



# UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

Ecole Doctorale : Sciences du Mouvement Humain (ED 463)  
Institut des Sciences du Mouvement Étienne-Jules MAREY  
UMR 7287 - Aix-Marseille Université et CNRS

## THÈSE DE DOCTORAT

**Discipline : Sciences du Mouvement Humain**  
**Spécialité : Physiologie de l'Exercice**

Soutenue publiquement par :  
**Guillaume CARON**

le Vendredi 13 novembre 2015  
(Amphithéâtre Jacques PAILLARD - Faculté des Sciences du Sport)

## **Étude de l'altération et de la récupération de la réponse des différents éléments de la boucle sensori-motrice.**

Composition du jury :

<b>Dr Éric BERTON</b>	Professeur, Aix-Marseille Université	<i>Examineur</i>
<b>Dr Patrick DECHERCHI</b>	Professeur, Aix-Marseille Université	<i>Directeur de thèse</i>
<b>Dr Alain FRUGIÈRE</b>	Professeur, Directeur de l'ESP de Paris	<i>Rapporteur</i>
<b>Dr Tanguy MARQUESTE</b>	Maître de Conférences, Aix-Marseille Université	<i>Directeur de thèse</i>
<b>Dr Didier MORIN</b>	Professeur, Université de Bordeaux	<i>Rapporteur</i>
<b>Dr Agnès VINET-JULLIAN</b>	Maître de Conférences (HDR), Université d'Avignon	<i>Examineur</i>

# Résumé

Le travail présenté dans ce manuscrit a été construit dans le but de comparer les adaptations mises en place par le système nerveux après différentes méthodes d'altération et de récupération.

Nos deux premières études portaient sur les altérations nerveuses faisant suite à une injection de toxine botulique de type A dans le muscle *gastrocnemius*. Pour cela, nous avons étudié les propriétés contractiles musculaires ainsi que la réponse des afférences musculaires mécano- et métabosensibles qui sont connues pour réguler les réseaux spinaux et supraspinaux. Les afférences mécanosensibles ont été sollicitées par des vibrations tendineuses et les afférences métabosensibles par une fatigue musculaire induite électriquement (FIE) et des injections de chlorure de potassium (KCl) et d'acide lactique (AL).

Les résultats de la première étude montrent lors de la paralysie, une perte de masse et de force musculaire ainsi qu'une diminution de la réponse des afférences mécano- et métabosensibles. Ceux de la deuxième étude mettent en évidence, après disparition des effets paralysant de la toxine, une récupération de la réponse des afférences mécanosensibles, une réponse exacerbée des afférences métabosensibles à la FIE et une diminution de la réponse aux injections de KCl et d'AL. Globalement, les propriétés contractiles du muscle ont retrouvé leurs valeurs d'origine hormis l'index de fatigue.

La troisième étude s'inscrivait dans la continuité des deux premières, et consistait à déterminer la relation qui existe entre le phénotype musculaire et la réponse des afférences métabosensibles. Pour cela, nous avons enregistré la réponse des afférences métabosensibles à des injections de KCl et d'AL, et après une FIE pour un muscle rapide, intermédiaire et lent, à savoir respectivement les muscles *tibialis anterior*, *gastrocnemius* et *soleus*. Les résultats ont révélé que l'amplitude des réponses du *gastrocnemius* aux injections et à la FIE était plus importante que les deux autres muscles, ce qui a permis de dégager les caractéristiques de chaque phénotype musculaire.

Les deux dernières études avaient pour objectif de répondre à des questions soulevées lors de la deuxième étude. En effet, les animaux qui avaient des altérations après récupération de la paralysie induite par la toxine étaient âgés de plus de douze mois. Il paraissait donc essentiel de déterminer si les altérations observées étaient le résultat du vieillissement ou des injections de toxine. Ainsi, nous avons étudié pour les muscles *tibialis anterior* et *soleus*, la réponse des afférences métabosensibles, aux injections de KCl et d'AL, à la FIE, mais aussi l'excitabilité de la boucle sensori-motrice à l'aide de l'enregistrement du réflexe H. Ces études ont été complétées par un protocole d'activité physique de huit semaines pour différencier les altérations dues à la sédentarité de celles du vieillissement. Les résultats de ces études montrent une diminution de la réponse des afférences métabosensibles et une absence d'effet de l'entraînement. L'étude du fonctionnement de la boucle sensori-motrice lors du vieillissement met en évidence une diminution de la dépression dépendante à la fréquence du réflexe H pour les deux muscles ainsi qu'une récupération uniquement pour le *tibialis anterior* après entraînement.

Les résultats de ce travail de thèse indiquent que les afférences mécano- et métabosensibles ont des profils de récupération qui diffèrent après disparition des effets paralysant de la toxine botulique et que la réponse des afférences métabosensibles est dépendante en partie de la typologie musculaire. Enfin, les résultats indiquent que le vieillissement est responsable de l'altération de la boucle sensori-motrice et que selon le muscle, l'entraînement permet une récupération. De plus, l'activité des afférences métabosensibles est aussi altérée par le vieillissement mais l'activité physique ne permet pas de la récupérer.

---

**Mots clés :** *Système nerveux, muscle, réflexe, afférences, plasticité, paralysie, vieillissement, récupération, activité physique.*

---

# Abstract

Sensorimotricity allows us to be linked to the surrounding world and depend on the nervous system. However, the properties of the sensorimotor loop are not fixed, but plastic to better adapt to the imposed constraints. Thereby, after neuromuscular alteration, adaptations are implemented by the nervous system, which reflects this plasticity. The studies work presented in this manuscript were built in order to compare the adaptations implemented by the nervous system after different impairments and recoveries.

Our two first studies consisted in studying nervous alterations after injection of botulinum toxin A into the gastrocnemius muscle. To this end, we studied the muscle contractile properties and the mechano- and metabosensitive afferents response, which are known to regulate the motor activity at spinal and supraspinal levels. Mechanosensitive afferent fibers were activated by tendon vibrations, and metabosensitive afferent fibers were activated by muscle electrically induced fatigue (EIF) and, by potassium chloride (KCl) or lactic acid (LA) injections.

Results from the first study indicated a loss of muscle mass and force as well as a reduced mechano- and metabosensitive afferents response at the maximum paralysis. The second study showed, after recovery from the toxin paralysis, a recovery of mechanosensitive afferent response, an exacerbated response to EIF and a reduced one to KCl and LA injections. The overall of muscle contractile properties recovered except the fatigue index.

The third study was in the continuity of the two first ones. It consisted in determining the relation between muscle fatigue index and the metabosensitive afferents response. To do so, we recorded the response from the metabosensitive afferent fibers after EIF and KCl or LA injections from fast, intermediary and slow twitch muscles, which are respectively *tibialis anterior*, *gastrocnemius* and *soleus* muscles. Results from this study revealed that the *gastrocnemius* has a higher response after EIF and injections than the two other muscles, which allowed us to clarify the afferents response characteristics depending on the muscle phenotype.

The two last studies questioned the role of aging on the response of the metabosensitive afferent fibers, in link with the second study. Indeed, the recovery of afferent response from alterations induced by botulinum toxin injections was observed in animals of more than twelve months. It was then essential to determine if the observed alterations were the results of aging or of the toxin injection itself. Thereby, we studied, for the *tibialis anterior* and the *soleus* muscles, the response from the metabosensitive afferents after EIF and chemicals injections, and the excitability of the sensorimotor loop by recording the H reflex. These studies were completed by a physical activity protocol during eight weeks to point out the difference between alterations induced by aging or by sedentary lifestyle. Results from these studies showed a reduced metabosensitive response and no subsequent alteration by the physical activity. The study of the sensorimotor loop during aging showed a reduced rate dependent-depression of the H reflex for the two muscles and a recovery after the physical activity for the *tibialis anterior*.

Results from this thesis indicated that the mechano- and metabosensitive afferent fibers recover differently after the paralysis from botulinum toxin and that the response of metabosensitive afferents to KCl, LA and EIF depend on the muscle characteristics. Finally, results indicated that aging is responsible for the response of metabosensitive afferents fibers and for sensorimotor loop alterations. Moreover, physical activity during eight weeks cannot reverse aging effects on the metabosensitive afferent response but can be beneficial on the sensorimotor loop functioning depending on the muscle phenotype considered.

---

**Keywords:** *Nervous system, muscular system, spinal cord, afferent fibers, plasticity, alteration, paralysis, aging, recovery, physical activity.*

---

***Être un Homme, c'est sentir, en posant sa pierre,  
que l'on contribue à bâtir le monde.***

*Antoine de Saint-Exupéry*



# Remerciements

Les expérimentations de mon doctorat ont été réalisées au sein de l'Institut des Sciences du Mouvement : Étienne-Jules MAREY (UMR CNRS 7287) dans l'équipe Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire (PSNM) dirigée par Monsieur le Professeur Patrick DECHERCHI.

Je remercie Messieurs les Professeurs Alain FRUGIÈRE et Didier MORIN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit et de ma soutenance de thèse, d'avoir évalué mon travail et réalisé un rapport.

Je remercie également Madame le Docteur Agnès VINET et Monsieur le Professeur Éric BERTON d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Merci à Monsieur le Professeur Patrick DECHERCHI et Monsieur le Docteur Tanguy MARQUESTE d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse mais aussi de m'avoir aidé à partir au Canada pour perfectionner mon anglais en Master 1 et de m'avoir accueilli en stage pour mon Master 2. La liberté scientifique que vous m'avez accordée est le gage de votre confiance et cette liberté m'a rendu indépendant.

# Remerciements professionnels

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Jean-Louis VERCHER et Monsieur le Professeur Éric BERTON pour m'avoir accepté au sein du laboratoire qu'ils ont successivement dirigé.

Merci à Monsieur le Professeur Reinoud BOOTSMA, directeur de l'École Doctorale 463 « Sciences du Mouvement Humain », de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse et de siéger au conseil d'administration de l'École Doctorale.

Merci à Mesdames Mireille MEOZZI, Nathalie ROUSTAN, Bernadette DERDERIAN-BESSON et Nathalie FENOUIL qui ont toujours été présentes pour régler les problèmes administratifs avec le sourire.

Merci à Madame les Docteurs Joëlle BARTHÉLÉMY et Caroline NICOL et Messieurs les Docteurs Jérôme LAURIN et Vincent PERTICI pour m'avoir aidé à m'approprier les cours que j'ai pu donner lors de mes trois années de monitorat.

Merci à Monsieur Jean-Pierre BLETON pour sa gentillesse, son accessibilité et sa compétence quand j'avais des questions sur la toxine botulique. J'espère avoir un jour, l'opportunité de travailler avec vous.

Merci tout particulièrement à Monsieur le Docteur Vincent PERTICCI qui a toujours su me guider et être présent quand j'en avais besoin. Tes critiques et tes conseils ont tous été précieux et m'ont permis de me remettre en question.

# Remerciements personnels

Merci à mes parents, minette et toute ma famille pour avoir toujours cru en moi et m'avoir fait confiance dans mes choix. Merci de m'avoir aimé et responsabilisé, c'est sûrement le plus beau cadeau que vous pouviez me faire.

Merci à Théo, Thibault, Pierre, Florent, Clément, Bruno, Nicolas, Romain, Adrien, Jérémy, Mathieu, Éric, Florian, Laura, Charlotte, Marine, Laetitia, Julie, Jessica, Sophia, Manon, Camille, Jade, Marjorie, Caroline, Sabrina, Fanny, Alice et j'en oublie, d'avoir au moins fait semblant de vous intéresser à mon travail et pour m'avoir supporté.

Merci à Simon, Noémie, Nicolas, Numa, Jonathan, Martin, Thomas, Manon, Claude et les autres doctorants et post-doctorants pour avoir partagé cette expérience de doctorant qui peut parfois être pénible mais tellement agréable.

Merci à Vincent, Jérôme, Marie-Solenne, Caroline, Mathieu et Annabelle d'avoir passé toutes ces heures au laboratoire et de m'avoir fait aimer de venir y travailler. J'espère sincèrement être amené à faire un jour de la recherche avec vous.

Merci à Solveig d'avoir partagé si souvent ton déjeuner avec moi, ainsi que pour ton soutien et pour ton ouverture d'esprit. Tu m'as fait réaliser à quel point dans notre société, il n'était pas facile d'être une femme.

Je ne peux pas tous les citer mais merci à Baptiste, Baptiste, Philippe, Lucas, Hugo, Axel, Yann et Stéphane pour ces années inoubliables au Bâtiment E, 3<sup>ème</sup> étage de la cité U. Sans doute parmi les meilleurs moments de ma vie.

Merci à Marion, Amandine, Barbara, Julie et Sandra d'avoir fait de moi un homme meilleur.

Je tiens tout particulièrement à remercier Messieurs FRANCES et DEGUET et Mesdames DIMEGLIO, GARNIER, BOULET ET MURATORIO qui ont à jamais marqué ma scolarité. Sans vous et votre dévouement, votre empathie et vos méthodes alternatives d'enseignement, je n'aurais jamais eu l'envie de faire des études.

## **Ce travail a fait l'objet des communications suivantes :**

### Articles publiés dans des revues indexées à comité de lecture.

**CARON, G., ROUZI, T., GRELOT, L., MAGALON, G., MARQUESTE, T., DERCHERCHI, P.** (2014). Mechano- and metabo-sensitive alterations after injection of botulinum toxin into gastrocnemius muscle, *Journal of Neuroscience Research*, 92(7):904-914.

**CARON, G., DECHERCHI, P., MARQUESTE, T.** (2015). Does metabosensitive afferent fibers activity differ from slow- and fast-twitch muscles? *Experimental Brain Research*, 233(9), 2549–2554.

**CARON, G., MARQUESTE, T., DERCHERCHI, P.** Long-term effects of botulinum toxin injection on mechano- and metabo-sensitive afferent fibers originating from gastrocnemius muscle. *Plos One*.

### Articles soumis dans des revues indexées à comité de lecture.

**CARON, G., MARQUESTE, T., DECHERCHI, P.** Restoration of post-activation depression of the H-reflex by treadmill exercise in aged rats. *Neurobiology of Aging*.

**CARON, G., DERCHERCHI, P., MARQUESTE, T.** Metabosensitive afferents response is down-regulated by aging process: exercised versus sedentary rats. *Neurobiology of Aging*.

### Articles portant sur d'autres thématiques qui sont acceptées ou soumises dans des revues indexées à comité de lecture.

REMAUD, A., BOYAS, S., **CARON, G.A.**, BILODEAU, M. (2012). Attentional demands associated with postural control depend on task difficulty and visual condition, *Journal of Motor Behavior*, 44(5):329-340.

NAWROTEK, K., MARQUESTE, T., **CARON, G.**, MODRZEJEWSKA, Z., ZARZYCKI, R., DECHERCHI, P. Reconstruction of the Injured Spinal Cord by Implantation of a Hydrogel Based on Chitosan and  $\beta$ -Glycerol Phosphate - Motor Behavior, Ventilatory and Electrophysiological Assessments.

