 1994. '5-Hydroxytryptamine evokes depolarizations and membrane potential oscillations in rat sympathetic preganglionic neurones', *J Physiol*, 480 (Pt 1): 109-21.
- Pietrobon, D., and M. A. Moskowitz. 2014. 'Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations', *Nat Rev Neurosci*, 15: 379-93.
- Pitts, T., M. J. Rose, A. N. Mortensen, I. Poliaček, C. M. Sapienza, B. G. Lindsey, K. F. Morris, P. W. Davenport, and D. C. Bolser. 2013. 'Coordination of cough and swallow: a meta-behavioral response to aspiration', *Respir Physiol Neurobiol*, 189: 543-51.
- Pitts, T., M. J. Rose, I. Poliaček, J. Condrey, P. W. Davenport, and D. C. Bolser. 2015. 'Effect of laparotomy on the swallow-breathing relationship in the cat', *Lung*, 193: 129-33.
- Pitts, T., I. Poliaček, M. J. Rose, M. D. Reed, J. A. Condrey, H. W. Tsai, G. Zhou, P. W. Davenport, and D. C. Bolser. 2018. 'Neurons in the dorsomedial medulla contribute to swallow pattern generation: Evidence of inspiratory activity during swallow', *PLoS One*, 13: e0199903.
- Poliaček, I., J. Jakus, M. Simera, M. Veternik, and J. Plevkova. 2014. 'Control of coughing by medullary raphe', *Prog Brain Res*, 212: 277-95.
- Prestori, F., I. Montagna, E. D'Angelo, and L. Mapelli. 2020. 'The Optogenetic Revolution in Cerebellar Investigations', *Int J Mol Sci*, 21.
- Price, C. J., and J. I. Goldberg. 1993. 'Serotonin activation of a cyclic AMP-dependent sodium current in an identified neuron from *Helisoma trivolvis*', *J Neurosci*, 13: 4979-87.
- Quigley, K. S., M. M. Myers, and H. N. Shair. 2005. 'Development of the baroreflex in the young rat', *Auton Neurosci*, 121: 26-32.
- Quinlan, M. F., S. D. Salman, D. L. Swift, H. N. Wagner, Jr., and D. F. Proctor. 1969. 'Measurement of mucociliary function in man', *Am Rev Respir Dis*, 99: 13-23.
- Ramirez, J. M., and K. G. Pearson. 1988. 'Generation of motor patterns for walking and flight in motoneurons supplying bifunctional muscles in the locust', *J Neurobiol*, 19: 257-82.
- Ramirez, J. M. 1998. 'Reconfiguration of the respiratory network at the onset of locust flight', *J Neurophysiol*, 80: 3137-47.
- Ramirez, J. M., A. K. Tryba, and F. Pena. 2004. 'Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view', *Curr Opin Neurobiol*, 14: 665-74.
- Ramirez, J. M., and N. A. Baertsch. 2018. 'The Dynamic Basis of Respiratory Rhythm Generation: One Breath at a Time', *Annu Rev Neurosci*, 41: 475-99.

- Rangarathnam, B., E. Kamarunas, and G. H. McCullough. 2014. 'Role of cerebellum in deglutition and deglutition disorders', *Cerebellum*, 13: 767-76.
- Ravich, W. J. 1995. 'The unrealized potential of pharyngeal manometry', *Dysphagia*, 10: 42-3.
- Reix, P., C. Duvareille, P. Letourneau, M. Pouliot, N. Samson, T. Niyonsenga, and J. P. Praud. 2006. 'C-fiber blockade influence on non-nutritive swallowing in full-term lambs', *Respir Physiol Neurobiol*, 152: 27-35.
- Reix, P., M. St-Hilaire, and J. P. Praud. 2007. 'Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside', *Pediatr Pulmonol*, 42: 674-82.
- Rekling, J. C., and J. L. Feldman. 1998. 'PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation', *Annu Rev Physiol*, 60: 385-405.
- Rekling, J. C., G. D. Funk, D. A. Bayliss, X. W. Dong, and J. L. Feldman. 2000. 'Synaptic control of motoneuronal excitability', *Physiol Rev*, 80: 767-852.
- Ren, J., and J. J. Greer. 2006. 'Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period', *J Physiol*, 574: 535-46.
- Renn, C. L., L. Lin, S. Thomas, and S. G. Dorsey. 2006. 'Full-length tropomyosin-related kinase B expression in the brainstem in response to persistent inflammatory pain', *Neuroreport*, 17: 1175-9.
- Revesz, D., B. Rydenhag, and E. Ben-Menachem. 2016. 'Complications and safety of vagus nerve stimulation: 25 years of experience at a single center', *J Neurosurg Pediatr*, 18: 97-104.
- Richardson, C. A., and R. A. Mitchell. 1982. 'Power spectral analysis of inspiratory nerve activity in the decerebrate cat', *Brain Res*, 233: 317-36.
- Richter, D. W. 1982. 'Generation and maintenance of the respiratory rhythm', *J Exp Biol*, 100: 93-107.
- Richter, D. W., D. Ballantyne, and J. E. Remmers. 1986. 'How Is the Respiratory Rhythm Generated? A Model', *Physiology*, 1: 109-12.
- Rigatto, H. 1992. 'Maturation of breathing', *Clin Perinatol*, 19: 739-56.
- Rijkers, K., M. W. Berfelo, E. M. Cornips, and H. J. Majoie. 2008. 'Hardware failure in vagus nerve stimulation therapy', *Acta Neurochir (Wien)*, 150: 403-5.
- Rinaman, L. 1998. 'Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats', *J Comp Neurol*, 399: 101-9.
- Rizvi, S., C. J. Wehrle, and M. A. Law. 2022. 'Anatomy, Thorax, Mediastinum Superior and Great Vessels.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Robbins, J., R. L. Levine, A. Maser, J. C. Rosenbek, and G. B. Kempster. 1993. 'Swallowing after unilateral stroke of the cerebral cortex', *Arch Phys Med Rehabil*, 74: 1295-300.
- Roberge, S., N. Samson, S. Dorion, D. Dorion, and J. P. Praud. 2007. 'Non-nutritive swallowing and respiration coordination among states of alertness in adult sheep', *J Otolaryngol*, 36: 140-7.
- Roda, F., C. Gestreau, and A. L. Bianchi. 2002. 'Discharge patterns of hypoglossal motoneurons during fictive breathing, coughing, and swallowing', *J Neurophysiol*, 87: 1703-11.
- Roda, F., J. Pio, A. L. Bianchi, and C. Gestreau. 2004. 'Effects of anesthetics on hypoglossal nerve discharge and c-Fos expression in brainstem hypoglossal premotor neurons', *J Comp Neurol*, 468: 571-86.
- Rodger, Damien C., Andy J. Fong, Wen Li, Hossein Ameri, Ashish K. Ahuja, Christian Gutierrez, Igor Lavrov, Hui Zhong, Parvathy R. Menon, Ellis Meng, Joel W. Burdick, Roland R. Roy, V. Reggie Edgerton, James D. Weiland, Mark S. Humayun, and Yu-Chong Tai. 2008. 'Flexible parylene-based multielectrode array technology for high-

- density neural stimulation and recording', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132: 449-60.
- Rodrigo, J., J. M. Polak, L. Fernandez, M. A. Ghatei, P. Mulderry, and S. R. Bloom. 1985. 'Calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory and motor nerves of the rat, cat, and monkey esophagus', *Gastroenterology*, 88: 444-51.
- Rofes, L., V. Arreola, M. Romea, E. Palomera, J. Almirall, M. Cabre, M. Serra-Prat, and P. Clave. 2010. 'Pathophysiology of oropharyngeal dysphagia in the frail elderly', *Neurogastroenterol Motil*, 22: 851-8, e230.
- Rose, M. F., J. Ren, K. A. Ahmad, H. T. Chao, T. J. Klisch, A. Flora, J. J. Greer, and H. Y. Zoghbi. 2009. 'Math1 is essential for the development of hindbrain neurons critical for perinatal breathing', *Neuron*, 64: 341-54.
- Roseberry, T. K., A. M. Lee, A. L. Lalive, L. Wilbrecht, A. Bonci, and A. C. Kreitzer. 2016. 'Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia', *Cell*, 164: 526-37.
- Rosin, D. L., D. A. Chang, and P. G. Guyenet. 2006. 'Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus', *J Comp Neurol*, 499: 64-89.
- Ross, M. G., and M. J. Nijland. 1998. 'Development of ingestive behavior', *Am J Physiol*, 274: R879-93.
- Roth, B. L., T. Nakaki, D. M. Chuang, and E. Costa. 1984. 'Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover', *Neuropharmacology*, 23: 1223-5.
- Roth, B. L., S. A. Berry, W. K. Kroeze, D. L. Willins, and K. Kristiansen. 1998. 'Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation', *Crit Rev Neurobiol*, 12: 319-38.
- Round, A., and D. I. Wallis. 1987. 'Further studies on the blockade of 5-HT depolarizations of rabbit vagal afferent and sympathetic ganglion cells by MDL 72222 and other antagonists', *Neuropharmacology*, 26: 39-48.
- Roux, E. 2002. '[Origin and evolution of the respiratory tract in vertebrates]', *Rev Mal Respir*, 19: 601-15.
- Rowe, L. M., N. P. Connor, and J. A. Russell. 2021. 'Respiratory-swallow coordination in a rat model of chemoradiation', *Head Neck*, 43: 2954-66.
- Rubin, J. E., J. A. Hayes, J. L. Mendenhall, and C. A. Del Negro. 2009. 'Calcium-activated nonspecific cation current and synaptic depression promote network-dependent burst oscillations', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 2939-44.
- Rudney, J. D., Z. Ji, and C. J. Larson. 1995. 'The prediction of saliva swallowing frequency in humans from estimates of salivary flow rate and the volume of saliva swallowed', *Arch Oral Biol*, 40: 507-12.
- Rybak, I. A., R. O'Connor, A. Ross, N. A. Shevtsova, S. C. Nuding, L. S. Segers, R. Shannon, T. E. Dick, W. L. Dunin-Barkowski, J. M. Orem, I. C. Solomon, K. F. Morris, and B. G. Lindsey. 2008. 'Reconfiguration of the pontomedullary respiratory network: a computational modeling study with coordinated in vivo experiments', *J Neurophysiol*, 100: 1770-99.
- Rybak, I. A., Y. I. Molkov, P. E. Jasinski, N. A. Shevtsova, and J. C. Smith. 2014. 'Rhythmic bursting in the pre-Botzinger complex: mechanisms and models', *Prog Brain Res*, 209: 1-23.
- Rychlicki, F., N. Zamponi, E. Cesaroni, L. Corpaci, R. Trignani, A. Ducati, and M. Scerrati. 2006. 'Complications of vagal nerve stimulation for epilepsy in children', *Neurosurg Rev*, 29: 103-7.

- Ryvlin, P., E. L. So, C. M. Gordon, D. C. Hesdorffer, M. R. Sperling, O. Devinsky, M. T. Bunker, B. Olin, and D. Friedman. 2018. 'Long-term surveillance of SUDEP in drug-resistant epilepsy patients treated with VNS therapy', *Epilepsia*, 59: 562-72.
- Ryvlin, P., S. Rheims, and S. D. Lhatoo. 2019. 'Risks and predictive biomarkers of sudden unexpected death in epilepsy patient', *Curr Opin Neurol*, 32: 205-12.
- Saito, Y., I. Tanaka, and K. Ezure. 2002. 'Morphology of the decrementing expiratory neurons in the brainstem of the rat', *Neurosci Res*, 44: 141-53.
- Saito, Y., K. Ezure, I. Tanaka, and M. Osawa. 2003. 'Activity of neurons in ventrolateral respiratory groups during swallowing in decerebrate rats', *Brain Dev*, 25: 338-45.
- Sakamoto, Y. 2014. 'Gross anatomical observations of attachments of the middle pharyngeal constrictor', *Clin Anat*, 27: 603-9.
- Sameroff, A. J. 1968. 'The components of sucking in the human newborn', *J Exp Child Psychol*, 6: 607-23.
- Samson, N., M. St-Hilaire, E. Nsegbe, P. Reix, F. Moreau-Bussiere, and J. P. Praud. 2005. 'Effect of nasal continuous or intermittent positive airway pressure on nonnutritive swallowing in the newborn lamb', *J Appl Physiol (1985)*, 99: 1636-42.
- Samson, N., B. Roy, A. Ouimet, F. Moreau-Bussiere, D. Dorion, S. Mayer, and J. P. Praud. 2008. 'Origins of the inhibiting effects of nasal CPAP on nonnutritive swallowing in newborn lambs', *J Appl Physiol (1985)*, 105: 1083-90.
- Sasegbon, A., and S. Hamdy. 2017. 'The anatomy and physiology of normal and abnormal swallowing in oropharyngeal dysphagia', *Neurogastroenterol Motil*, 29.
- Sato, K., and T. Nakashima. 2006. 'Human adult deglutition during sleep', *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 115: 334-9.
- Sato, K., and T. Nakashima. 2009. 'Sleep-related deglutition in patients with sleep apnea-hypopnea syndrome', *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 118: 30-6.
- Sato, M., H. Tohara, T. Iida, S. Wada, M. Inoue, and K. Ueda. 2012. 'Simplified cough test for screening silent aspiration', *Arch Phys Med Rehabil*, 93: 1982-6.
- Savoirdo, M., M. Bracchi, A. Passerini, and A. Visciani. 1987. 'The vascular territories in the cerebellum and brainstem: CT and MR study', *AJNR Am J Neuroradiol*, 8: 199-209.
- Schaller, F., F. Watrin, R. Sturny, A. Massacrier, P. Szepetowski, and F. Muscatelli. 2010. 'A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted *Magel2* gene', *Hum Mol Genet*, 19: 4895-905.
- Scheffer, H., E. R. Brunt, G. J. Mol, P. van der Vlies, R. P. Stulp, E. Verlind, G. Mantel, Y. N. Averyanov, R. M. Hofstra, and C. H. Buys. 1998. 'Three novel *KCNA1* mutations in episodic ataxia type I families', *Hum Genet*, 102: 464-6.
- Schmid, K., A. S. Foutz, and M. Denavit-Saubie. 1996. 'Inhibitions mediated by glycine and GABAA receptors shape the discharge pattern of bulbar respiratory neurons', *Brain Res*, 710: 150-60.
- Schoofs, A., S. Huckesfeld, S. Surendran, and M. J. Pankratz. 2014. 'Serotonergic pathways in the *Drosophila* larval enteric nervous system', *J Insect Physiol*, 69: 118-25.
- Schwarzacher, S. W., Z. Wilhelm, K. Anders, and D. W. Richter. 1991. 'The medullary respiratory network in the rat', *J Physiol*, 435: 631-44.
- Selley, W. G., F. C. Flack, R. E. Ellis, and W. A. Brooks. 1989. 'Respiratory patterns associated with swallowing: Part 1. The normal adult pattern and changes with age', *Age Ageing*, 18: 168-72.
- Shaker, R., W. J. Dodds, R. O. Dantas, W. J. Hogan, and R. C. Arndorfer. 1990. 'Coordination of deglutitive glottic closure with oropharyngeal swallowing', *Gastroenterology*, 98: 1478-84.
- Shaker, R., Q. Li, J. Ren, W. F. Townsend, W. J. Dodds, B. J. Martin, M. K. Kern, and A. Rynders. 1992. 'Coordination of deglutition and phases of respiration: effect of aging,

- tachypnea, bolus volume, and chronic obstructive pulmonary disease', *Am J Physiol*, 263: G750-5.
- Shaker, R. 2006. 'Reflex interaction of pharynx, esophagus, and airways', *GI Motility online*.
- Shannon, R., D. M. Baekey, K. F. Morris, and B. G. Lindsey. 1996. 'Brainstem respiratory networks and cough', *Pulm Pharmacol*, 9: 343-7.
- Shannon, R., D. M. Baekey, K. F. Morris, S. C. Nuding, L. S. Segers, and B. G. Lindsey. 2004. 'Pontine respiratory group neuron discharge is altered during fictive cough in the decerebrate cat', *Respir Physiol Neurobiol*, 142: 43-54.
- Shaw, D. W., I. J. Cook, M. Gabb, R. H. Holloway, M. E. Simula, V. Panagopoulos, and J. Dent. 1995. 'Influence of normal aging on oral-pharyngeal and upper esophageal sphincter function during swallowing', *Am J Physiol*, 268: G389-96.
- Shaw, S. M., and R. Martino. 2013. 'The normal swallow: muscular and neurophysiological control', *Otolaryngol Clin North Am*, 46: 937-56.
- Shen, F. M., J. Wang, C. R. Ni, J. G. Yu, W. Z. Wang, and D. F. Su. 2007. 'Ketanserin-induced baroreflex enhancement in spontaneously hypertensive rats depends on central 5-HT(2A) receptors', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34: 702-7.
- Shi, C., S. R. Flanagan, and U. Samadani. 2013. 'Vagus nerve stimulation to augment recovery from severe traumatic brain injury impeding consciousness: a prospective pilot clinical trial', *Neurol Res*, 35: 263-76.
- Shiba, K., I. Satoh, N. Kobayashi, and F. Hayashi. 1999. 'Multifunctional laryngeal motoneurons: an intracellular study in the cat', *J Neurosci*, 19: 2717-27.
- Shiba, K., K. Nakazawa, K. Ono, and T. Umezaki. 2007. 'Multifunctional laryngeal premotor neurons: their activities during breathing, coughing, sneezing, and swallowing', *J Neurosci*, 27: 5156-62.
- Shik, M. L., F. V. Severin, and G. N. Orlovskii. 1966. '[Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]', *Biofizika*, 11: 659-66.
- Shik, M. L., F. V. Severin, and G. N. Orlovsky. 1969. 'Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mesencephalon', *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 26: 549.
- Shulman, J. M., P. L. De Jager, and M. B. Feany. 2011. 'Parkinson's disease: genetics and pathogenesis', *Annu Rev Pathol*, 6: 193-222.
- Sills, M. A., B. B. Wolfe, and A. Frazer. 1984. 'Determination of selective and nonselective compounds for the 5-HT 1A and 5-HT 1B receptor subtypes in rat frontal cortex', *J Pharmacol Exp Ther*, 231: 480-7.
- Simakajornboon, N., and T. Kuptanon. 2005. 'Maturation changes in neuromodulation of central pathways underlying hypoxic ventilatory response', *Respir Physiol Neurobiol*, 149: 273-86.
- Simons, J. A. 2017. 'Swallowing Dysfunctions in Parkinson's Disease', *Int Rev Neurobiol*, 134: 1207-38.
- Siniaia, M. S., D. L. Young, and C. S. Poon. 2000. 'Habituation and desensitization of the Hering-Breuer reflex in rat', *J Physiol*, 523 Pt 2: 479-91.
- Skrapari, I., N. Tentolouris, and N. Katsilambros. 2006. 'Baroreflex function: determinants in healthy subjects and disturbances in diabetes, obesity and metabolic syndrome', *Curr Diabetes Rev*, 2: 329-38.
- Sladek, M., J. B. Groggaard, R. A. Parker, and H. W. Sundell. 1993. 'Prolonged hypoxemia enhances and acute hypoxemia attenuates laryngeal reflex apnea in young lambs', *Pediatr Res*, 34: 813-20.
- Slawinska, U., K. Miazga, and L. M. Jordan. 2014. '5-HT(2) and 5-HT(7) receptor agonists facilitate plantar stepping in chronic spinal rats through actions on different populations of spinal neurons', *Front Neural Circuits*, 8: 95.

- Slugg, R. M., and A. R. Light. 1994. 'Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin', *J Comp Neurol*, 339: 49-61.
- Smart, S. L., V. Lopantsev, C. L. Zhang, C. A. Robbins, H. Wang, S. Y. Chiu, P. A. Schwartzkroin, A. Messing, and B. L. Tempel. 1998. 'Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice', *Neuron*, 20: 809-19.
- Smith, J., N. Wolkove, A. Colacone, and H. Kreisman. 1989. 'Coordination of eating, drinking and breathing in adults', *Chest*, 96: 578-82.
- Smith, J. C., H. H. Ellenberger, K. Ballanyi, D. W. Richter, and J. L. Feldman. 1991. 'Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals', *Science*, 254: 726-9.
- Smith, J. C., R. J. Butera, N. Koshiya, C. Del Negro, C. G. Wilson, and S. M. Johnson. 2000. 'Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model', *Respir Physiol*, 122: 131-47.
- Smith, J. C., A. P. Abdala, H. Koizumi, I. A. Rybak, and J. F. Paton. 2007. 'Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms', *J Neurophysiol*, 98: 3370-87.
- Smith, J. C., A. P. Abdala, I. A. Rybak, and J. F. Paton. 2009. 'Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364: 2577-87.
- Smith, J. C., A. P. Abdala, A. Borgmann, I. A. Rybak, and J. F. Paton. 2013. 'Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits', *Trends Neurosci*, 36: 152-62.
- Smith, S. J. 1992. 'Do astrocytes process neural information?', *Prog Brain Res*, 94: 119-36.
- Smyth, M. D., R. S. Tubbs, E. M. Bebin, P. A. Grabb, and J. P. Blount. 2003. 'Complications of chronic vagus nerve stimulation for epilepsy in children', *J Neurosurg*, 99: 500-3.
- Song, G., H. Xu, H. Wang, S. M. Macdonald, and C. S. Poon. 2011. 'Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kolliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons', *Neuroscience*, 175: 145-53.
- Soros, P., Y. Inamoto, and R. E. Martin. 2009. 'Functional brain imaging of swallowing: an activation likelihood estimation meta-analysis', *Hum Brain Mapp*, 30: 2426-39.
- Sotelo, C., B. Cholley, S. El Mestikawy, H. Gozlan, and M. Hamon. 1990. 'Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei', *Eur J Neurosci*, 2: 1144-54.
- Spearman, D. G., I. Poliak, M. J. Rose, D. C. Bolser, and T. Pitts. 2014. 'Variability of the pharyngeal phase of swallow in the cat', *PLoS One*, 9: e106121.
- Spuck, S., V. Tronnier, I. Orosz, R. Schonweiler, A. Sepelnyak, G. Nowak, and J. Sperner. 2010. 'Operative and technical complications of vagus nerve stimulator implantation', *Neurosurgery*, 67: 489-94.
- St-John, W. M. 1998. 'Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity', *Prog Neurobiol*, 56: 97-117.
- St-John, W. M., and J. F. Paton. 2000. 'Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation', *Respir Physiol*, 123: 201-13.
- Stacey, W. C., and B. Litt. 2008. 'Technology insight: neuroengineering and epilepsy-designing devices for seizure control', *Nat Clin Pract Neurol*, 4: 190-201.
- Stecker, E. C., K. Reinier, A. Uy-Evanado, C. Teodorescu, H. Chugh, K. Gunson, J. Jui, and S. S. Chugh. 2013. 'Relationship between seizure episode and sudden cardiac arrest in patients with epilepsy: a community-based study', *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 6: 912-6.

- Stephen, J. R., D. H. Taves, R. C. Smith, and R. E. Martin. 2005. 'Bolus location at the initiation of the pharyngeal stage of swallowing in healthy older adults', *Dysphagia*, 20: 266-72.
- Stornetta, R. L., D. L. Rosin, H. Wang, C. P. Sevigny, M. C. Weston, and P. G. Guyenet. 2003. 'A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Botzinger complex', *J Comp Neurol*, 455: 499-512.
- Stornetta, R. L., D. Spirovski, T. S. Moreira, A. C. Takakura, G. H. West, J. M. Gwilt, P. M. Pilowsky, and P. G. Guyenet. 2009. 'Galanin is a selective marker of the retrotrapezoid nucleus in rats', *J Comp Neurol*, 512: 373-83.
- Sugiyama, T., M. Ohkubo, Y. Honda, A. Tasaka, K. Nagasawa, R. Ishida, and K. Sakurai. 2013. 'Effect of swallowing exercises in independent elderly', *Bull Tokyo Dent Coll*, 54: 109-15.
- Sugiyama, Y., K. Shiba, K. Nakazawa, T. Suzuki, T. Umezaki, K. Ezure, N. Abo, T. Yoshihara, and Y. Hisa. 2011. 'Axonal projections of medullary swallowing neurons in guinea pigs', *J Comp Neurol*, 519: 2193-211.
- Sugiyama, Y., K. Shiba, S. Mukudai, T. Umezaki, and Y. Hisa. 2014. 'Activity of respiratory neurons in the rostral medulla during vocalization, swallowing, and coughing in guinea pigs', *Neurosci Res*, 80: 17-31.
- Sugiyama, Y., K. Shiba, S. Mukudai, T. Umezaki, H. Sakaguchi, and Y. Hisa. 2015. 'Role of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group in coughing and swallowing in guinea pigs', *J Neurophysiol*, 114: 1792-805.
- Sumi, T. 1963. 'The activity of brain-stem respiratory neurons and spinal respiratory motoneurons during swallowing', *J Neurophysiol*, 26: 466-77.
- Sun, Q. J., A. K. Goodchild, J. P. Chalmers, and P. M. Pilowsky. 1998. 'The pre-Botzinger complex and phase-spanning neurons in the adult rat', *Brain Res*, 809: 204-13.
- Sun, Q. J., T. G. Bautista, R. G. Berkowitz, W. J. Zhao, and P. M. Pilowsky. 2011. 'The temporal relationship between non-respiratory burst activity of expiratory laryngeal motoneurons and phrenic apnoea during stimulation of the superior laryngeal nerve in rat', *J Physiol*, 589: 1819-30.
- Suntrup-Krueger, S., P. Muhle, I. Kampe, P. Egidi, T. Ruck, F. Lenze, M. Jungheim, R. Gminski, B. Labeit, I. Claus, T. Warnecke, J. Gross, and R. Dziewas. 2021. 'Effect of Capsaicinoids on Neurophysiological, Biochemical, and Mechanical Parameters of Swallowing Function', *Neurotherapeutics*, 18: 1360-70.
- Suntrup, S., I. Teismann, J. Bejer, I. Suttrup, M. Winkels, D. Mehler, C. Pantev, R. Dziewas, and T. Warnecke. 2013. 'Evidence for adaptive cortical changes in swallowing in Parkinson's disease', *Brain*, 136: 726-38.
- Sura, L., A. Madhavan, G. Carnaby, and M. A. Crary. 2012. 'Dysphagia in the elderly: management and nutritional considerations', *Clin Interv Aging*, 7: 287-98.
- Sutton, G. P., J. B. Macknin, S. S. Gartman, G. P. Sunny, R. D. Beer, P. E. Crago, D. M. Neustadter, and H. J. Chiel. 2004a. 'Passive hinge forces in the feeding apparatus of *Aplysia* aid retraction during biting but not during swallowing', *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 190: 501-14.
- Sutton, G. P., E. V. Mangan, D. M. Neustadter, R. D. Beer, P. E. Crago, and H. J. Chiel. 2004b. 'Neural control exploits changing mechanical advantage and context dependence to generate different feeding responses in *Aplysia*', *Biol Cybern*, 91: 333-45.
- Swann, H. E., S. D. Kauer, J. T. Allmond, and M. R. Brumley. 2017. 'Stimulation of 5-HT_{2A} receptors recovers sensory responsiveness in acute spinal neonatal rats', *Behav Neurosci*, 131: 92-98.

- Tachibana, T., M. S. Khan, K. Matsuda, H. Ueda, and M. A. Cline. 2010. 'Central administration of substance P inhibits feeding behavior in chicks', *Horm Behav*, 57: 203-8.
- Takakura, A. C., T. S. Moreira, E. Colombari, G. H. West, R. L. Stornetta, and P. G. Guyenet. 2006. 'Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats', *J Physiol*, 572: 503-23.
- Takata, N., T. Mishima, C. Hisatsune, T. Nagai, E. Ebisui, K. Mikoshiba, and H. Hirase. 2011. 'Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo', *J Neurosci*, 31: 18155-65.
- Takatsuji, H., H. M. Zakir, R. M. Mostafaezur, I. Saito, Y. Yamada, K. Yamamura, and J. Kitagawa. 2012. 'Induction of the Swallowing Reflex by Electrical Stimulation of the Posterior Oropharyngeal Region in Awake Humans', *Dysphagia*.
- Takeuchi, S., D. Ziegler, Y. Yoshida, K. Mabuchi, and T. Suzuki. 2005. 'Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels', *Lab Chip*, 5: 519-23.
- Tamura, Y., S. Matsushita, K. Shinoda, and S. Yoshida. 1998. 'Development of perioral muscle activity during suckling in infants: a cross-sectional and follow-up study', *Dev Med Child Neurol*, 40: 344-8.
- Tamvacakis, A. N., A. Senatore, and P. S. Katz. 2018. 'Single neuron serotonin receptor subtype gene expression correlates with behaviour within and across three molluscan species', *Proc Biol Sci*, 285.
- Tan, W., S. Pagliardini, P. Yang, W. A. Janczewski, and J. L. Feldman. 2010. 'Projections of preBotzinger complex neurons in adult rats', *J Comp Neurol*, 518: 1862-78.
- Tanaka, Y. 1999. '[Evaluation of masticatory comminute function using multiple variables-- Part. I: Observation of mastication using inter-jaw positional EMG]', *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 66: 351-60.
- Taniguchi, H., K. Matsuo, H. Okazaki, M. Yoda, H. Inokuchi, M. Gonzalez-Fernandez, M. Inoue, and J. B. Palmer. 2013. 'Fluoroscopic evaluation of tongue and jaw movements during mastication in healthy humans', *Dysphagia*, 28: 419-27.
- Tatum, W. O. th, D. B. Moore, M. M. Stecker, G. H. Baltuch, J. A. French, J. A. Ferreira, P. M. Carney, D. R. Labar, and F. L. Vale. 1999. 'Ventricular asystole during vagus nerve stimulation for epilepsy in humans', *Neurology*, 52: 1267-9.
- Tauber, M., K. Boulanouar, G. Diene, S. Cabal-Berthoumieu, V. Ehlinger, P. Fichaux-Bourin, C. Molinas, S. Faye, M. Valette, J. Pourrinet, C. Cessans, S. Viaux-Sauvelon, C. Bascoul, A. Guedeney, P. Delhanty, V. Geenen, H. Martens, F. Muscatelli, D. Cohen, A. Consoli, P. Payoux, C. Arnaud, and J. P. Salles. 2017. 'The Use of Oxytocin to Improve Feeding and Social Skills in Infants With Prader-Willi Syndrome', *Pediatrics*, 139.
- Tazerart, S., L. Vinay, and F. Brocard. 2008. 'The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm', *J Neurosci*, 28: 8577-89.
- Tell, F., L. Fagni, and A. Jean. 1990. 'Neurons of the nucleus tractus solitarius, in vitro, generate bursting activities by solitary tract stimulation', *Exp Brain Res*, 79: 436-40.
- Tell, F., and A. Jean. 1991. 'Activation of N-methyl-d-aspartate Receptors Induces Endogenous Rhythmic Bursting Activities in Nucleus Tractus Solitarii Neurons: An Intracellular Study on Adult Rat Brainstem Slices', *Eur J Neurosci*, 3: 1353-65.
- Tellez-Zenteno, J. F., L. H. Ronquillo, and S. Wiebe. 2005. 'Sudden unexpected death in epilepsy: evidence-based analysis of incidence and risk factors', *Epilepsy Res*, 65: 101-15.
- Ten Donkelaar, HJ. 2011. 'Clinical Neuroanatomy', *Springer*, Brain Circuitry and Its Disorders: 834.

- Terzi, N., D. Orlikowski, P. Aegerter, M. Lejaille, M. Ruquet, G. Zalcman, C. Fermanian, J. C. Raphael, and F. Lofaso. 2007. 'Breathing-swallowing interaction in neuromuscular patients: a physiological evaluation', *Am J Respir Crit Care Med*, 175: 269-76.
- Terzi, N., H. Prigent, M. Lejaille, L. Falaize, D. Annane, D. Orlikowski, and F. Lofaso. 2010. 'Impact of tracheostomy on swallowing performance in Duchenne muscular dystrophy', *Neuromuscul Disord*, 20: 493-8.
- Thach, B. T. 2005. 'Can we breathe and swallow at the same time?', *J Appl Physiol* (1985), 99: 1633.
- Thexton, A. J., and C. Griffiths. 1979. 'Reflex oral activity in decerebrate rats of different age', *Brain Res*, 175: 1-9.
- Thoby-Brisson, M., and J. M. Ramirez. 2001. 'Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice', *J Neurophysiol*, 86: 104-12.
- Thoby-Brisson, M., J. B. Trinh, J. Champagnat, and G. Fortin. 2005. 'Emergence of the pre-Botzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo', *J Neurosci*, 25: 4307-18.
- Thoby-Brisson, M., M. Karlen, N. Wu, P. Charnay, J. Champagnat, and G. Fortin. 2009. 'Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex', *Nat Neurosci*, 12: 1028-35.
- Thurman, D. J., D. C. Hesdorffer, and J. A. French. 2014. 'Sudden unexpected death in epilepsy: assessing the public health burden', *Epilepsia*, 55: 1479-85.
- Tierney, A. J. 2018. 'Invertebrate serotonin receptors: a molecular perspective on classification and pharmacology', *J Exp Biol*, 221.
- Tomsen, N., O. Ortega, W. Nascimento, S. Carrion, and P. Clave. 2022. 'Oropharyngeal Dysphagia in Older People is Associated with Reduced Pharyngeal Sensitivity and Low Substance P and CGRP Concentration in Saliva', *Dysphagia*, 37: 48-57.
- Tomson, T., L. Nashef, and P. Ryvlin. 2008. 'Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions', *Lancet Neurol*, 7: 1021-31.
- Toor, Ruas, Q. J. Sun, N. N. Kumar, S. Le, C. M. Hildreth, J. K. Phillips, and S. McMullan. 2019. 'Neurons in the Intermediate Reticular Nucleus Coordinate Postinspiratory Activity, Swallowing, and Respiratory-Sympathetic Coupling in the Rat', *J Neurosci*, 39: 9757-66.
- Toporikova, N., and R. J. Butera. 2011. 'Two types of independent bursting mechanisms in inspiratory neurons: an integrative model', *J Comput Neurosci*, 30: 515-28.
- Tran, Y., A. K. Shah, and S. Mittal. 2011. 'Lead breakage and vocal cord paralysis following blunt neck trauma in a patient with vagal nerve stimulator', *J Neurol Sci*, 304: 132-5.
- Tribollet, E., S. Charpak, A. Schmidt, M. Dubois-Dauphin, and J. J. Dreifuss. 1989. 'Appearance and transient expression of oxytocin receptors in fetal, infant, and peripubertal rat brain studied by autoradiography and electrophysiology', *J Neurosci*, 9: 1764-73.
- Troche, M. S., I. Huebner, J. C. Rosenbek, M. S. Okun, and C. M. Sapienza. 2011. 'Respiratory-swallowing coordination and swallowing safety in patients with Parkinson's disease', *Dysphagia*, 26: 218-24.
- Troche, M. S., A. E. Brandimore, K. D. Foote, T. Morishita, D. Chen, K. W. Hegland, and M. S. Okun. 2014. 'Swallowing outcomes following unilateral STN vs. GPi surgery: a retrospective analysis', *Dysphagia*, 29: 425-31.
- Tsuboi, A., A. Kolta, C. C. Chen, and J. P. Lund. 2003. 'Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns', *Eur J Neurosci*, 17: 229-38.
- Tsuji, K., T. Tsujimura, S. Sakai, T. Suzuki, M. Yoshihara, K. Nagoya, J. Magara, Y. Satoh, and M. Inoue. 2020. 'Involvement of capsaicin-sensitive nerves in the initiation of

- swallowing evoked by carbonated water in anesthetized rats', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 319: G564-G72.
- Tsujimura, T., J. Kitagawa, K. Ueda, and K. Iwata. 2009. 'Inhibition of swallowing reflex following phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in nucleus tractus solitarii neurons in rats with masseter muscle nociception', *Neurosci Lett*, 450: 361-4.
- Tsujimura, T., M. Shinoda, K. Honda, S. Hitomi, M. Kiyomoto, S. Matsuura, A. Katagiri, K. Tsuji, M. Inoue, Y. Shiga, and K. Iwata. 2011. 'Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis, upper cervical cord, NTS and Pa5 following capsaicin injection into masticatory and swallowing-related muscles in rats', *Brain Res*, 1417: 45-54.
- Tsujimura, T., R. Ueha, M. Yoshihara, E. Takei, K. Nagoya, N. Shiraishi, J. Magara, and M. Inoue. 2019. 'Involvement of the epithelial sodium channel in initiation of mechanically evoked swallows in anaesthetized rats', *J Physiol*, 597: 2949-63.
- Tunstall, M. J., and A. Roberts. 1994. 'A longitudinal gradient of synaptic drive in the spinal cord of *Xenopus* embryos and its role in co-ordination of swimming', *J Physiol*, 474: 393-405.
- Umezaki, T., K. Shiba, and Y. Sugiyama. 2020. 'Intracellular activity of pharyngeal motoneurons during breathing, swallowing, and coughing', *J Neurophysiol*, 124: 750-62.
- Ushioda, T., Y. Watanabe, Y. Sanjo, G. Y. Yamane, S. Abe, Y. Tsuji, and A. Ishiyama. 2012. 'Visual and auditory stimuli associated with swallowing activate mirror neurons: a magnetoencephalography study', *Dysphagia*, 27: 504-13.
- Vadhan, J., and P. Tadi. 2022. 'Physiology, Herring Breuer Reflex.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Veenker, E. A., P. E. Andersen, and J. I. Cohen. 2003. 'Cricopharyngeal spasm and Zenker's diverticulum', *Head Neck*, 25: 681-94.
- Vergara, C., R. Latorre, N. V. Marrion, and J. P. Adelman. 1998. 'Calcium-activated potassium channels', *Curr Opin Neurobiol*, 8: 321-9.
- Viemari, J. C., H. Burnet, M. Bevenegut, and G. Hilaire. 2003. 'Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies', *Eur J Neurosci*, 17: 1233-44.
- Viemari, J. C., A. J. Garcia, 3rd, A. Doi, and J. M. Ramirez. 2011. 'Activation of alpha-2 noradrenergic receptors is critical for the generation of fictive eupnea and fictive gasping inspiratory activities in mammals in vitro', *Eur J Neurosci*, 33: 2228-37.
- Villalon, C. M., and D. Centurion. 2007. 'Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 376: 45-63.
- Voss, M. D., D. De Castro, J. Lipski, P. M. Pilowsky, and C. Jiang. 1990. 'Serotonin immunoreactive boutons form close appositions with respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat', *J Comp Neurol*, 295: 208-18.
- Wall, N. R., I. R. Wickersham, A. Cetin, M. De La Parra, and E. M. Callaway. 2010. 'Monosynaptic circuit tracing in vivo through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 21848-53.
- Wallis, L. A., M. Healy, M. B. Undy, and I. Maconochie. 2005. 'Age related reference ranges for respiration rate and heart rate from 4 to 16 years', *Arch Dis Child*, 90: 1117-21.
- Wang, G. M., G. Song, and H. Zhang. 2005. 'Phenomenon of non-associative learning in Hering-Breuer reflex simulated by electrical vagal stimulation in rabbits', *Sheng Li Xue Bao*, 57: 511-6.
- Wang, H., H. Zhang, G. Song, and C. S. Poon. 2008. 'Modulation of Hering-Breuer reflex by ventrolateral pons', *Adv Exp Med Biol*, 605: 387-92.

- Wang, S., N. Benamer, S. Zanella, N. N. Kumar, Y. Shi, M. Bevorgut, D. Penton, P. G. Guyenet, F. Lesage, C. Gestreau, J. Barhanin, and D. A. Bayliss. 2013. 'TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons', *J Neurosci*, 33: 16033-44.
- Wang, Y., and A. G. Ramage. 2001. 'The role of central 5-HT(1A) receptors in the control of B-fibre cardiac and bronchoconstrictor vagal preganglionic neurones in anaesthetized cats', *J Physiol*, 536: 753-67.
- Watanabe, T., M. Anno, Y. Matsubayashi, Y. Nagasako, K. Sakuishi, Y. Fujimoto, N. Tachibana, Y. Taniguchi, T. Hayashi, Y. Oshima, S. Tsuji, and S. Tanaka. 2019. 'Hypoglossal Nerve Palsy as a Cause of Severe Dysphagia along with the Oropharyngeal Stenosis due to Occipitocervical Kyphosis', *Case Rep Orthop*, 2019: 7982847.
- Watemberg, S., O. Landau, and R. Avrahami. 1996. 'Zenker's diverticulum: reappraisal', *Am J Gastroenterol*, 91: 1494-8.
- Wei, X. P., M. Collie, B. Dempsey, G. Fortin, and K. Yackle. 2022. 'A novel reticular node in the brainstem synchronizes neonatal mouse crying with breathing', *Neuron*, 110: 644-57 e6.
- Weimann, J. M., and E. Marder. 1994. 'Switching neurons are integral members of multiple oscillatory networks', *Curr Biol*, 4: 896-902.
- Weimann, J. M., P. Skiebe, H. G. Heinzel, C. Soto, N. Kopell, J. C. Jorge-Rivera, and E. Marder. 1997. 'Modulation of oscillator interactions in the crab stomatogastric ganglion by crustacean cardioactive peptide', *J Neurosci*, 17: 1748-60.
- Weninger, J. M., L. G. Pan, L. Klum, T. Leekley, J. Bastastic, M. R. Hodges, T. Feroah, S. Davis, and H. V. Forster. 2004. 'Small reduction of neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the pre-Botzinger complex area induces abnormal breathing periods in awake goats', *J Appl Physiol (1985)*, 97: 1620-8.
- Westberg, K., P. Clavelou, G. Sandstrom, and J. P. Lund. 1998. 'Evidence that trigeminal brainstem interneurons form subpopulations to produce different forms of mastication in the rabbit', *J Neurosci*, 18: 6466-79.
- Westneat, M. W., and W. G. Hall. 1992. 'Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing', *Behav Neurosci*, 106: 539-54.
- Wheeler Hegland, K., J. E. Huber, T. Pitts, P. W. Davenport, and C. M. Sapienza. 2011. 'Lung volume measured during sequential swallowing in healthy young adults', *J Speech Lang Hear Res*, 54: 777-86.
- Wheeler Hegland, K. M., J. E. Huber, T. Pitts, and C. M. Sapienza. 2009. 'Lung volume during swallowing: single bolus swallows in healthy young adults', *J Speech Lang Hear Res*, 52: 178-87.
- Wheless, J. W., A. J. Gienapp, and P. Ryvlin. 2018. 'Vagus nerve stimulation (VNS) therapy update', *Epilepsy Behav*, 88S: 2-10.
- Widdicombe, J. G. 1986. 'The physiology of the nose', *Clin Chest Med*, 7: 159-70.
- Wigley, R., N. Hamilton, A. Nishiyama, F. Kirchhoff, and A. M. Butt. 2007. 'Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons', *J Anat*, 210: 661-70.
- Williamson, A., J. Rivnay, L. Kergoat, A. Jonsson, S. Inal, I. Uguz, M. Ferro, A. Ivanov, T. A. Sjoström, D. T. Simon, M. Berggren, G. G. Malliaras, and C. Bernard. 2015. 'Controlling epileptiform activity with organic electronic ion pumps', *Adv Mater*, 27: 3138-44.
- Willins, D. L., A. Y. Deutch, and B. L. Roth. 1997. 'Serotonin 5-HT_{2A} receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex', *Synapse*, 27: 79-82.

- Wilson-Pauwels, L., E. J. Akesson, P. A. Stewart, and S. D. U. <https://books.google.com/books?id=itStZZaQCSpacey>. 2002. *Cranial Nerves in Health and Disease* (B C Decker).
- Wilson, Donald M. 1961. 'The central nervous control of flight in a locust', *J Appl Physiol*, 38: 471-90.
- Wilson, S. L., B. T. Thach, R. T. Brouillette, and Y. K. Abu-Osba. 1981. 'Coordination of breathing and swallowing in human infants', *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 50: 851-8.
- Winter, D. A. 1991. 'Changes in gait with aging', *Can J Sport Sci*, 16: 165-7.
- Wolf, L.S., and R.P. Glass. 1992. *Feeding and Swallowing Disorders in Infancy: Assessment and Management* (Therapy Skill Builders).
- Wolff, P. H. 1968. 'The serial organization of sucking in the young infant', *Pediatrics*, 42: 943-56.
- Wollman, L., A. Hill, B. Hasse, C. Young, G. Hernandez-De La Pena, R. B. Levine, and R. F. Fregosi. 2022. 'Influence of developmental nicotine exposure on serotonergic control of breathing-related motor output', *Dev Neurobiol*, 82: 175-91.
- Won, S. Y., S. Krieger, D. Dubinski, F. Gessler, B. Behmanesh, T. M. Freiman, J. Konczalla, V. Seifert, and S. Lapa. 2021. 'Neurogenic Dysphagia in Subdural Hematoma', *Front Neurol*, 12: 701378.
- Wong-Riley, M. T., Q. Liu, and X. P. Gao. 2013. 'Peripheral-central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control', *Respir Physiol Neurobiol*, 185: 156-69.
- Wood, JD. 2017. 'Enteric Nervous System: Physiology', *Elsevier*, Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology.
- Wrobel, L. J., I. Reymond-Marron, A. Dupre, and M. Raggenbass. 2010. 'Oxytocin and vasopressin enhance synaptic transmission in the hypoglossal motor nucleus of young rats by acting on distinct receptor types', *Neuroscience*, 165: 723-35.
- Wu, J. Y., L. B. Cohen, and C. X. Falk. 1994. 'Neuronal activity during different behaviors in Aplysia: a distributed organization?', *Science*, 263: 820-3.
- Wyeth, R. C., and R. P. Croll. 2011. 'Peripheral sensory cells in the cephalic sensory organs of *Lymnaea stagnalis*', *J Comp Neurol*, 519: 1894-913.
- Wyllie, E., R. Wyllie, R. P. Cruse, A. D. Rothner, and G. Erenberg. 1986. 'The mechanism of nitrazepam-induced drooling and aspiration', *N Engl J Med*, 314: 35-8.
- Yabunaka, K., H. Sanada, S. Sanada, H. Konishi, T. Hashimoto, H. Yatake, K. Yamamoto, T. Katsuda, and M. Ohue. 2011. 'Sonographic assessment of hyoid bone movement during swallowing: a study of normal adults with advancing age', *Radiol Phys Technol*, 4: 73-7.
- Yagi, N., Y. Oku, S. Nagami, Y. Yamagata, J. Kayashita, A. Ishikawa, K. Domen, and R. Takahashi. 2017. 'Inappropriate Timing of Swallow in the Respiratory Cycle Causes Breathing-Swallowing Discoordination', *Front Physiol*, 8: 676.
- Yamada, J., A. Okabe, H. Toyoda, W. Kilb, H. J. Luhmann, and A. Fukuda. 2004. 'Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1', *J Physiol*, 557: 829-41.
- Yamamoto, R., Y. Sugiyama, K. Hashimoto, S. Kinoshita, A. Takemura, S. Fuse, M. Kaneko, S. Mukudai, T. Umezaki, M. Dutschmann, T. Nakagawa, and S. Hirano. 2021. 'Firing characteristics of swallowing interneurons in the dorsal medulla during physiologically induced swallowing in perfused brainstem preparation in rats', *Neurosci Res*.
- Yamanishi, T., K. Takao, H. Koizumi, K. Ishihama, K. Nohara, M. Komaki, A. Enomoto, Y. Yokota, and M. Kogo. 2010. 'Alpha2-adrenoceptors coordinate swallowing and respiration', *J Dent Res*, 89: 258-63.

- Yamasaki, M., S. Ebihara, T. Ebihara, S. Yamanda, H. Arai, and M. Kohzuki. 2010. 'Effects of capsiate on the triggering of the swallowing reflex in elderly patients with aspiration pneumonia', *Geriatr Gerontol Int*, 10: 107-9.
- Yamasue, H., and G. Domes. 2018. 'Oxytocin and Autism Spectrum Disorders', *Curr Top Behav Neurosci*, 35: 449-65.
- Yang, C. F., and J. L. Feldman. 2018. 'Efferent projections of excitatory and inhibitory preBotzinger Complex neurons', *J Comp Neurol*, 526: 1389-402.
- Yoder, Jason A., and Eduardo J. Izquierdo. 2018. "Behavioral Stability in the Face of Neuromodulation in Brain-Body-Environment Systems." In *ALIFE 2018: The 2018 Conference on Artificial Life*, 268-75.
- Yokota, S., T. Tsumori, K. Ono, and Y. Yasui. 2001. 'Phrenic motoneurons receive monosynaptic inputs from the Kolliker-Fuse nucleus: a light- and electron-microscopic study in the rat', *Brain Res*, 888: 330-35.
- Yokota, S., T. Oka, T. Tsumori, S. Nakamura, and Y. Yasui. 2007. 'Glutamatergic neurons in the Kolliker-Fuse nucleus project to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus: a combined retrograde tracing and in situ hybridization study in the rat', *Neurosci Res*, 59: 341-6.
- Yokoyama, M., N. Mitomi, K. Tetsuka, N. Tayama, and S. Niimi. 2000. 'Role of laryngeal movement and effect of aging on swallowing pressure in the pharynx and upper esophageal sphincter', *Laryngoscope*, 110: 434-9.
- Yoshida, Y., Y. Tanaka, M. Hirano, and T. Nakashima. 2000. 'Sensory innervation of the pharynx and larynx', *Am J Med*, 108 Suppl 4a: 51S-61S.
- Yoshikawa, M., M. Yoshida, T. Nagasaki, K. Tanimoto, K. Tsuga, and Y. Akagawa. 2006. 'Influence of aging and denture use on liquid swallowing in healthy dentulous and edentulous older people', *J Am Geriatr Soc*, 54: 444-9.
- Zalvan, C., L. Sulica, S. Wolf, J. Cohen, O. Gonzalez-Yanes, and A. Blitzer. 2003. 'Laryngopharyngeal dysfunction from the implant vagal nerve stimulator', *Laryngoscope*, 113: 221-5.
- Zanella, S., M. Barthelemy, F. Muscatelli, and G. Hilaire. 2008. 'Necdin gene, respiratory disturbances and Prader-Willi syndrome', *Adv Exp Med Biol*, 605: 159-64.
- Zanella, S., M. Tauber, and F. Muscatelli. 2009. 'Breathing deficits of the Prader-Willi syndrome', *Respir Physiol Neurobiol*, 168: 119-24.
- Zhan, G., F. Shaheen, M. Mackiewicz, P. Fenik, and S. C. Veasey. 2002. 'Single cell laser dissection with molecular beacon polymerase chain reaction identifies 2A as the predominant serotonin receptor subtype in hypoglossal motoneurons', *Neuroscience*, 113: 145-54.
- Zhu, J.X. 2021. *Dopamine in the Gut* (Springer Singapore).
- Zieba, A., P. Stepnicki, D. Matosiuk, and A. A. Kaczor. 2021. 'Overcoming Depression with 5-HT_{2A} Receptor Ligands', *Int J Mol Sci*, 23.
- Zilov, V. G., A. P. Patyshakuliev, R. V. Merkur'eva, L. I. Ivanova, and S. K. Rogacheva. 1986. '[Role of substance P in regulating the feeding behavior and the avoidance reaction in the rabbit]', *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 36: 1045-53.
- Zimmer, M. R., A. E. Schmitz, and M. O. Dietrich. 2019. 'Activation of Agrp neurons modulates memory-related cognitive processes in mice', *Pharmacol Res*, 141: 303-09.
- Zochowski, M., L. B. Cohen, G. Fuhrmann, and D. Kleinfeld. 2000. 'Distributed and partially separate pools of neurons are correlated with two different components of the gill-withdrawal reflex in Aplysia', *J Neurosci*, 20: 8485-92.

Articles



Article

Quipazine Elicits Swallowing in the Arterially Perfused Rat Preparation: A Role for Medullary Raphe Nuclei?

Victor Bergé-Laval and Christian Gestreau *

Aix-Marseille Université and INSERM, Institut de Neurosciences des Systèmes, UMR 1106, Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France; victor.berge-laval@etu.univ-amu.fr

* Correspondence: christian.gestreau@univ-amu.fr; Tel.: +33-91-698-8786

Received: 20 May 2020; Accepted: 16 July 2020; Published: 20 July 2020



Abstract: Pharmacological neuromodulation of swallowing may represent a promising therapeutic option to treat dysphagia. Previous studies suggested a serotonergic control of swallowing, but mechanisms remain poorly understood. Here, we investigated the effects of the serotonergic agonist quipazine on swallowing, using the arterially perfused working heart-brainstem (in situ) preparation in rats. Systemic injection of quipazine produced single swallows with motor patterns and swallow-breathing coordination similar to spontaneous swallows, and increased swallow rate with moderate changes in cardiorespiratory functions. Methysergide, a 5-HT₂ receptor antagonist, blocked the excitatory effect of quipazine on swallowing, but had no effect on spontaneous swallow rate. Microinjections of quipazine in the nucleus of the solitary tract were without effect. In contrast, similar injections in caudal medullary raphe nuclei increased swallow rate without changes in cardiorespiratory parameters. Thus, quipazine may exert an excitatory effect on raphe neurons via stimulation of 5-HT_{2A} receptors, leading to increased excitability of the swallowing network. In conclusion, we suggest that pharmacological stimulation of swallowing by quipazine in situ represents a valuable model for experimental studies. This work paves the way for future investigations on brainstem serotonergic modulation, and further identification of neural populations and mechanisms involved in swallowing and/or swallow-breathing interaction.

Keywords: swallow; breathing; central pattern generators; serotonin; neuromodulation

1. Introduction

Despite extensive experimental and clinical studies, swallowing remains one of the most important and least appreciated functions [1]. Dysfunctions in the brainstem's swallowing central pattern generator (swCPG) and other medullary or supra-medullary structures may be an important causal factor of oropharyngeal dysphagia, a severe disease whose neural pathophysiology remains poorly understood [2–4].

Neurophysiological investigations have identified the nucleus of the solitary tract (NTS) as a key brainstem structure responsible for the pharyngeal phase of swallowing [5,6], but the exact location of the swCPG is still controversial. In addition, the precise neural mechanisms operated by the swCPG are obscure, and the interactions between the central pattern generator for breathing (rCPG) and the swCPG are not fully characterized [7,8]. This lack of knowledge may be explained by the complexity of brainstem circuitry, the paucity of information on the phenotypes of the swCPG neurons and their mechanisms of neuromodulation. Furthermore, the experimental protocols and/or animal models required to study swallowing and swallow-breathing coordination are generally complex, time-consuming and expensive [8–11].

In some investigations, the arterially perfused working heart-brainstem (in situ) preparation has been used as an advantageous experimental model to study swallowing and record brainstem neuronal activity [12–15]. However, few spontaneous swallows occurred in situ [16], and several methods were used to evoke swallowing, such as mechanical stimulation of the pharyngeal cavity [15], manual injection of water into the oral cavity [17] and electrical stimulation of the superior laryngeal nerves [13,14]. To our knowledge, a pharmacological method to enhance swallowing over a long period has not been tested in situ.

Previous in vivo studies identified a precise region in the nucleus of the solitary tract (NTS) where injection of glutamate or glutamatergic agonists acting on N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) or non-NMDA receptors (kainate or quisqualate) strongly elicited rhythmic swallows and central apnea [6,18]. This region, also called the “trigger zone” for swallowing, is thought to correspond with glutamatergic terminals from upper airway afferent fibers, forming synapses onto swCPG interneurons [6]. Elicitation of swallowing was also observed after peripheral or central injection of serotonergic agonists [5,19]. Interestingly, compounds such as quipazine (QPZ), a serotonergic agonist with main affinity and selectivity for 5-HT_{2A} receptors, have been suggested to exert a central stimulatory effect at the NTS level [5]. Contrary to glutamate effects, QPZ injection in vivo produced single or “isolated” swallows and increased the swallow rate over a long period [5,19], which represents an optimal condition to study swallow-breathing interaction, and a good alternative method to evoke swallowing [8]. In agreement with the role of bulbar serotonergic control of swallowing [5], mice with central 5-HT deficiency had lower swallow rates than control animals [20]. However, inhibitory effects of serotonergic agonists on swallowing, including QPZ, have also been reported [21,22]. Thus, previous in vivo experiments on serotonergic control of swallowing have led to conflicting data. These opposite effects have been interpreted as resulting from differences in drug concentration and protocols of anesthesia between studies [19].