### Communications dans des congrès internationaux

**CARON, G.**, ROUZI, T., GRELOT, L., MAGALON, G., MARQUESTE, T., DERCHERCHI, P. Long-term effects of botulinum toxin injection on mechano- and metabo-sensitive afferent fibers originating from gastrocnemius muscle, 9<sup>th</sup> International Conference of Federation of European Neuroscience Societies, Milan, 2014.

NAWROTEK, K., MARQUESTE, T., **CARON, G.**, MODRZEJEWSKA, Z., ZARZYCKI, R., DECHERCHI, P. Reconstruction of the Injured Spinal Cord by Implantation of a Hydrogel Based on Chitosan and  $\beta$ -Glycerol Phosphate – Motor Behavior, Ventilatory and Electrophysiological Assessments. 3<sup>rd</sup> ECCOMAS Thematic Conference on Tissue Engineering (ICTE), Leiria, 2013.

REMAUD, A., BOYAS, S., **CARON, G.A.**, BILODEAU, M. (2012). Attentional demands associated with postural control depend on task difficulty and visual condition, 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2010

### Communication dans des congrès nationaux

**CARON, G.**, ROUZI, T., GRELOT, L., MAGALON, G., MARQUESTE, T., DERCHERCHI, P. (2014). Évolution des fonctions neuromusculaires suite à l'injection intramusculaire de toxine botulique. *EDSMH*, Montpellier, 2014. 1<sup>er</sup> prix de la présentation orale.

## Abréviations

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : Concentration Intracellulaire de l'Ion Calcium  
[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> : Concentration Intracellulaire de l'Ion Chlorure  
5-HT : 5-Hydroxytryptamine ou Sérotonine  
A : Amplitude  
Ach : Acétylcholine  
AL : Acide Lactique  
ASIC3 : Acid Sensing Ion Channel 3 ou Récepteur à Canal Ionique Sensible à l'Acidité 3  
B2 : Récepteur de la Bradykinine 2  
BoNT : Botulinum Neurotoxin ou Toxine Botulique  
CB1 : Récepteur Cannabinoïde 1  
CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide ou Peptide Relié au Gène de la Calcitonine  
CPG : Générateurs de Rythme Centraux  
CRPS : Complex Regional Pain Syndroms ou Syndromes de Douleur Régionale Complexe  
CVLM : Noyau Caudal Ventrolatéral Médullaire  
DRR : Dorsal Root Reflex ou Réflexe du Ganglion Dorsal  
EMG : Électromyogramme  
EPR : Exercise Pressor Reflex ou Réflexe de Pression lié à l'Exercice ou Ergoréflexe  
FC : Fréquence Cardiaque  
FIE : Fatigue Induite Électriquement  
FNM : Fuseau Neuromusculaire  
GABA :  $\gamma$ -Aminobutyric Acid ou Acide  $\gamma$ -Amino-Butyrique  
GDNF : Glial Derived Neurotrophic Factor ou Facteur Neurotrophique Dérivé des Cellules Gliales  
i.p. : Intrapéritonéal(e)  
ITS : Intermediary Toe Spread ou Largeur Intermédiaire de la Patte  
K<sub>Ca</sub> : Canal Potassique Calcium-Dépendant  
KCC2 : Co-transporteur K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>  
KCl : Chlorure de Potassium  
MCR : Maximum Contraction Rate ou Vitesse Maximale de Contraction  
MRR : Maximum Relaxing Rate ou Vitesse Maximale de Relaxation  
MSNA : Muscle Sympathetic Nerve Activity ou Activité Nerveuse Sympathique Musculaire  
MSR : Monosynaptic Reflex ou Réflexe Monosynaptique  
NA : Noyau Ambigu  
Nav1.7 : Canal Sodique Voltage-Dépendant 1.7  
NGF : Nerve Growth Factor ou Facteur Trophique Nerveux  
NKCC1 : Co-transporteur Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>  
NO : Monoxyde d'Azote  
NTS : Nucleus Tractus Solitarius ou Noyau du Tractus Solitaire  
OTG : Organe Tendineux de Golgi  
P2X3 : Récepteur Purinergique 2X3  
PA : Pression Artérielle  
PAD : Primary Afferent Depolarisation ou Dépolarisation de l'Afférence Primaire  
PGE2 : Prostaglandine E2  
PIC : Persistent Inward Current ou Courant Entrant Persistant  
PL : Paw Length ou Longueur de la Patte

PPS : Potentiel Post-Synaptique  
PPSE : Potentiel Post-Synaptique Excitateur  
PPSI : Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur  
PTK : Phosphotyrosine Kinase  
Réflexe H : Réflexe de Hoffmann  
RVLM : Rostral Ventrolateral Medulla ou Bulbe Rostral Ventrolatéral  
SFI : Sciatic Functional Index ou Index Fonctionnel du Nerf Sciatique  
SNAP-25 : Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa  
SNARE : Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptors  
SNC : Système Nerveux Central  
SNP : Système Nerveux Périphérique  
SNV : Système Nerveux Végétatif  
SP : Substance P  
SV2 : Synaptic Vesicle 2 Proteine  
TC : Temps de Contraction  
TRPV1 : Transient Receptor Potential Vanilloid 1  
TS : Toe Spread ou Largeur de la Patte

## Tables et Figures

**Tableau n°01 :** *La classification des afférences musculaires.*

**Tableau n°02 :** *Le protocole de course sur tapis roulant.*

**Figure n°01 :** *La boucle sensori-motrice.*

**Figure n°02 :** *L'innervation sensitive d'un muscle strié squelettique.*

**Figure n°03 :** *Le fuseau neuromusculaire.*

**Figure n°04 :** *L'organe tendineux de Golgi.*

**Figure n°05 :** *La régulation de l'EPR par les afférences musculaires.*

**Figure n°06 :** *Le réflexe d'axone.*

**Figure n°07 :** *Le réflexe du ganglion dorsal (DRR).*

**Figure n°08 :** *Le réflexe monosynaptique.*

**Figure n°09 :** *L'inhibition présynaptique.*

**Figure n°10 :** *La régulation de la boucle sensorimotrice.*

**Figure n°11 :** *La libération de neurotransmetteurs au niveau de la jonction neuromusculaire.*

**Figure n°12 :** *La diminution du ratio  $H_{max}/M_{max}$  avec l'âge.*

**Figure n°13 :** *La dépression dépendante à la fréquence du réflexe H.*

**Figure n°14 :** *L'effet de l'augmentation de l'ischémie sur la MSNA.*

**Figure n°15 :** *L'index fonctionnel du nerf sciatique.*

**Figure n°16 :** *La secousse musculaire élémentaire.*

**Figure n°17 :** *Dispositif expérimental de l'enregistrement des afférences musculaires métabosensibles et mécanosensibles.*

**Figure n°18 :** *La moyenne des courbes de recrutement des réflexes H et réponses M.*

**Figure n°19 :** *L'activation d'une afférence de type C/IV.*

**Figure n°20 :** *L'inflammation neurogénique.*

**Figure n°21 :** *Le récepteur TRPV1.*

**Figure n°22 :** *Les voies de la sensibilisation des afférences mécanosensibles.*



# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>15</b>
<b>I. La boucle sensori-motrice. ....</b>	<b>17</b>
1. Le rôle de la boucle sensori-motrice. ....	17
2. La plasticité de la boucle sensori-motrice. ....	18
2.1 La plasticité dépendante de l'expérience. ....	18
2.2 La plasticité post-traumatique. ....	19
<b>II. Les afférences musculaires. ....</b>	<b>20</b>
1. Les afférences mécanosensibles. ....	22
2. Les afférences métabosensibles. ....	25
<b>III. La régulation de la boucle sensorimotrice.....</b>	<b>32</b>
1. Le réflexe H. ....	33
2. La modulation du réflexe H. ....	34
2.1 L'inhibition réciproque. ....	36
2.2 Les inhibitions D1 et D2. ....	36
2.3 L'inhibition récurrente. ....	36
2.4 L'inhibition des afférences Ib. ....	37
2.5 Les voies descendantes supraspinales. ....	37
2.6 Le rôle des afférences III et IV. ....	37
2.7 La dépression post-activation. ....	38
<b>IV. Les altérations neuromusculaires.....</b>	<b>39</b>
1. La dénervation chimique par la toxine botulique. ....	39
1.1. Les effets de la BoNT/A sur les afférences musculaires. ....	42
1.2. La récupération suite aux injections de BoNT/A. ....	43
2. Le vieillissement. ....	44
2.1. Le vieillissement neuromusculaire. ....	44
2.2. La modification de la propagation des messages afférents. ....	45
2.3. Les modifications de la boucle sensorimotrice. ....	45
2.4. Les afférences métabosensibles. ....	47
2.5. Le rôle de l'activité physique sur le vieillissement neuromusculaire. ....	48
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>51</b>
<b>I. Études 1 et 2.....</b>	<b>52</b>
1. Les injections de toxine botulique. ....	52
2. Analyse de la récupération fonctionnelle. ....	53
3. Préparation aux enregistrements électrophysiologiques. ....	54
4. Les enregistrements électrophysiologiques. ....	54
4.1. La secousse musculaire élémentaire. ....	54
4.2. Le seuil tétanique. ....	55
4.3. Enregistrement des fibres afférentes. ....	56
4.3.1. Les afférences mécanosensibles. ....	56
4.3.2. Les afférences métabosensibles. ....	57
5. Euthanasie et prélèvements tissulaires. ....	58
<b>II. Étude 3.....</b>	<b>58</b>
1. Préparation à l'électrophysiologie. ....	58
2. Enregistrement des fibres afférentes métabosensibles. ....	59
3. Euthanasie et prélèvements tissulaires. ....	59
<b>III. Études 4 et 5. ....</b>	<b>59</b>
1. Le vieillissement et l'exercice physique. ....	59
2. Préparation à l'électrophysiologie. ....	60
2.1. Le réflexe H et l'onde M. ....	60
2.2. Enregistrement des fibres afférentes métabosensibles. ....	62
3. Euthanasie et prélèvements tissulaires. ....	62

<b>Résultats.....</b>	<b>63</b>
<b>I. L'altération neuromusculaire suite à une injection de BoNT/A.....</b>	<b>64</b>
<b>II. La récupération neuromusculaire suite à une injection de BoNT/A. ....</b>	<b>76</b>
<b>III. La réponse métabosensible de différents muscles.....</b>	<b>99</b>
<b>IV. Les effets du vieillissement et de l'exercice physique sur le fonctionnement de la boucle sensori-motrice des muscles <i>tibialis anterior</i> et <i>soleus</i>. ....</b>	<b>106</b>
<b>V. Les effets du vieillissement et de l'exercice physique sur l'activité des afférences métabosensibles des muscles <i>tibialis anterior</i> et <i>soleus</i>. ....</b>	<b>125</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>140</b>
<b>I. Les afférences musculaires.....</b>	<b>141</b>
1. La réponse des afférences métabosensibles. ....	141
2. La réponse des afférences mécanosensibles. ....	144
<b>II. La toxine botulique de type A (BoNT/A). ....</b>	<b>145</b>
1. La réponse des afférences métabosensibles après paralysie induite par de la BoNT/A. ....	145
2. La réponse des afférences mécanosensibles après paralysie induite par de la BoNT/A.....	149
<b>III. Le vieillissement et l'activité physique.....</b>	<b>151</b>
1. La réponse des afférences métabosensibles. ....	151
2. La dépression fréquence dépendante du réflexe H. ....	153
<b>Conclusion .....</b>	<b>156</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>159</b>

# Introduction

Le contrôle du mouvement volontaire est généré par le système nerveux et son origine est située dans le cerveau. Les neurones pyramidaux du cortex moteur se projettent directement sur les motoneurones- $\alpha$  situés dans la moelle épinière. Leur activation entraîne la contraction synchrone des fibres musculaires striées squelettiques innervées par le motoneurone, ce qui constitue l'unité motrice. Le muscle en se contractant, va se déformer, ce qui va activer des afférences mécanosensibles. Cette contraction peut aussi amener le muscle à libérer des métabolites qui vont activer des afférences métabosensibles. Les afférences vont transmettre l'information non seulement aux centres supérieurs afin d'intégrer les changements induits par la contraction musculaire mais aussi au niveau spinal afin de réguler l'excitabilité des motoneurones- $\alpha$ , c'est la boucle sensori-motrice. Parmi ces afférences, celles de type III ( $A\delta$ ) et IV (C) sont sensibles aux changements mécaniques, chimiques et thermiques. Leur activation permet aussi d'induire des ajustements cardiovasculaires et respiratoires (McCloskey et Mitchell, 1972). Cependant, suite à une lésion ou une altération du système nerveux, des stratégies d'adaptation sont mises en oeuvre, c'est la plasticité. Cette plasticité peut être efficace et permettre une récupération des fonctions déficientes et, quelques fois, ne pas l'être et entraîner un handicap.