We hypothesized that QPZ at a dose similar to that used in vivo [5] may stimulate swallowing in the arterially perfused working heart-brainstem preparation of an adult rat (an in situ preparation) which requires no anesthesia [15,23]. The aims of our study were (1) to investigate the effects of QPZ on swallowing and breathing in situ, (2) to compare swallowing motor patterns and swallow-breathing phase relationship between spontaneous and QPZ-induced swallows, and (3) to identify brainstem nuclei mediating the stimulatory effect of QPZ on swallowing. Identifying both the neural structures and neurotransmitters (or neuromodulators) involved in swallowing represents one of the challenges to better understand this important function, and to find therapeutic strategies for patients suffering from swallowing disorders [1–3,24–26].

2. Results

2.1. Systemic QPZ Effects on Cardiorespiratory Parameters

Mean group data showed that systemic injection of QPZ (1.5 µM/kg) significantly increased respiratory frequency (Rf) (23 ± 9 vs. 30 ± 17 cycles/min, in control vs. QPZ groups, respectively; $p < 0.05$; Table S1). This effect was not consistent across the preparations since no obvious change (4/16) or decrease in Rf (4/16) was also detected. Changes in Rf were observed 108 ± 36 sec after the injection and lasted for about 18 min (Table S1). The mean increase in Rf was associated with non-significant decreases in both inspiratory and expiratory durations compared to control values (0.78 ± 0.32 vs. 0.76 ± 0.25 sec for inspiration, $p = 0.72$, and 1.98 ± 0.9 vs. 1.74 ± 0.99 for expiration, $p = 0.48$; Table S2). Systemic QPZ significantly increased blood pressure (BP) by $25\% \pm 12\%$ (87 ± 43 vs. 109 ± 61 mmHg in control vs. QPZ groups, respectively; $p < 0.001$; Table S3). This hypertensive effect was consistent across the preparations, detected 69 ± 27 sec after injection, and lasted up to 30 min post-injection. Systemic QPZ injection had no effect on heart rate (345 ± 51 vs. 341 ± 45 bpm in control vs. QPZ groups, respectively; $p = 0.73$; Table S4).

2.2. Characterization of Swallows

All rats analyzed in this study had eupneic patterns of breathing at the start of recordings and displayed spontaneous swallows over the entire 15 min control period (Figure 1). These spontaneous events were always isolated within the respiratory cycle, i.e., a single swallow occurred per respiratory cycle (Figure 1A). They were characterized by typical swallowing-related bursts on hypoglossal (XII) and vagal (X) nerves associated with no (or very small) phrenic activity (Figure 1). Swallowing was consistently observed after systemic QPZ injection at a final concentration of 1.5 $\mu\text{M/kg}$ in the artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (Figure 1B). Similarly to spontaneous events, all swallows elicited after injection of QPZ were isolated.

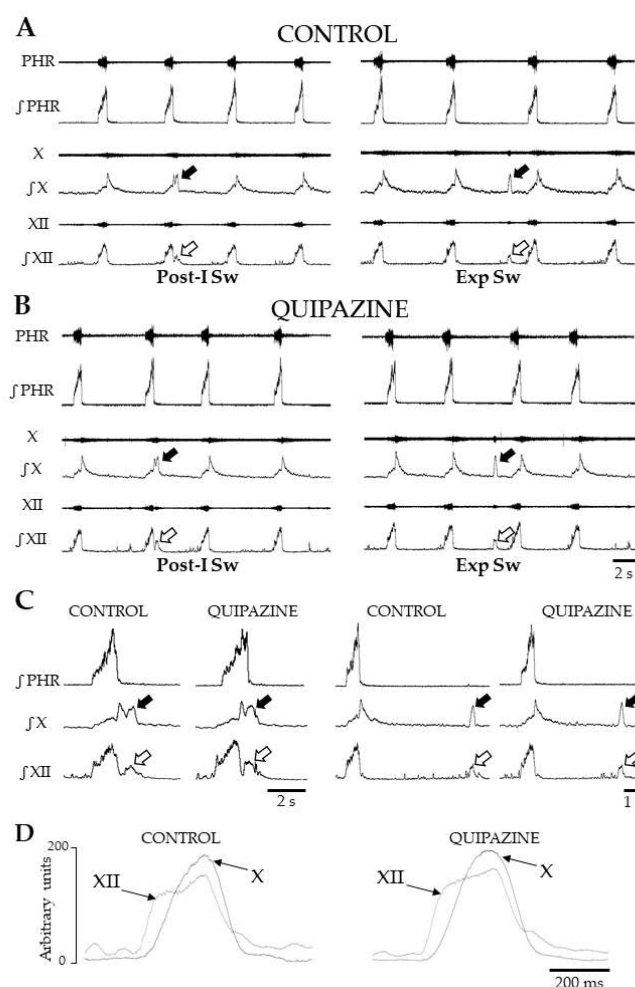


Figure 1. Patterns of breathing and swallowing in situ. Representative traces showing raw and integrated nerve activities during breathing and swallowing in control condition (Control) (A) and after systemic quipazine (QPZ; 1.5 $\mu\text{M/kg}$ in aCSF) (B). In both cases, single swallows were observed, and two types of swallow were identified. Swallows were characterized by concomitant vagal (X, solid arrow) and hypoglossal (XII, open arrow) bursts, occurring either in early expiration (post-inspiratory swallows, Post-I Sw) or later in expiration (Exp Sw). Enlarged views of single Post-I and Exp Sw in control and QPZ conditions (C). Note that Exp Sw were always preceded and followed by central expiration. Averaged envelopes computed from integrated X and XII nerve activities during Exp Sw ($n = 5$) in control and QPZ conditions in the same preparation (D). Swallowing-related bursts had similar motor patterns and delays between the starts of the XII and X bursts across conditions. This physiological delay reflects the normal sequence of the pharyngeal phase of swallowing. PHR: phrenic nerve activity.

In both control and QPZ conditions, two types of swallows were distinguished according to their timing of initiation within the central respiratory cycle. Swallows occurring during the first 20% of the normalized duration of the expiratory phase, i.e., during post-inspiration, were referred to as post-inspiratory swallows (Post-I Sw) (Figure 1A–C). Swallows occurring later in expiration were referred to as expiratory swallows (or Exp Sw) (Figure 1A–D). Swallow duration did not differ between control and QPZ conditions (0.53 ± 0.11 vs. 0.52 ± 0.14 , respectively, $p = 0.43$, Table S5). More detailed comparisons of duration, amplitude and area under the curve (AUC) of hypoglossal (XII) and vagal (X) swallowing-related bursts, and delays between the starts of XII and X bursts (Figure 1D), were made across conditions. All parameters did not significantly change between the two groups (Figure S1; Table 1 and Table S5). Therefore, swallows elicited by QPZ had similar motor patterns to spontaneous swallows.

Table 1. Quantification of swallowing-related bursts.

	Hypoglossal Nerve		Vagus Nerve		
	Control	QPZ	Control	QPZ	
Normalized Amplitude (%)	100	101 ± 19	100	97 ± 9	ns
Normalized area under the curve (%)	100	107 ± 19	100	98 ± 13	ns
Duration (s)	0.56 ± 0.12	0.51 ± 0.14	0.43 ± 0.08	0.43 ± 0.06	ns

Data are expressed as mean $\pm$ SD, ns: not significant, Wilcoxon matched-pairs signed rank test or paired t -test for nonparametric or parametric data, respectively.

2.3. Systemic QPZ Increased Swallow Rate

Spontaneous swallows were observed at slow rate (0.5 ± 0.4 sw/min) without significant changes over the 15 min control period (Figure 2, Table S6). Swallow rate (SR) was significantly increased 105 ± 28 sec after QPZ injection, with a peak effect around 5–6 min following drug injection (Figure 2A, Table S6). This increase lasted for 15 min, and the mean SR over this period was 2.3 ± 0.8 sw/min ($p < 0.001$; Table S6). The magnitude of increase in SR was variable across the preparations, as reflected by standard deviation values in Figure 2A. This was also revealed in the individual (range 1.1 to 28) or averaged (8.5 ± 7.6) means ratio, another index of the magnitude of change in SR across conditions (Table S7). We further determined if this variability of responses to QPZ could be attributable to changes in Rf and/or BP measured in the same preparations. This was not the case, as revealed by the lack of significant correlation between the magnitude of increase in SR and changes in either Rf ($r = 0.358$; $p = 0.20$) or BP ($r = 0.519$; $p = 0.06$; Table S7). In other experiments ($n = 5$), spontaneous swallows were first recorded for 15 min (control period), then QPZ ($1.5 \mu\text{M/kg}$) was added to aCSF and SR was measured for 5 min. Finally, the 5-HT₂ receptor antagonist methysergide (Methy, $1 \mu\text{M/kg}$) was also added to aCSF and SR was measured for 15 additional min. Multiple comparisons showed a significant difference between the three conditions ($p < 0.05$; Figure 2B; Table S8). A significant increase in SR was found in preparations injected with QPZ alone ($p < 0.05$ for both comparisons), whereas SR did not change between control and Methy conditions ($p = 0.99$; Figure 2B; Table S8). Therefore, the stimulatory effect seen with QPZ alone was reversed by methysergide. In three additional rats, SR was measured for 15 min before and after injection of Methy alone ($1 \mu\text{M/kg}$). Results revealed that the 5-HT₂ receptor antagonist methysergide per se had no effect on swallowing (0.79 ± 0.34 vs. 0.66 ± 0.29 sw/min in control and drug conditions, respectively; $p = 0.51$; Table S9).

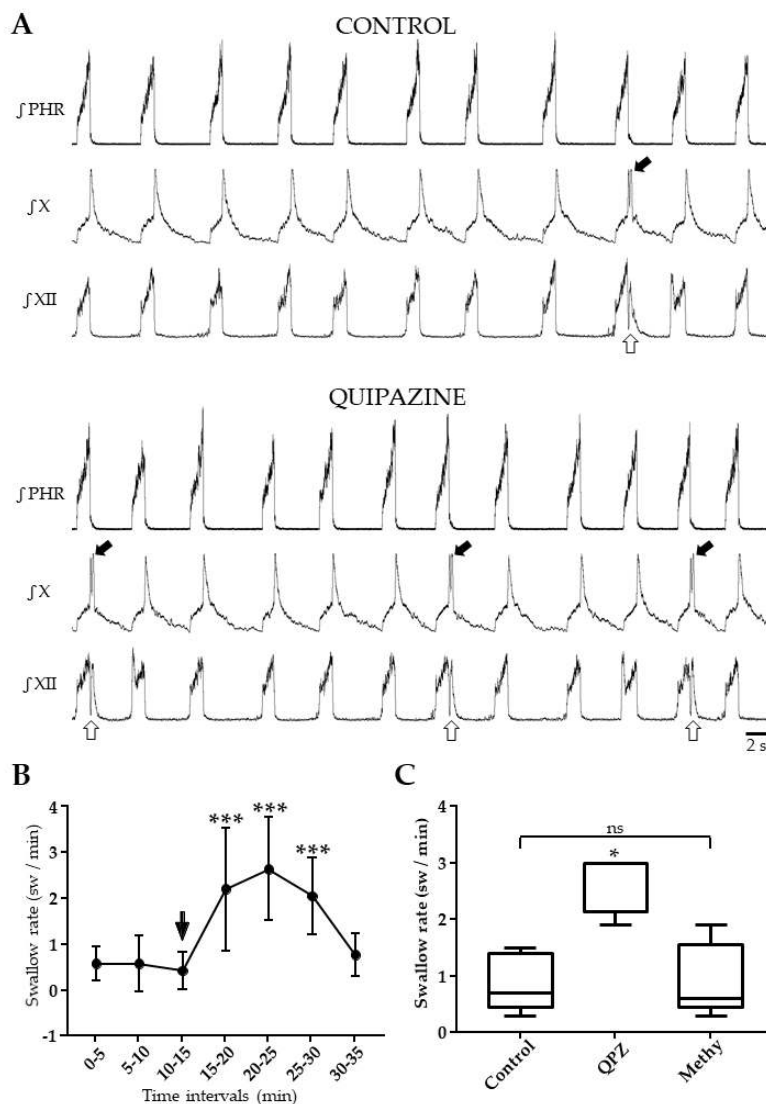


Figure 2. Effect of systemic quipazine (QPZ, 1.5 μ M/kg) on swallowing, and its blockade by methysergide (Methy, 1 μ M/kg). Integrated nerve activities in the same preparation during control and QPZ conditions, showing a drug-induced increase in swallowing (A). Swallows were identified by hypoglossal (XII, open arrow) and vagal (X, solid arrow) bursts. Changes in swallow rate, expressed as swallows per min (sw/min) per 5 min intervals, 15 min before (control) and 20 min after QPZ injection (arrow) (B). Comparisons of values with a Kruskal–Wallis test indicated the significant effect of QPZ ($p < 0.001$). Post-hoc tests revealed no change in swallow rate over the 15 min control period ($p = 0.43$), and a significant increase in swallow rate for 15 min after drug injection compared to control values (***, $p < 0.001$ for all comparisons). Methysergide reversed the excitatory effect of QPZ on swallowing (C). Boxplots representing swallow rates measured for 15 min in control conditions, for 5 min after systemic QPZ injection, and for 15 min after adding Methy into aCSF. A one-way ANOVA showed a significant difference across conditions ($F = 22.9$, $p < 0.01$). Swallow rate after QPZ injection was significantly increased compared to both control and Methy conditions (*, $p < 0.05$). Swallow rate measured after Methy injection did not differ from control values ($p = 0.87$, ns: not significant).

2.4. Analyses of Swallow-Breathing Coordination and Effect of Swallowing on Central Respiration

Analyses of the phase-relationship between swallowing and breathing were performed using single spontaneous swallows ($n = 182$) and QPZ-induced swallows ($n = 229$) (Figure 3A). In both cases, no swallowing occurred during central inspiration. Most of the swallows (~85%) corresponded to Post-I Sw; Exp Sw were also observed (Figure 3A). Of note, none of the Exp Sw occurred at the

expiratory to inspiratory phase transition, as attested by the lack of events in the last percentile (81%–100%) of the normalized expiratory phase duration of the swallow-breathing cycle (Figure 3A). Thus, each Exp Sw was preceded and followed by expiration, as shown in the electrophysiological traces (Figure 1A–D). Distribution of Post-I and Exp Sw within the respiratory cycle did not change across conditions ($X^2(1) = 0.79, p = 0.38$). In vivo, Post-I Sw prematurely terminated the preceding phrenic burst without affecting the central expiratory phase, whereas Exp Sw prolonged expiration without affecting the central inspiratory phase [8,27]. To perform similar analyses of the relationship between swallowing and central respiration in situ, we measured the effects of Post-I and Exp Sw on the inspiratory and expiratory phases of swallow-breathing cycles across conditions. Contrary to the studies mentioned above, Post-I or Exp Sw did not significantly change the duration of inspiration or expiration in situ, whether the swallows were spontaneous or induced by QPZ (Figure 3B).

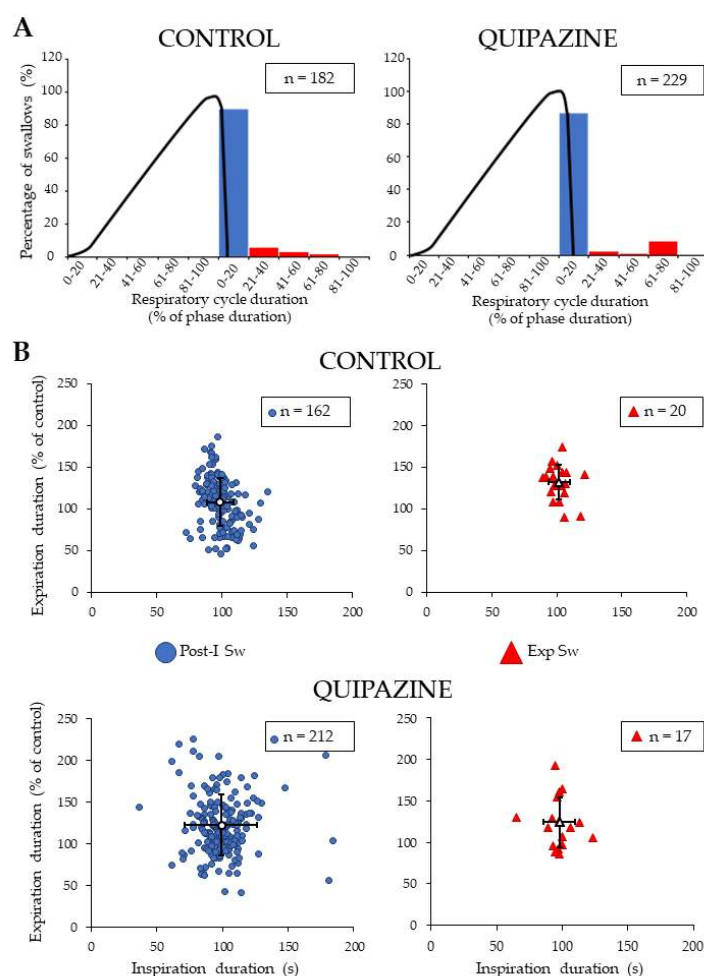


Figure 3. Analyses of swallow-breathing relationship. Occurrence of single swallows within the normalized swallow-breathing cycle in control and quipazine (1.5 $\mu\text{M/kg}$) groups (A). Histograms represent the percentage of swallows observed within the inspiratory and expiratory phases of the swallow-breathing cycles. The black line corresponds to the averaged integrated phrenic activity during fictive breathing and thus delineate the central inspiratory phase. Note that all of the swallows occurred in expiration, most of them being observed in post-inspiration (blue symbols). Effects of swallowing on central breathing (B). For both post-inspiratory (Post-I Sw) and expiratory (Exp Sw, red symbols) swallows (numbers indicated in boxes), duration of inspiration and expiration of the swallow-breathing cycle was normalized and compared to control breathing cycles. There was no significant change in inspiration or expiration phase duration induced by Post-I or Exp swallows in either control (upper panels) or quipazine (lower panels) conditions.

2.5. Effects of Central Drug Injections on Swallowing

Microinjection experiments first targeted the NTS ($n = 6$), a key structure involved in swallowing which also has a likely role in mediating the effects of serotonin [5,19]. To identify the swallowing trigger zone within the NTS, N-Methyl D Aspartate (NMDA, 1 mMol, 10–50 nL) was first injected (Figure 4). Then, the pipette containing the drug was removed and NMDA was replaced by QPZ (3mM, 50–200nL). After repositioning of the pipette at the same coordinates, QPZ was injected into the NTS ($n = 6$; Figure 4A). All NMDA microinjections resulted in repetitive swallows and central apnea (Figure 4B). In contrast, no swallow could be observed when QPZ was microinjected in the NTS swallowing trigger zone. This remained true even after repeated injections (two times) of the highest volume (200 nL) a minute apart, or after increasing drug concentration to 5 mM.

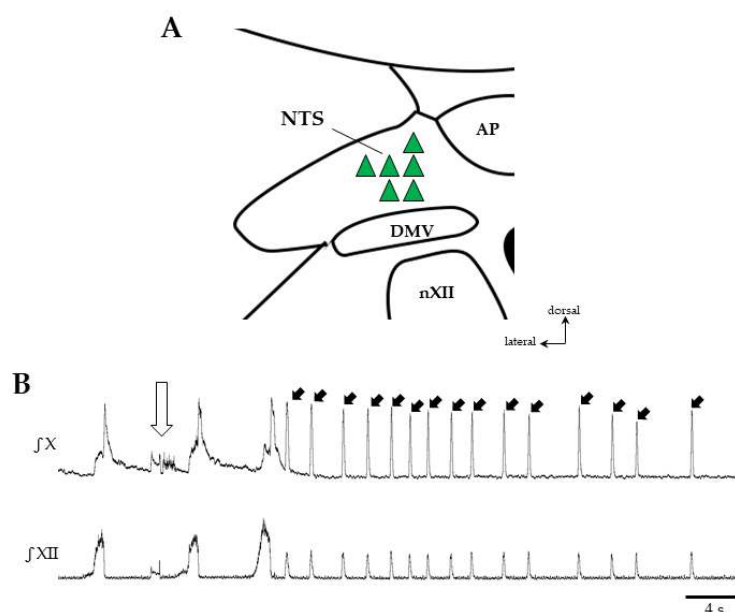


Figure 4. Effects of central drug microinjections in the nucleus of the solitary tract (NTS) on swallowing. Sites of drug injection within the NTS (A). Microinjection of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA, 1 mMol, 10–50 nL) in the NTS (green triangles) elicited swallowing, whereas quipazine (QPZ 3 mM, 50–200 nL) injected at the same sites did not. Representative traces of vagal (X) and hypoglossal (XII) nerve discharges after NMDA injection in NTS (open arrow) showing repetitive swallows (solid arrows pointing to the X burst) and central apnea (B). DMV, dorsal motor nucleus of the vagus nerve; AP, area postrema; nXII, motor nucleus of the hypoglossal nerve.

In other experiments, QPZ (3mM, 50–100 nL) was microinjected in the medullary raphe nuclei in order to map its effects on swallowing (Figure 5). This structure was chosen because it contains serotonergic neurons as well as non-serotonergic neurons, harboring 5HT_{2A} receptors and innervating numerous medullary nuclei, including the NTS [28]. Overall, 118 injections were made at 18 different sites in the caudal part of raphe nuclei ($n = 15$). The mean number of tracks was 3 ± 1 , and the mean number of injections per track was also 3 ± 1 per preparation. These microinjections produced either no change ($n = 86$) or an increase ($n = 32$) in SR compared to control conditions (Table 2).

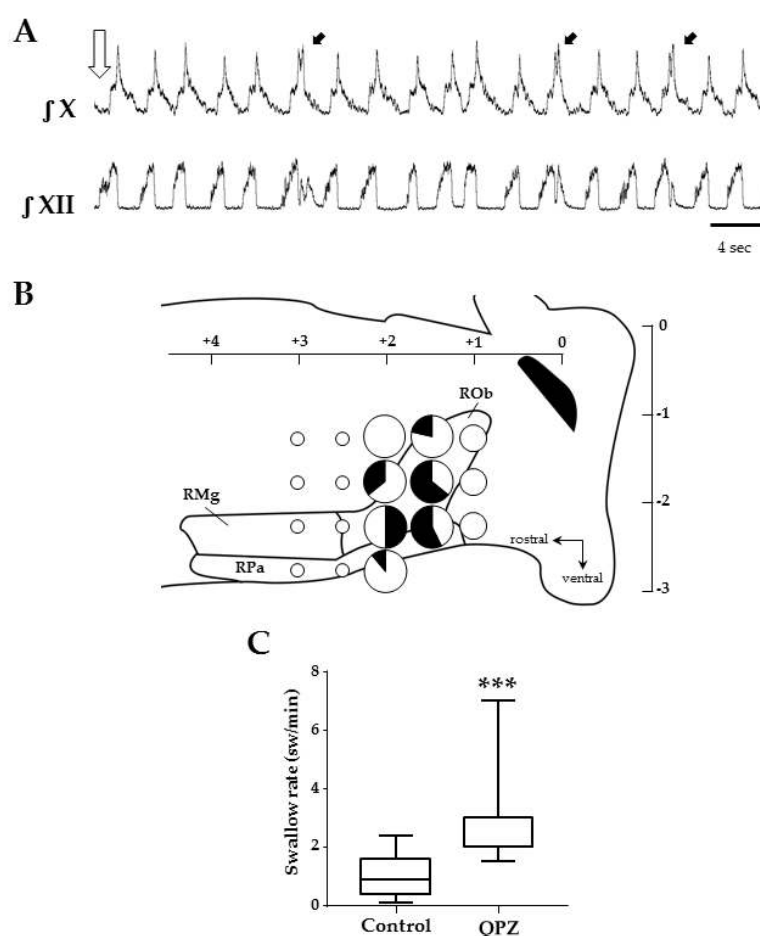


Figure 5. Effects of quipazine microinjections in the medullary raphe nuclei on swallowing. Example of swallows (black arrows) elicited after QPZ injection (open arrow) in the caudal medullary raphe (+1.5 mm from obex, −1.75 mm below the surface) (A). Schematic representation of the raphe medullary nuclei, and the 18 sites tested in 15 preparations to map the effects of QPZ on swallowing (B). Sites are represented as pie charts with different sizes, according to the total number of injections made in different preparations (small, medium and big sizes corresponding to 1–2, 3–7 and 8–14 injections, respectively), and different colors depending on the effect of QPZ (white: no change; black: increase in swallow rate). Mixed color pie charts indicate sites where QPZ produced both effects and display percentages of the observed effects. Note that 3 adjacent sites were identified in caudal parts of the raphe pallidus and obscurus where 50% or more of the tested injections elicited an increase in swallow rate. Swallow rates in control conditions and after successful QPZ injections in the raphe nuclei (C). Note that QPZ significantly increased the swallow rate compared to control values (***, $p < 0.001$). ROb, RPa and RMg: raphe obscurus, pallidus and magnus, respectively.

Table 2. Number of injections per site and effects of quipazine on swallowing after drug microinjection in the medullary raphe nuclei.

Depth (mm)	Obex (mm)				
	+1	+1.5	+2	+2.5	+3
1.25	(6)	3 (11)	(11)	(1)	(2)
1.75	(7)	9 (5)	5 (9)	(1)	(2)
2.25	(7)	8 (6)	6 (6)	(1)	(1)
2.75	—	—	1 (8)	(1)	(1)

Numbers indicated in parenthesis or in bold represent injections associated with no effect or an increase in swallow rate, respectively.

Similarly to systemic QPZ experiments, all swallows observed after QPZ microinjections in raphe nuclei were isolated (Figure 5A). To evaluate the effects of these microinjections on SR (and the latency to the first swallow), we used two different methods. First, regardless of the injection site, all successful injections leading to an increase in SR in a single preparation (range 1–4) were used to measure the mean SR per rat. Averaged QPZ group values revealed a significant increase in SR compared to control values (0.8 ± 0.7 vs. 2.2 ± 0.5 , $p < 0.001$, in control vs. QPZ conditions, respectively; Figure 5C; Table S10). SR was significantly increased for the first minute post-injection, but not over the 5 min post-injection period, compared to the control. The mean latency to the first swallow was 14 ± 11 s (Table S10). Then, we further analyzed the effects of QPZ on swallowing per site of injection. To do so, we counted the total number of injections made at a given site in our different rats and determined the number of successful (and unsuccessful) injections (Table 2).

A map representing the 18 sites of injections and the different effects of QPZ observed at each site is illustrated in Figure 5B. In most sites (12/18), QPZ injections did not change SR. However, successful injections were observed at six adjacent sites within the caudal aspect of the raphe nuclei encompassing the raphe pallidus and raphe obscurus. Consistent data were particularly obtained at three sites, where more than eight injections were made and 50% of them (or more) resulted in an increase in SR.

Table 3 reports the mean SR measured after QPZ injection at these sites. With this method of evaluation, SR at each of the three sites varied from 2.3 to 3.0 swallows per min, and group values showed a significant increase in SR at one minute, but not over the entire 5 min post-injection period (Table 3). Of note, the systemic or central route of QPZ injection resulted in similar SR (2.3 ± 0.8 vs. 2.7 ± 0.4 sw/min, respectively, $p = 0.19$), although the systemic route produced longer effects than the central route. The latency of the first swallow found with this method was 9.1 ± 3.9 sec. Interestingly, QPZ microinjections in the medullary raphe nuclei had no effect on Rf (30 ± 10 vs 30 ± 8 cycles/min, in control vs. QPZ groups, respectively; $p = 0.34$) or on BP (78 ± 23 mmHg for both groups).

Table 3. Changes in swallow rate (SR) after microinjections of quipazine (QPZ) at the most successful sites in raphe nuclei. SR was measured for 5 min in control, and for 1 and 5 min after QPZ injection.

Successful Sites (mm)		Swallow Rate (sw/min)			
From Obex	Depth	Control	QPZ 0–1 min	QPZ 0–5 min	Latency
+1.5	−1.75	0.8	2.9	2.0	7.8
+1.5	−2.25	0.8	3.0	2.1	6.0
+2	−2.25	1.4	2.3	2.0	13.4
Mean $\pm$ SD		1.0 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.2 ± 0.1	9.1 ± 3.9

3. Discussion

This study demonstrated that the serotonergic agonist QPZ enhanced swallowing in situ. Furthermore, injection of the 5-HT₂ receptor antagonist methysergide prevented the stimulatory effect of QPZ on swallowing but was without effect on spontaneous swallows. Both spontaneous and QPZ-induced swallows were isolated and displayed similar motor patterns and relationships with central breathing. Contrary to the effects of NMDA, microinjection of QPZ in the NTS did not enhance swallowing. By contrast, microinjection of QPZ in the medullary raphe nuclei increased SR. Thus, we concluded that pharmacological stimulation of swallowing by QPZ in situ represents a useful model to further study the core circuitry of the swCPG, mechanisms of neuromodulation of swallowing, and swallow-breathing interactions.

3.1. Distribution of Serotonergic Receptors in Brainstem Respiratory and Swallowing Networks

Serotonin 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a widespread monoaminergic neurotransmitter in the brain, and brainstem raphe nuclei represent the main source of 5-HT innervation to the brain and spinal cord. A large variety of 5-HT receptor (5-HTR) subtypes, ranging from 5-HTR1 to 5-HTR7, contribute to the neuromodulatory effects of 5-HT. Many structures belonging to the respiratory and

swallowing networks receive dense 5-HT projections [29–34] and express a majority of 5-HTR1 and 5-HTR2, although other types of receptors have been described. For example, the NTS contains neurons expressing 5-HTR1a, 5-HTR1b, 5-HTR2a, 5-HTR2c [28,35,36], 5-HTR3 [37], 5-HTR4 [38] and 5-HTR7 receptor subtypes [39]. Axonal labeling has also been observed, notably in the solitary tract [40]. In the ventral medulla, neurons of the pre-Bötzinger complex express 5-HTR1a, 5-HTR2a and 5-HTR4a receptors [41–43]. In the dorsolateral pons, parabrachial neurons express 5-HTR1a, 5-HTR2a, 5-HTR2c and 5-HTR3 receptors [44]. In addition, cranial and spinal motor nuclei involved in breathing and/or swallowing harbor dense 5-HT axon terminals. Hypoglossal motoneurons express 5-HTR1a, 5-HTR1b and 5-HTR2a receptors [45]. These receptors are also retrieved in the nucleus ambiguus, where laryngeal and pharyngeal motoneurons are located [45–47]. Phrenic motoneurons are known to express multiple serotonergic receptors, including 5-HTR1b, 5-HTR2a and 5-HTR2c [48]. Therefore, such a large number of structures expressing a diversity of 5-HTR subtypes likely mediate multiple functional effects induced by 5-HT or serotonergic mimetics such as QPZ.

3.2. Specificity and Functional Effects of Quipazine

Quipazine is a predominantly 5-HTR2a agonist [49–51], and it may have a potential agonist activity at 5-HTR1b [52–54]. Quipazine also acts as a potent antagonist at peripheral 5-HT3 receptors [49,55,56]. Interestingly, 5-HT2a receptor stimulation by QPZ has been used to induce motor activity and promote recovery of function after spinal cord injury in rodents [57,58]. Quipazine also promotes fictive locomotion via stimulation of 5-HT2a receptors on in vitro spinal cord preparations from newborn rats [59]. At a cellular level, QPZ excites both interneurons and motoneurons of the spinal locomotor networks through 5HT2a stimulation [60,61]. Of note, reports in rodents suggested that QPZ has no affinity for 5HT1a autoreceptors which are classically coupled to inhibitory G proteins [51,59,61]. Thus, it is reasonable to assume that elicitation of fictive swallowing after systemic QPZ injection in situ was mainly achieved via 5-HTR2a stimulation at the central level. The blockade of this stimulatory effect by the 5-HTR2 antagonist methysergide is in agreement with this assumption.

Numerous experiments demonstrated an important role for the 5HT2a in central respiratory control [62–66] and cardiovascular regulation [47,67,68], in accordance with a moderate to strong somatodendritic 5-HTR2a expression in medullary structures involved in cardiorespiratory control, including cranial motoneurons [69]. Activation of 5-HTR2a induced a membrane depolarization and increased firing frequency of both phrenic and hypoglossal motoneurons [70–72], expiratory interneurons of the ventral respiratory column [73], as well as sympathetic preganglionic neurons [74]. Interestingly, intravenous injection of a serotonergic agonist acting at 5-HTR2a (and 2c) improved upper airway stability and also elevated blood pressure (BP) [75]. Thus, the increases in Rf and BP observed herein after systemic QPZ injection may result from a broad stimulation of 5HT2a expressed by medullary neurons of the cardiorespiratory networks. Our results showed no significant correlation between changes in Rf or BP and SR after systemic QPZ injection. Thus, we believe that enhancement of swallowing after systemic QPZ was not a secondary side effect originating from alteration of cardiorespiratory functions. Distinct medullary structures may mediate the different functional effects of QPZ. This view is reinforced by our results showing that microinjection of QPZ in medullary raphe nuclei also increased SR but had no effect on Rf and BP.

3.3. Effects of QPZ on Swallowing

Previous studies on serotonergic modulation of swallowing reported conflicting results in anesthetized rats. Stimulatory effects of various serotonergic agonists such as 5-HT, CPP and QPZ were first reported [5], whereas Kessler and Jean [21,22] showed inhibitory effects of monoamines including noradrenaline, 5HT and QPZ and suggested the existence within the NTS of a serotonergic inhibition of the swallowing reflex elicited by laryngeal afferents. Discrepancies may be due to the use of different doses of serotonergic agonists, but also different anesthetics between these studies [19]. The excitatory effect of QPZ on swallowing found in our experimental model without anesthesia

confirmed earlier observations [5]. However, a similar dose of QPZ (1–2 $\mu\text{M}/\text{kg}$) produced a shorter effect in situ (15 min, present results) than in vivo (up to hours) [5]. Similarly, a faster SR was reported in vivo (up to 7–8 swallows per min). A lower temperature and/or a decrease in drug bioavailability may be responsible for this reduced effect of QPZ in situ.

All of the spontaneous and QPZ-induced swallows were isolated, and showed similar types of swallow and motor patterns, with a similar delay between the starts of the XII and X swallowing bursts. This physiological sequence of motor events characterizes the pharyngeal phase of swallowing [7,8]. Interestingly, the 5-HT₂ antagonist methysergide efficiently blocked the stimulatory effect of QPZ on swallowing but did not suppress all swallows. These results suggest that QPZ may increase excitability of the swCPG via 5-HT₂ stimulation. They also suggest that the blockade of 5-HT₂ has no effect on mechanisms involved in spontaneous (or reflexive) swallow production. Spontaneous swallows in situ have been interpreted as being due to an incomplete descending inhibitory gating from the pons [12,16]. We do not exclude, however, the possibility that fluid penetration (or small movements of fluid) in upper airways produced a tonic excitation of swallowing-related peripheral afferents, and resulted in low numbers of reflexive (instead of spontaneous) swallows in our preparations.

3.4. Swallow-Breathing Coordination In Situ

Single but not repetitive swallows were produced after QPZ injection, allowing swallow-breathing coordination and the effects of swallowing on central respiratory activity to be analyzed in situ. This method of pharmacological elicitation of isolated swallows represents an advantage over sustained electrical stimulation of the superior laryngeal nerves or injection of water into the pharyngeal cavity which resulted in repetitive swallows [8,10,12,13]. Most swallows were produced near the phase transition between central inspiration and the post-inspiratory phase of breathing, in agreement with previous experimental data in vivo [8,9] and in situ [12,16]. However, there was no significant change in duration of central inspiration or expiration by Post-I or Exp swallows, respectively. This is in contrast with recent results obtained in ventilated animals [8], but in agreement with a previous observation during stage 2 auto-resuscitation in situ [16]. Fictive breathing in situ is not associated with rib cage movement, airflow, vagal feedback from the lungs, muscle feedback or changes in glottal or sub-glottal pressure. The present data suggest a contribution of these parameters in swallow-breathing interactions. This is in line with evidence showing a negative modulation of swallow initiation by vagal feedback and a resetting by lung inflation (peripheral gating), highlighting the important role of vagal pulmonary afferent activity in swallow-breathing coordination [8]. Future in situ experiments using artificial ventilation applied through the upper airway or a tracheal tube may help to further explore the role of these parameters.

3.5. Is the NTS Involved in Serotonergic Modulation of Swallowing?

The NTS is supposed to contain the second-order sensory neurons and the core circuitry forming the swallowing central pattern generator (swCPG) responsible for the purely reflexive pharyngeal phase of swallowing [2,76–78]. Deglutition can be triggered by activating either NMDA or non-NMDA receptors localized within the NTS, suggesting that both receptor subtypes are involved in swallowing elicited under physiological conditions [18]. Consistent with this observation, our results showed that repetitive swallows with central apnea were readily evoked after microinjection of NMDA within the swallow trigger zone in the NTS. However, no swallow could be induced after microinjection of QPZ in the active NTS sites, despite the expression of 5-HT₂ (including 5-HT_{2a}) in NTS neurons [28,40]. Therefore, our results suggest that 5-HT_{2a} stimulation of NTS neurons is unable to initiate and/or enhance swallowing. This markedly contrasts with the conclusions from findings in anesthetized rats, although 5-HT but not QPZ was microinjected in the NTS [19]. Further experiments are required to clarify this apparent complex serotonergic neuromodulation of swallowing at the level of the NTS.

3.6. Medullary Raphe Nuclei May Modulate Swallowing

Previous work by Jean and Kessler [22] showed that electrical stimulation of several brainstem structures overlapping serotonergic regions, such as the nucleus raphe magnus and the nucleus raphe pallidus, induced an inhibition of swallowing. Opposite results were obtained in our study, since microinjection of QPZ in the caudal aspect of medullary raphe nuclei, including the raphe obscurus and pallidus, increased SR. Methodological differences between the two studies may explain these conflicting results. Brainstem raphe nuclei contain distinct groups of neurons, i.e., serotonergic and non-serotonergic cells, harboring different serotonergic receptors, and are supposed to play distinct functional roles (see below) [28]. Given this heterogeneity of neurons, electrical stimulation of the raphe nuclei may not represent an appropriate method to study serotonergic modulation of swallowing. On the contrary, it is conceivable that drug microinjection in raphe nuclei exerted a more selective stimulation of neuronal sub-types, unraveling a serotonergic stimulatory effect on swallowing. Raphe nuclei have been suggested to control the cough reflex [79]. To our knowledge, the present study is the first to suggest a direct implication of medullary raphe nuclei in the control of swallowing.

Serotonergic neurons of the medullary raphe nuclei mostly express 5-HT_{1a} somatodendritic autoreceptors responsible for an inhibition of serotonergic transmission, whereas non-serotonergic raphe neurons harboring the excitatory 5-HT_{2a} have been involved in autonomic functions including the control of breathing [28,80]. Interestingly, serotonergic and non-serotonergic medullary raphe neurons displayed distinct electrophysiological properties [81,82], and many non-serotonergic (mesencephalic) raphe projection neurons are glutamatergic [83]. Therefore, distinct afferent inputs to the NTS from the raphe nuclei could exert a differential neuromodulation within the respiratory and swallowing networks. We suggest that QPZ may stimulate post-synaptic 5-HT_{2a} of serotonergic or more likely non-serotonergic raphe neurons, which in turn may excite the NTS neurons forming the swCPG. Further investigations are needed to verify this hypothesis, notably to demonstrate an increased excitability of raphe neurons during swallowing, precise their phenotype and identify their afferent and efferent projections.

3.7. Functional Relevance of Findings

Raphe nuclei have a major role in the control of cranial and spinal motoneuron excitability and autonomic function, including breathing [24]. This study suggests a role for the caudal medullary raphe nuclei in serotonergic control of swallowing, although precise conditions that could stimulate raphe nuclei to increase swallowing remain to be identified. Our results also reinforce the view that raphe nuclei represent an important structure extrinsic to the swCPG that could operate as a link between higher CNS structures and the brainstem swallowing network [76]. For example, if the raphe regions identified herein receive projections from swallowing-related cortical areas and send efferent projections to the swCPG in NTS, they might be involved in volitional control of swallowing. Loss of medullary serotonergic raphe neurons occurs in multiple system atrophy [24], and patients with this disease also suffer from dysphagia [25]. In addition, breathing and feeding difficulties are frequently observed in Prader–Willi syndrome (PWS) and Shaaf–Yang syndrome [84], and several alterations in raphe nuclei have been demonstrated in mice models for PWS [85–87]. Better knowledge of serotonergic modulation of swallowing, such as identification of new targets, mechanisms of action, and serotonergic receptor subtypes, would be particularly useful to find new therapeutic treatments for patients suffering from dysphagia.

4. Materials and Methods

Rats were handled and cared for in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (N.R.C., 1996), the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU, 74), as well as the French laws. Since all experiments were performed post-mortem, experimental protocols did not need accreditation from the French Ministry of Agriculture.

4.1. Working Heart-Brainstem or In Situ Preparation

The experiments were performed in the arterially perfused working heart-brainstem (in situ) preparation as described originally by Paton [88]. Juvenile *Wistar* rats (P15-P21; $n = 42$; body weight 50–110 g; Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) were deeply anesthetized with isoflurane (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether; Baxter). The level of anesthesia was assessed by a lack of response to noxious pinches of the hindpaw or the tail. Once both cardiac and respiratory activities were depressed, animals were transected below the diaphragm and decerebrated at the pre-collicular level. The preparation was then immersed in cool (5 °C) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) gassed with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂; pH 7.35) and skinned. The composition of aCSF was as described previously [7]. Lungs, but not the heart, were systematically removed, the descending aorta was isolated, and the right phrenic, vagal and hypoglossal nerves were dissected free from surrounding tissues and prepared for recording. The preparation was moved to a recording chamber, where the descending aorta was cannulated and perfused with warm (32 °C) oxygenated aCSF using a peristaltic pump (Watson-Marlow, Falmouth, Cornwall, UK; model 520s). The perfusate was filtered and continuously recirculated. Flowrates (20–28 mL/min) were adjusted to obtain a stable eupneic pattern of breathing, as evidenced by a ramp-like inspiratory activity recorded from the phrenic nerve, a sharp transition between inspiration and expiration, and by a post-inspiratory discharge activity recorded from the vagal nerve. The perfusion pressure (50–125 mmHg) was measured via a double lumen cannula connected to the descending aorta and a blood pressure monitor (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA).

4.2. Recording and Analyses of Cardiorespiratory and Swallowing Parameters

Motor activities were recorded from the phrenic (Phr), vagal (X) and hypoglossal (XII) nerves using suction electrodes mounted on micromanipulators. Raw and integrated (time constant 100 ms) signals were amplified and filtered (gain 500–10000; BP 300–3000Hz) before being digitized (12 KHz, 16 bits). Signals corresponding to blood pressure (BP) and electrocardiogram (ECG) were also recorded and digitized (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA). Digitized signals were visualized and stored on a PC for later processing (OpenEx softwares, Plexon Inc., Dallas, TX, USA). In all experiments, stable respiratory rhythm with a clear three-phase pattern on nerve activities was detected 20 to 30 min after onset of reperfusion. This pattern included a pre-inspiratory XII activity, a ramp-like Phr activity and a typical decrementing vagal discharge indicative of the post-inspiratory phase of breathing. Swallowing consisted in short-lasting (300–500 ms) bursts on the XII and X nerves, corresponding to normal outflow to tongue and laryngeal muscles, respectively [7,8,12].

Several criteria were used to precisely identify and quantify respiratory and swallowing parameters from integrated nerve signals, as partially described in previous studies [7,8,89]. First, swallows were characterized by concomitant bursts on cranial nerves, with a slight precession of the XII burst which corresponded to the normal sequence of motor events. Second, swallow-related bursts not associated with respiratory activity on Phr, XII and X nerves were labeled as to expiratory-type swallows (Exp Sw). Those immediately preceded by early expiration (or post-inspiration) corresponded to post-inspiratory type swallows (Post-I Sw). The start of the Post-I Sw was always marked by a clear indentation (almost reaching the baseline) on the integrated XII signal. An indentation was also seen on the integrated X trace toward the beginning of Post-I swallow. This indentation was always preceded by a peak corresponding to respiratory (i.e., post-inspiratory) discharge, and followed by another peak corresponding to swallow-related discharge.

A semi-automatic thresholding method was applied to each integrated trace to detect and mark the rising edge and/or peak of each respiratory or swallowing burst (Offline Sorter, Plexon Inc., Dallas, TX, USA Ver2). The peak markers were then used as triggers to compute averaged envelopes, and measure burst and/or cycle duration (in seconds), as well as peak amplitude and area under the curve (AUC) in arbitrary units (NeuroExplorer, Plexon Inc., Dallas, TX, USA Ver3.266). For respiratory parameters, inspiratory and/or post-inspiratory nerve activities were measured before and after drug

application using 20 to 50 respiratory cycles. These cycles were made of consecutive breaths in control condition, but not after drug application due to more frequent swallow-breathing cycles. For swallow parameters, the total duration of both Post-I and Exp swallows were defined as the delay between the start of the integrated XII discharge and the end of the integrated X discharge. Whatever the type of swallow, the start and the end of the XII burst were constantly used to measure the duration and AUC of the XII burst (Figure S1). A similar method was used to compute the duration and AUC of Exp swallows. Due to the overlap between respiratory and swallowing discharges of the X nerve, we developed an original method to provide accurate measurements of the duration and AUC of the X burst during Post-I swallows (Figure S1A). Indeed, we noticed that if the indentation clearly visible on the X envelope toward the beginning of swallowing was used to mark the start of the X swallow burst, it resulted in reduced duration and AUC of Post-I X bursts compared to values measured during Exp swallows (Figure S1B). This was considered an artefact, because the duration (and AUC) of the XII bursts and the total duration of swallow were almost similar between the two types of swallows. Thus, we used a graphical method to estimate the start of the Post-I X burst (Figure S1C). The rising edge of the Post-I X burst was used to draw a tangent line from the peak, through the indentation, down to the baseline of the integrated trace. The crossing point between the tangent line and the baseline was used to define the (estimated) start of the X burst. The resulting construct formed a triangular envelope delineating the Post-I swallow-related X burst, from which consistent measurements of burst duration and AUC were made.

4.3. Pharmacological Induction of Swallowing

A few spontaneous swallows have been observed *in situ* when preparations displayed a eupneic pattern of breathing [16]. To enhance the number of swallows *in situ*, we used a pharmacological method previously described in the rat *in vivo* [5], consisting in systemic injection of the serotonergic agonist quipazine (QPZ, quipazine maleate, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). The drug concentration was first assessed in preliminary experiments by varying the dose of QPZ dissolved in the aCSF (range 0.5–10 $\mu\text{M/Kg}$). Swallowing was enhanced with 1 and 2 $\mu\text{M/Kg}$ drug concentrations, and higher doses did not produce stronger or longer effects. Therefore, we choose a concentration of 1.5 $\mu\text{M/Kg}$ of QPZ in the present experiments, because it not only corresponded to the optimal drug concentration found in our preliminary study, but also matched the doses used *in vivo* [5]. In order to evaluate the low production of swallow in control conditions, i.e., spontaneous events without drug, the number of swallows was counted in each rat over 10 or 15 min, and results were expressed as swallows per min and averaged per 5 min intervals. After this control period, QPZ was added to the aCSF (systemic injection), and the number of swallows was counted over 15 to 20 min, and results were also expressed as mean SR per 5 min intervals and per rat. Other experiments ($n = 5$) were performed to test the ability of the 5-HT₂-receptor antagonist methysergide (methysergide bimeleate, Sigma; 1 $\mu\text{M/kg}$ in aCSF) to block QPZ-induced swallowing. In those experiments, after an initial 10–15 min control period, QPZ was injected in aCSF and SR was determined for 5 min. Then, methysergide was added to the perfusate and SR was recorded for 15 to 20 min after drug injection. Other experiments ($n = 3$) were performed to test the effect of methysergide alone on swallowing. Swallow rate was measured for 15 min before and after injection of methysergide (1 $\mu\text{M/kg}$). Two series of experiments were designed to study the central effects of QPZ on swallowing. In the first series, we performed microinjections of QPZ (3 mM, 50–200 nL) into the NTS ($n = 5$) using a nanoinjector (WPI, USA) mounted on a micromanipulator (nanostepper), and a microcontroller allowing flowrate and volume adjustments (5–10 nL/s, WPI, USA). The proper placement of the pipette into the NTS swallowing “trigger zone” was first assessed by microinjection of N-methyl-D-aspartate (NMDA, 1 mM, 10–50 nL; $n = 5$), as previously reported [18]. Because NMDA but not QPZ induced swallowing, we did not quantify SR in this series. In the second series, we mapped the effects of QPZ microinjections (3 mM, 50–100 nL) within the caudal medullary raphe nuclei ($n = 15$). In these experiments, the control SR was measured for 15 min before the injection protocol. The nanoinjector was positioned perpendicular to

the floor of the fourth ventricle and moved along the midline from 1 to 3 mm rostral to the obex with 0.5 mm steps. Then the pipette was inserted through the dorso-ventral axis of the medulla at depths between 1.25 to 2.25–2.75 mm below the surface with 0.5 mm steps. In each rat, several tracks were performed at different positions along the midline. A single track was made at a given midline position, and 3 to 4 injections were made per track. Only one injection was made at a given depth, and a 5 min period was always respected between 2 injections. This delay was chosen because we noticed a rather short-lasting effect during the experiments, which was confirmed by offline analyses. For each site of injection, results are reported as a success or a failure to increase SR for the first minute post-injection (although SR was also measured over the 5 min period post-injection). Thus, each success or failure was attributed based on a single microinjection. For successful injections, the latency between the end of injection and the occurrence of the first swallow was also determined. All successful injections observed in an individual were used to calculate the mean SR per rat, and the mean latency to the first swallow. To further evaluate the potency of QPZ to increase swallowing at a given site, the total number of injections made at the same site in different rats was calculated, and numbers of successes and/or failures were determined. Each site was represented as a pie chart with a different color to depict the effects on swallowing, and a different size according to the total number of injections. For those sites where both successes and failures were observed, the colored areas within pie charts represented the percentages of successes and failures.

4.4. Experimental Protocol and Parameter Analyses

In each experiment, parameters related to spontaneous fictive breathing, BP, heart rate (ECG), and swallowing started to be recorded ~45 min after onset of reperfusion. Control cardiorespiratory parameters and the rate of spontaneous swallows were measured over an initial 15 min recording period. Then, the parameters were recorded over a longer period (~30–45 min) to analyze the effects of systemic or central QPZ injections, or the effects of methysergide, on cardiorespiratory and swallowing functions. Integrated activities of the Phr, X and XII nerves were marked and coded for measurements of breathing and swallow motor output (total duration of burst activity, peak amplitude, area under the curve, the delay between the starts and peaks of the XII and X bursts, as previously described) [8,11,89]. Overall, analyses were done using spontaneous ($n = 233$) and QPZ-induced swallows ($n = 307$) obtained in the same preparations ($n = 16$). The swallow duration was defined as the interval between the start of the swallowing-related XII nerve burst activity and the end of the swallowing-related X nerve burst activity. For analysis of swallow-breathing coordination in control and QPZ conditions, the duration of the normal respiratory cycle was first calculated from at least 15 successive respiratory cycles without swallowing. As both spontaneous and QPZ-induced swallows always resulted in isolated and not repetitive swallows (see Results), the occurrence of each isolated swallow was marked within each breathing cycle containing a swallow (i.e., swallow-breathing cycle). Analyses of the phase-relationship between breathing and swallowing were performed as described recently [8]. Durations of both inspiratory and expiratory phases of the swallow-breathing cycle were measured and normalized to control respiratory cycle values. Therefore, the occurrence of each swallow was expressed as a percentage of the control-normalized duration of the inspiratory or expiratory phase of breathing. Swallows that appear within 0%–20% of the normalized expiratory duration were labelled Post-I swallows, whereas the others occurring later during the expiratory phase (i.e., within 21%–100% of the normalized expiratory duration) were labelled Exp-swallows, as previously described [8].

4.5. Statistical Analyses

Results were averaged per preparation and per group. Amplitudes and areas under the curve (AUC) of integrated nerve activities, as well as duration of inspiration and expiration of the swallow-respiratory cycles, were normalized. Normality of the values was tested using the Shapiro–Wilk test. Variables with normal distribution were analyzed using paired *t*-tests or an analysis of variance (ANOVA), when two or three groups were compared, respectively. When normality

was not verified, continuous variables were compared using the nonparametric paired Wilcoxon test or the Kruskal–Wallis test (followed by Dunn’s post-hoc tests). A Pearson’s Chi-squared test with Yates’ continuity correction with a 2×2 contingency table was used to compare the distribution of swallows within the swallow-breathing cycle between control (spontaneous swallows) and QPZ groups. Comparisons of SR obtained in control, QPZ and methysergide groups were performed with ANOVA followed by Dunnett’s post-hoc tests. Pearson’s correlation tests were used to compare the magnitude of change in SR with change in either Rf or BP elicited by QPZ. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Values were considered significant when $p < 0.05$.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/14/5120/s1>. Figure S1. Schematic illustration of methods used to identify and quantify swallow-related bursts in situ. Table S1. Respiratory frequency (Rf) before and after systemic quipazine (QPZ) injection at 15 min, and latency to the first swallow after drug injection. Data are expressed per 5 min or 15 min intervals. Table S2. Of the inspiratory (Ti) and expiratory (Te) phases of breathing before and after systemic quipazine (QPZ) injection. Table S3. Blood pressure (BP, mmHg) before and after systemic quipazine (QPZ) injection, and percentage of increase (% Inc) between conditions. Table S4. Heart rate before and after quipazine (QPZ) injection. Table S5. Detailed comparisons of swallowing-related bursts before and after quipazine injection (QPZ). Duration of swallows, swallowing-related bursts and the delay between the starts of the hypoglossal and vagal nerves (Delay) are expressed in seconds, whereas burst amplitude and the area under the curve (AUC) are expressed in percentage of Control values. Table S6. Swallow rate (SR) before and after systemic quipazine (QPZ) injection at 15 min, and latency to the first swallow after drug injection. Data are expressed per 5 min or 15 min intervals in control and QPZ conditions. Table S7. Magnitude of increase in BP and Rf before and after systemic quipazine (QPZ) injection, and ratio between the mean swallow rate (SR) after QPZ injection and the mean SR in control condition (means ratio). Table S8. Swallow rate in control condition, after injection of quipazine alone (QPZ), and after methysergide (Methy) injection in the same preparation. Data are expressed per 5 or 15 min intervals. Table S9. Swallow rate and respiratory frequency before and after methysergide injection. Parameters were measured for 15 min before and after systemic drug injection. Table S10. Swallow rate (SR) before and after quipazine (QPZ) microinjection in raphe nuclei, and latency to the first swallow after drug injection. SR was measured for 5 min in control, and for 1 and 5 min after QPZ injection using successful trials eliciting swallows after drug injection.