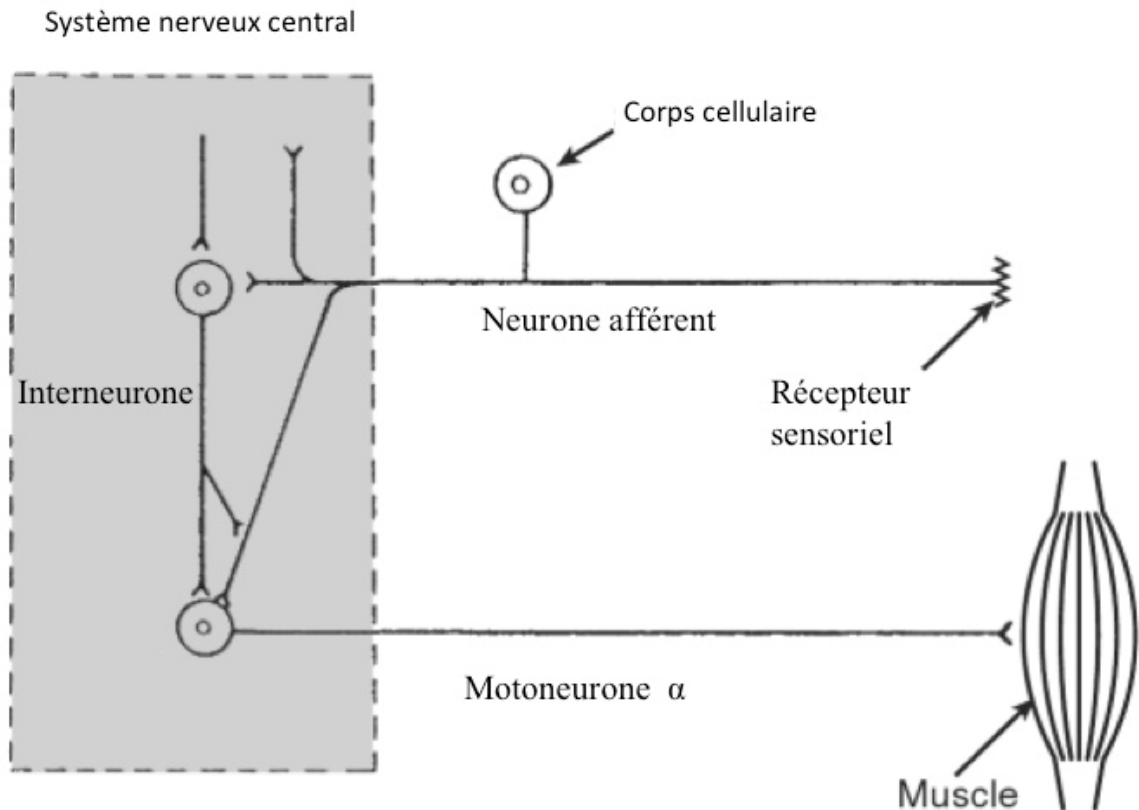
Afin d'évaluer la plasticité sensori-motrice, j'ai choisi d'étudier l'évolution de la réponse des afférences musculaires après une paralysie musculaire induite par de la toxine botulique. La récupération des fonctions locomotrices ayant entraîné un changement de fatigabilité, nous a conduit à comparer la réponse des afférences métabosensibles pour des muscles aux caractéristiques différentes. Les délais de récupération après injection de toxine botulique étant de plusieurs mois, nous avons vérifié que les altérations observées n'étaient pas liées au vieillissement. Ainsi, nous avons étudié la réponse des afférences métabosensibles issues d'un muscle rapide et d'un muscle lent, et de la boucle sensorimotrice chez des animaux âgés. Ces études ont été complétées par un protocole d'activité physique sur tapis roulant afin de déterminer si les altérations observées étaient réversibles.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent donc dans le cadre de l'étude de la plasticité de la boucle sensorimotrice.

## **I. La boucle sensori-motrice.**

### **1. Le rôle de la boucle sensori-motrice.**

La moelle épinière contient un réseau de neurones et interneurones qui activent les neurones moteurs dans un ordre et une intensité appropriés afin de permettre l'activité locomotrice, ce sont les générateurs de rythme centraux (CPG « *Central Pattern Generator* ») (Grillner, 2003). Une activité réflexe des CPG a été démontrée chez des animaux qui, à la suite d'une lésion spinale, étaient capables de générer une activité locomotrice (Rossignol et al., 1998). Il est à noter que le terme CPG n'est pas utilisé que pour la locomotion mais aussi pour le contrôle de la respiration ou encore de la mastication (Aoki et al., 1980; Nakamura et Katakura, 1995). De plus, leur activité est régulée par les voies supérieures provenant des aires motrices du cerveau mais aussi par les informations afférentes (Harkema et al., 1997). La régulation de la commande motrice par les afférences est appelée la boucle sensori-motrice. Cette boucle sensori-motrice se définit comme étant l'ensemble des neurones afférents, des interneurones, des motoneurones et des muscles qu'ils innervent (Figure n°01). Les afférences détectent les changements mécaniques, métaboliques et thermiques, transmettent ces informations aux neurones centraux qui vont réguler en retour l'activité musculaire. La voie finale commune de la contraction musculaire étant le motoneurone- $\alpha$  (Sherrington, 1906), la régulation de son activité se fait donc par les neurones lui faisant synapse. Ces neurones généreront des potentiels au niveau de l'élément post-synaptique (PPS) qui seront qualifiés d'excitateurs (PPSE) ou d'inhibiteurs (PPSI) en fonction des neurotransmetteurs libérés, des récepteurs et des courants ioniques mis en jeu (Bear et al., 2007). La sommation des potentiels post-synaptiques permettra une dépolarisation ou une hyperpolarisation du motoneurone- $\alpha$  qui génèrera à son tour des potentiels d'action si la dépolarisation atteint le seuil nécessaire, au niveau de la zone trigger située à l'extrémité proximale de l'axone. Toutefois, les connexions synaptiques entre ces différents éléments de la boucle sensori-motrice ne sont pas figées.



**Figure n°01** : La boucle sensori-motrice. Schématisation des éléments composant la boucle sensori-motrice (d'après [Enoka, 2015](#)).

## 2. La plasticité de la boucle sensori-motrice.

Les structures qui composent la boucle sensori-motrice sont le siège de remodelages permanents qualifiés de neuroplasticité, qui s'exprimera tout au long de la vie de l'individu. D'après le dictionnaire médical Merriam-Webster, la neuroplasticité se définit comme étant la capacité de changements continus des voies nerveuses et des synapses du système nerveux en réponse à l'expérience ou à des blessures se traduisant par la formation de nouvelles voies nerveuses ou synapses, et l'élimination ou la modification de celles qui existent déjà.

Ainsi, il semble se dégager une plasticité permanente qui est dépendante de l'expérience et une autre, réactionnelle, qui est le résultat d'une adaptation à un traumatisme.

### 2.1. La plasticité dépendante de l'expérience.

Cette plasticité serait à la base des processus d'apprentissage, de mémorisation et d'adaptation fonctionnelle. On la rencontre également au cours du vieillissement. Ces mécanismes ont été mis en évidence, entre autre, lors d'expériences de conditionnement

(réflexes conditionnants). Le principe de Hebb énonce que lorsqu'un élément pré-synaptique A active de manière répétitive un élément post-synaptique B, il se produit une modification durable de la transmission synaptique entre les deux éléments (Hebb, 1949). Ce principe est devenu la pierre angulaire de notre compréhension des bases cellulaires de cette plasticité. Il constitue depuis un modèle élémentaire qui rend compte de la manière dont un réseau de neurones peut garder trace de ses expériences passées. Cette théorie s'est vue confirmée au niveau cellulaire par l'étude de réseaux nerveux de l'aplysie (Brunelli et al., 1976) qui a permis d'aboutir, d'une manière générale, aux notions de sensibilisation, de potentialisation, d'habituation et de dépression. Ainsi, ces travaux mettent en évidence qu'après la génération d'un PPSE, le suivant pourra être, soit être plus grand que le précédent en cas de potentialisation ou de sensibilisation, soit plus petit en cas de dépression ou d'habituation. Par exemple, une stimulation soutenue à basse fréquence (1-5 Hz) d'un élément pré-synaptique va induire une diminution de l'efficacité de la transmission avec l'élément post-synaptique, c'est la dépression à long terme (Ito et al., 1982). Cependant, la stimulation soutenue à haute fréquence (environ 100 Hz) de la même synapse entraînera cette fois-ci une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique, c'est la potentialisation à long terme (Lomo, 2003).

## 2.2. La plasticité post-traumatique.

A côté de cette plasticité qui est présente chez le sujet sain, il existe une plasticité réactionnelle (ou post-traumatique) qui se manifeste après une perturbation (e.g. lésion traumatique, maladie neurodégénérative, ...). La sensibilité d'un élément post-synaptique va ainsi se retrouver augmentée après qu'il soit dénervé de son élément pré-synaptique, c'est l'hypersensibilité de dénervation (Desmedt et Franken, 1958; Sharpless, 1975). Lors d'une lésion de la moelle épinière par exemple, la perte du signal des voies cortico-spinales, va entraîner dans un premier temps une perte du tonus musculaire (« choc spinal ») (Ditunno et al., 2004). Après plusieurs jours, voire plusieurs semaines, une seconde phase accompagnée d'une augmentation du tonus musculaire apparaît. Celle-ci provient en partie d'une hypersensibilité de dénervation des structures sous lésionnelles. Ce mécanisme est dû à une sensibilité accrue aux neurotransmetteurs qui ne sont plus libérés à cause de la lésion (Guttman, 1992) et/ou à une augmentation du nombre de récepteurs membranaires au niveau des structures sous lésionnelles (Merlie et al., 1984).

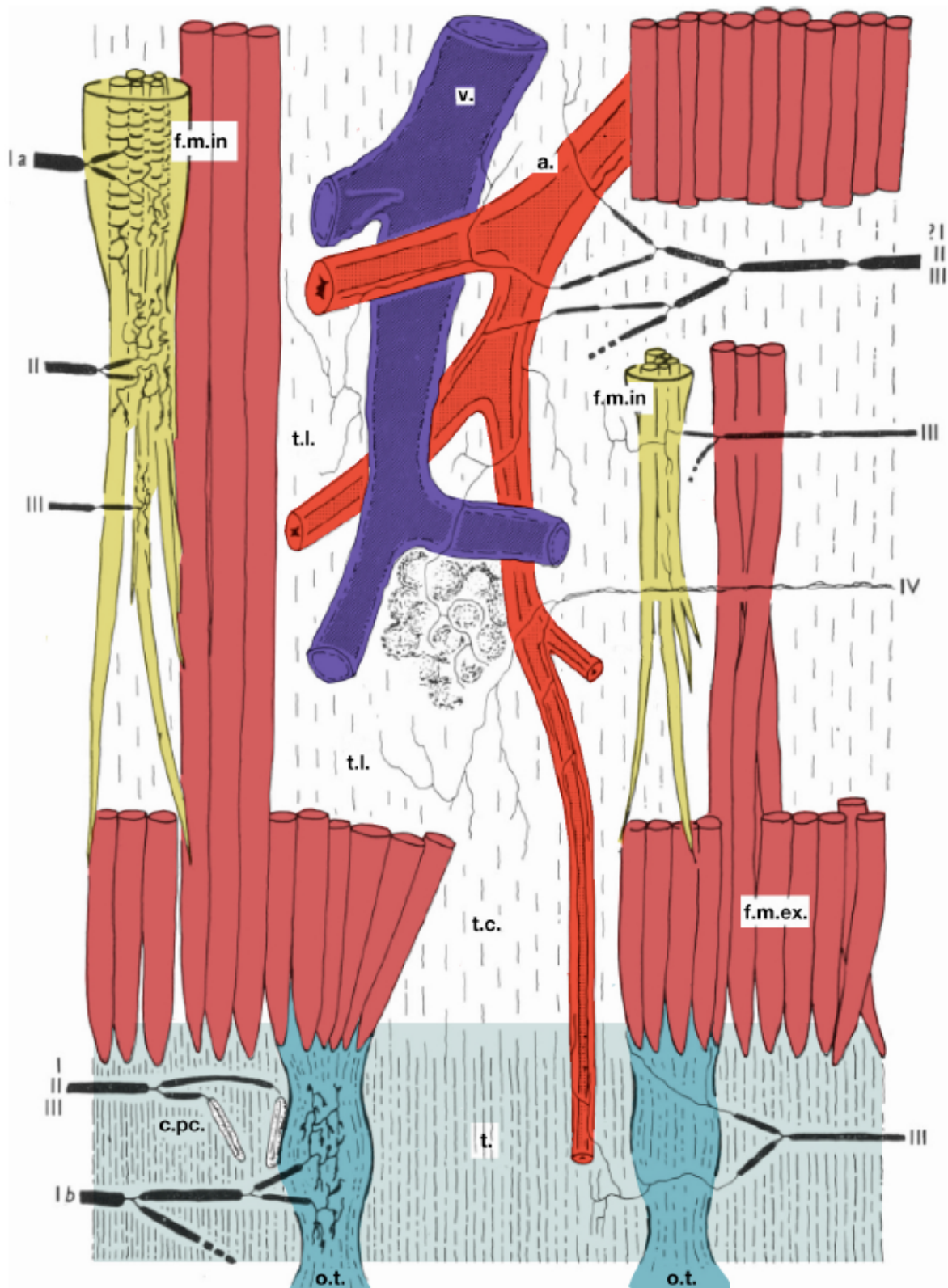
Toutefois, les mécanismes de récupération fonctionnelle post-traumatique ne seront pas les mêmes selon qu'il s'agisse du Système Nerveux Central (SNC) ou du Système Nerveux Périphérique (SNP) (Cajal, 1928). Dans le SNP, les axones sectionnés repoussent au travers des

cellules de Schwann (les bandes de Büngner) afin de rétablir des contacts avec les cibles d'origine. Cette régénérescence se fait en partie grâce à des facteurs trophiques (e.g. NGF « *Nerve Growth Factor* » ou GDNF « *Glia Derived Neurotrophic Factor* »). Au niveau du SNC, cette repousse est quasi inexistante. Cependant, une étude a réussi à démontrer qu'une repousse axonale des neurones du SNC peut être constatée lorsqu'un nerf périphérique a été suturé pour former une dérivation au niveau de la moelle épinière. Il en a été conclu que l'inhibition de la repousse axonale dans le SNC est due au milieu environnant contenant des facteurs inhibiteurs de la croissance axonale (David et Aguayo, 1981). Toutefois, malgré l'absence de repousse axonale, le SNC a la possibilité de remodeler ses connexions synaptiques et d'émettre des collatérales (sur de très faibles distances) à partir de neurones intacts afin de rétablir ou renforcer la communication avec les cibles totalement ou partiellement dénervées (Blesch et Tuszynski, 2009 ; (Matthews et al., 1976).

## II. Les afférences musculaires.

Les fibres afférentes des muscles squelettiques (**Figure n°02**) ont été réparties en quatre groupes (I, II, III et IV) en fonction de leur diamètre et donc des vitesses de conduction (relation constante : vitesse (m/s) = 6 x le diamètre (µm) ; Hursh, 1939), de la nature des stimuli qu'elles détectent et de la localisation de leurs récepteurs (**Tableau n°01**).





**Figure n°02 :** *L'innervation sensitive d'un muscle strié squelettique.* (f.m.ex. : cellule musculaire extrafusale ; f.m.in : fibre musculaire intrafusale ; c.pc. : corpuscule de Pacini ; t. : tendon ; o.t. : organe tendineux de Golgi ; t.l. : terminaisons libres ; t.c. : tissu conjonctif ; a. : artériol ; v. : vénule) (d'après [Stacey, 1969](#)).

Type	Structure innervée	Diamètre des fibres ( $\mu\text{m}$ )	Vitesse de conduction (m/s)
Ia (A $\alpha$ )	Fuseau neuromusculaire	12-20	72-120
Ib (A $\alpha$ )	Organe tendineux de Golgi	12-20	72-120
II (A $\beta$ )	Fuseau neuromusculaire	6-12	36-72
III (A $\delta$ )	Terminaisons libres	1-6	6-36
IV (C)	Terminaisons libres	<1	0,5-2

**Tableau n°01** : La classification des afférences musculaires. Données obtenues chez le chat en fonction de leur diamètre, avec entre parenthèse la classification des fibres nerveuses d'origine cutanée (d'après [Lloyd et Chang, 1948](#)).

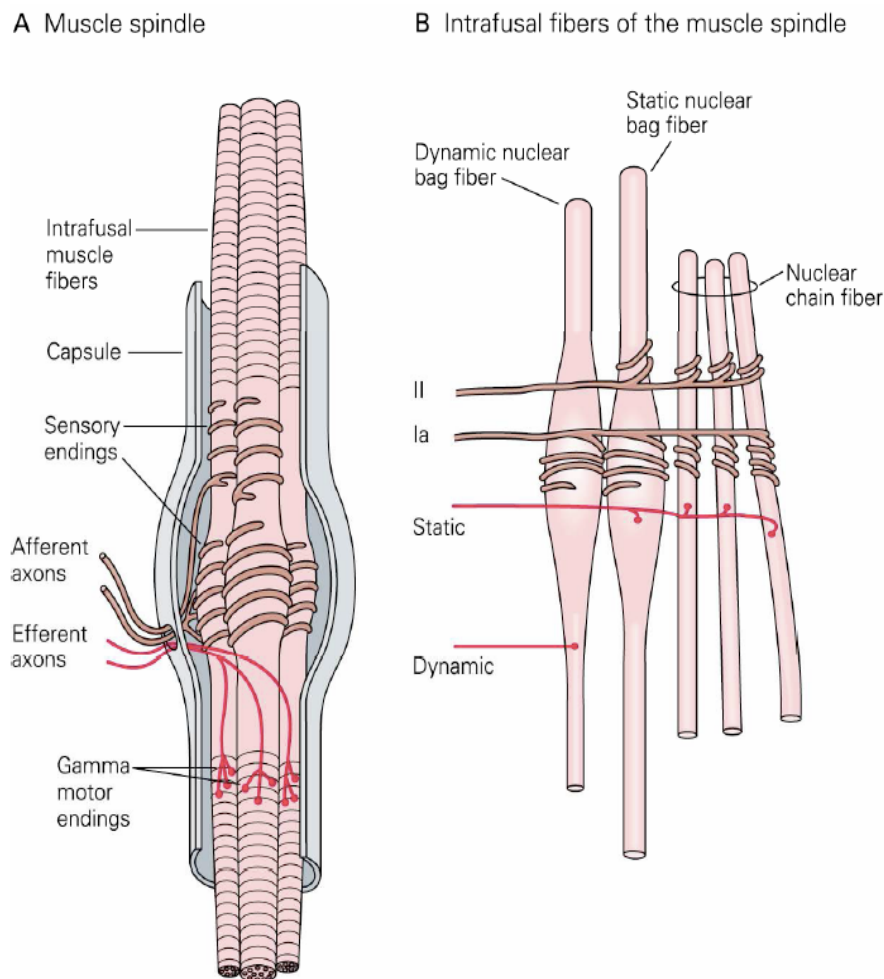
Toutefois, il est important de préciser qu'historiquement les premières études sur les vitesses de conduction et le diamètre des fibres afférentes ont été menées sur le chat, et que celles-ci sont différentes selon les diamètres des neurones de l'espèce choisie comme modèle. Les afférences I, II et III sont myélinisées, tandis que celles du groupe IV ne le sont pas. Les afférences de type I sont composées des afférences de type Ia qui proviennent des fuseaux neuromusculaires (FNM) et des Ib qui proviennent des organes tendineux de Golgi (OTG). Les fibres de type II sont, elles aussi, reliées aux FNM. Les afférences de type III et IV, de petit diamètre, sont des terminaisons libres et transmettent une grande variété d'informations comme la pression, l'acidité, la douleur, ...

L'autre classification souvent utilisée est faite en fonction de la qualité des stimuli que vont détecter ces afférences. On aura donc d'un côté les afférences dites mécanosensibles et de l'autre côté les afférences dites metabosensibles.

### 1. Les afférences mécanosensibles.

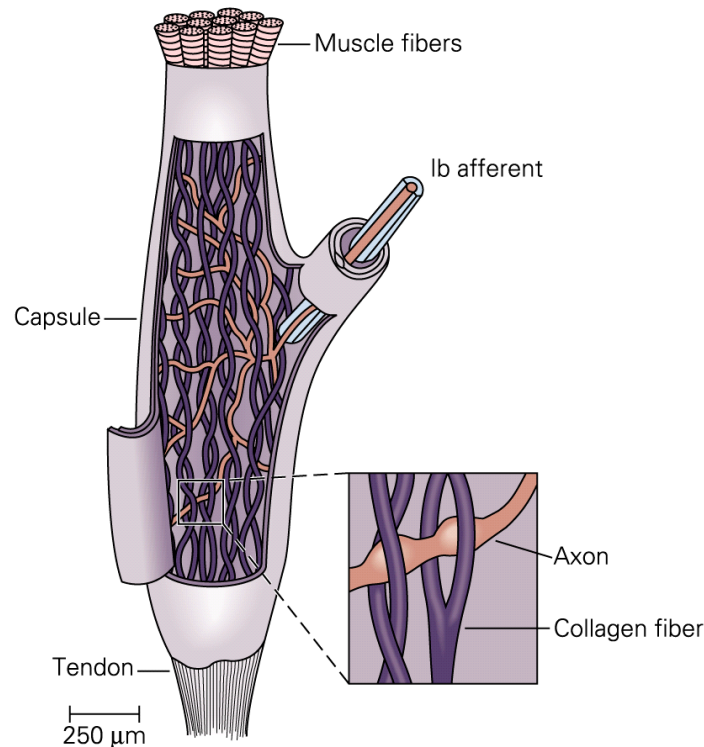
Les FNM sont localisés dans le muscle et préférentiellement au contact des fibres musculaires à forte capacité oxydative ([Rosales et al., 1996](#)). Les fibres afférentes Ia ont pour origine la région équatoriale des FNM tandis que les fibres II prennent leur origine au niveau de la région juxta-équatoriale (**Figure n°03**). Les afférences de type Ia détectent les changements de longueur (statique) et de vitesse de raccourcissement (dynamique), tandis que les afférences de type II sont uniquement sensibles aux changements de longueur ([Brown et al. 1967a](#); [Roll et al. 1989](#)). Ces afférences originaires des FNM sont activées quand la fibre musculaire intrafusale est allongée soit par l'étirement des fibres musculaires extrafusales soit par la contraction de sa partie distale ([Matthews, 1972](#)). Cependant, quand le muscle se contracte, son raccourcissement

devrait diminuer l'activité des afférences provenant des FNM. C'est pour cela que les motoneurones- $\gamma$  statiques et dynamiques stimulent en permanence les cellules musculaires intrafusales statiques (à chaîne et à sac) et/ou dynamiques (à sac) pour qu'elles maintiennent un certain niveau de tension (McCloskey, 1978; Gandevia et al., 1992), ce qui permet finalement de maintenir une activité des afférences de type Ia et II (Kandel et al., 2000).



**Figure n°03 :** *Le fuseau neuromusculaire.* A) Les structures composant le fuseau neuromusculaire. B) Innervation motrice et afférente des fibres intrafusales (d'après Kandel et al., 2000).

Les OTG, quant à eux, sont des terminaisons encapsulées situées au niveau des fibres de collagène de la jonction myotendineuse. Ils sont sensibles à l'étirement des tendons et participent donc à la détection de force. Leur configuration en série avec les fibres musculaires les rendent capables de détecter l'activation d'une seule unité motrice (Binder et al., 1977; Binder et Osbron, 1985; Jami, 1992). Leur réponse est diminuée quand la fibre musculaire qui leur est associée n'est plus contractée (Latash, 2002) (Figure n°04).



**Figure n°04** : L'organe tendineux de Golgi. Représentation de l'afférence Ib innervant l'OTG entouré de sa capsule (d'après [Kandel et al., 2000](#)).

À ces récepteurs mécanosensibles musculaires viennent s'ajouter des mécanorécepteurs encapsulés articulaires (les corpuscules de Meissner, Golgi-Mazzoni, de Ruffini et de Vater-Pacini) qui déchargent surtout quand la position articulaire est proche des limites physiologiques ([Latash, 2002](#)). Les récepteurs cutanés (corpuscules de Meissner, de Ruffini, de Pacini et les disques de Merkel) permettent la détection fine des déformations de la peau ([Latash, 2002](#)) notamment au niveau de la main ([Edin et Johansson, 1995](#)). Les récepteurs articulaires et cutanés étaient, par le passé, considérés comme étant les principaux responsables de la détection de l'angle articulaire, mais ont depuis été jugés comme apportant des informations insuffisantes ([Burgess et al., 1982](#)). En effet, leur suppression entraîne peu de perturbation de la perception de force et de longueur musculaire ([Roland et Ladegaard-Pedersen, 1977](#); [Matthews, 1981](#)) tandis que l'application de vibrations, qui sont connues pour stimuler les FNM, fausse la détection de l'angle articulaire ([Goodwin et al., 1972](#)).

Les vibrations tendineuses induisent une contraction réflexe du muscle concerné par l'intermédiaire de l'activation des afférences fusoriales ([Marsden et al., 1969](#); [Burke et al., 1976](#)). Les vibrations peuvent être tendineuses ou musculaires et stimulent les afférences de type Ia quand elles sont appliquées à des hautes fréquences avec une réponse optimale pour des

fréquences de 70-80 Hz (Brown et al., 1967b; Roll et al., 1989; Decherchi et al., 1998; Fallon et Macefield, 2007). L'activation des motoneurones- $\gamma$  statiques et/ou dynamiques entraîne une augmentation de la réponse des afférences Ia aux vibrations (Brown et al., 1967b) et donc, par voie réflexe, induit une augmentation de la contraction musculaire (Marsden et al., 1969). Les vibrations à plus basses fréquences (inférieures à 50 Hz) semblent, quant à elles, stimuler préférentiellement les afférences de type Ib et II (Brown et al., 1967a, b et c; Roll et al., 1989). L'activation des motoneurones- $\gamma$  statiques semble augmenter la réponse des afférences de type II. Cependant, il a été montré chez l'Homme, que les afférences de type Ia déchargent aussi pour des vibrations à basses fréquences (Roll et al., 1989). Toutefois, lors d'une contraction isométrique, la sensibilité des OTG aux vibrations tendineuses de 10 à 40 Hz augmente, ce qui pourrait être interprété par l'organisme comme étant une augmentation inappropriée de l'activité musculaire (Roll et al., 1989). L'amplitude de l'impact semble également influencer sur la réponse des afférences fusoriales. Pour une fréquence donnée de 100 Hz, si la profondeur de l'impact est de 0,12 mm, les afférences de type II ont une fréquence de réponse située entre 25 et 50 potentiels d'action toutes les 100 percussions, alors que si la profondeur de l'impact est de 1 mm, ces mêmes afférences ont une fréquence de réponse située entre 50 et 100 potentiels d'action toutes les 100 percussions (De-Doncker et al., 2003).

## **2. Les afférences métabosensibles.**

À l'origine, les afférences myélinisées du groupe III et les afférences non myélinisées du groupe IV étaient considérées respectivement comme mécanosensibles et métabosensibles (Mense et Stahnke, 1983). Toutefois, certaines fibres du groupe III répondent aussi à des stimulations chimiques et certaines afférences du groupe IV répondent aussi à des stimulations mécaniques (Kaufman et Rybicki, 1987; Rotto et Kaufman 1988; Kaufmann et Forster, 1996). Des études ont permis de localiser ces afférences comme étant des terminaisons libres au niveau des tissus conjonctifs pour les afférences de type III, tandis que les afférences de type IV sont localisées à l'intérieur ou proche des artérioles, des veinules et des petits vaisseaux lymphatiques (Stacey, 1969; Von-Düring et Andres, 1990; Yamauchi et al., 2014). Les afférences de type IV représentent à elles seules environ 50% de toutes les afférences musculaires (Stacey, 1969) et les afférences des groupes III et IV représentent environ le double des afférences de type I et II (Mitchell et Schmidt, 1983), soit deux tiers des afférences musculaires totales. Ces afférences des groupes III et IV détectent aussi les changements de pression (Ge et Khalsa 2003; Mense et Meyer, 1985), de contraction (Kaufman et al., 1983; Mense et Stahnke, 1983), de dilatation des vaisseaux sanguins intramusculaires (Haouzi et al., 1999; Yamauchi et al., 2014) et de température (Hertel et al., 1976; Kumazawa et Mizumura, 1977; Mense et Meyer, 1985). Elles



sont spécifiquement activées pendant et après la fatigue musculaire (Decherchi et al., 1998) et par différents métabolites comme la bradykinine, la capsaïcine (Kaufman et al. 1982), la 5-hydroxytryptamine (5-HT)(Mense, 1981), l'acide lactique (AL), les ions H<sup>+</sup> (Rotto et Kaufman 1988; Victor et al., 1988), l'acide arachidonique, la prostaglandine E2 (PGE2) (Rotto et Kaufman 1988), la thromboxane A2 (Kenagy et al., 1997) et le chlorure de potassium (KCl) (Rybicki et al., 1985; Decherchi et al., 2001). Qui plus est, il semblerait que les afférences détectant des changements mécaniques puissent être sensibilisées par des métabolites, en particulier en présence d'une faible irrigation sanguine (Kaufman et al., 1984b).

Les afférences des groupes III et IV font synapses dans la corne dorsale de la moelle épinière. Celles de type III le font principalement dans les lames de Rexed I et II tandis que celles de type IV le font dans les lames I et V. Cependant, des éléments de preuves supplémentaires suggèrent que des afférences de type IV forment des projections denses au niveau de la lame VI dans la partie rostrale de la moelle épinière (Craig et Mense, 1983; Mense et Craig, 1988; Panneton et al., 2005). Cette distribution est différente des afférences cutanées A $\delta$  et C qui se terminent principalement au niveau des lames I et II (Light et Perl, 1979; Sugiura et al., 1986). Les terminaisons des afférences III et IV forment des connexions poly-synaptiques avec des neurones de deuxième ordre. Ceux-ci sont aussi localisés dans les lames profondes de la corne dorsale (Menetrey et al., 1980; Yu et Mense, 1990; Burstein et al., 1991). Ces neurones de deuxième ordre, activés par les afférences musculaires, reçoivent également des informations en provenance des afférences issues de la peau et d'autres tissus. Les afférences cutanées se projettent aussi sur des seconds neurones qui ne sont activés que par les afférences cutanées (Pomeranz et al., 1968; Craig et Kniffki, 1985). Les afférences musculaires de type III et IV peuvent transmettre plusieurs types d'information.