Author Contributions: Conceptualization, C.G.; methodology, C.G., V.B.-L.; software, V.B.-L.; validation, C.G., V.B.-L.; formal analysis, C.G., V.B.-L.; investigation, C.G., V.B.-L.; resources, C.G., V.B.-L.; data curation, C.G., V.B.-L.; writing—original draft preparation, V.B.-L.; writing—review and editing, C.G., V.B.-L.; supervision, C.G.; project administration, C.G.; funding acquisition, C.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research project was supported by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Altman, K.W. Understanding dysphagia: A rapidly emerging problem. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* **2013**, *46*, xiii–xvi. [CrossRef]
- Costa, M.M.B. Neural Control of Swallowing. *Arq. Gastroenterol.* **2018**, *55* (Suppl. 1), 61–75. [CrossRef]
- Miller, N. Swallowing in Parkinson’s disease: Clinical issues and management. *Neurodegener. Dis. Manag.* **2017**, *7*, 205–217. [CrossRef]
- Suntrup, S.; Teismann, I.; Bejer, J.; Suttrup, I.; Winkels, M.; Mehler, D.; Pantev, C.; Dziewas, R.; Warnecke, T. Evidence for adaptive cortical changes in swallowing in Parkinson’s disease. *Brain J. Neurol.* **2013**, *136*, 726–738. [CrossRef]
- Bieger, D. Role of bulbar serotonergic neurotransmission in the initiation of swallowing in the rat. *Neuropharmacology* **1981**, *20*, 1073–1083. [CrossRef]
- Jean, A. Brain stem control of swallowing: Neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 929–969. [CrossRef]
- Gestreau, C.; Dutschmann, M.; Obled, S.; Bianchi, A.L. Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2005**, *147*, 159–176. [CrossRef]
- Horton, K.K.; Segers, L.S.; Nuding, S.C.; O’Connor, R.; Alencar, P.A.; Davenport, P.W.; Bolser, D.C.; Pitts, T.; Lindsey, B.G.; Morris, K.F.; et al. Central Respiration and Mechanical Ventilation in the Gating of Swallow with Breathing. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 785. [CrossRef] [PubMed]

9. Dick, T.E.; Oku, Y.; Romaniuk, J.R.; Cherniack, N.S. Interaction between central pattern generators for breathing and swallowing in the cat. *J. Physiol.* **1993**, *465*, 715–730. [\[CrossRef\]](#)
10. Gestreau, C.; Milano, S.; Bianchi, A.L.; Grelot, L. Activity of dorsal respiratory group inspiratory neurons during laryngeal-induced fictive coughing and swallowing in decerebrate cats. *Exp. Brain Res.* **1996**, *108*, 247–256. [\[CrossRef\]](#)
11. Roda, F.; Pio, J.; Bianchi, A.L.; Gestreau, C. Effects of anesthetics on hypoglossal nerve discharge and c-Fos expression in brainstem hypoglossal premotor neurons. *J. Comp. Neurol.* **2004**, *468*, 571–586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Bautista, T.G.; Dutschmann, M. Ponto-medullary nuclei involved in the generation of sequential pharyngeal swallowing and concomitant protective laryngeal adduction in situ. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 2605–2623. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Fuse, S.; Sugiyama, Y.; Hashimoto, K.; Umezaki, T.; Oku, Y.; Dutschmann, M.; Hirano, S. Laryngeal afferent modulation of swallowing interneurons in the dorsal medulla in perfused rats. *Laryngoscope* **2019**. [\[CrossRef\]](#)
14. Hashimoto, K.; Sugiyama, Y.; Fuse, S.; Umezaki, T.; Oku, Y.; Dutschmann, M.; Hirano, S. Activity of swallowing-related neurons in the medulla in the perfused brainstem preparation in rats. *Laryngoscope* **2019**, *129*, E72–E79. [\[CrossRef\]](#)
15. Paton, J.F.; Li, Y.W.; Kasparov, S. Reflex response and convergence of pharyngoesophageal and peripheral chemoreceptors in the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* **1999**, *93*, 143–154. [\[CrossRef\]](#)
16. Bautista, T.G.; Fong, A.Y.; Dutschmann, M. Spontaneous swallowing occurs during autoresuscitation in the in situ brainstem preparation of rat. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2014**, *202*, 35–43. [\[CrossRef\]](#)
17. Roda, F.; Gestreau, C.; Bianchi, A.L. Discharge patterns of hypoglossal motoneurons during fictive breathing, coughing, and swallowing. *J. Neurophysiol.* **2002**, *87*, 1703–1711. [\[CrossRef\]](#)
18. Kessler, J.P.; Jean, A. Evidence that activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors within the nucleus tractus solitarius triggers swallowing. *Eur. J. Pharm.* **1991**, *201*, 59–67. [\[CrossRef\]](#)
19. Hashim, M.A.; Bieger, D. Excitatory action of 5-HT on deglutitive substrates in the rat solitary complex. *Brain Res. Bull.* **1987**, *18*, 355–363. [\[CrossRef\]](#)
20. Haney, M.M.; Sinnott, J.; Osman, K.L.; Deninger, I.; Andel, E.; Caywood, V.; Mok, A.; Ballenger, B.; Cummings, K.; Thombs, L.; et al. Mice Lacking Brain-Derived Serotonin Have Altered Swallowing Function. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2019**, *161*, 468–471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Kessler, J.P.; Jean, A. Inhibition of the swallowing reflex by local application of serotonergic agents into the nucleus of the solitary tract. *Eur. J. Pharm.* **1985**, *118*, 77–85. [\[CrossRef\]](#)
22. Kessler, J.P.; Jean, A. Inhibitory influence of monoamines and brainstem monoaminergic regions on the medullary swallowing reflex. *Neurosci. Lett.* **1986**, *65*, 41–46. [\[CrossRef\]](#)
23. St-John, W.M.; Paton, J.F. Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. *Respir. Physiol.* **2000**, *123*, 201–213. [\[CrossRef\]](#)
24. Benarroch, E.E. Medullary serotonergic system: Organization, effects, and clinical correlations. *Neurology* **2014**, *83*, 1104–1111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Do, H.J.; Seo, H.G.; Lee, H.H.; Oh, B.M.; Kim, Y.; Kim, A.; Kim, H.J.; Jeon, B.; Han, T.R. tProgression of Oropharyngeal Dysphagia in Patients with Multiple System Atrophy. *Dysphagia* **2020**, *35*, 24–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Simons, J.A. Swallowing Dysfunctions in Parkinson's Disease. *Int. Rev. Neurobiol.* **2017**, *134*, 1207–1238. [\[CrossRef\]](#)
27. Saito, Y.; Ezure, K.; Tanaka, I. Swallowing-related activities of respiratory and non-respiratory neurons in the nucleus of solitary tract in the rat. *J. Physiol.* **2002**, *540*, 1047–1060. [\[CrossRef\]](#)
28. Paterson, D.S.; Darnall, R. 5-HT_{2A} receptors are concentrated in regions of the human infant medulla involved in respiratory and autonomic control. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **2009**, *147*, 48–55. [\[CrossRef\]](#)
29. Descarries, L.; Riad, M.; Parent, M. Ultrastructure of the serotonin innervation in the mammalian central nervous system. *Handb. Behav. Neurobiol. Serotonin* **2010**, *21*, 65–101.
30. Holtman, J.R., Jr. Immunohistochemical localization of serotonin- and substance P-containing fibers around respiratory muscle motoneurons in the nucleus ambiguus of the cat. *Neuroscience* **1988**, *26*, 169–178. [\[CrossRef\]](#)
31. Holtman, J.R., Jr.; Vascik, D.S.; Maley, B.E. Ultrastructural evidence for serotonin-immunoreactive terminals contacting phrenic motoneurons in the cat. *Exp. Neurol.* **1990**, *109*, 269–272. [\[CrossRef\]](#)

32. Hodges, M.R.; Richerson, G.B. Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: Neuromodulatory and trophic effects. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2008**, *164*, 222–232. [[CrossRef](#)]
33. Jacobs, B.L.; Azmitia, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* **1992**, *72*, 165–229. [[CrossRef](#)]
34. Voss, M.D.; De Castro, D.; Lipski, J.; Pilowsky, P.M.; Jiang, C. Serotonin immunoreactive boutons form close appositions with respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat. *J. Comp. Neurol.* **1990**, *295*, 208–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Okabe, S.; Mackiewicz, M.; Kubin, L. Serotonin receptor mRNA expression in the hypoglossal motor nucleus. *Respir. Physiol.* **1997**, *110*, 151–160. [[CrossRef](#)]
36. Austgen, J.R.; Dantzer, H.A.; Barger, B.K.; Kline, D.D. 5-hydroxytryptamine 2C receptors tonically augment synaptic currents in the nucleus tractus solitarii. *J. Neurophysiol.* **2012**, *108*, 2292–2305. [[CrossRef](#)]
37. Nosjean, A.; Callera, J.C.; Bonagamba, L.; Machado, B.; Hamon, M.; Laguzzi, R. Serotonin (3) receptor stimulation in the nucleus tractus solitarii activates non-catecholaminergic neurons in the rat ventrolateral medulla. *Neuroscience* **2002**, *112*, 935–949. [[CrossRef](#)]
38. Edwards, E.; Paton, J.F. 5-HT (4) receptors in nucleus tractus solitarii attenuate cardiopulmonary reflex in anesthetized rats. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, H1914–H1923. [[CrossRef](#)]
39. Matott, M.P.; Kline, D.D. Activation of 5-hydroxytryptamine 7 receptors within the rat nucleus tractus solitarii modulates synaptic properties. *Brain Res.* **2016**, *1635*, 12–26. [[CrossRef](#)]
40. Cornea-Hebert, V.; Riad, M.; Wu, C.; Singh, S.K.; Descarries, L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comp. Neurol.* **1999**, *409*, 187–209. [[CrossRef](#)]
41. Doi, A.; Ramirez, J.M. State-dependent interactions between excitatory neuromodulators in the neuronal control of breathing. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 8251–8262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Manzke, T.; Niebert, M.; Koch, U.R.; Caley, A.; Vogelgesang, S.; Hulsmann, S.; Ponimaskin, E.; Müller, U.; Smart, T.G.; Harvey, R.J.; et al. Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor $\alpha 3$ controls breathing in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 4118–4128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Niebert, M.; Vogelgesang, S.; Koch, U.R.; Bischoff, A.M.; Kron, M.; Bock, N.; Manzke, T. Expression and function of serotonin 2A and 2B receptors in the mammalian respiratory network. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21395. [[CrossRef](#)]
44. Gobbi, G.; Cassano, T.; Radja, F.; Morgese, M.G.; Cuomo, V.; Santarelli, L.; Hen, R.; Blier, P. Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2007**, *17*, 328–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Liu, Q.; Wong-Riley, M.T. Postnatal changes in the expressions of serotonin 1A, 1B, and 2A receptors in ten brain stem nuclei of the rat: Implication for a sensitive period. *Neuroscience* **2010**, *165*, 61–78. [[CrossRef](#)]
46. Wang, Y.; Ramage, A.G. The role of central 5-HT (1A) receptors in the control of B-fibre cardiac and bronchoconstrictor vagal preganglionic neurones in anaesthetized cats. *J. Physiol.* **2001**, *536*, 753–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dergacheva, O.; Griffioen, K.J.; Wang, X.; Kamendi, H.; Gorini, C.; Mendelowitz, D. 5-HT (2) receptor subtypes mediate different long-term changes in GABAergic activity to parasympathetic cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Neuroscience* **2007**, *149*, 696–705. [[CrossRef](#)]
48. Mantilla, C.B.; Bailey, J.P.; Zhan, W.Z.; Sieck, G.C. Phrenic motoneuron expression of serotonergic and glutamatergic receptors following upper cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **2012**, *234*, 191–199. [[CrossRef](#)]
49. Cohen, M.L.; Fuller, R.W. Antagonism of vascular serotonin receptors by m-chlorophenylpiperazine and m-trifluoromethylphenylpiperazine. *Life Sci.* **1983**, *32*, 711–718. [[CrossRef](#)]
50. Glennon, R.A.; Young, R.; Rosecrans, J.A. Antagonism of the effects of the hallucinogen DOM and the purported 5-HT agonist quipazine by 5-HT₂ antagonists. *Eur. J. Pharm.* **1983**, *91*, 189–196. [[CrossRef](#)]
51. Gorea, E.; Adrien, J. Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: Electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT₂ receptors. *Eur. J. Pharm.* **1988**, *154*, 285–291. [[CrossRef](#)]
52. Goodwin, G.M.; Green, A.R. A behavioural and biochemical study in mice and rats of putative selective agonists and antagonists for 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1985**, *84*, 743–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Peroutka, S.J. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex. *J. Neurochem.* **1986**, *47*, 529–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sills, M.A.; Wolfe, B.B.; Frazer, A. Determination of selective and nonselective compounds for the 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor subtypes in rat frontal cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *231*, 480–487. [[PubMed](#)]
55. Ireland, S.J.; Tyers, M.B. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced depolarization of the rat isolated vagus nerve. *Br. J. Pharmacol.* **1987**, *90*, 229–238. [[CrossRef](#)]
56. Round, A.; Wallis, D.I. Further studies on the blockade of 5-HT depolarizations of rabbit vagal afferent and sympathetic ganglion cells by MDL 72222 and other antagonists. *Neuropharmacology* **1987**, *26*, 39–48. [[CrossRef](#)]
57. Courtine, G.; Gerasimenko, Y.; van den Brand, R.; Yew, A.; Musienko, P.; Zhong, H.; Song, B.; Ao, Y.; Ichiyama, R.M.; Lavrov, I.; et al. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 1333–1342. [[CrossRef](#)]
58. Swann, H.E.; Kauer, S.D.; Allmond, J.T.; Brumley, M.R. Stimulation of 5-HT_{2A} receptors recovers sensory responsiveness in acute spinal neonatal rats. *Behav. Neurosci.* **2017**, *131*, 92–98. [[CrossRef](#)]
59. Oueghlani, Z.; Juvin, L.; Lambert, F.M.; Cardoit, L.; Courtand, G.; Masméjean, F.; Cazalets, J.R.; Barrière, G. Serotonergic modulation of sacral dorsal root stimulation-induced locomotor output in newborn rat. *Neuropharmacology* **2019**. [[CrossRef](#)]
60. Chopek, J.W.; MacDonell, C.W.; Power, K.E.; Gardiner, K.; Gardiner, P.F. Removal of supraspinal input reveals a difference in the flexor and extensor monosynaptic reflex response to quipazine independent of motoneuron excitation. *J. Neurophysiol.* **2013**, *109*, 2056–2063. [[CrossRef](#)]
61. Slawinska, U.; Miazga, K.; Jordan, L.M. 5-HT₂ (2) and 5-HT₂ (7) receptor agonists facilitate plantar stepping in chronic spinal rats through actions on different populations of spinal neurons. *Front. Neural Circuits* **2014**, *8*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. 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. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 48–55. [[CrossRef](#)]
63. Bou-Flores, C.; Lajard, A.M.; Monteau, R.; De Maeyer, E.; Seif, I.; Lanoir, J.; Hilaire, G. Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: Possible role of a serotonin excess. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 4646–4656. [[CrossRef](#)]
64. Cayetanot, F.; Gros, F.; Larnicol, N. Postnatal changes in the respiratory response of the conscious rat to serotonin 2A/2C receptor activation are reflected in the developmental pattern of fos expression in the brainstem. *Brain Res.* **2002**, *942*, 51–57. [[CrossRef](#)]
65. Kinkead, R.; Belzile, O.; Gulemetova, R. Serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. *J. Appl. Physiol.* **2002**, *93*, 936–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ramirez, J.M.; Tryba, A.K.; Pena, F. Pacemaker neurons and neuronal networks: An integrative view. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 665–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Shen, F.M.; Wang, J.; Ni, C.R.; Yu, J.G.; Wang, W.Z.; Su, D.F. Ketanserin-induced baroreflex enhancement in spontaneously hypertensive rats depends on central 5-HT_{2A} receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 702–707. [[CrossRef](#)]
68. Villalon, C.M.; Centurion, D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: A pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2007**, *376*, 45–63. [[CrossRef](#)]
69. Zhan, G.; Shaheen, F.; Mackiewicz, M.; Fenik, P.; Veasey, S.C. Single cell laser dissection with molecular beacon polymerase chain reaction identifies 2A as the predominant serotonin receptor subtype in hypoglossal motoneurons. *Neuroscience* **2002**, *113*, 145–154. [[CrossRef](#)]
70. Bobker, D.H. A slow excitatory postsynaptic potential mediated by 5-HT₂ receptors in nucleus prepositus hypoglossi. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 2428–2434. [[CrossRef](#)]
71. Lindsay, A.D.; Feldman, J.L. Modulation of respiratory activity of neonatal rat phrenic motoneurons by serotonin. *J. Physiol.* **1993**, *461*, 213–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Morin, D.; Monteau, R.; Hilaire, G. Compared effects of serotonin on cervical and hypoglossal inspiratory activities: An in vitro study in the newborn rat. *J. Physiol.* **1992**, *451*, 605–629. [[CrossRef](#)]
73. Lalley, P.M.; Bischoff, A.M.; Schwarzscher, S.W.; Richter, D.W. 5-HT₂ receptor-controlled modulation of medullary respiratory neurones in the cat. *J. Physiol.* **1995**, *487 Pt 3*, 653–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Pickering, A.E.; Spanswick, D.; Logan, S.D. 5-Hydroxytryptamine evokes depolarizations and membrane potential oscillations in rat sympathetic preganglionic neurones. *J. Physiol.* **1994**, *480 Pt 1*, 109–121. [[CrossRef](#)]
75. Ogasa, T.; Ray, A.D.; Michlin, C.P.; Farkas, G.A.; Grant, B.J.; Magalang, U.J. Systemic administration of serotonin 2A/2C agonist improves upper airway stability in Zucker rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *170*, 804–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Bieger, D. Rhombencephalic pathways and neurotransmitters controlling deglutition. *Am. J. Med.* **2001**, *111* (Suppl. 8A), 85–89. [[CrossRef](#)]
77. Ertekin, C.; Aydogdu, I. Neurophysiology of swallowing. *Clin. Neurophysiol.* **2003**, *114*, 2226–2244. [[CrossRef](#)]
78. Jean, A. Brainstem organization of the swallowing network. *Brain Behav. Evol.* **1984**, *25*, 109–116. [[CrossRef](#)]
79. Poliaček, I.; Jakus, J.; Simera, M.; Veternik, M.; Plevkova, J. Control of coughing by medullary raphe. *Prog. Brain Res.* **2014**, *212*, 277–295. [[CrossRef](#)]
80. Sotelo, C.; Cholley, B.; El Mestikawy, S.; Gozlan, H.; Hamon, M. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur. J. Neurosci.* **1990**, *2*, 1144–1154. [[CrossRef](#)]
81. Bayliss, D.A.; Li, Y.W.; Talley, E.M. Effects of serotonin on caudal raphe neurons: Inhibition of N- and P/Q-type calcium channels and the afterhyperpolarization. *J. Neurophysiol.* **1997**, *77*, 1362–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Bayliss, D.A.; Li, Y.W.; Talley, E.M. Effects of serotonin on caudal raphe neurons: Activation of an inwardly rectifying potassium conductance. *J. Neurophysiol.* **1997**, *77*, 1349–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Jackson, J.; Bland, B.H.; Antle, M.C. Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse* **2009**, *63*, 31–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Fountain, M.D.; Schaaf, C.P. Prader-Willi Syndrome and Schaaf-Yang Syndrome: Neurodevelopmental Diseases Intersecting at the MAGEL2 Gene. *Diseases* **2016**, *4*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Zanella, S.; Barthelemy, M.; Muscatelli, F.; Hilaire, G. Necdin gene, respiratory disturbances and Prader-Willi syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *605*, 159–164. [[CrossRef](#)]
86. Zanella, S.; Tauber, M.; Muscatelli, F. Breathing deficits of the Prader-Willi syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2009**, *168*, 119–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Matarazzo, V.; Caccialupi, L.; Schaller, F.; Shvarev, Y.; Kourdougli, N.; Bertoni, A.; Menuet, C.; Voituren, N.; Deneris, E.; Gaspar, P.; et al. Necdin shapes serotonergic development and SERT activity modulating breathing in a mouse model for Prader-Willi syndrome. *eLife* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Paton, J.F. A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J. Neurosci. Methods* **1996**, *65*, 63–68. [[CrossRef](#)]
89. Wang, S.; Benamer, N.; Zanella, S.; Kumar, N.N.; Shi, Y.; Bevingut, M.; Penton, D.; Guyenet, P.G.; Lesage, F.; Gestreau, C.; et al. TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 16033–16044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Assessment of the Use of Multi-Channel Organic Electrodes to Record ENG on Small Nerves: Application to Phrenic Nerve Burst Detection

Yvan Avdeew ^{1,†} , Victor Bergé-Laval ^{2,†}, Virginie Le Rolle ^{1,*}, Gabriel Dieuset ¹, David Moreau ³, Loïc Kergoat ², Benoît Martin ¹ , Christophe Bernard ² , Christian Gestreau ²  and Alfredo Hernández ¹

¹ Univ Rennes, Inserm, LTSI-UMR 1099, F-35000 Rennes, France; yvan.avdeew@univ-rennes1.fr (Y.A.); gabriel.dieuset@univ-rennes1.fr (G.D.); benoit.martin@univ-rennes1.fr (B.M.); alfredo.hernandez@univ-rennes1.fr (A.H.)

² Institut de Neurosciences des Systèmes (INS), INSERM, UMR-1106, Aix-Marseille Université Marseille, F-13007 Marseille, France; victor.berge-laval@etu.univ-amu.fr (V.B.-L.); kergoatloig@gmail.com (L.K.); christophe.bernard@univ-amu.fr (C.B.); christian.gestreau@univ-amu.fr (C.G.)

³ Mines Saint-Etienne, Centre CMP, Département BEL, F-13541 Gardanne, France; david.moreau@emse.fr

* Correspondence: virginie.lerolle@univ-rennes1.fr

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Avdeew, Y.; Bergé-Laval, V.; Le Rolle, V.; Dieuset, G.; Moreau, D.; Kergoat, L.; Martin, B.; Bernard, C.; Gestreau, C.; Hernández, A.

Assessment of the Use of Multi-Channel Organic Electrodes to Record ENG on Small Nerves: Application to Phrenic Nerve Burst Detection. *Sensors* **2021**, *21*, 5594. <https://doi.org/10.3390/s21165594>

Academic Editor: Nigel T. Maidment

Received: 4 May 2021

Accepted: 7 August 2021

Published: 19 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Effective closed-loop neuromodulation relies on the acquisition of appropriate physiological control variables and the delivery of an appropriate stimulation signal. In particular, electroneurogram (ENG) data acquired from a set of electrodes applied at the surface of the nerve may be used as a potential control variable in this field. Improved electrode technologies and data processing methods are clearly needed in this context. In this work, we evaluated a new electrode technology based on multichannel organic electrodes (OE) and applied a signal processing chain in order to detect respiratory-related bursts from the phrenic nerve. Phrenic ENG (pENG) were acquired from nine Long Evans rats in situ preparations. For each preparation, a 16-channel OE was applied around the phrenic nerve's surface and a suction electrode was applied to the cut end of the same nerve. The former electrode provided input multivariate pENG signals while the latter electrode provided the gold standard for data analysis. Correlations between OE signals and that from the gold standard were estimated. Signal to noise ratio (SNR) and ROC curves were built to quantify phrenic bursts detection performance. Correlation score showed the ability of the OE to record high-quality pENG. Our methods allowed good phrenic bursts detection. However, we failed to demonstrate a spatial selectivity from the multiple pENG recorded with our OE matrix. Altogether, our results suggest that highly flexible and biocompatible multi-channel electrode may represent an interesting alternative to metallic cuff electrodes to perform nerve bursts detection and/or closed-loop neuromodulation.

Keywords: neuromodulation; electroneurogram; organic electrode; suction electrode; phrenic nerve

1. Introduction

Neuromodulation is a therapeutic approach used in a number of pathologies including neurodegenerative and neuropsychiatric disorders [1–3], epilepsy [3,4], neural prostheses [5,6], chronic pain [7], etc. Regarding all of these clinical applications, a common difficulty is to provide effective therapy while minimizing side effects. In fact, delivering an optimal neuromodulation can be particularly complex, because the evoked effect highly depends on (i) the delivered stimulation parameters (current amplitude, frequency, etc.) [8], (ii) the individual response of a given patient to these parameters [8], and (iii) the used electrode configurations and technologies [9]. It has been shown that closed-loop control may be a promising approach to optimize the response to the therapy in a subject-specific, adaptive manner in order to minimize side effects [10]. Closed-loop neuromodulation therapy requires the definition of appropriate control variables and the electroneurogram

(ENG), acquired from implanted electrodes, may be a pertinent source of information to this goal [11]. However, improved electrode technologies and data processing methods are needed for the acquisition of this ENG and for deriving useful control variables.

Two types of electrodes are used for peripheral nerve stimulation and/or recording, extraneural electrodes in contact with the epineurium and intraneurals also called intrafascicular electrodes [12–14]. Extraneural electrodes are more commonly used in clinical practice [13,15]. Electrode designs and implanted materials are highly variable depending on clinical needs. Different methods of implantation and nerve cuffing can be used for extraneural electrodes, with the most commonly used being metallic spiral cuff electrodes and split-cylinder cuff electrodes [16]. Indeed, such metallic spiral nerve cuff electrodes have been used to record ENG data from small nerves, such as the phrenic nerve [17]. However, the design, materials, and implantation methods of those electrodes need to be improved, particularly regarding their adjustment to the morphology of the nerve, rigidity, difficulty to install, lose contact with the nerve, and/or nerve compression damages [18–21]. There is also a need for improving spatial resolution of peripheral nerve interfaces [22]. There are some reports of selective stimulation using large metallic multicontact cuff electrodes, such as the one adapted to the dog hypoglossal nerve trunk [23].

Moreover, conjugated polymers provide many benefits over metal electrodes in terms of compliance and biocompatibility as well as selectivity and sensitivity. Doped with polystyrene sulfonate (PSS), PEDOT:PSS has a greatly enhanced conductivity, chemical stability, and biocompatibility [24]. PEDOT:PSS was shown to be a prime material for polymer-based bio-electronic devices as its application on various cultured cell lines proved to preserve their survivability [25], and it was also used to both record and stimulate cortical areas [24,26] as well as peripheral nerves [27,28]. The substrate material of this electrode is parylen C, a polymer known for his flexibility [29,30], and his biocompatibility in both acute and chronic implantation as well as his minimal inflammatory reaction compared to PDMS, another biocompatible polymer used in chronic implantable electrodes [31].

To our knowledge, multicontact OE have not been used to record from small nerves, although this technology may have several advantages over metal electrodes, as discussed. In this paper, we choose to record from the phrenic nerve (PHR) which plays a crucial role in breathing. The objectives of our study were (1) to record pENG signals using a 16 channels custom-design OE adapted to the PHR nerve, (2) to analyze PHR burst detection in a multichannel basis, and (3) to analyze the performance of the OE in comparison with a suction electrode (SE) used as a gold standard.

This paper is organized as follows: Section 2 details the description of the experimental protocol and methods for data processing and comparison. Results on all datasets and a representative example are presented in Section 3. Discussion on the main findings and limitations of the study are given in Section 4.

2. Methods

2.1. *In Situ Preparation*

All experiments were performed in Long Evans rats ($n = 9$, P17–25, body weight 50–110 g) of either sex, using the arterially perfused working heart-brainstem or in situ preparation, as described previously [32,33]. This preparation allows the brainstem to be well oxygenated, maintaining a normal blood pH and resulting in a physiological eupneic pattern of respiratory motor activity [34]. Briefly, rats were deeply anesthetized with isoflurane (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether; Baxter). Each animal was transected below the diaphragm and decerebrated at the precollicular level once respiration was suppressed and the animal failed to respond to noxious pinch to the tail or toe. After transfer to an ice-cooled area (5 °C) and equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ aCSF (composition below), the skin and the lungs were removed. The cerebellum was also removed. The left PHR was prepared for recording (see Figure 1). Following these initial procedures, the preparation was transferred to a custom made recording chamber. The descending aorta was cannulated and perfused with warmed and carbogen-gassed

aCSF (33 °C) using a peristaltic pump (Watson-Marlow) via a double-lumen catheter connected to the aortic perfusion cannula and a blood pressure monitor (WPI, USA) at a flow rate of 24–32 mL/min. The aCSF is composed of (in mM) 125 NaCl, 3 KCl, 1.25 KH_2PO_4 , 2.5 CaCl_2 , 1.25 MgSO_4 , 25 NaHCO_3 , and 10 D-glucose (1.25% Ficoll), maintained at 7.35 pH by gassing with a 90% O_2 and 5% CO_2 carbogen. Filtered and passed through bubble traps, the perfusate was re-collected after leaking from the preparation and re-circulated after its re-oxygenation. Cardiac activity resumed within seconds and rhythmic contractions of respiratory muscles returned 2 to 5 min after the start of perfusion. Respiratory-related movements were abolished by using 250 μL of vecuronium bromide (3–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Organon) dissolved in aCSF to avoid muscular activity-related artifacts, but it does not affect the central activity of the respiratory network recorded on the nerves. The perfusion flow was then adjusted to obtain an identifiable three-phase respiratory pattern, which was assessed by the recording of the phrenic, vagus and hypoglossal nerve (not shown), innervating the diaphragm, the larynx and the tongue respectively, attesting of the state of the respiratory network (i.e., Inspiration, early-expiration and late-expiration).

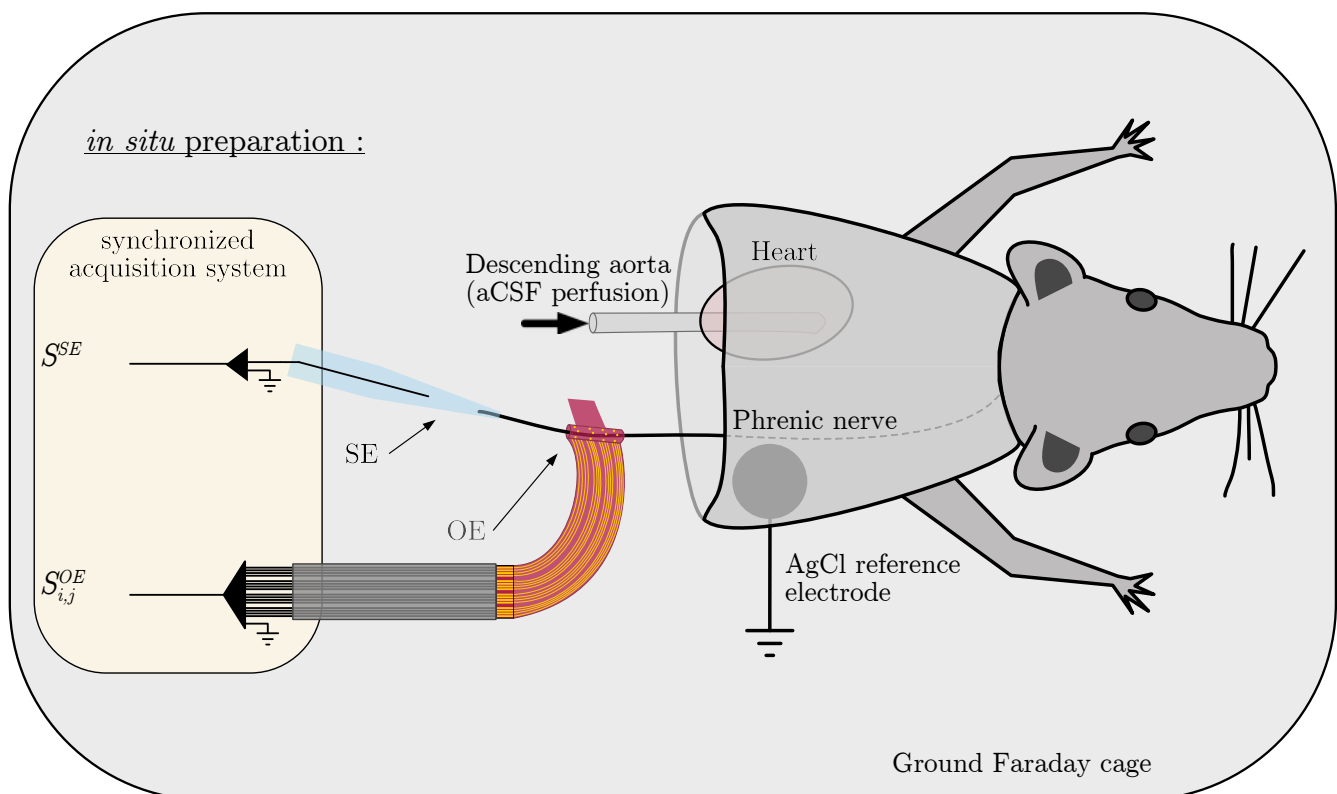


Figure 1. Schematic representation of the in situ preparation. Perfusion was applied through the descending aorta using a warmed (31 °C) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) equilibrated in carbogen. A pump with an adjustable flowrate was used to control perfusion pressure, and ensure an adequate oxygenation of the brainstem. Cardiorespiratory functions resume 5–10 min after re-perfusion, and the preparation generates an eupneic pattern of breathing. Serial recordings of the phrenic nerve discharge were made with SE attached to the cut end, and OE attached to the main nerve trunk. All signals were acquired synchronously with the same acquisition system.

2.2. Organic Electrode for ENG Recording

The recording grid is composed of 16 (4×4) OE with a size of $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$. Each OE will be noted here as $C_{i,j}$ (row i column j , as shown in Figure 2). The recording sites of the OE are disposed in $200 \mu\text{m} \times 135 \mu\text{m}$ rectangles. The OE was connected to the recording instrument with a zero insertion force (ZIF) connector with a $250 \mu\text{m}$ pitch. The device has a strip at the end and a hole of $100 \mu\text{m} \times 680 \mu\text{m}$ about $300 \mu\text{m}$ away from

the center of the grid. The grid is rolled around the PHR and locked by sliding the strip inside the hole. OE grid fabrication process was described previously [35,36]. A 3 μm thick parylene (PaC) layer (SCS Labcoater 2) is deposited on top of a clean glass slide. Then, metallic electrodes, interconnects, and contact pads are patterned by photolithography (SUSS MBJ4 Contact Aligner). First, AZnLOF2070 negative photoresist is patterned on top of the PaC. Then, a 10 nm thick chromium layer (for a better gold adhesion) and a 100 nm thick gold layer are deposited by thermal evaporation (Suss Microtec, MJB4 Mask Aligner). Finally, the metallic pattern is obtained by lifting off the resist in acetone. A second 3 μm PaC is deposited to act as insulator. Then, the outline of the device is patterned by photolithography using the positive photoresist AZ9260, followed by reactive ion etching of both PaC layers with an oxygen plasma (Oxford, Plasmalab 80 Plus). A sacrificial 3 μm thick PaC layer is deposited and openings in the PaC are patterned, on top of the electrodes and the contact pads, by photolithography using AZ9260 then etched by reactive ion etching with the oxygen plasma. A mixture of PEDOT:PSS (Heraeus Clevisions PH1000), ethylene glycol, dodecylbenzene sulfonic acid, and 3-glycidoxypopyltrimethoxysilane is then deposited by spin-coating and baked at 110 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min. The sacrificial layer is peeled off, leaving PEDOT:PSS only on top of the OEs and the contact pads. Then, the PEDOT:PSS is hard baked at 140 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Finally, the device is put in water and delaminates from the glass slide, to obtain the flexible device.

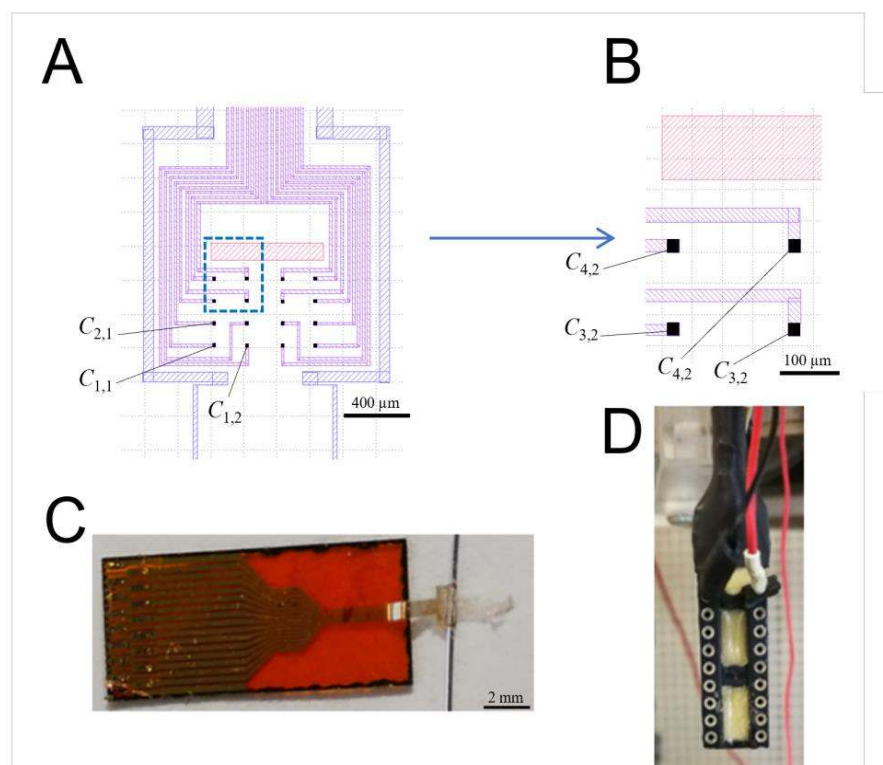


Figure 2. OE representation. (A) Schematic view of the 16 (4×4) recording sites with in purple gold wires; blue PaC boundaries; red gap to insert the tongue (upper panel) and dark purple the recording sites. The PaC tongue of the organic electrode is not fully represented here (dotted line) and is 4.4 mm long. (B) Zoomed view of the blue dotted square in A representing 4 gold/PEDOT:PSS recording sites $20 \times 20 \mu\text{m}$. A matrix notation of the form $C_{i,j}$ is used here to identify a given individual channel in row i and column j . The nerve lies along the horizontal axis on both top figures. (C) Whole picture of the organic electrode mounted on a kapton layer, with the recording sites wrapped around a $350 \text{ } \varnothing \mu\text{m}$ wire. (D) The reference is an Ag/Cl electrode connected to the black wire disposed under the ribcage of the animal and the red wire (the ground) is connected to a Faraday cage.

2.3. Electrochemical Impedance Spectroscopy

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were performed in a PBS solution, with an Autolab PGSTAT128N. PEDOT:PSS-coated electrodes were used as the working electrodes and an Ag/AgCl electrode as the counter electrode. A 10 mV sinusoidal voltage was applied at a frequency ranging from 10 to 100,000 Hz (Figure 3).

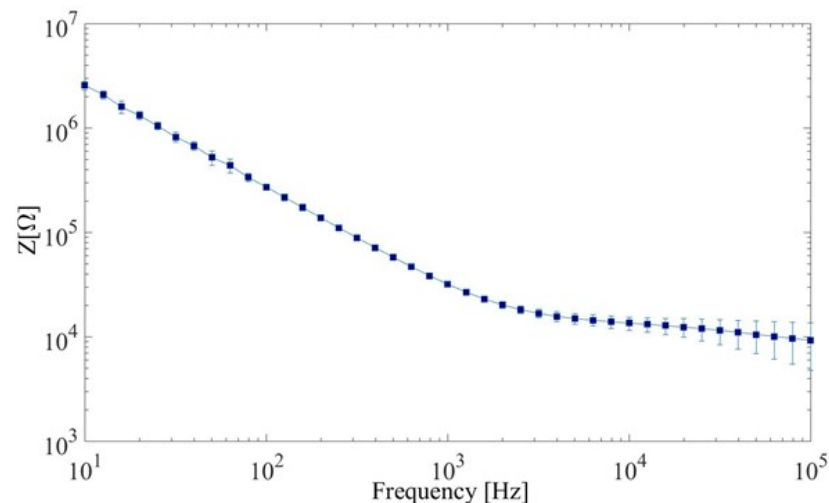


Figure 3. Electrochemical impedance spectrum of PEDOT:PSS-coated electrodes. Ten electrodes were used for these measurements.

2.4. Nerve Recordings

In each experiment, the left PHR, and the right vagus and hypoglossal nerves were dissected and cut to record the respiratory motor activity using glass suction electrodes (gold standard). SE was made from borosilicate glass capillaries tubes (OD 1.5 mm, WPI), pulled with a vertical pipette puller (Model 720, KOPF). The tip of the electrode was sectioned at a diameter fitting the recorded nerve (200 μ m for the PHR) and threaded to a silver probe and filled with conductive liquid (aCSF). The electrode was attached to a waterproof support with a side hole connected to a syringe, with which the nerve was suctioned into the electrode, forming an isolated medium inside it. Once in the electrode, the nerve will be connected to the silver probe due to the conductive liquid. Then, the matrix of organic electrodes was applied, surrounding the trunk of the left phrenic nerve. Signals were amplified and filtered (gain 0.5–10 K; BP 0.3–3 KHz), digitized (12 KHz, 16 bits; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA) and exported using OpenEx software (Offline Sorter and NeuroExplorer; Plexon Inc., Dallas, TX, USA). Signal from the gold standard SE pENG will be noted in this work as S^{SE} and those from each OE channel $C_{i,j}$ are named $S_{i,j}^{OE}$.

2.5. Data Processing

A data processing chain is proposed to compare phrenic bursts detection obtained from S^{SE} (gold standard) with each $S_{i,j}^{OE}$. The proposed method (Figure 4) starts with noise reduction and envelope detection. Then it proceeds to the extraction of comparison indicators (correlation and ROC curves). Each step of the developed approach will be explained in the following subsections.

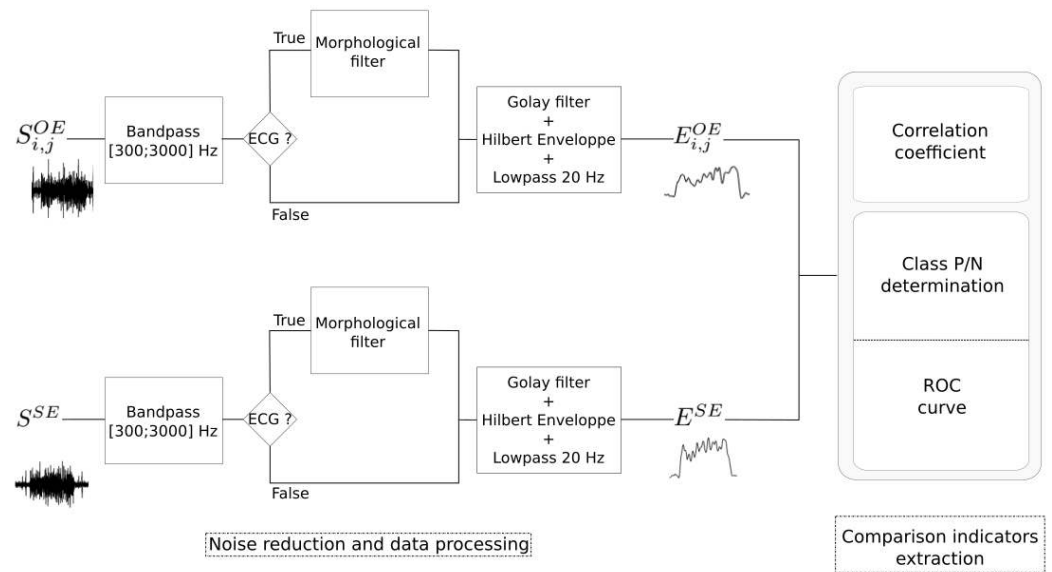


Figure 4. Description of data processing and feature extraction applied to OE and SE signals. All available channels from the OE are processed. Every channel is compared with the filtered SE signal, used as gold standard, in order to estimate performance.

2.5.1. Noise Reduction and Envelope Detection

All the acquired signals ($S_{i,j}^{OE}$ and S^{SE}) were bandpass filtered in the 300–3000 Hz interval using a 4th-order Butterworth filter [11]. When ECG artifacts are present (with an energy high enough to disturb phrenic bursts detection), morphological filters were applied on a moving 20-samples window, in order to reduce noise without disturbing the initial quality of the signal [37]. Then, a Savitzky–Golay filter was applied to smooth the signal without distortion and envelopes were obtained through a Hilbert transform. Finally, envelopes were smoothed using a 20 Hz 4th-order Butterworth low-pass filter. The resulting signal envelopes ($E_{i,j}^{OE}$ and E^{SE}) were used to extract performance indicators (see Figure 4).

2.5.2. Performance Indicators

In order to investigate the relations between OE and SE signals, two indicators were used: (1) correlation coefficient between $E_{i,j}^{OE}$ and E^{SE} , and (2) area under the curve (AUC) extracted from the receiver operating characteristic (ROC) curve produced to estimate the capacity of OE to detect spontaneous bursts using SE signal as reference.

Correlation coefficient: The Pearson correlation coefficient ($\rho_{i,j}$) was calculated to measure the degree to which $E_{i,j}^{OE}$ and E^{SE} signals are linearly related:

$$\rho_{i,j} = \frac{cov(E_{i,j}^{OE}, E^{SE})}{\sigma_{i,j}^{OE} \cdot \sigma^{SE}} \quad (1)$$

where cov is the covariance and σ_i^{OE} and σ^{SE} are, respectively, the standard deviation of $E_{i,j}^{OE}$ and E^{SE} signals.

ROC curves and AUC: ROC curves were used to analyze the performance of a simple thresholding, applied on $E_{i,j}^{OE}$, to detect phrenic bursts. Reference classes were extracted from E^{SE} by applying a threshold K fixed manually, by minimizing the number of visible phrenic bursts. Positive (P) and negative (N) classes were defined as sample sets belonging to a burst or not (Figure 5). Concerning the ROC curves constructed from the OE signals, 200 points were plotted for discriminating threshold values, λ , varying from 0 to M maximum value of the signal. We define prediction classes from those discriminating

thresholds: predicted condition positive (True or T) for all samples greater than λ and predicted condition negative (False or F) for the lower ones. We define the outcomes as

$$\begin{aligned} TP &= (P) \cap (T); & TN &= (N) \cap (F) \\ FP &= (N) \cap (T); & FN &= (P) \cap (F) \end{aligned} \quad (2)$$

The ROC curve shows the true positive rate, or detection probability $P_d(\lambda)$, against false positive rate, or false alarm probability $P_{fa}(\lambda)$, for variable threshold and characterizes the detector of phrenic burst behaviour:

$$\begin{aligned} P_d(\lambda) &= \frac{TP}{TP + FN} \\ P_{fa}(\lambda) &= \frac{FP}{TN + FP} \end{aligned} \quad (3)$$

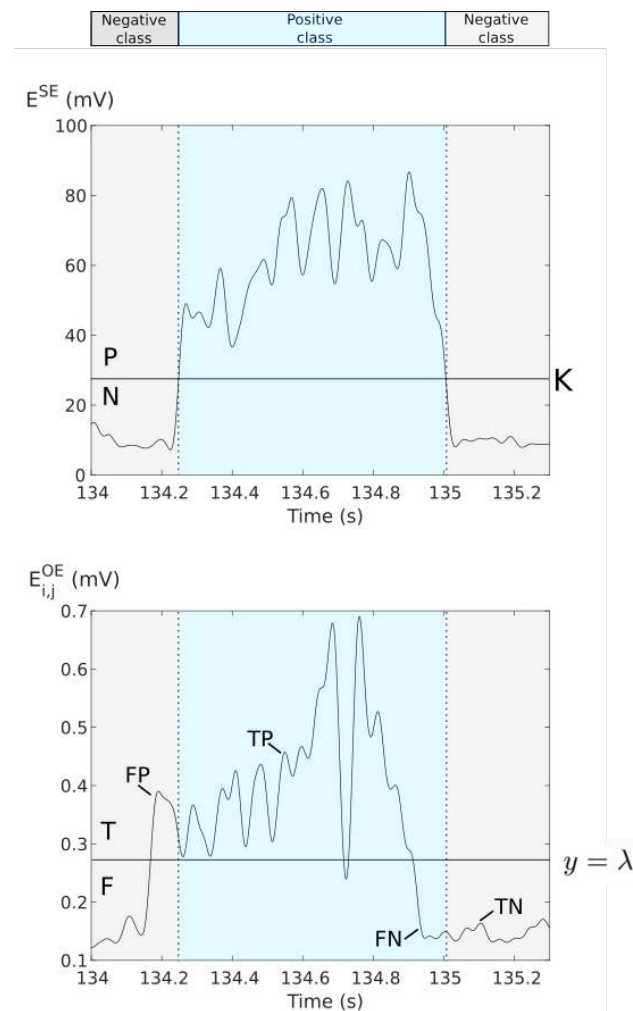


Figure 5. Classifier determination. SE signal is used as reference to create our classifier. Positive class (P) is defined as “all points above the threshold” and negative class (N) the opposite. The same definition is applied to the OE signal for “True”-class (T) and “False”-class (F) with the threshold defined as $y = \lambda$. We define True positive (TP) all samples belonging to (P) and (T), True Negative (TN) those belonging to (N) and (F), False Positive (FP) to (N) and (T) and False Negative (FN) to (P) and (F).

Finally, the Area Under the Curve (AUC) is extracted from the ROC curve in order to evaluate the detection performance. The AUC value lies between 0.5 to 1, where 0.5 denotes a bad detector and 1 corresponds to an ideal detector. All analysis were performed using the commercially available software MatLab (Mathworks Inc., Natick, MI, USA).

Signal-to-noise ratio: For all the datasets, the SNR was calculated as the ratio between the mean absolute value (MAV) amplitude of the ENG signals recorded during bursts period and outside bursts period, based on P/N classifier defined on AUC and ROC curves part, as performed in [38]:

$$\text{MAV} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x|$$

$$\text{SNR} = 20 \log_{10} \frac{\text{mean}(\text{MAV}(\text{ENG}_P))}{\text{mean}(\text{MAV}(\text{ENG}_N))}$$

where ENG_P is ENG signal during bursts period and ENG_N outside.

3. Results

This section presents: (1) results of one representative dataset, which was chosen because it includes a set of 16 OE channels, (2) global results from the whole dataset.

3.1. Example of Data Processing and Analysis

Figure 6 shows raw (S^{SE} , $S_{i,j}^{OE}$) and envelope (E^{SE} , $E_{i,j}^{OE}$) signals from one dataset. Phrenic bursts were clearly visible from the suction electrode (SE) signal. Their duration was ~0.5 s, and the respiratory rate was about 33 breath per minute, in accordance with previous results [34]. Most OE sites also displayed visible phrenic bursts. Table 1 describes the SNR for each recording site of the OE and the SE. As expected, the highest SNR was measured from the SE (11 dB before, and 15 dB after data processing). SNR from OE recording sites varied from 0.36 to 6.78 dB before processing and from 0.63 to 8.87 dB after processing. The mean SNR ($\pm$ SD) after data processing was 5.51 ± 3.61 dB. Of note, ECG artifacts visible on some channels (see, for example, $S_{1,1}^{OE}$, $S_{1,3}^{OE}$, and $S_{4,2}^{OE}$ in Figure 6) were removed after data processing. Correlation coefficients between all signals were calculated from the whole dataset. Figure 7A shows the correlation map of the example dataset. The last row represents the correlation coefficients of every OE channel with SE which values are indicated in Table 1. The mean correlation coefficient ($\pm$ SD) after data processing was 0.83 ± 0.19 (range 0.39 to 0.93). However, 3 out of 16 channels had low correlation coefficient values (<0.6). Figure 7B presents the detection probability of phrenic bursts recorded by the 16 OE sites (ROC curves obtained by comparing OE signals with the SE signal). The mean PHR burst AUC ($\pm$ SD) after data processing was 0.94 ± 0.07 (range 0.77 to 0.99) (Table 1). Twelve out of 16 channels had an AUC greater than 0.9.

Table 1. Results of the proposed phrenic waves detection of the dataset after filtering and ECG removal steps. Second and sixth line are correlation coefficient between OE signal and SE signal for every channel, third and seventh line AUC results using SE signal as true detect, and fourth and eighth lines are SNR in dB.

Channels	1,1	1,2	1,3	1,4	2,1	2,2	2,3	2,4
Correlation	0.934	0.391	0.933	0.768	0.439	0.927	0.932	0.933
AUC	0.994	0.708	0.994	0.929	0.734	0.992	0.994	0.993
SNR (dB)	8.705	0.678	8.574	2.278	0.745	7.188	8.396	8.758
3,1	3,2	3,3	3,4	4,1	4,2	4,3	4,4	Mean $\pm$ STD
0.934	0.934	0.933	0.821	0.686	0.935	0.523	0.748	0.798 ± 0.191
0.994	0.994	0.994	0.958	0.879	0.994	0.783	0.918	0.925 ± 0.072
8.811	8.701	8.861	2.974	1.611	8.874	0.980	2.063	5.510 ± 3.61

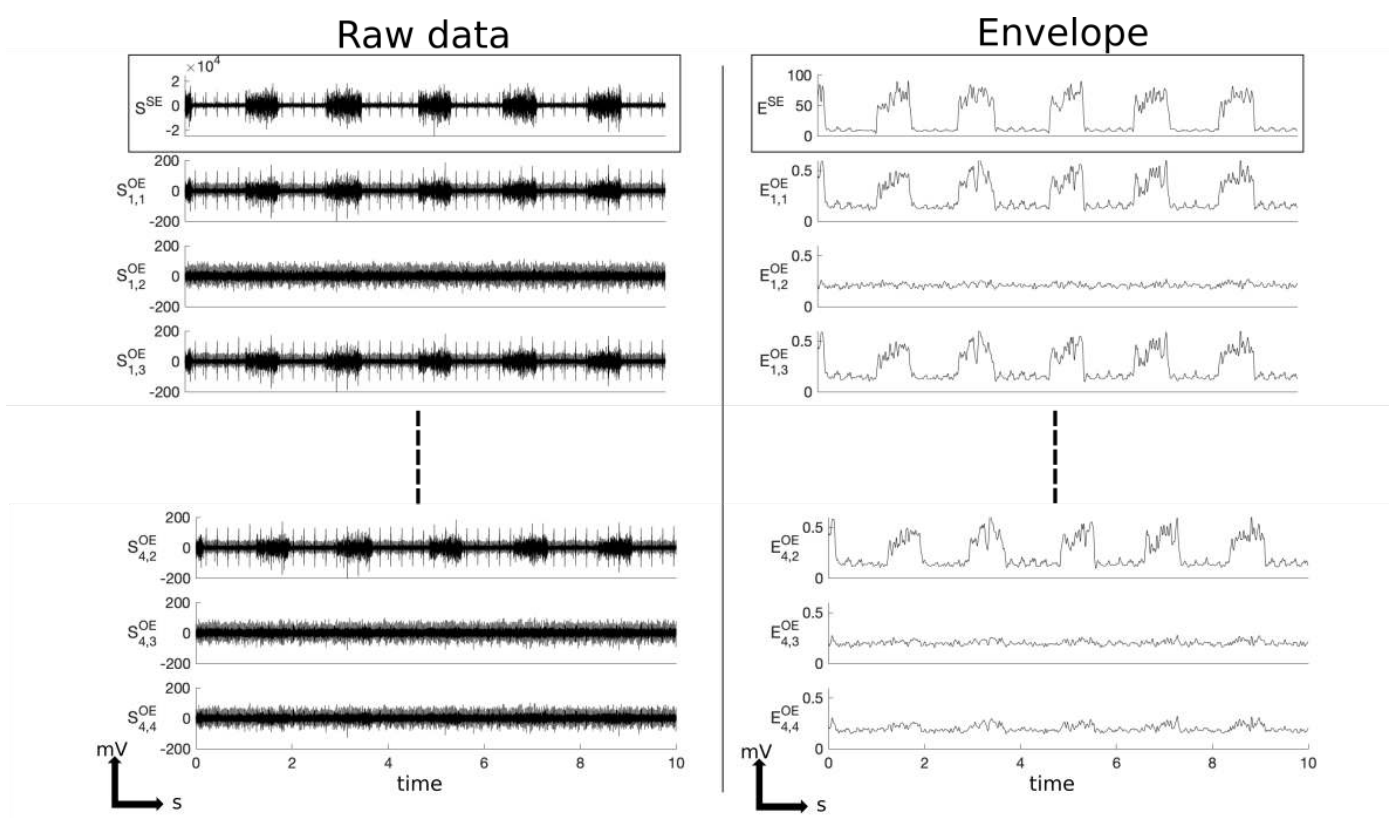


Figure 6. Left: Raw data from one representative example of the acquired dataset. Right: Output of the data processing step, showing the envelope of a denoised signal. **Top panel:** Phrenic signal provided by gold standard suction electrode with typical phrenic waves and electrocardiogram artifacts and Phrenic integrated signal provided by gold standard suction electrode. **Bottom panels:** Phrenic signal obtained from the OE multipolar cuff electrode. This example underlines the heterogeneous properties of these different recordings and the kinds of noise typically observed in this setup.