*Le réflexe de pression lié à l'exercice.* L'activation des afférences des groupes III et IV est aussi connue pour entraîner une augmentation de la décharge du système nerveux sympathique, nommée réflexe de pression lié à l'exercice ou ergoréflexe (EPR « *Exercise Pressor Reflex* ») (Stebbins et al., 1988; Victor et al., 1989; McMahon et McWilliam, 1992). Alam et Smirk furent les premiers à mettre en évidence que les métabolites produits lors de la contraction musculaire pouvaient engendrer une régulation de la pression artérielle (PA) (Alam et Smirk, 1937). Ces auteurs ont démontré que la PA restait au dessus de son niveau de repos si la circulation du muscle en activité était maintenue bloquée après la fin de l'exercice. Le système de détection métabolique est activé quand le muscle se fatigue (Saito et al., 1989; Seals et Enoka, 1989), ce qui entraîne une augmentation du tonus sympathique et une vasoconstriction des

vaisseaux sanguins du muscle (Mark et al., 1985; Victor et al., 1988; Seals, 1989 ; Sinoway et al., 1989).

L'introduction de la notion d'EPR a été proposée pour la première fois par Coote et al. (Coote et al., 1971). Ces auteurs avaient démontré que la stimulation d'une racine ventrale entraînait une augmentation de la PA et de la fréquence cardiaque (FC) qui pouvait être abolie après transection de la racine dorsale. De plus, l'amplitude de cette réponse était proportionnelle à la tension musculaire engendrée. Il a également été démontré que la contraction du muscle en condition ischémique engendrait une plus grande réponse (Coote et al., 1971; Stebbins et al., 1989). McCloskey et Mitchell ont été les premiers à démontrer que ce réflexe était transmis *via* les afférences III et IV (McCloskey et Mitchell, 1972). Leur expérimentation consistait à produire un blocage anodal de la racine dorsale (le blocage était réalisé à l'aide d'un courant direct passant entre deux électrodes placées sous les racines dorsales avec l'anode placée coté distal), ce qui permettait d'empêcher uniquement la transmission des informations provenant des afférences des groupes I et II ou à utiliser un anesthésique local appliqué sur la racine dorsale, qui lui, empêchait la transmission des informations *via* les afférences de type III et IV. Dans la première condition, le réflexe ne disparaissait pas alors que dans la deuxième condition il disparaissait, montrant ainsi l'implication des afférences de type III et IV dans l'EPR (McCloskey et Mitchell, 1972). D'autres auteurs, utilisant des protocoles de stimulation électrique sont arrivés aux mêmes conclusions (Mizumura et Kumazawa, 1976; Tibes, 1977; Sato et al., 1981). Wilson et al., ont ainsi défini l'EPR comme étant une augmentation de la PA, de la FC, de la contractilité musculaire, de l'activité sympathique rénale et de la fréquence ventilatoire lors de la contraction musculaire (Wilson et al., 1993). Plus récemment, il a été montré une augmentation de la fréquence et de l'amplitude respiratoire, de la pression artérielle et du débit sanguin après sollicitation des afférences des groupes III et IV du *tibialis anterior* (Decherchi et al., 2007).

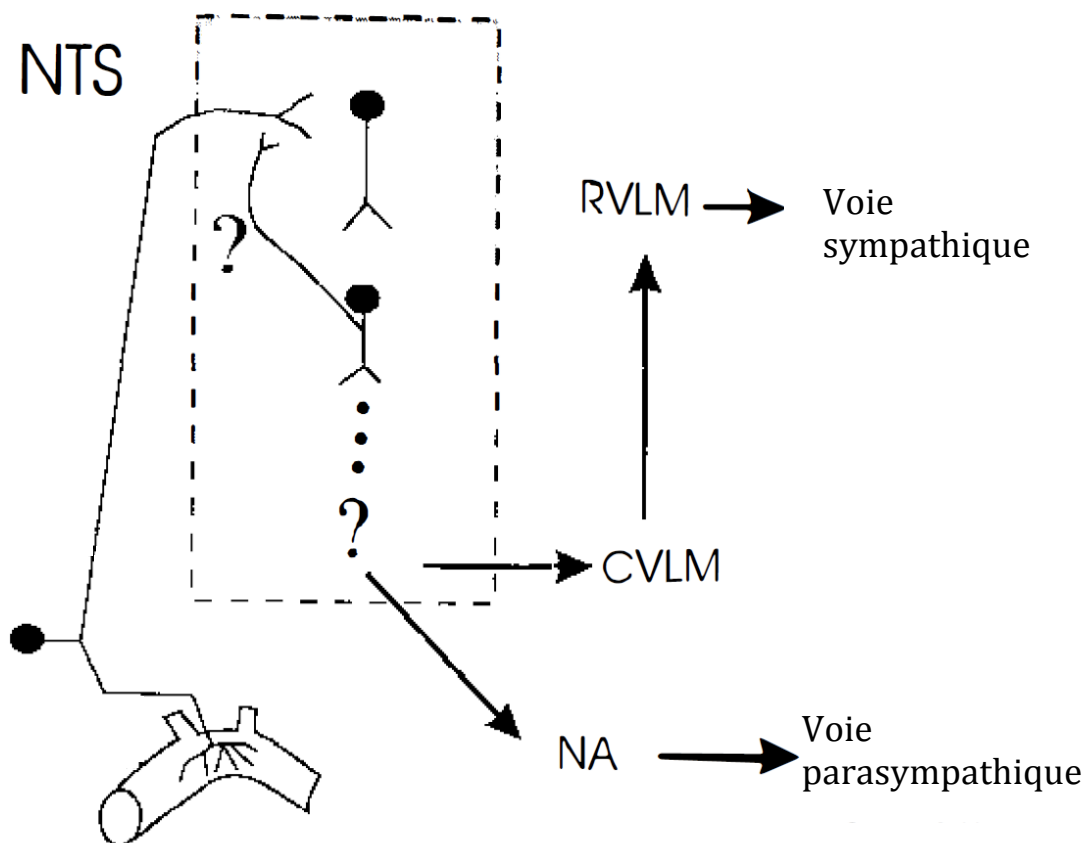
L'EPR a deux composantes distinctes. La première est appelée le 'mécano-réflexe musculaire' et est principalement mis en jeu par les afférences du groupe III et la deuxième est appelée le 'métabo-réflexe musculaire', qui est principalement mis en jeu par les afférences du groupe IV (Andres et al., 1985; Kaufman et Forster, 1996). Les récepteurs activant ces afférences sont principalement mis en jeu par des changements de pression intramusculaire ainsi que par des distorsions mécaniques pendant la contraction musculaire (Stebbins et al., 1988; Williamson et al., 1994). Ainsi, les afférences de type III déchargent immédiatement (entre 0,2 à 5 s) après le début de la contraction musculaire (Kaufman et al., 1983). Les récepteurs associés aux afférences du groupe III ne sont pas bien définis mais devraient inclure des chaînes calciques et/ou des chaînes cationiques à ouverture mécanique (Hamill et McBride, 1996; Smith et al.,

2014). Les afférences de type IV répondent, quant à elles, plus tardivement (5 à 30 s), lorsque l'accumulation de métabolites est suffisante (Kaufman et al., 1983; Mense et Stahnke, 1983). De nombreux récepteurs périphériques ont été associés à l'activation de ces afférences du groupe IV tels que le récepteur à canal ionique ATP-dépendant (P2X3), le récepteur à canal ionique sensible à l'acidité (ASIC3), le récepteur à la bradykinine (B2), le récepteur transitoire potentiel vanilloïde (TRPV1), et le récepteur cannabinoïde (CB1) pour n'en citer que quelques-uns (Pan et al., 1993; Hanna et al., 2002; Li et al., 2004a; Williams et al., 2008; Smith et al., 2010).

Au niveau central, les afférences peuvent libérer plusieurs types de neurotransmetteurs et peptides tels que, par exemple, le glutamate, la substance P (SP), l'aspartate et l'oxyde nitrique (NO) (Wilson et al., 1993; Hand et al., 1996; Li et Mitchell, 2002). De même, un certain nombre de récepteurs tels que les récepteurs NMDA, non-NMDA, NK-1 et P2X ont été identifiés au sein de la moelle épinière (Wilson, 2000). Il semblerait que les afférences des groupes III et IV issues des muscles squelettiques se projettent depuis la racine dorsale vers les sillons dorso-latéraux et ventraux de la moelle épinière puis vers le noyau cunéiforme, le noyau du tractus solitaris (NTS), le noyau réticulaire latéral, le caudal ventrolatéral médullaire (CVLM), et le rostral ventrolatéral médullaire (RVLM) du tronc cérébral (Iwamoto et al., 1984; Kozelka et Wurster, 1985; Dykes et Craig, 1998; Potts et al., 2002). Il semblerait que le centre de traitement primaire soit dans le NTS mais d'autres noyaux tels que le CVLM, le RVLM, le champ tegmental latéral, le noyau ambigu et le noyau gris périaqueducal pourraient également contribuer au traitement des informations en provenance des muscles squelettiques (Iwamoto et al., 1982; Iwamoto and Kaufman, 1987; Person, 1989; Li et al., 1997; Ishide et al., 2000; Li et Mitchell, 2000).

Depuis le tronc cérébral, les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques qui ont pour origine le noyau ambigu (NA) se dirigent vers les neurones post-ganglionnaires des parois du cœur (Mendelowitz, 1999). Ainsi, l'activation de l'EPR par les afférences III et IV, diminuerait l'activité des neurones vagues, ce qui entraînerait donc une augmentation du rythme cardiaque. Le tonus sympathique est transmis depuis le tronc cérébral par l'activation des pré-motoneurones sympathiques qui font synapses sur les neurones pré-ganglionnaires sympathiques qui projettent à leur tour vers les ganglions de la chaîne paravertébrale pour faire synapses avec les neurones post-ganglionnaires qui innervent le cœur et les vaisseaux sanguins (Dampney et al., 2003). Ainsi, l'activation de l'EPR entraînerait une augmentation de l'activité du nerf sympathique, ce qui augmenterait la fréquence de contraction et la capacité contractile du cœur à l'origine de l'augmentation du débit cardiaque et, en parallèle, d'une vasoconstriction artérielle et veineuse. Pour résumer, l'EPR consiste en des ajustements autonomes pendant l'exercice par l'augmentation de l'activité sympathique et par la diminution de l'activité parasympathique (**Figure n°05**).





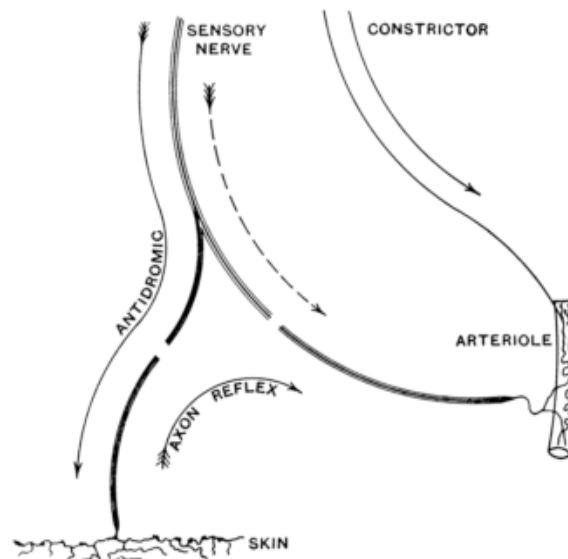
**Figure n°05 :** La régulation de l'EPR par les afférences musculaires. Représentation schématique des projections des afférences de type A $\delta$  et C au niveau du NTS (modifié et complété, d'après [Andresen et Kunze, 1994](#)).

*La douleur.* Elle a été largement étudiée au niveau de la peau avec les afférences A $\delta$  et C car sa localisation est bien plus précise que pour le muscle pour lequel elle est décrite comme diffuse ([Mense, 1993](#)). Cependant, les afférences de type III et IV sont également connues pour véhiculer les informations nociceptives en provenance des muscles. La part de ces afférences nociceptives représenterait respectivement 33% et 45% des afférences des groupes III et IV ([Mense et Meyer, 1985](#)). Plus récemment, cette même équipe a trouvé que la proportion de fibres codant pour la douleur pouvait dépasser les 55% après stimulation du triceps sural ([Mense, 2009](#)). Toutefois, dans la mesure où les substances perçues comme nocives le sont pour certains muscles plus que pour d'autres ([Svensson et al., 2005](#); [Dong et al., 2006a](#); [Mense, 2009](#)), ces interprétations sont à prendre avec précaution.

*L'inflammation neurogénique.* La vasodilatation locale du muscle en activité serait principalement causée par la synthèse locale de NO par l'endothélium ([Ignarro et al., 2002](#)). Cependant, dans le cas d'une stimulation des afférences du groupe C/IV après une lésion ou une

inflammation par exemple, la production de peptides par ces mêmes afférences, comme la SP et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP « *Calcitonin Gene-Related Peptide* ») participe aussi à une vasodilatation et à une sensibilisation locale (Kruger et al., 1989). Ces afférences non myélinisées, quand elles sont stimulées, vont libérer de la SP et de la CGRP au niveau périphérique, ce qui entraîne une vasodilatation et une extravasation plasmatique locale. Cette libération peut être provoquée par deux réflexes : le réflexe d'axone et le réflexe du ganglion dorsal (DRR « *Dorsal Root Reflex* »).

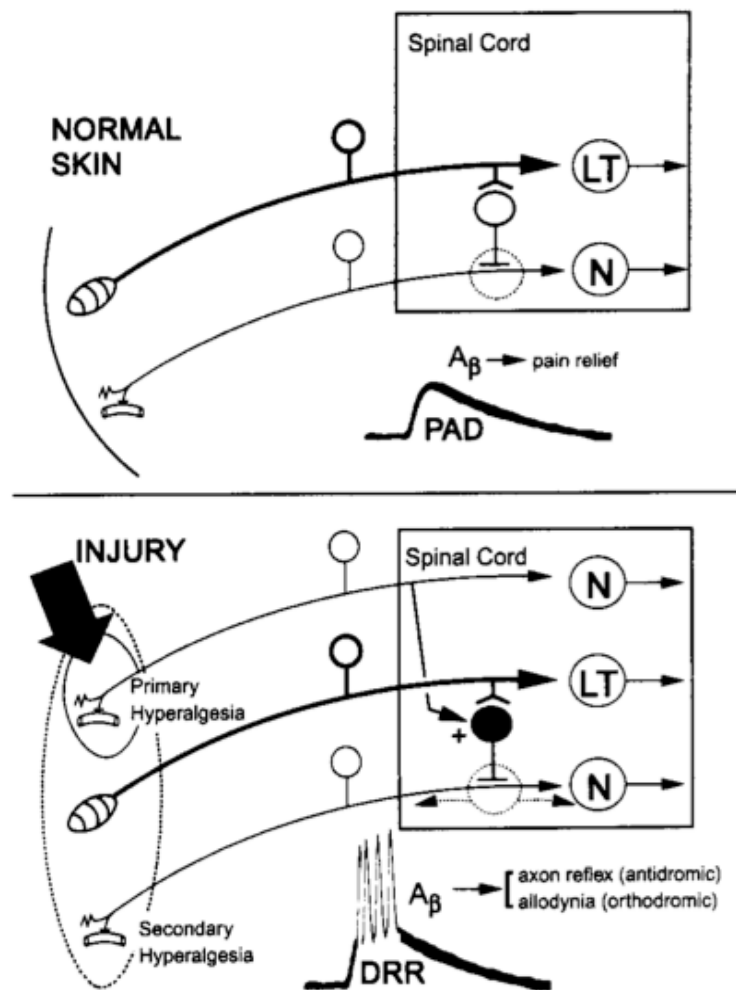
Quand une afférence est stimulée, les influx nerveux générés se propagent vers le SNC mais aussi vers des collatérales se projetant vers des vaisseaux sanguins, ce qui va entraîner une libération de SP et de CGRP qui entraîne une vasodilatation locale ; c'est le réflexe d'axone (Willis, 1999) (Figure n°06).



**Figure n°06 :** *Le réflexe d'axone.* Un neurone afférent innerve à la fois la peau et une artériole. L'artériole est aussi innervée par une fibre sympathique qui permet la vasoconstriction. L'activation de la fibre afférente va envoyer un signal vers le SNC, mais va aussi envoyer un message nerveux vers l'artériole, ce qui entraîne une vasodilatation (d'après Willis, 1999).

Le DRR, quant à lui, est engendré par le mécanisme de l'inhibition pré-synaptique qui sera décrit en détail dans la partie suivante (partie I.2.3). Pour résumer, l'activation d'une fibre afférente va activer une autre fibre afférente métabosensible par l'intermédiaire d'un interneurone spinal. Quand le niveau d'activation est suffisamment important pour générer un potentiel d'action, l'influx nerveux va se diriger dans les deux sens ; vers la moelle épinière et vers la périphérie, ce qui entraîne une libération locale de SP et de CGRP (Lin et al., 1999; Willis, 1999; Garcia-Nicas et al., 2001) (Figure n°07). Ces réflexes ont été démontrés comme

intervenant lors de lésions périphériques (Lin et al., 1999) mais des études suggèrent qu'ils seraient aussi impliqués dans la régulation de l'activité locomotrice (Côté et Gossard, 2003).



**Figure n°07 :** *Le réflexe du ganglion dorsal (DRR).* En haut : représentation du mécanisme de l'inhibition présynaptique sur une afférence nociceptive (N) induite par un interneurone inhibiteur activé par une afférence mécanosensible (LT). En bas : représentation d'une suractivation de l'inhibition présynaptique par une afférence N sur une autre afférence N, ce qui conduit à la production d'un DRR. Le DRR entraîne la propagation d'un influx nerveux orthodromique vers la moelle épinière et un autre antidromique vers la périphérie (d'après Willis, 1999).

Ces deux réflexes ont donc la même finalité et ont pour but de s'opposer à la diminution du flux sanguin pendant la contraction musculaire. Ainsi, la combinaison de la vasoconstriction générale induite par l'EPR et de la vasodilatation locale induite par ces réflexes, pourrait être en partie responsable de l'orientation du flux sanguin vers les muscles en activité (Sato et al., 2000). De plus, en cas de diminution voire d'absence de l'inflammation neurogénique, il en résulterait une accumulation accrue de métabolites produits par le muscle durant l'exercice et donc une

stimulation accrue des afférences métabosensibles associée à une sensibilisation des afférences mécanosensibles (Kaufman et al., 1984b).

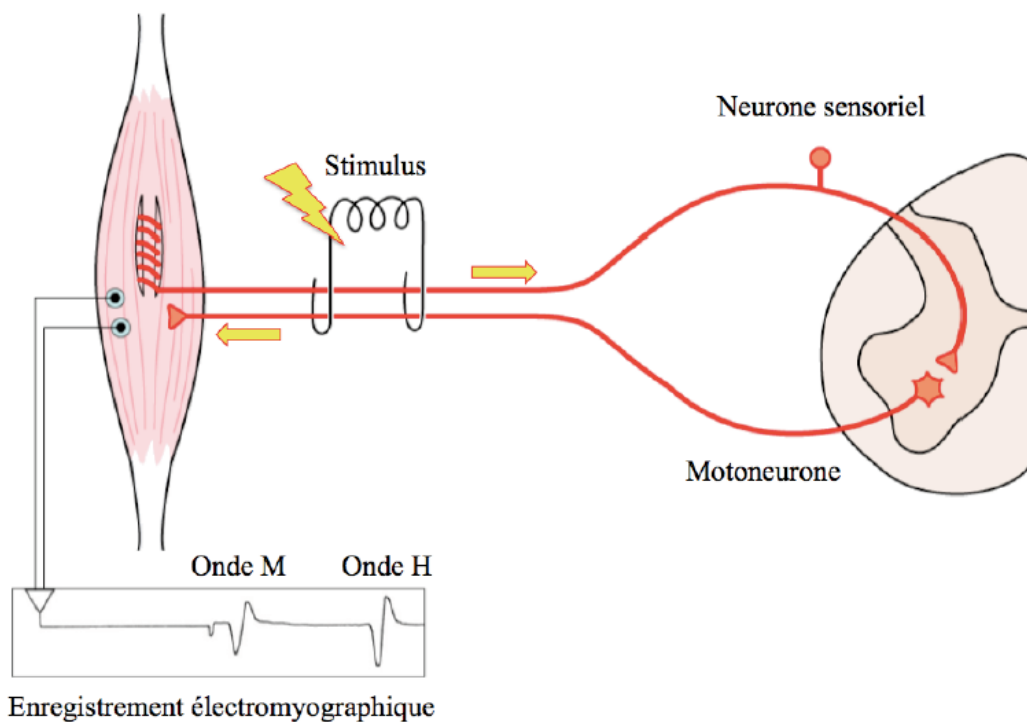
### III. La régulation de la boucle sensorimotrice.

Certaines afférences forment au niveau spinal des synapses excitatrices avec les motoneurones, ce qui entraîne une activation réflexe de ces motoneurones. D'autres afférences forment des synapses avec des interneurones inhibiteurs ou excitateurs qui eux font synapse avec ces motoneurones. Ce réseau de neurone permet donc de réguler finement l'activité des motoneurones. L'utilisation des voies réflexes est donc devenue indispensable pour étudier ces réseaux moteurs.

Les afférences de type Ia font partie de ces afférences qui forment une synapse excitatrice avec des motoneurones innervant le muscle dont elles proviennent. Cette structure forme ainsi une boucle sensorimotrice monosynaptique. Quand elles sont stimulées, ces afférences entraînent une activation des motoneurones : c'est le réflexe monosynaptique (MSR « Mono-Synaptique Reflex ») (Renshaw, 1940). Depuis les années 1940, ce réflexe est utilisé pour étudier l'excitabilité des motoneurones. Plus précisément, il est utilisé pour évaluer les patrons de recrutement des unités motrices car la stimulation des afférences active les motoneurones de manière naturelle selon un ordre déterminé qualifié de 'principe de Henneman' : les plus petits motoneurones (qui innervent les cellules musculaires lentes) étant activés en premier, les plus gros (qui innervent les cellules musculaires rapides) en dernier (Henneman et Mendell, 1981). Cette voie monosynaptique est aussi activée lors du réflexe d'étirement : une contraction du muscle est observée en réponse à son étirement (réflexe monosynaptique d'étirement). Cette technique est surtout utilisée pour déterminer la sensibilité des FNM et de la boucle  $\gamma$  (Burke et al., 1983; Morita et al., 1998). Toutefois, chez l'Homme, comme il n'est pas possible de réaliser des enregistrements très invasifs, la technique du réflexe H est privilégiée. Cette technique fut appelée réflexe d'Hoffmann (réflexe H), du nom de son inventeur, Paul Hoffmann (Hoffmann, 1918). Le réflexe H est un réflexe moteur « artificiel » évoqué uniquement par stimulation électrique alors que le réflexe d'étirement est naturel. Le réflexe H diffère également du réflexe d'étirement par le fait qu'il implique une plus grande part de fibres afférentes de type Ib et une synchronisation des décharges du fait qu'il est induit électriquement (Burke et al., 1983). L'activité des FNM peut toutefois être responsable d'une diminution du réflexe H, ce qui implique que la position des membres doit rester rigoureusement la même lorsque plusieurs réflexes H sont évoqués successivement (Wood et al., 1996).

## 1. Le réflexe H.

Le réflexe H est obtenu par stimulation électrique d'un nerf périphérique mixte (contenant à la fois des fibres afférentes et efférentes). De ce fait, la stimulation entraîne l'activation des afférences et des efférences du nerf. Ainsi, les influx nerveux se propagent, d'une part, du site de stimulation vers le muscle par les afférences (antidromiquement) et par les efférences (orthodromiquement) ; ces dernières entraînent la dépolarisation de la membrane musculaire : c'est la réponse motrice directe ou **onde M**. D'autre part, l'influx se propage aussi antidromiquement du site de stimulation vers la moelle épinière par les efférences et orthodromiquement par les afférences. La stimulation dépolarise les axones de gros diamètre du groupe I et dans une moindre mesure du groupe II, jusqu'à entraîner la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique entre les afférences et les motoneurones- $\alpha$ . Cette activation des motoneurones- $\alpha$  génère une deuxième onde qualifiée d'**onde H**. Les ondes M et H sont recueillies au niveau du muscle grâce à des électrodes d'électromyographie (EMG) positionnées sur ou dans le muscle chez l'animal. Étant donné que la distance à parcourir par les influx nerveux est plus courte pour aller du point de stimulation au muscle que du point de stimulation à la moelle épinière puis au muscle, l'onde H apparaît donc toujours après l'onde M sur le tracé EMG (**Figure n°08**).



**Figure n°08:** *Le réflexe monosynaptique.* La stimulation électrique recrute directement les motoneurones- $\alpha$  et les fibres afférentes de gros diamètre, qui vont ensuite recruter les motoneurones- $\alpha$ . Les ondes M et H sont recueillies par des électrodes EMG (d'après [Kandel et al., 2000](#)).

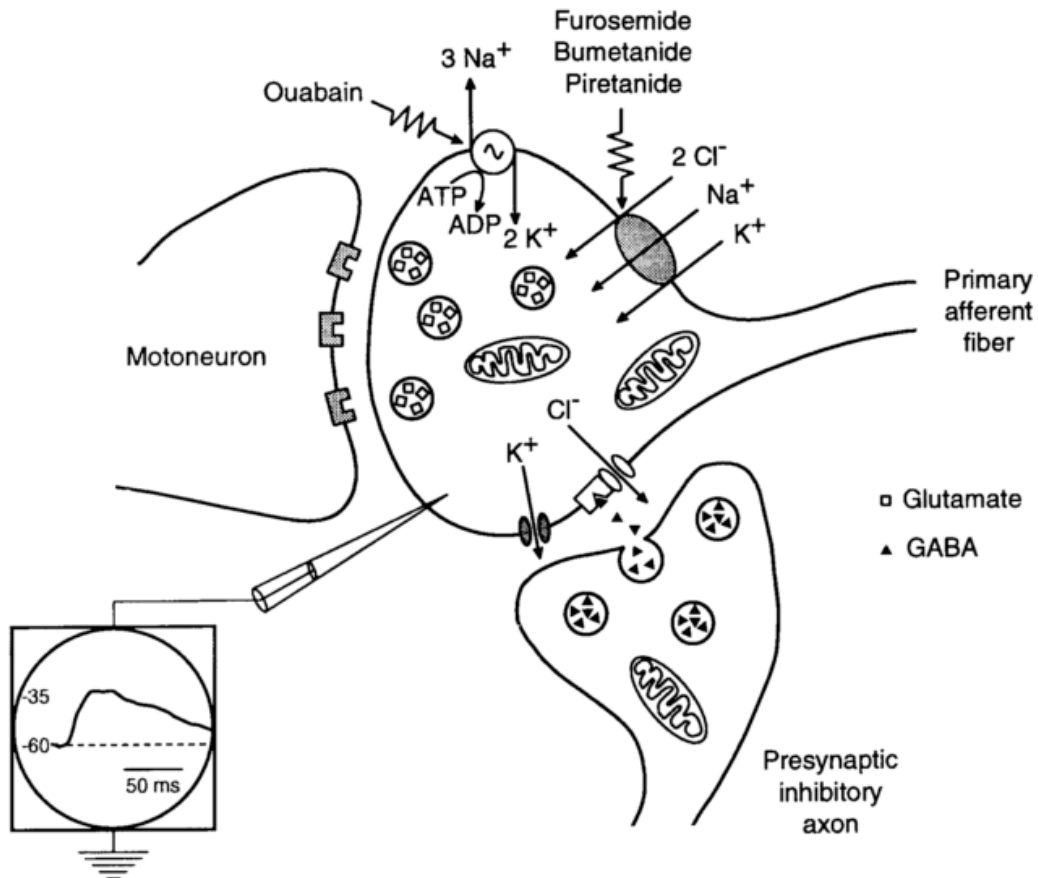
Toutefois, si les intensités de stimulation sont trop élevées, les potentiels d'action générés par les motoneurones- $\alpha$  suite à l'activation des fibres afférentes entrent en collision avec les influx se propageant antidromiquement par les efférences, ce qui va diminuer l'amplitude de l'onde H. L'importance de ce phénomène varie entre l'Homme et l'animal. En effet, chez l'animal contrairement à l'Homme, le réflexe H ne diminue que très peu, voire pas du tout quand l'intensité de la stimulation atteint  $M_{\max}$ . Pour étudier le réflexe H, il a donc fallu le normaliser avec l'amplitude de  $M_{\max}$  qui représente toutes les unités motrices recrutées par la stimulation. On utilise donc le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  pour estimer la proportion de motoneurones recrutés par voie réflexe par rapport au nombre total de motoneurones. De plus, le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  permet d'éliminer le risque de variation de l'excitabilité des cellules musculaires. La technique du réflexe H permet donc d'évaluer la plasticité de la boucle sensori-motrice et plus particulièrement, les variations d'excitabilité des motoneurones.

## 2. La modulation du réflexe H.

Le réflexe H est principalement induit par l'activation des afférences Ia mais est modulé par des interneurones excitateurs et inhibiteurs ou encore par les voies supraspinales. Il est donc indispensable de distinguer les différents mécanismes qui pourraient l'influencer.