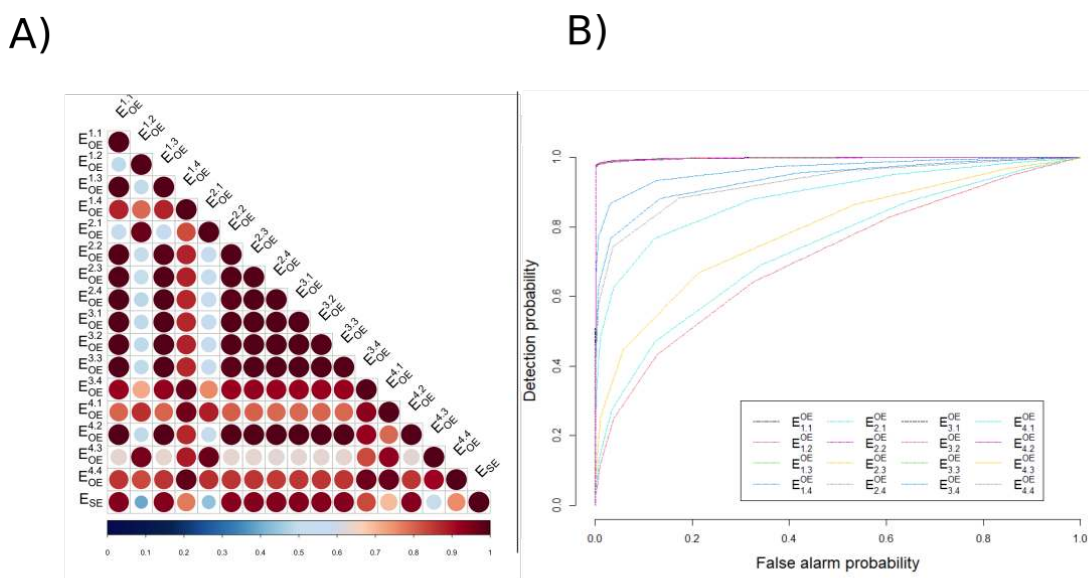


Figure 7. (A) Correlation map between signal provided by gold standard SE and OE. (B) Receiver operating characteristic curve illustrating the detection of phrenic waves based on constant thresholding on gold standard signal. Those scores reflects the correlation scores. The lower the correlation is, the lower the AUC is.

3.2. Global Results

The measured EIS calculated from 10 electrodes was $31,668 \pm 1866 \Omega$ (mean $\pm$ SD) at 1 kHz. Table 2 represents averaged results obtained from 9 rats. Correlations $\rho(i, j)$ ranged between 0.047 and 0.997, and average value is 0.736 ± 0.135 . Minimum and maximum values of AUC were 0.63 and 0.99, respectively. Mean AUC values ($\pm$ SD) were 0.900 ± 0.091 . In each dataset, at least one channel showed a correlation coefficient higher than 0.7, and at least one AUC was above 0.9.

Table 2. Global performance of the proposed phrenic waves detection. Column 2 indicates the number of channel used for recording; Columns 3 to 5 and columns 6 to 8 show, respectively, correlation performance and AUC performance. Last line shows the global mean of each marker. On recordings 9 and 10, only 1 channel was correctly acquired, min and max interval and standard deviations are thus not provided.

Rat	Chan.	Corr. Mean	Corr. Interval	Corr. std	AUC Mean	AUC Interval	AUC std
1	16	0.798	[0.391;0.935]	0.191	0.925	[0.708;0.994]	0.072
2	3	0.872	[0.858;0.879]	0.012	0.998	[0.998;0.999]	5.8×10^{-4}
3	8	0.661	[0.047;0.997]	0.175	0.860	[0.557;0.967]	0.3553
4	8	0.398	[0.097;0.960]	0.275	0.816	[0.628;0.999]	0.1207
5	8	0.656	[0.166;0.940]	0.297	0.908	[0.648;0.999]	0.1600
6	8	0.549	[0.451;0.945]	0.169	0.825	[0.758;0.999]	0.0769
7	16	0.582	[0.505;0.702]	0.052	0.867	[0.819;0.943]	0.0337
8	8	0.954	[0.915;0.995]	0.042	0.999	[0.996;1]	1.75×10^{-4}
9	3	0.972	[0.969;0.973]	0.003	0.999	[0.998;0.998]	8.55×10^{-5}
Mean		0.736	[0.610;0.923]	0.135	0.900	[0.852;0.989]	0.091

4. Discussion

The objective of this study was to investigate the performances of a self-locking custom-designed multicontact organic electrode (OE) technology to record from a small nerve after acute implantation. To this aim, we recorded from the phrenic (PHR) nerve in the rat working heart–brainstem preparation, which preserves physiological cardiorespiratory functions [34,39,40]. A dual PHR ENG recording protocol was achieved by applying a suction electrode (SE) at the cut-end of the PHR nerve to obtain a high quality signal, and wrapping the OE around the PHR epineurium. We performed data filtering to improve PHR ENG burst detection on our signals and analyzed the quality of the OE recordings compared with SE signals. Although we do not provide a comparison with respect to classical metallic electrode technologies, our results show that good quality recordings could be obtained with small PEDOT:PSS recording sites at low impedance. Furthermore, we were able to bring out clear inspiratory activity from signals that were *prima facie* expressing no respiratory activity. These results suggest that OEs are suitable to record respiratory signals and show the feasibility to easily install 16 recording sites around a small nerve, therefore improving spatial resolution.

4.1. Electrophysiological Relevance of PEDOT:PSS

One of the main advantages to use the organic conducting polymer PEDOT:PSS is its mixed ionic/electronic conductivity making it a good candidate for bioelectronics applications in general. The ability of the material to absorb water and thus to uptake dissolved ions, making the entire bulk of the material participating in the interaction between ions and electrons, makes it a good candidate for bioelectronics applications in general. The electrical aspect of it results in a difference in the capacitive component of the electrode: for metal electrodes, the capacitance is surfacic, while for PEDOT:PSS, the capacitance is

volumetric [41]. This means that for the same electrode surface, the use of PEDOT:PSS results in an increase in the capacitance. As a consequence, considering a fixed electrode surface, the use of PEDOT:PSS allows to achieve a lower impedance, thus a better signal to noise ratio for recording purposes compared to metal electrodes [42]. Furthermore, planar metallic electrodes such as IrOx based devices might increase unwanted faradaic contributions, tolerable only if redox processes are confined and reversible [43]. Venkatraman et al. also compared PEDOT:PSS electrodes with PtIr and IrOx electrodes, and found out that PEDOT:PSS coated microelectrodes exhibit superior performances than PtIr electrodes in terms of both recordings and stimulation and present as well superior charge injection limits than IrOx electrodes at 0 DC bias voltage [44].

4.2. Suction Electrode for ENG Recording

SE are commonly used to record ENG from transected axons of various nerves in situ [34,40,45,46]. They provide very high-quality ENG signals that can be used to monitor the central breathing activity, and also to compute spike-trigger averaging in electrophysiological studies [47,48]. The quality of our SE signals is thus in agreement with previous observations. This is likely due to the fact that a small part of the distal nerve, including the cut-end, is aspirated and inserted within the SE tip which contains a small amount of conducting liquid. Consequently, action potentials propagating along the nerve reach the distal nerve portion almost simultaneously. Thus, it produces a high current density within the SE, and this results in high-amplitude compound action potentials. Such ENG signals recorded with SE is classically used as the gold standard for nerve recordings. However, for obvious reasons, nerve transection cannot be considered in humans. A challenge thus remains to design appropriate electrodes that can be applied at the surface of the nerve while providing useful ENG signals.

4.3. Acute ENG Recordings with OE

Different types of self-locking electrodes are available, and some of them are used in humans for neuromodulation [49]. Here, we provide evidence for good PHR ENG acute recordings using PEDOT:PSS electrode that include a self-locking part. When locked, the electrode diameter is 250 μm (see Figure 2). The rat phrenic nerve varies from 160 to 220 μm in diameter [50]. Thus, the internal cuff diameter of our OE is larger than the external diameter of the PHR nerve and should limit nerve damage. OEs are made with a thin biocompatible polymer (parylene) and use conducting polymers called PEDOT:PSS coupled with gold wires, conferring a low impedance and flexibility. Recordings performed on this paper are acute ones. Even if our electrodes have high flexibility, chronic experiments can lead to drastically different results such as the materials, but also the stiffness and various form factors influencing the outcome. This technology has been shown to provide high signal-to-noise ratio recordings of the neural interface on electroencephalographic and electrocorticographic applications [24,35,51–54]. OEs have also been used to record neuronal activity in patients in the operating room [55]. Moreover, OE sites can be used to both record and stimulate neurons [52]. Compared to the S^{SE} , the S^{OE} had a lower signal-to-noise ratio. This likely resulted from the transfer function and signal attenuation from the signal sources within the nerve to the recording sites on the epineurium. A limitation of this study was the lack of impedance measurement of the various OE sites when the electrode was in contact with the nerve. Higher impedance on some OE sites may be responsible for a decrease in pENG amplitude and AUC, and thus weak correlations between S^{OE} and S^{SE} . However, our results demonstrated that both the S^{OE} and S^{SE} had a similar pattern. This pattern included a step increase in discharge at the beginning of inspiration, a ramp-like increase throughout the inspiratory phase, and a sharp decrease in PHR activity at the end of inspiration, reflecting a physiological PHR discharge [34,39,40,45,46,56]. Furthermore, high correlation coefficients were measured between S^{SE} and S^{OE} . In addition, elevated AUC scores were found on several OE channels in each preparation. Our results suggest that OE may represent an alternative to more classical electrodes that are currently used

for neuromodulation applications. Recordings of the PHR nerve activity have been made in cats using simple metallic cuff electrode, and the averaged signal to noise ratio (SNR) was 2.44 ± 0.18 dB [17]. Here, the technology proposed in this paper allow us to record from the rat PHR nerve with a higher averaged SNR (5.51 ± 3.61 dB). Helical, cuffs or flat electrodes, with mono-, bi-, or tri-polar characteristics have been mainly tested for neurostimulation [57–59]. Further investigations are needed to compare the performances of those electrodes with multicontact OE in ENG recording. Furthermore, our study was performed in acute condition, while neuromodulation studies require in vivo chronic implantation. Although the stability of PEDOT:PSS-coated electrodes has been previously reported, their reliability might be improved before it can be used in chronic condition [60]. One of the main issues in terms of long-term stability of PEDOT:PSS-coated electrodes remains the delamination of such conducting polymer from the electrode surface. This comes from the poor adhesion properties of such materials on the top of metal layers in aqueous conditions, even more pronounced under stimulation. Future approaches may overcome those technological limitations, as for instance using biostable adhesion promoters [61]. Fibrosis was not investigated in our study although this problem (as well as other nerve damage) has been reported with commonly used metallic electrodes. As evidences for tissue damage were seen 1 day post-implantation [62], we hypothesize that fibrosis did not develop in our acute conditions. A recent study using similar Parylen C biosensors suggested a very good biostability after 6 months of brain recording activity [63]. Further investigations after chronic nerve implantation with PEDOT:PSS electrode are needed to determine if fibrosis occurs.

4.4. Towards a Better Selectivity to Record and Stimulate with OE?

In this study, we designed an OE with symmetrical sites adapted for ENG acquisition. We succeeded to use this OE as a cuff electrode with most of the OE sites in contact with the nerve, allowing multiple pENG recordings. Such a recording technique may be transposed to other peripheral nerves such as the vagus nerve which is the target of neuromodulation in a number of pathologies [64–66]. As stimulation of the vagus nerve with an OE has been shown to elicit differential cardiac responses, future studies should test the possibility to both stimulate and record with the same multicontact OE, probably using different contacts.

The phrenic nerve is mainly composed of motor fibers, and is also composed of 30–45% sensory fibers [67]. The vast majority of motor fibers (97%) correspond to alpha-axons, and the rest (3%) are gamma-axons [68]. As this nerve was cut, signals recorded in pENG corresponded only to active motor fibers. Our results did not provide evidence for differentiated compound action potentials between the various OE sites channels. This apparent lack of spatial selectivity may be explained by several factors. The very small diameter of the PHR likely reduces transversal (or fascicular) selectivity [69]. Furthermore, the fast conduction velocity of PHR motor fibers ($\sim 55\text{--}60\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ [70]) associated with the rather short distance between OE sites may limit the velocity selectivity [71]. It is therefore possible that similar multiple ENG recordings with OE applied to bigger peripheral nerves or designed with longer distances between OE sites may be able to achieve fascicular and/or velocity selectivity, and thus differentiate distinct pools of nerve fibers. Moreover, the signal processing methods can be improved to better estimate complementary information from the different acquired sites. Achieving successful spatial selectivity of phrenic nerve activity could foster researches on axonal transmission pathologies or unexplained respiratory failures.

5. Conclusions

The main contribution of this study was to show the ability of custom biocompatible OE to record respiratory-related nerve signals and to detect physiological bursts on PHR activity from a matrix of electrodes placed around the phrenic epineurium. We also provided evidences for an optimization of respiratory-related burst detection after signal processing, and the measurements of correlations between OE channels and SE envelopes

as well as ROC curves demonstrated a good performance of the OE matrix. OE appear as a promising tool to record from multiple ENG signals in peripheral nerves. Future works will be directed towards the improvement of the OE geometry and the related signal processing methods in order to improve selective recording, as well as the application and evaluation of this OE technology for estimating useful ENG-derived control variables for closed-loop neuromodulation therapy.

Author Contributions: Conceptualization, Y.A., V.B.-L., V.L.R., C.G. and A.H.; Data curation, Y.A. and V.B.-L.; Formal analysis, Y.A. (lead), V.B.-L., V.L.R., C.G. and A.H.; Funding acquisition, A.H.; Investigation, Y.A. and V.B.-L.; Methodology, Y.A., V.B.-L., V.L.R., C.G. and A.H.; Project administration, A.H.; Resources, V.B.-L. (lead), D.M., C.B. and C.G.; Software, Y.A. (lead), V.B.-L., V.L.R. and A.H.; Supervision, V.L.R., C.G. and A.H.; Validation, Y.A., V.B.-L., V.L.R., G.D., D.M., L.K., B.M., C.B., C.G. and A.H.; Visualization, Y.A., V.B.-L. and A.H.; Writing—original draft, Y.A., V.B.-L., V.L.R., C.G. and A.H.; Writing—review & editing, Y.A., V.B.-L., V.L.R., G.D., D.M., L.K., B.M., C.B., C.G. and A.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project (AdaptVNS) was supported by the French Research National Agency (ANR-17-CE19-0001 project).

Institutional Review Board Statement: Rats were handled and cared for in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (N.R.C., 1996), the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU, 74), as well as the French laws. As all experiments were performed post-mortem, experimental protocols did not need accreditation from the French Ministry of Agriculture.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, V.L.R., upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ENG	Electroneurogram
OE	Organic electrode
pENG	Phrenic electroneurogram
PHR	Phrenic nerve
ROC	Receiver operating characteristic
SE	Suction electrode

References

1. Farrand, A.Q.; Helke, K.L.; Gregory, R.A.; Gooz, M.; Hinson, V.K.; Boger, H.A. Vagus nerve stimulation improves locomotion and neuronal populations in a model of Parkinson's disease. *Brain Stimul.* **2017**, *10*, 1045–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cook, I.A.; Schrader, L.M.; DeGiorgio, C.M.; Miller, P.R.; Maremont, E.R.; Leuchter, A.F. Trigeminal nerve stimulation in major depressive disorder: Acute outcomes in an open pilot study. *Epilepsy Behav.* **2013**, *28*, 221–226. [[CrossRef](#)]
3. Milby, A.H.; Halpern, C.H.; Baltuch, G.H. Vagus Nerve Stimulation for Epilepsy and Depression. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 75–85. [[CrossRef](#)]
4. Pop, J.; Murray, D.; Markovic, D.; DeGiorgio, C.M. Acute and long-term safety of external trigeminal nerve stimulation for drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Behav.* **2011**, *22*, 574–576. [[CrossRef](#)]
5. Gilja, V.; Nuyujukian, P.; Chestek, C.A.; Cunningham, J.P.; Yu, B.M.; Fan, J.M.; Churchland, M.M.; Kaufman, M.T.; Kao, J.C.; Ryu, S.I.; et al. A high-performance neural prosthesis enabled by control algorithm design. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 1752–1757. [[CrossRef](#)]
6. Gustafson, K.J.; Pinault, G.C.; Neville, J.J.; Syed, I.; Davis, J.A.; Jean-Claude, J., Jr.; Triolo, R.J. Fascicular anatomy of human femoral nerve: Implications for neural prostheses using nerve cuff electrodes. *J. Rehabil. Res. Dev.* **2009**, *46*, 973–984. [[CrossRef](#)]
7. Chakravarthy, K.; Chaudhry, H.; Williams, K.; Christo, P.J. Review of the Uses of Vagal Nerve Stimulation in Chronic Pain Management. *Curr. Pain Headache Rep.* **2015**, *19*, 54. [[CrossRef](#)]

8. Ojeda, D.; Rolle, V.L.; Romero-Ugalde, H.M.; Gallet, C.; Bonnet, J.L.; Henry, C.; Bel, A.; Mabo, P.; Carrault, G.; Hernández, A.I. Sensitivity Analysis of Vagus Nerve Stimulation Parameters on Acute Cardiac Autonomic Responses: Chronotropic, Inotropic and Dromotropic Effects. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163734. [\[CrossRef\]](#)
9. Guiraud, D.; Andreu, D.; Bonnet, S.; Carrault, G.; Couderc, P.; Hagège, A.; Henry, C.; Hernandez, A.; Karam, N.; Rolle, V.L.; et al. Vagus nerve stimulation: State of the art of stimulation and recording strategies to address autonomic function neuromodulation. *J. Neural Eng.* **2016**, *13*, 041002. [\[CrossRef\]](#)
10. Romero Ugalde, H.; Rolle, V.; Bonnet, J.L.; Henry, C.; Mabo, P.; Carrault, G.; Hernandez, A. Closed-Loop Vagus Nerve Stimulation Based on State Transition Models. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2017**, *65*, 1630–1638. [\[CrossRef\]](#)
11. Gallet, C.; Bonnet, S.; Le Rolle, V.; Laporte, L.; Bonnet, J.; Karam, N.; Hagège, A.; Malbert, C.; Mabo, P.; Maubert, S.; et al. Characteristics of the right cervical vagal activity during baseline and Valsalva-like manoeuvre. In Proceedings of the 2015 7th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER), Montpellier, France, 22–24 April 2015; pp. 988–991. [\[CrossRef\]](#)
12. Tyler, D.; Durand, D. Functionally selective peripheral nerve stimulation with a flat interface nerve electrode. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2002**, *10*, 294–303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Christie, B.; Freeberg, M.; Memberg, W.; Pinault, G.; Huyen, H.; Tyler, D.; Triolo, R. Long-term stability of stimulating spiral nerve cuff electrodes on human peripheral nerves. *J. Neuroeng. Rehabil.* **2017**, *14*, 70. [\[CrossRef\]](#)
14. Boretius, T.; Badia, J.; Pascual-Font, A.; Schuettler, M.; Navarro, X.; Yoshida, K.; Stieglitz, T. A transverse intrafascicular multichannel electrode (TIME) to interface with the peripheral nerve. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 62–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Ottestad, E.; Orlovich, D.S. History of Peripheral Nerve Stimulation—Update for the 21st Century. *Pain Med.* **2020**, *21*, S3–S5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Russell, C.; Roche, A.; Chakrabarty, S. Peripheral nerve bionic interface: A review of electrodes. *Int. J. Intell. Robot. Appl.* **2019**, *3*, 11–18. [\[CrossRef\]](#)
17. Sahin, M.; Haxhiu, M.A.; Durand, D.M.; Dreshaj, I.A. Spiral nerve cuff electrode for recordings of respiratory output. *J. Appl. Physiol.* **1997**, *83*, 317–322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Mackinnon, S.; Dellon, A.; Hudson, A.; Hunter, D. Chronic nerve compression; an experimental model in the rat. *Ann. Plast. Surg.* **1984**, *13*, 112–120. [\[CrossRef\]](#)
19. Mortimer, J.T.; Bhadra, N. Peripheral Nerve And Muscle Stimulation. In *Neuroprosthetics: Theory and Practice*; World Scientific: Singapore, 2004; pp. 638–682. [\[CrossRef\]](#)
20. Romero, E.; Deneff, J.F.; Delbeke, J.; Robert, A.; Veraart, C. Neural morphological effects of long-term implantation of the self-sizing spiral cuff nerve electrode. *Med. Biol. Eng. Comput.* **2001**, *39*, 90–100. [\[CrossRef\]](#)
21. Cooreman, P.; Thoelen, R.; Manca, J.; vandeVen, M.; Vermeeren, V.; Michiels, L.; Ameloot, M.; Wagner, P. Impedimetric immunosensors based on the conjugated polymer PPV. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2151–2156. [\[CrossRef\]](#)
22. Bettinger, C. Recent advances in materials and flexible electronics for peripheral nerve interfaces. *Bioelectron. Med.* **2018**, *4*, 6. [\[CrossRef\]](#)
23. Yoo, P.B.; Sahin, M.; Durand, D.M. Selective stimulation of the canine hypoglossal nerve using a multi-contact cuff electrode. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32*, 511–519. [\[CrossRef\]](#)
24. Khodagholy, D.; Doublet, T.; Gurfinkel, M.; Quilichini, P.; Ismailova, E.; Leleux, P.; Hervé, T.; Sanaur, S.; Bernard, C.; Malliaras, G. Highly Conformable Conducting Polymer Electrodes for In Vivo Recordings. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H268–H272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Berggren, M.; Richter-Dahlfors, A. Organic Bioelectronics. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3201–3213. [\[CrossRef\]](#)
26. Williamson, A.; Rivnay, J.; Kergoat, L.; Jonsson, A.; Inal, S.; Uguz, I.; Ferro, M.; Ivanov, A.; Sjöström, T.A.; Simon, D.T.; et al. Controlling Epileptiform Activity with Organic Electronic Ion Pumps. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 3138–3144. [\[CrossRef\]](#)
27. Kergoat, L.; Dieuset, G.; Le Rolle, V.; Malliaras, G.; Martin, B.; Bernard, C.; Hernandez, A. PEDOT:PSS electrodes for acute experimental evaluation of vagus nerve stimulation on rodents. In Proceedings of the 2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), Honolulu, HI, USA, 18–21 July 2018; pp. 4760–4763. [\[CrossRef\]](#)
28. Decataldo, F.; Cramer, T.; Martelli, D.; Gualandi, I.; Korim, W.; Yao, S.; Tessarolo, M.; Murgia, M.; Scavetta, E.; Amici, R.; et al. Stretchable Low Impedance Electrodes for Bioelectronic Recording from Small Peripheral Nerves. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10598. [\[CrossRef\]](#)
29. Rodger, D.; Fong, A.; Li, W.; Ameri, H.; Ahuja, A.; Gutierrez, C.; Lavrov, I.; Zhong, H.; Menon, P.; Meng, E.; et al. Flexible parylene-based multielectrode array technology for high-density neural stimulation and recording. *Sens. Actuators B Chem.* **2008**, *132*, 449–460. [\[CrossRef\]](#)
30. Takeuchi, S.; Ziegler, D.; Yoshida, Y.; Mabuchi, K.; Suzuki, T. Parylene flexible neural probes integrated with microfluidic channels. *Lab Chip* **2005**, *5*, 519–523. [\[CrossRef\]](#)
31. Lee, D.; Kim, S.; Kwon, E.; Park, C.; Jun, S.; Choi, B.; Kim, S. Comparison of in vivo biocompatibilities between parylene-C and polydimethylsiloxane for implantable microelectronic devices. *Bull. Mater. Sci.* **2013**, *36*, 1127–1132. [\[CrossRef\]](#)
32. Dutschmann, M.; Kron, M.; Mörschel, M.; Gestreau, C. Activation of Orexin B receptors in the pontine Kölliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2007**, *159*, 232–235. [\[CrossRef\]](#)

33. Wang, S.; Benamer, N.; Zanella, S.; Kumar, N.N.; Shi, Y.; Bévengut, M.; Penton, D.; Guyenet, P.G.; Lesage, F.; Gestreau, C.; et al. TASK-2 Channels Contribute to pH Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptor Neurons. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 16033–16044. [\[CrossRef\]](#)
34. Paton, J.F. A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J. Neurosci. Methods* **1996**, *65*, 63–68. [\[CrossRef\]](#)
35. Khodagholy, D.; Doublet, T.; Quilichini, P.; Gurfinkel, M.; Leleux, P.; Ghestem, A.; Ismailova, E.; Hervé, T.; Sanaur, S.; Bernard, C.; et al. In vivo recordings of brain activity using organic transistors. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1575. [\[CrossRef\]](#)
36. Donahue, M.J.; Kaszas, A.; Turi, G.F.; Rózsa, B.; Slézia, A.; Vanzetta, I.; Katona, G.; Bernard, C.; Malliaras, G.G.; Williamson, A. Multimodal Characterization of Neural Networks Using Highly Transparent Electrode Arrays. *eNeuro* **2018**, *5*. [\[CrossRef\]](#)
37. Morel, G.L. Feasibility and Advantages of Real-Time Monitoring of Diaphragmatic Ventilatory Fatigue in Anesthesiology and in Intensive Care Unit. Ph.D. Thesis, Université Jean Monnet Saint-Etienne, Saint-Etienne, France, 2014.
38. Raspopovic, S.; Carpaneto, J.; Udina, E.; Navarro, X.; Micera, S. On the identification of sensory information from mixed nerves by using single-channel cuff electrodes. *J. Neuroeng. Rehabil.* **2010**, *7*, 17. [\[CrossRef\]](#)
39. Gestreau, C.; Dutschmann, M.; Obled, S.; Bianchi, A. Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2005**, *147*, 159–176. [\[CrossRef\]](#)
40. Bergé-Laval, V.; Gestreau, C. Quipazine Elicits Swallowing in the Arterially Perfused Rat Preparation: A Role for Medullary Raphe Nuclei? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5120. [\[CrossRef\]](#)
41. Proctor, C.M.; Rivnay, J.; Malliaras, G.G. Understanding volumetric capacitance in conducting polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2016**, *54*, 1433–1436. [\[CrossRef\]](#)
42. Dijk, G.; Ruigrok, H.J.; O'Connor, R.P. Influence of PEDOT:PSS Coating Thickness on the Performance of Stimulation Electrodes. *Adv. Mater. Interfaces* **2020**, *7*, 2000675. [\[CrossRef\]](#)
43. Rivnay, J.; Wang, H.; Fenno, L.; Deisseroth, K.; Malliaras, G.G. Next-generation probes, particles, and proteins for neural interfacing. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1601649. [\[CrossRef\]](#)
44. Venkatraman, S.; Hendricks, J.; King, Z.A.; Sereno, A.J.; Richardson-Burns, S.; Martin, D.; Carmenta, J.M. In Vitro and In Vivo Evaluation of PEDOT Microelectrodes for Neural Stimulation and Recording. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2011**, *19*, 307–316. [\[CrossRef\]](#)
45. Hashimoto, K.; Sugiyama, Y.; Fuse, S.; Umezaki, T.; Oku, Y.; Dutschmann, M.; Hirano, S. Activity of swallowing-related neurons in the medulla in the perfused brainstem preparation in rats: Swallowing-Related Neurons in Perfused Rats. *Laryngoscope* **2018**, *129*, E72–E79. [\[CrossRef\]](#)
46. Fuse, S.; Sugiyama, Y.; Hashimoto, K.; Umezaki, T.; Oku, Y.; Dutschmann, M.; Hirano, S. Laryngeal afferent modulation of swallowing interneurons in the dorsal medulla in perfused rats. *Laryngoscope* **2020**, *130*, 1885–1893. [\[CrossRef\]](#)
47. Baekey, D.; Morris, K.; Gestreau, C.; Li, Z.; Lindsey, B.; Shannon, R. Medullary respiratory neurones and control of laryngeal motoneurons during fictive eupnoea and cough in the cat. *J. Physiol.* **2001**, *534*, 565–581. [\[CrossRef\]](#)
48. Ott, M.; Nuding, S.; Segers, L.; O'Connor, R.; Morris, K.; Lindsey, B. Central chemoreceptor modulation of breathing via multipath tuning in medullary ventrolateral respiratory column circuits. *J. Neurophysiol.* **2012**, *107*, 603–617. [\[CrossRef\]](#)
49. Parker, J.L.; Cameron, T. Technology for Peripheral Nerve Stimulation. In *Progress in Neurological Surgery*; S. Karger AG: Basel, Switzerland, 2016; pp. 1–19. [\[CrossRef\]](#)
50. Rodrigues, A.; Ferreira, R.; Salgado, H.; Fazan, V. Morphometric analysis of the phrenic nerve in male and female Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2011**, *44*, 583–591. [\[CrossRef\]](#)
51. Green, R.; Lovell, N.; Wallace, G.; Poole-Warren, L. Conducting polymers for neural interfaces: Challenges in developing an effective long-term implant. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3393–3399. [\[CrossRef\]](#)
52. Williamson, A.; Ferro, M.; Leleux, P.; Ismailova, E.; Kaszas, A.; Doublet, T.; Quilichini, P.; Rivnay, J.; Rózsa, B.; Katona, G.; et al. Localized Neuron Stimulation with Organic Electrochemical Transistors on Delaminating Depth Probes. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 4405–4410. [\[CrossRef\]](#)
53. Jonsson, A.; Inal, S.; Uguz, L.; Williamson, A.; Kergoat, L.; Rivnay, J.; Khodagholy, D.; Berggren, M.; Bernard, C.; Malliaras, G.; et al. Bioelectronic neural pixel: Chemical stimulation and electrical sensing at the same site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 9440–9445. [\[CrossRef\]](#)
54. Rivnay, J.; Leleux, P.; Ferro, M.; Sessolo, M.; Williamson, A.; Koutsouras, D.; Khodagholy, D.; Ramuz, M.; Strakosas, X.; Owens, R.; et al. High-performance transistors for bioelectronics through tuning of channel thickness. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1400251. [\[CrossRef\]](#)
55. Khodagholy, D.; Gelin, J.; Thesen, T.; Doyle, W.; Devinsky, O.; Malliaras, G.; Buzsáki, G. NeuroGrid: Recording action potentials from the surface of the brain. *Nat. Neurosci.* **2014**, *18*, 310–315. [\[CrossRef\]](#)
56. Bautista, T.; Dutschmann, M. Ponto-medullary nuclei involved in the generation of sequential pharyngeal swallowing and concomitant protective laryngeal adduction in situ. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 2605–2623. [\[CrossRef\]](#)
57. Chen, S.P.; Ay, I.; Morais, A.; Qin, T.; Zheng, Y.; Sadhegiani, H.; Oka, F.; Simon, B.; Eikermann-Haerter, K.; Ayata, C. Vagus nerve stimulation inhibits cortical spreading depression. *Pain* **2015**, *157*, 797–805. [\[CrossRef\]](#)
58. Yagi, M.; Morishita, K.; Ueno, A.; Nakamura, H.; Akabori, H.; Senda, A.; Kojima, M.; Aiboshi, J.; Costantini, T.; Coimbra, R.; et al. Electrical stimulation of the vagus nerve improves intestinal blood flow after trauma and hemorrhagic shock. *Surgery* **2019**, *167*, 638–645. [\[CrossRef\]](#)
59. Bucksot, J.E.; Wells, A.J.; Rahebi, K.C.; Sivaji, V.; Romero-Ortega, M.; Kilgard, M.P.; Rennaker, R.L., II; Hays, S.A. Flat electrode contacts for vagus nerve stimulation. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215191. [\[CrossRef\]](#)