*L'inhibition présynaptique (ou contrôle présynaptique de la libération de neurotransmetteurs).* Elle est réalisée par l'intermédiaire d'un interneurone inhibiteur (Lamotte d'Incamps et al., 1998a) qui fait synapse sur une afférence et qui va diminuer les influx qu'elle propage (Figure n°09). L'existence de cette inhibition fut prouvée en observant la diminution de l'amplitude des PPSE dans les motoneurones suite à l'activation des afférences de type Ia et ce, sans changement de conductance au niveau de la membrane du motoneurone (Frank et Fuortes, 1957; Eccles et al., 1961). Il a été montré que cette inhibition présynaptique était de nature GABAergique (Eccles, 1963; Curtis et al., 1998; Lamotte d'Incamps et al., 1998b). La fixation de l'acide Gamma-Aminobutyrique (GABA « *Gamma-AminoButyric Acid* ») sur son récepteur GABA-A entraîne l'ouverture du canal  $\text{Cl}^-$  et, contre toute attente, la sortie d'ions  $\text{Cl}^-$ . En effet, comme les afférences Ia ont des concentrations intracellulaires en  $\text{Cl}^-$  très élevées (Alvarez et al., 1998) en raison de la présence du co-transporteur  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$  (NKCC1) et de l'absence du co-transporteur  $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$  (KCC2), la fixation du GABA sur son récepteur de type A va ouvrir le canal  $\text{Cl}^-$  qui va laisser diffuser les ions  $\text{Cl}^-$  du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré et entraîner une dépolarisation de l'extrémité axonique (Willis, 1999; Price et al., 2009). Cette dépolarisation des afférences primaires (PAD « *Primary Afférent Depolarisation* »)

entraînerait l'inactivation des canaux sodiques et un changement de conductance au niveau de l'extrémité axonale entravant ainsi la propagation des potentiels d'action afférents (Cattaert et al., 2001).



**Figure n°09** : *L'inhibition présynaptique*. Schématisation d'une synapse formée par une afférence Ia et un motoneurone et d'une synapse axo-axonique avec un interneurone GABAergique. Les principaux transporteurs et canaux ioniques y sont représentés ainsi que l'enregistrement de la dépolarisation de l'afférence (PAD) engendrée par la fixation du GABA sur son récepteur GABA-A (d'après Willis, 1999).

*L'inhibition postsynaptique* est à différencier de l'inhibition présynaptique car son action inhibitrice est directement située au niveau du motoneurone- $\alpha$ . Son mécanisme d'inhibition est principalement GABAergique et glycinergique. Cependant, le motoneurone a une concentration interne en  $\text{Cl}^-$  inférieure au milieu extracellulaire grâce à la présence du co-transporteur KCC2. La fixation du GABA sur le récepteur GABA-A va donc entraîner une entrée de  $\text{Cl}^-$ , ce qui hyperpolarise le motoneurone- $\alpha$  et diminue son excitabilité (Delpire et Mount, 2002; Payne et al., 2003).



### **2.1. L'inhibition réciproque.**

Les influx nerveux des afférences Ia vont être transmis à partir d'une collatérale d'axone directement sur les motoneurones des muscles synergiques (Rosales et Dressler, 2010) mais aussi à des interneurones inhibiteurs se projetant sur les motoneurones des muscles antagonistes. Ainsi, ces derniers seront inhibés par un mécanisme d'inhibition postsynaptique provenant du muscle antagoniste. C'est ce que l'on appelle, *l'inhibition réciproque*. Ce mécanisme a été mis en évidence après observation de l'inhibition du réflexe H du muscle *soleus* dans les 2 à 4 ms après la stimulation du nerf péronier commun innervant le muscle *tibialis anterior* (Crone et al., 1987).

### **2.2. Les inhibitions D1 et D2.**

La stimulation des afférences Ia du muscle antagoniste entraîne une diminution de l'excitabilité des motoneurones du muscle agoniste, mais avec des délais supérieurs par rapport à l'inhibition réciproque. Ainsi, il a été montré que la mise en jeu des afférences Ia du muscle *tibialis anterior* par des vibrations tendineuses entraîne une diminution de l'amplitude du réflexe H du muscle *soleus* dans un intervalle de 25 à 60 ms (Hultborn et al., 1987a et b). Dans la mesure où l'activité corticale n'est pas perturbée par de telles vibrations, il a été conclu que cette inhibition était d'origine présynaptique (Berardelli et al., 1987). Elle fut appelée inhibition D1 (Mizuno et al., 1971).

La stimulation du nerf péronier commun entraîne aussi une diminution plus importante du réflexe H du soléaire dans un intervalle de 60 à 100 ms. C'est l'inhibition D2. Cette inhibition semble toutefois moins sujette aux dépressions post-activations (*cf* partie 2.7. La dépression post-activation) pouvant intervenir pour des intervalles de stimulation plus courts (Lundbye-Jensen et Nielsen, 2008).

### **2.3. L'inhibition récurrente.**

L'inhibition récurrente, est transmise par les cellules de Renshaw (interneurones inhibiteurs) *via* un mécanisme d'inhibition postsynaptique. La cellule de Renshaw est activée par un axone collatéral du motoneurone et entraîne, entre autre, l'inhibition de ce dernier ainsi que de l'interneurone inhibiteur Ia (Windhorst, 1996). C'est ainsi que la cellule de Renshaw induit un *feedback* négatif quand la décharge du motoneurone augmente, ce qui fait diminuer le réflexe H (Hultborn et Pierrot-Deseilligny, 1979).



## 2.4. L'inhibition des afférences Ib.

Les afférences de type Ib en provenance des OTG ont un rôle principalement inhibiteur au niveau postsynaptique. En effet, leur activation est responsable de l'inhibition des motoneurones- $\alpha$  du muscle homonyme comme des muscles hétéronymes (Granit, 1950; Laporte et Lloyd, 1952). Il a également été identifié qu'en plus de l'inhibition des muscles synergiques, les afférences Ib avaient un rôle excitateur sur les motoneurones des muscles antagonistes (Watt et al., 1976). L'effet inhibiteur est d'ailleurs supérieur à celui des interneurones inhibiteurs des afférences de type Ia et agirait directement sur le motoneurone (Hultborn et al., 1987a). Ces deux groupes d'afférences pourraient toutefois agir sur des interneurones communs (Fetz et al., 1979; Jami, 1992).

## 2.5. Les voies descendantes supraspinales.

Les voies descendantes corticales et sous corticales jouent également un rôle dans la régulation du réflexe H. En effet, il a été montré à l'aide de stimulations magnétiques transcrâniennes que les voies descendantes pouvaient diminuer l'inhibition présynaptique du réflexe H au niveau du muscle *soleus* (Meunier et Pierrot-Deseilligny, 1998). D'autres études, utilisant différentes postures et tâches motrices ont permis de montrer une augmentation de l'inhibition présynaptique en passant de la position allongée, à debout, puis de la marche à la course (Koceja et al. 1993, 1995; Mynark et Koceja 1997; Mynark et al. 1997; Goulart et al. 2000). Petersen et ses collaborateurs ont, quant à eux, enregistré le réflexe H au cours de la marche, et ont constaté une facilitation du réflexe H (diminution de l'inhibition présynaptique) uniquement pendant la phase d'appui et de flexion plantaire (Petersen et al., 1998). Par ailleurs, une étude de Baudry et Duchateau a montré que le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  ne variait pas significativement lorsque la vision des sujets était supprimée ou lorsque la proprioception perturbée (position debout sur de la mousse) et cela malgré une augmentation de l'activité EMG. Étant donné que l'amplitude du réflexe H augmente en parallèle avec l'activité EMG (Matthews, 1986) et que le réflexe H n'augmente pas dans ce cas, les auteurs suggèrent que l'inhibition présynaptique est augmentée (Capaday et Stein, 1989). Ainsi l'augmentation de l'inhibition présynaptique interviendrait pour diminuer l'information provenant des afférences et laisser place à l'influence des voies cortico-spinales (Baudry et Duchateau, 2012).

## 2.6. Le rôle des afférences III et IV.

L'activation des afférences métabosensibles par stimulation chimique régule l'excitabilité des motoneurones- $\alpha$  (Pettorossi et al., 1999; Taylor et al., 2000; Gandevia, 2001), augmente

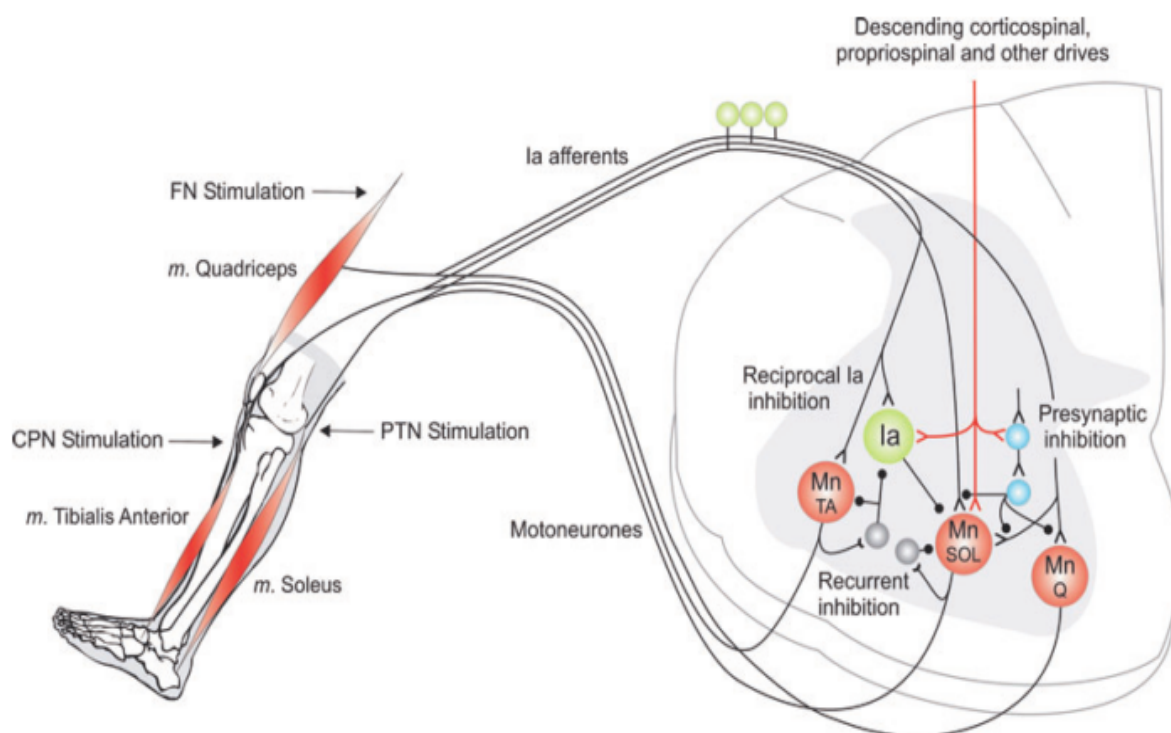
l'activité des motoneurones- $\gamma$  et des afférences originaires des FNM (Jovanovic et al., 1990; Johansson et al., 1993; Ljubisavljevic et al., 1994). De plus, la stimulation de ces afférences chez le rat entraîne également une diminution de l'amplitude du réflexe H (Laurin et al., 2010). D'autres études montrent que la stimulation à basse fréquence des afférences musculaires, cutanées ou articulaires de petit diamètre (afférences C/IV) entraîne une augmentation de l'excitabilité des motoneurones responsables du réflexe de flexion par l'intermédiaire d'un interneurone excitateur (Wall et Woolf, 1984; Woolf et Wall, 1986; Arendt-Nielsen, 1997).

## 2.7. La dépression post-activation.

La stimulation répétitive est à l'origine de la déplétion en neurotransmetteurs des afférences Ia. Ce principe est appelé *dépression post-activation*. Ainsi, une stimulation arrivant dans un délai inférieur à 10 s (0,1 Hz) après la première stimulation sera moins efficace pour dépolariser le même motoneurone- $\alpha$  (Macgladery et McDougal, 1950). Cependant, il est admis qu'à une fréquence de 0,2-0,3 Hz les changements de l'amplitude du réflexe H ne sont pas suffisamment importants et la variabilité assez minime, ce qui permet d'utiliser ces fréquences pour enregistrer plusieurs réflexes consécutifs (Pierrot-Deseilligny et Mazevet, 2000).

La dépression post-activation du réflexe H serait due à une diminution du nombre de neurotransmetteurs libérés par les afférences précédemment activées (Hultborn et al., 1996). De plus, la dépression du réflexe H peut être augmentée en parallèle avec l'augmentation de la fréquence de stimulation. Cependant, cette dépression semble aussi être modulée par l'excitabilité motoneuronale (Li et al., 2004a), l'inhibition récurrente (Mazzocchio et Rossi, 1997), l'inhibition réciproque (Boorman et al., 1996; Crone et al., 2007), l'inhibition présynaptique des interneurones inhibiteurs Ia (Lloyd et Wilson, 1957; Kohn et al., 1997; Katz, 1999), par des voies descendantes des centres supérieurs agissant au niveau pré- et postsynaptique (Andersen et al., 1962; Jimenez et al., 1988; Rudomin, 1994; Boulenguez et al., 2010; Côté et al., 2014) et par les afférences du réflexe de flexion (Rémy-Néris et al., 1999). Cette dépression dépendante à la fréquence du réflexe H est largement étudiée chez les sujets présentant des spasmes ou des spasticités suite à des lésions du SNC (accident vasculaire cérébral, lésion de la moelle épinière)(Grey et al., 2008). La spasticité peut se définir comme étant une augmentation vitesse dépendante du tonus musculaire engendrée par une exagération du réflexe d'étirement, des spasmes et une hypersensibilité à des stimuli normalement anodins (Boulenguez et al., 2010).

Le réflexe H est une technique simple mais une multitude de paramètres détermine son amplitude. Il est donc indispensable d'être rigoureux dans la méthodologie afin de ne pas se tromper d'interprétation (Pierrot-Deseilligny et Mazevet, 2000; Zehr, 2002). (Figure n°10).



**Figure n°10** : La régulation de la boucle sensorimotrice. Représentation simplifiée de différents mécanismes spinaux influençant le réflexe H lors d'une stimulation du nerf tibial postérieur (PTN), nerf péronier commun (CPN) ou du nerf fémoral (FN) (d'après Lundbye-Jensen et Nielsen, 2008).