-
60. Dijk, G.; Rutz, A.L.; Malliaras, G.G. Stability of PEDOT:PSS-Coated Gold Electrodes in Cell Culture Conditions. *Adv. Mater. Technol.* **2020**, *5*, 1900662. [[CrossRef](#)]
 61. Oldroyd, P.; Malliaras, G. Achieving long-term stability of thin-film electrodes for neurostimulation. *Acta Biomater.* **2021**. [[CrossRef](#)]
 62. Polikov, V.S.; Tresco, P.A.; Reichert, W.M. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J. Neurosci. Methods* **2005**, *148*, 1–18. [[CrossRef](#)]
 63. Lecomte, A.; Degache, A.; Descamps, E.; Dahan, L.; Bergaud, C. In vitro and in vivo biostability assessment of chronically-implanted Parylene C neural sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *251*, 1001–1008. [[CrossRef](#)]
 64. Wang, Y.; Zhan, G.; Cai, Z.; Jiao, B.; Zhao, Y.; Li, S.; Luo, A. Vagus nerve stimulation in brain diseases: Therapeutic applications and biological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2021**, *127*, 37–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 65. Senova, S.; Rabu, C.; Beaumont, S.; Michel, V.; Palfi, S.; Mallet, L.; Domenech, P. Stimulation du nerf vague dans le traitement de la dépression. *La Presse Médicale* **2019**, *48*, 1507–1519. [[CrossRef](#)]
 66. Urits, I.; Schwartz, R.; Smoots, D.; Koop, L.; Veeravelli, S.; Orhurhu, V.; Cornett, E.; Manchikanti, L.; Kaye, A.; Imani, F.; et al. Peripheral Neuromodulation for the Management of Headache. *Anesthesiol. Pain Med.* **2020**, in press. [[CrossRef](#)]
 67. Fogarty, M.J.; Mantilla, C.B.; Sieck, G.C. Breathing: Motor Control of Diaphragm Muscle. *Physiology* **2018**, *33*, 113–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 68. Gottschall, J. The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fiber composition; perikarya and axons of efferent and afferent neurons. *Anat. Embryol.* **2004**, *161*, 405–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 69. Ueno, A.; Katayama, N.; Karashima, A.; Nakao, M. Improvement of Diameter Selectivity in Nerve Recruitment Using Multi-cuff Electrodes. *Adv. Biomed. Eng.* **2012**, *1*, 36–42. [[CrossRef](#)]
 70. Fontanesi, L.B.; Fazan, F.S.; Dias, F.J.; Schiavoni, M.C.L.; Marques Jr, W.; Fazan, V.P.S. Sensory and Motor Conduction Velocity in Spontaneously Hypertensive Rats: Sex and Aging Investigation. *Front. Syst. Neurosci.* **2019**, *13*, 62. [[CrossRef](#)]
 71. Donaldson, N.; Rieger, R.; Schuettler, M.; Taylor, J. Noise and selectivity of velocity-selective multi-electrode nerve cuffs. *Med. Biol. Eng. Comput.* **2008**, *46*, 1005–1018. [[CrossRef](#)]

Optimal selection of multipolar electrode configurations for nerve burst detection

Yvan Avdeew¹, Virginie Le Rolle¹, Victor Bergé Laval², Christian Gestreau² and Alfredo Hernández¹

Abstract—Nerve cuff electrodes are commonly used for neural stimulation and recording applications. Usually, these electrodes are composed of a limited set of metal rings, disposed around the nerve. Although widely used, this technology may be insufficient to record and stimulate in a more selective manner. Higher resolution electrodes, usually composed of a matrix of independent contact points, have been proposed in this sense. These electrodes allow for the exploration of a wide variety of bipolar or multipolar setups, for selective recording and stimulation. In this study, we propose a method to optimally select such multipolar setups and to quantitatively evaluate the performance of a multi-contact neural organic electrode (OE) in recording burst discharges from the rat's phrenic nerve. A 16-channel OE was wrapped around the phrenic nerve (studied electrode) and a suction electrode was applied to the cut-end of the same nerve (gold standard electrode). Analysis of all possible combinations of bipoles and tripoles from the OE were carried out to assess the improvement in the recording performance, measured as the signal-to-noise ratio, compared to the gold standard. The results showed that the bipolar and tripolar configuration significantly increased the overall recording performance. Such configurations are therefore essential to improve nerve burst detection.

I. INTRODUCTION

Nerve cuff (or extra-neural) electrodes are commonly used for a wide range of neural stimulation and recording applications [1]. Usually, these electrodes are composed of a limited set of metal rings disposed around the nerve and these electrodes are recognized as safe and reliable methods to locally record the electroneurogram (ENG) [2]. Although widely used, ring electrodes may be insufficient to record and stimulate in a selective manner and this may thus limit the development of closed-loop technologies integrating ENG measurements as control variables [3]. Higher resolution electrodes, usually composed of a matrix of independent contact points, have been proposed in this sense [4], [5]. These electrodes allow for the exploration of a wide variety of bipolar or multipolar setups, for selective recording and stimulation.

PEDOT:PSS technology electrodes were recently proposed to record ENG on the phrenic (PHR) nerve, which plays a crucial role in breathing, and presents spontaneous respiratory bursts. Doped with polystyrene sulfonate (PSS), PEDOT:PSS has been shown to be an interesting technology for both recording and stimulation [5], [6]. In a recent work of our team [7], we have shown that multicontact organic electrodes (OE) could be used to record phrenic

nerve activity and correctly detect nerve bursts in monopolar configurations. However, the possibility of combining several channels, in order to improve SNR and further increase burst detection performance, was not analyzed.

The objective of this study is to propose a method to optimally select such multipolar setups and to quantitatively evaluate the performance of a multi-contact neural OE in recording burst discharges from the rat's phrenic nerve. Linear combinations of raw multi-channel data, constituting dipoles and/or tripoles, were obtained through Principal Component Analysis (PCA) and compared to the results obtained in [7] on the same data set (rat #1). A quantitative performance evaluation of the synthesized bipoles and tripoles with respect to a monopolar approach and to a gold standard suction electrode are also proposed.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Animal preparation

In this study, recordings were made over a long rat Evans. The protocol was carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (N.R.C., 1996), the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU, 74), as well as the French laws, however accreditation from the French Ministry of Agriculture was not necessary as the experiments were *post-mortem*. As previously reported [7], the arterially perfused working heart-brainstem or in situ preparation was used to record from the left phrenic nerve in a Long Evans rat. The rat was anesthetized with isoflurane. Once respiration stopped and the animal did not respond to a noxious pinch to the tail or toe, the animal was transected below the diaphragm and decerebrated at the precollicular level. The preparation was moved to an ice-cooled (5°C) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂, and several organs including the cerebellum were removed. Then the preparation was moved out to a custom-made recording chamber. aCSF perfusion was placed on the descending aorta, which was cannulated, via a double-lumen catheter connected to the aortic perfusion cannula and a blood pressure monitor (WPI, USA) at a flow rate of 24–32 mL/min. Both cardiac and respiratory activities resumed after 2 to 5 minutes of perfusion.

B. Recording

The left phrenic nerve was dissected and cut near the diaphragm. The cut-end of the nerve was aspirated within a suction electrode (used as gold standard and denoted SE). SE was made from borosilicate glass capillaries tubes (OD

¹ Univ Rennes, Inserm, LTSI - UMR 1099, F-35000 Rennes, France

² Aix-Marseille Université, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), INSERM U1249, Marseille

1.5 mm, WPI), pulled with a vertical pipette puller (Model 720, KOPF). To fit with the left phrenic nerve the tip of SE was sectioned at a corresponding diameter (200 μm for the PHR) and filled with conductive liquid aCSF (see Figure 1).

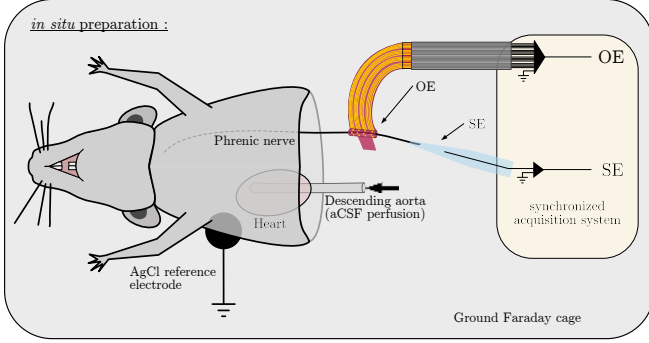


Fig. 1. Schematic representation of the in situ preparation. Phrenic nerve was recorded from the cut-end with SE electrode (gold standard) and with OE attached dot the main nerve trunk and recordings were synchronized with the same acquisition system. To ensure adequate oxygenation of the brainstem an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) perfusion was applied through the descending aorta, which pressure was controlled by a pump with adjustable flow rate.

The recorded grid of organic electrode is composed of a matrix of 4×4 channels ($20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$). Each channel is denoted $C_{i,j}$ according to the i -th row and j -th column. The grid is rolled around the PHR and locked by sliding a strip inside the hole of $100 \mu\text{m} \times 680 \mu\text{m}$.

The signal from the gold standard SE pENG will be noted in this work as S^{SE} and those from each OE channel $C_{i,j}$ are named $S_{i,j}^{OE}$. Signals were amplified and filtered (gain 0.5–10 K; BP 0.3–3 KHz), digitized (12 KHz, 16 bits; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA) and exported using OpenEx software (Offline Sorter and NeuroExplorer; Plexon Inc., Dallas, TX, USA).

C. Data analysis

The following steps were applied to the acquired signals (steps 1 and 2 are not necessary for the monopolar case).

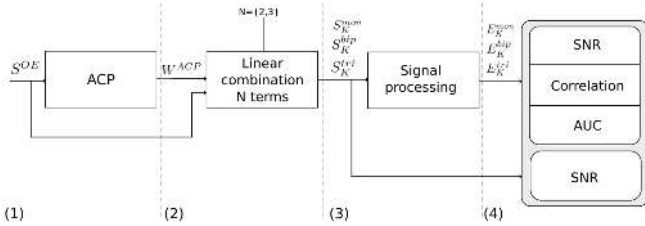


Fig. 2. Description of data processing: All channels from the OE are processed in ACP. Linear combinations with N terms are calculated from S^{OE} with the eigenvector W^{ACP} . $N=2$ corresponds to bipolar configuration and $N=3$ to tripolar. Step (1) and step (2) are unnecessary for monopolar configuration. From the simulated signal indicators are estimated.

1) *Principal component analysis*: PCA was applied to the 16 OE channels to determine the linear combination of channels that maximizes the variance associated with the phrenic activity. OE signals were first centered to obtain a

matrix S ($16 \times N$), where N is the size of an OE signal. Then, the whitening matrix W was calculated from the PCA of S and $Z = W \cdot S$. The eigenvector, which maximizes phrenic activity, was called W^{ACP} such that:

$$W^{ACP} = \{W(k) / \forall i, SNR(Z(i)) \leq SNR(Z(k))\} \quad (1)$$

2) *Linear Combination*: From W^{PCA} vector, $\sum_{i=1}^{15} i = 120$ bipolar combinations of OEs were synthesized:

$$S_K^{bip} = \{W^{ACP}(I)S_{i,j}^{OE} + W^{ACP}(J)S_{i',j'}^{OE} / I = 4(i-1)+j, J = 4(i'-1)+j', K = (j-i) + 16(i-1) + \sum_{k=0}^{i-1} k\} \quad (2)$$

with $i \in [1, 4], j \in [1, 4]$ and $I < J$.

3) *Signal processing*: Once the 120 dipoles have been synthesized, the signal-noise-ratio is estimated (method described in [7]) and all S_K^{bip} signals were bandpass filtered in the 300-3000 Hz interval using a 4-th order Butterworth filter. A morphological filter is applied if any ECG artifacts are present [8]. Then signals were filtered by a Savitzky-Golay filter before extracting envelopes through a Hilbert transform. The resulting envelopes were finally low-pass filtered using a 20 Hz 4-th Butterworth. The same signal processing is applied to S^{SE} . Envelopes for S_K^{bip} and S^{SE} signals are denoted E_K^{bip} and E^{SE} respectively.

4) *Performance evaluation*: Three performance indicators were estimated [7]:

- Correlation coefficients between E_K^{bip} and E^{SE} ,
- ROC curves and AUC estimations: Reference classes were extracted from E^{SE} and predictive classes from each E_K^{bip} .
- Signal-noise-ratio from each different channel ($SNR \pm STD$):

$$MAV = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x|$$

$$SNR = 20 \log_{10} \frac{\text{mean}(MAV(ENG_P))}{\text{mean}(MAV(ENG_N))}$$

where ENG_P is ENG signal during bursts period and ENG_N outside.

A similar process was performed with a linear combination of three OEs in order to obtain a tripolar configuration. In such configuration only equation 2 is modified.

D. Statistical test

A left unilateral Wilcoxon rank-sum test between each indicator from each configuration is used to estimate if the modification of the results on the parameters is significant (based on p-value annotated p) with a significance level $\alpha = 0.1$.

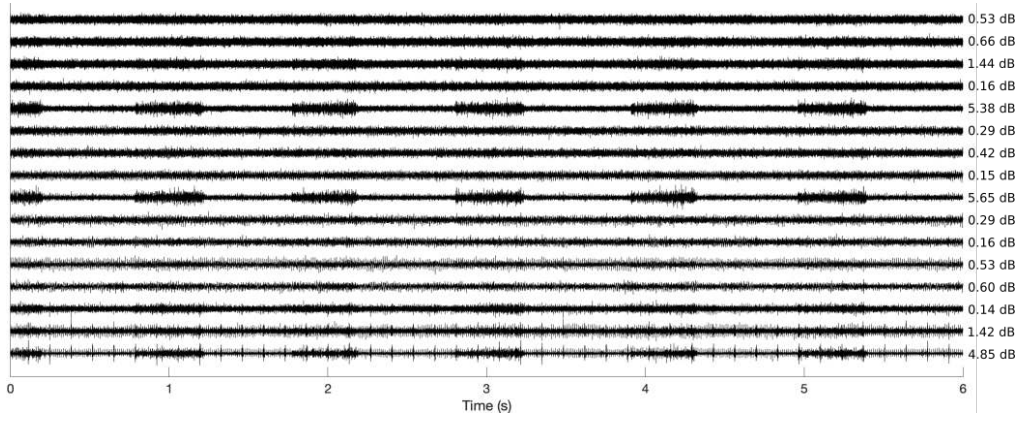


Fig. 3. Raw signals after the PCA whitening step. The signals are classified in increasing order of eigenvalues. For each signal, the SNR is noted on the right. The choice of the eigenvector is associated with the greatest value of SNR calculated from the whitened signals, here signal number 9.

III. RESULTS

A. Monopolar configuration

The performances in monopolar configuration were extracted from a previous published work of our team [7] and were summarized in table I. In monopolar configuration, mean SNR was $5.51 \text{ dB} \pm 3.61$ with a maximum of 8.87 dB, mean correlation was 0.798 ± 0.191 and mean AUC was 0.92 ± 0.07 .

TABLE I
RESULTS IN MONOPOLAR CONFIGURATION

	Mean	STD	Min	Max
SNR (pre-filtering)	3.82 dB	2.65 dB	0.37 dB	6.82 dB
SNR (post-filtering)	5.51 dB	3.61 dB	0.67 dB	8.87 dB
Correlation	0.798	0.191	0.391	0.935
AUC	0.92	0.072	0.708	0.99/1

B. Bipolar configuration

The maximum SNR value (5.65 dB) was found at the 9-th vector of the whitening matrix, which was used to define W^{PCA} . Figure 4 shows an example of synthesized bipolar recording obtained by $S_{1,1}^{OE}$ and $S_{3,4}^{OE}$. A good simulation result is visually observed with visible phrenic bursts similar to those recorded by the SE. The SNR of the simulated channel is 6.85 dB before filtering and 10.17dB after filtering. The correlation coefficient is 0.94 with a detection score of 0.99 based on the AUC calculation.

The results of all S_K^{bip} are given in the table II. The average SNR of the entire configuration was 6.64 ± 2.22 dB with a maximum of 10.18 dB. The post-processing mean correlation coefficient was 0.84 ± 0.19 and the mean phrenic burst detection AUC was 0.95 ± 0.1 . In order to compare the SNR of the simulated channels to the reference, the SNR of E^{SE} was estimated at 15dB. Compared to the monopolar configuration, results from the bipolar configuration showed a significant increase in the SNR post-filtered ($p=0.077$), correlation ($p=0.003$) and AUC ($p=1.30 \cdot 10^{-4}$), while the SNR pre-filtered increase was not significant ($p=0.19$).

TABLE II

PERFORMANCE ON ALL 120 BIPOLAR CONFIGURATIONS AVAILABLE

	Mean	STD	Min	Max
SNR (pre-filtering)	4.55 dB	2.22 dB	0.07 dB	7.43 dB
SNR (post-filtering)	6.64 dB	3.12 dB	0.04 dB	10.18 dB
Correlation	0.84	0.19	0.03	0.95
AUC	0.95	0.1	0.51	0.99/1

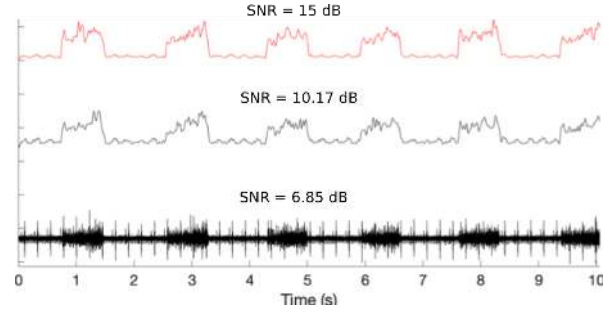


Fig. 4. From top to bottom: i) In red is the envelope of the reference signal SE. ii) The envelope of the synthesized signal between channel 1.1 and channel 3.4 of the OE matrix. iii) The raw signal of the synthesized signal between channel 1.1 and channel 3.4 of the OE matrix

C. Tripolar configuration

Concerning tripolar configuration, results are given in table III. The average SNR of the entire configuration was 7.13 ± 7.80 dB with a maximum of 12.85 dB. The post-processing mean correlation coefficient was 0.88 ± 0.02 and the mean phrenic burst detection AUC was 0.95 ± 0.1 . For each performance indicator, maximum values were higher and minimum values were lower than in bipolar configuration..

TABLE III

PERFORMANCE ON ALL 1680 TRIPOLAR CONFIGURATIONS AVAILABLE

	Mean	STD	Min	Max
SNR (pre-filtering)	4.89 dB	4.00 dB	0.02 dB	9.27 dB
SNR (post-filtering)	7.13 dB	7.80 dB	0.03 dB	12.85 dB
Correlation	0.88	0.02	0.03	0.97
AUC	0.95	0.1	0.51	0.99/1

Compared to the monopolar configuration, results from the tripolar configuration showed a significant increase in the SNR pre-filtered ($p=0.065$), the SNR post-filtered ($p=0.022$), the correlation ($p=2.49 \cdot 10^{-4}$) and the AUC ($p=1.59 \cdot 10^{-6}$). Values measured in the tripolar configuration were also significantly different from those obtained in bipolar configuration (SNR pre-filtered, $p=0.069$; SNR post-filtered, $p=0.063$; correlation, $p=0.082$; AUC, $p=0.079$). Thus, the tripolar configuration provided better performances than both monopolar and bipolar configurations, with in return a greater number of calculations and configurations.

IV. DISCUSSION

The objective of this study was to test the hypothesis that bipolar and tripolar configurations derived from the same OE grid improve nerve burst detection compared to monopolar configuration (see our previous results in [7]). Four indicators were used to assess the quality of nerve signals. Results from bipolar configuration showed a significant increase in three indicators, whereas all four indicators were increased in tripolar configuration. Also tripolar configuration provided significantly better performance than bipolar configuration. For each indicator, increases were found for averaged and maximum values. However, very low minimum values were also obtained with both bipolar and tripolar configurations. Those results suggest that a tripolar configuration allows a better selection and optimization of the available channels from the OE grid. Selecting the right linear combination is critical to increase nerve burst detection performance.

When wrapped around the phrenic nerve the OE diameter was $250 \mu\text{m}$. This diameter was chosen to preserve nerve integrity as the diameter of the rat phrenic nerve is slightly smaller (160 to $220 \mu\text{m}$). Therefore, the quality of nerve-electrode contacts may vary from one site to another, partly explaining the values measured for the four indicators. Indeed, the highest values may be due to perfect electrode-tissue interface, while the lowest may be imputable to bad nerve-electrode contacts. Poor electrode-tissue interfaces may even highlight the noise component. These changes in quality of the electrode-tissue interface are inherent to the recording method, and also represent a major determinant for the selection of the optimal recording setup. However, certain combinations of dipoles or tripoles highly improved the signal detection as seen with the SNR, correlation and AUC. Thus the methods and results described herein may be critical to optimize nerve burst detection, in particular in the context of closed-loop stimulation protocols [3].

These results are a first approach to spatial selectivity. Depending on the functional and anatomical structure of the nerve, certain phenomena may be better observed in certain volumes of the nerve. The phrenic nerve is composed of a majority of motor fibers. 30-45% are sensory fibers [9]. The vast majority of motor fibers (97%) correspond to alpha-axons, and the rest (3%) are gamma-axons [10]. Synthesizing linear combinations of these electrode pathways could allow us to isolate a volumetric behavior associated with the activity of certain types of active fibers, thus being

able to record or even stimulate these fibers in particular. With this differential method, we can extract features of the nerve if the nerve-electrode interface allows it.

V. CONCLUSIONS

The main contribution of this work is to propose signal processing methods in order to improve selective recording of a multicontact OE. Bipolar and tripolar configurations were shown to significantly enhance bursts detection on PHR activity by increasing correlations between simulated channels and SE envelopes and AUC values calculated from ROC curves. Results also showed a significant increase of SNR after filtering between monopolar and tripolar configuration. The improvement of OE performances, based on the proposed signal processing tools, are promising for the recording of multiple ENG signals in peripheral nerves. Future work will be carried out to choose the best configuration to improve selective recording or stimulation with the best optimization for closed-loop neuromodulation therapy.

REFERENCES

- [1] Russell, C.; Roche, A.; Chakrabarty, S. Peripheral nerve bionic interface: A review of electrodes. *Int. J. Intell. Robot. Appl.* **2019**, 3, doi:10.1007/s41315-019-00086-3.
- [2] Sahin, M.; Haxhiu, M.A.; Durand, D.M.; Dreshaj, I.A. Spiral nerve cuff electrode for recordings of respiratory output. *J. Appl. Physiol.* **1997**, 83, 317–322, doi:10.1152/jappl.1997.83.1.317, PMID: 9216978.
- [3] Romero Ugalde, H.; Rolle, V.; Bonnet, J.L.; Henry, C.; Mabo, P.; Carrault, G.; Hernandez, A. Closed-Loop Vagus Nerve Stimulation Based on State Transition Models. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2017**, 65, 1630–1638, doi:10.1109/TBME.2017.2759667.
- [4] Yoo, P.B.; Sahin, M.; Durand, D.M. Selective stimulation of the canine hypoglossal nerve using a multi-contact cuff electrode. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, 32, 511–519.
- [5] Kergoat, L.; Dieuset, G.; Le Rolle, V.; Malliaras, G.; Martin, B.; Bernard, C.; Hernandez, A. PEDOT:PSS electrodes for acute experimental evaluation of vagus nerve stimulation on rodents. In Proceedings of the 2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), Honolulu, HI, USA, 18–21 July 2018; pp. 4760–4763, doi:10.1109/EMBC.2018.8513235.
- [6] Decataldo, F.; Cramer, T.; Martelli, D.; Gualandi, I.; Korim, W.; Yao, S.; Tessarolo, M.; Murgia, M.; Scavetta, E.; Amici, R.; et al. Stretchable Low Impedance Electrodes for Bioelectronic Recording from Small Peripheral Nerves. *Sci. Rep.* **2019**, 9, doi:10.1038/s41598-019-46967-2.
- [7] Avdeew, Y.; Bergé Laval, V.; Le Rolle, V.; Dieuset, G.; Moreau, D.; Kergoat, L.; Martin, B.; Bernard, C.; Gestreau, C.; Hernández, A. Assessment of the Use of Multi-Channel Organic Electrodes to Record ENG on Small Nerves: Application to Phrenic Nerve Burst Detection. *Sensors* **2021**, 1424–8220 doi:10.3390/s21165594
- [8] Morel, G.L. Feasibility and Advantages of Real-Time Monitoring of Diaphragmatic Ventilatory Fatigue in Anesthesiology and in Intensive Care Unit. Theses, Université Jean Monnet Saint-Etienne, Saint-Etienne, France, 2014.
- [9] Fogarty, M.J.; Mantilla, C.B.; Sieck, G.C. Breathing: Motor Control of Diaphragm Muscle. *Physiology* **2018**, 33, 113–126, doi:10.1152/physiol.00002.2018, PMID: 29412056.
- [10] Gottschall, J. The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fiber composition; perikarya and axons of efferent and afferent neurons. *Anat. Embryol.* **2004**, 161, 405–417.