## IV. Les altérations neuromusculaires.

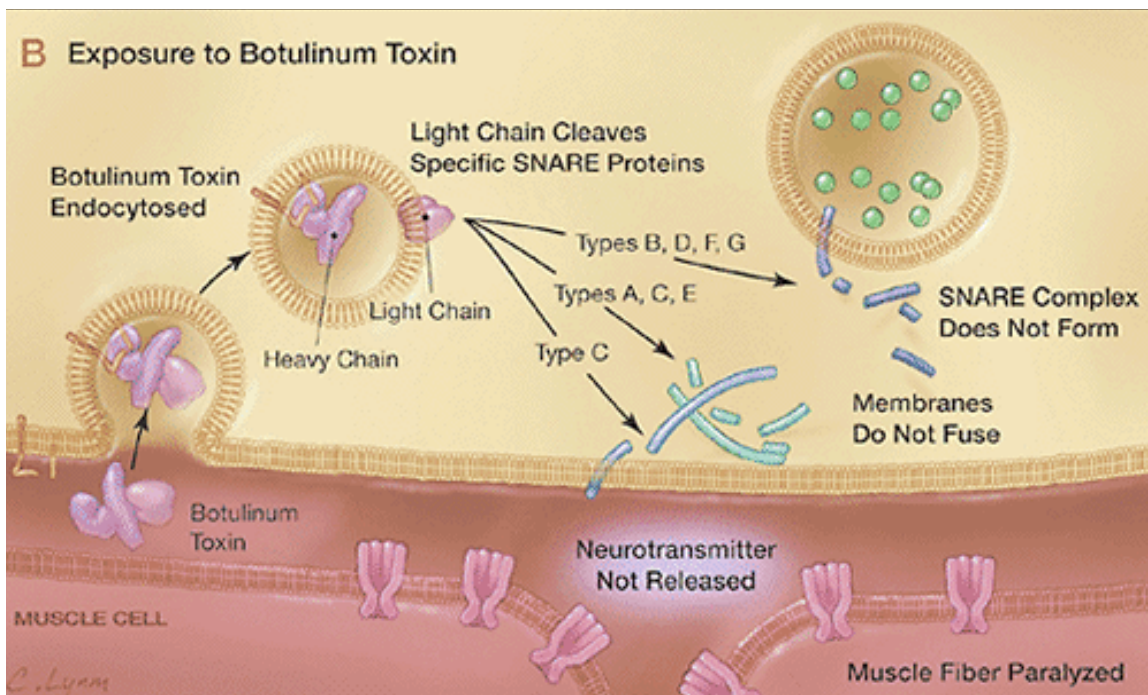
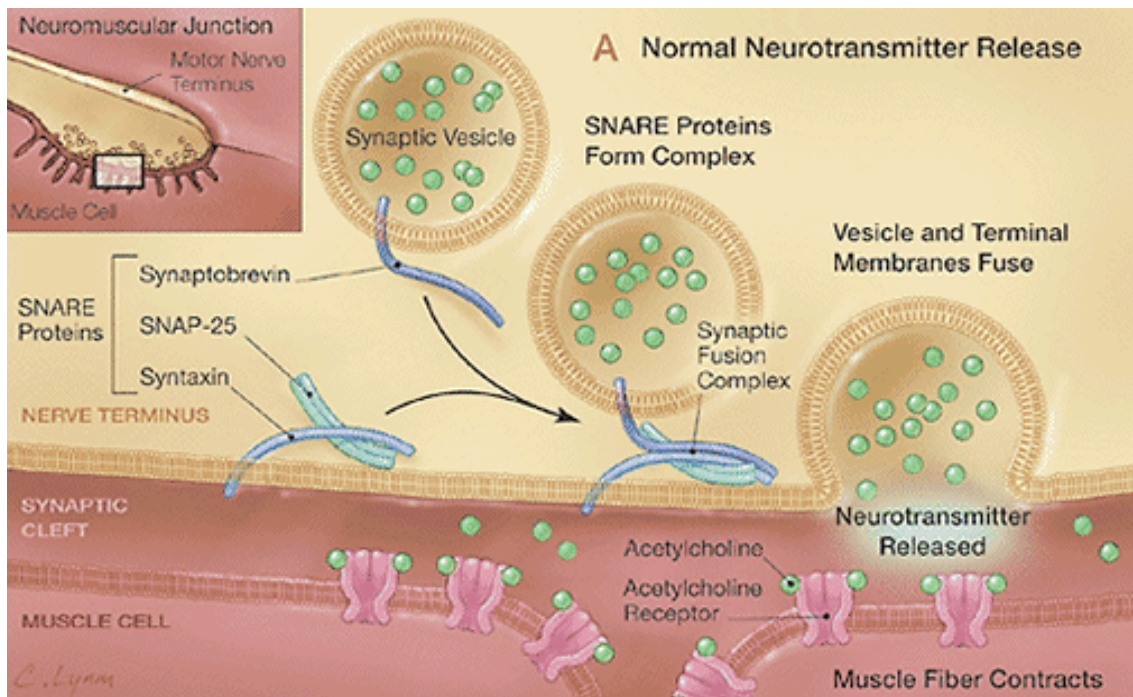
### 1. La dénervation chimique par la toxine botulique.

La toxine botulique (BoNT « *Botulinum Neurotoxin* ») est une neurotoxine produite par la bactérie anaérobie *Clostridium botulinum*. Cette toxine a été décrite comme étant responsable du botulisme qui entraîne une paralysie flasque de tous les muscles (van Ermengem, 1897). Cette paralysie est induite par inhibition de l'exocytose d'acétylcholine (ACh). La première expérimentation ayant permis de mettre en avant les propriétés relaxantes de la BoNT fut réalisée chez un singe par un ophtalmologiste sur un muscle extraoculaire pour traiter un strabisme (Scott, 1973, 1980). Au total, sept types de toxine botulique existent (notés de A à G) mais seules les toxines botuliques de types A (BoNT/A) et B (BoNT/B) sont utilisées en clinique (Rosetto et al., 2006). La BoNT/A est la plus toxique avec une dose létale 50 de 0,003 µg/kg.

Elle possède une masse moléculaire de 150 kDa et est composée de deux chaînes polypeptidiques, une lourde (100 kDa) et une légère (50 kDa), reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne légère est responsable de la fonction catalytique clivant la SNAP-25 après réduction du pont disulfure (Montecucco et al., 1996), tandis que la chaîne lourde est responsable de la fixation de la toxine sur la terminaison du neurone (sur sa partie COOH) et permet également l'entrée de la chaîne légère dans ce même neurone (sur sa partie NH<sub>2</sub>) (Lalli et al., 1999). L'entrée dans la cellule par endocytose n'est possible qu'après fixation sur un récepteur de type SV2 (*Synaptic Vesicle 2 protein*) (Dong et al., 2006b).

Une fois dans le cytosol du neurone, la toxine agit majoritairement au niveau du complexe SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*). Le SNARE a pour fonction de faire fusionner les vésicules avec la membrane plasmique du neurone. Il est composé de la synaptobrevine, la syntaxine et de la SNAP-25. Les BoNT/A et BoNT/E scindent la protéine SNAP-25 (*Synaptosomal-Associated Protein of 25kDa*), tandis que les BoNT/B, D, F et G scindent la synaptobrevine. La BoNT/C, quant à elles, vont couper la SNAP-25 mais aussi la syntaxine, ce qui leur confère un pouvoir cytotoxique qui les empêche d'être utilisée en clinique (Williamson et Neale, 1998; Zhao et al., 2010). Le complexe SNARE étant responsable de l'exocytose des vésicules contenant les neurotransmetteurs, l'action des différentes toxines va diminuer l'exocytose voire l'empêcher (Rizo et Sudhof, 2002). La BoNT/A coupant la protéine SNAP-25 présente au niveau de la jonction neuromusculaire a un rôle de puissant relaxant musculaire local et réversible (Hallett et al., 1994). (**Figure n°11**).





**Figure n°11** : La libération de neurotransmetteurs au niveau de la jonction neuromusculaire. A : Libération d'acétylcholine dans des conditions normales. B : En présence de toxine botulique (d'après Arnon et al., 2001).

### 1.1. Les effets de la BoNT/A sur les afférences musculaires.

Par le passé, les altérations centrales étaient associées seulement à de la plasticité spinale suite à la paralysie musculaire induite par la toxine (Priori et al., 1995; Giladi, 1997; Abbruzzese et Berardelli, 2006). Depuis, il a été montré que la toxine peut être transportée de manière rétrograde et antérograde par les neurones moteurs et sensoriels (Wiegand et al., 1976; Antonucci et al., 2008; Koizumi et al., 2014). Ce transport pourrait être étroitement lié aux mécanismes d'autophagocytose (Wang et al., 2015). Ainsi, de manière non exhaustive, les troubles du mouvement comme les dystonies, les spasticités ou encore les hyperhydroses, les strabismes, les douleurs neurogéniques et les rides du visage peuvent être soulagés temporairement avec des injections de BoNT, et principalement de BoNT/A (Lim et Seet, 2010).

La toxine empêche ainsi la contraction des fibres musculaires striées squelettiques mais aussi des fibres musculaires intrafusales (Rosales et al., 1996). Si les fibres musculaires intrafusales ne peuvent plus se contracter pour réguler la sensibilité des afférences fusoriales alors les afférences des FNM (Ia et II) auront une réponse diminuée après l'injection de la toxine, ce qui diminuera l'activation des motoneurones- $\alpha$  et l'inhibition du muscle antagoniste (Filippi et al., 1993; Priori et al., 1995). Des études utilisant la technique du réflexe H ont montré que les ondes M et l'onde H étaient diminuées simultanément (conservation du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$ ) après action de la BoNT/A, ce qui indique que l'excitabilité des motoneurones- $\alpha$  reste inchangée (Wiegand et Wellhoner, 1977; Phadke et al., 2013). De plus, les effets de la toxine sur les FNM (motoneurones- $\gamma$ ) semblent plus lents que sur les fibres musculaires extrafusales (motoneurones- $\alpha$ ) (Kim et al., 2006; Trompetto et al., 2006), et ceux au niveau du cerveau semblent encore plus lents, ce qui suggère un délai d'action plus important pour les structures centrales que pour les périphériques (Kim et al., 2006). Cependant, des études *in vitro* ont permis de vérifier que les neurones libéraient moins de glutamate (Purkiss et al., 1998), de SP (Purkiss et al., 2000; Welch et al., 2000; Verderio et al., 2007), de CGRP (Meng et al., 2007) et, dans une moindre mesure, de GABA (Verderio et al., 2007) en présence de BoNT/A. Les études *in vivo* ont, quant à elles, permis de confirmer le rôle analgésique de la BoNT/A (Jabbari, 2008) par inhibition de la libération de glutamate et de substance P (SP) au niveau central (Cui et al., 2004; Marinelli et al., 2010). Une diminution de l'inflammation neurogénique a également été observée suite à l'injection de BoNT/A responsable d'une diminution de la libération de SP et de CGRP au niveau périphérique (Cui et al., 2004; Lucioni et al., 2008; Carmichael et al., 2010). Toutefois, le rôle de la BoNT/A dans l'altération de la réponse des afférences métabosensibles de type III et IV n'a pas été précisé. C'est pour cette raison que la première partie de ce travail doctoral a consisté à étudier la réponse de ces afférences après une paralysie musculaire par la toxine botulique.

## 1.2. La récupération suite aux injections de BoNT/A.

Les effets de la BoNT/A apparaissent dans les 2 à 5 jours qui suivent les injections et durent environ 3 à 6 mois (Dressler et Rothwell, 2000). La durée des effets de la BoNT dépend du type de toxine (BoNT/A-G) et est d'autant plus longue que les volumes et les concentrations sont élevés. La récupération va dépendre de la vitesse de dégradation de la toxine dans le neurone, de la vitesse de renouvellement des complexes SNARE scindés, du bourgeonnement hétérotypique des axones atteints, du recrutement des neurones sains, et du retour à une masse musculaire normale (Keller, 2006). Toutefois, une forte concentration intracellulaire de calcium a la capacité de contrer la paralysie induite par le clivage des SNAP25 (Lawrence et al., 2002; Grumelli et al., 2010). Le fait que la concentration calcique augmente plus dans les neurones GABAergiques pourrait expliquer pourquoi ils sont moins sensibles à la BoNT/A que les autres neurones (Verderio et al., 2007; Grumelli et al. 2010).

Par ailleurs, il a été noté que la récupération fonctionnelle était biphasique (De Paiva et al., 1999). La première phase est due à la néosynaptogenèse faisant suite au bourgeonnement hétérotypique. Ce bourgeonnement par le neurone intoxiqué permet de réinnervier les fibres musculaires « dénervées ». Il a toutefois été montré que les néoaxones ne permettaient pas une compensation optimale de la fonction neuromusculaire car la densité des récepteurs cholinergiques postsynaptiques associés à ces nouvelles terminaisons axonales est divisée par trois par rapport à celle d'origine (Rogozhin et al., 2008). La deuxième phase est due à la récupération par renouvellement des complexes SNARE dans les axones originaux (Billante et al., 2002) qui entraînera une dégénérescence progressive des néoaxones quand les terminaisons synaptiques originelles retrouveront leurs fonctionnalités (De Paiva et al., 1999).

Enfin, il a été rapporté que la durée de la paralysie était variable selon le phénotype musculaire considéré. Chez la souris, le muscle *soleus* (muscle lent) retrouve ses propriétés contractiles normales quelques jours seulement après l'injection de la toxine botulique, alors que le muscle *gastrocnemius* (muscle plus rapide) récupère après plusieurs semaines (Duchen, 1971 a et b). De plus, les effets de la BoNT/A étant transitoires, il a été constaté que des injections répétées au cours du temps entraînaient une élévation des anticorps dirigés contre cette toxine et donc une diminution progressive de ses effets (Rogozhin et al., 2008).

La littérature ne reporte aucune donnée ni sur les altérations à long terme de la boucle sensorimotrice après une paralysie induite par la toxine botulique ni sur la disparition de ses effets (récupération). Est-ce que la paralysie temporaire altère durablement la réponse des

afférences musculaires et le fonctionnement de la boucle sensori-motrice ? Cette question fera l'objet de la deuxième étude de ce travail doctoral.

## **2. Le vieillissement.**

Le vieillissement représente la lente régression, non pathologique, de l'ensemble des fonctions vitales. Sa particularité est qu'il va atteindre progressivement tous les organes du corps humain. Chez l'Homme, de façon générale, il semblerait que cette régression commence à partir de l'âge de 30 ans. La perte moyenne annuelle de fonction est de moins de 0,5% pour les systèmes musculaire, nerveux, cardiovasculaire et les reins, de 0,7% pour les systèmes respiratoire, digestif et endocrinien et de plus de 1% pour les systèmes immunitaire, nerveux autonome et reproducteur (Sehl et Yates, 2001). Le vieillissement se définit également comme étant la perte progressive de plasticité (Cartee, 1994).

### **2.1. Le vieillissement neuromusculaire.**

La déficience observée au niveau du tissu musculaire strié squelettique augmente le risque de chute et entraîne une dépendance des personnes âgées qui aurait coûté environ 14 milliards d'euros au système social des USA rien que pour l'année 2000 (Janssen et al., 2004). Cette déficience se traduit par une perte de force qui serait imputable à une sarcopénie (perte de masse musculaire) ainsi qu'à un déficit des adaptations neurales (Enoka, 1997; Roos et al., 1997). Le processus de sarcopénie serait dû à une diminution du nombre des fibres musculaires de type I et II, ainsi qu'à une atrophie des fibres de type II (Lexell, 1988, 1995). Cette atrophie touche principalement les muscles posturaux (Holloszy et al., 1991). A ces modifications musculaires, s'ajoutent des altérations nerveuses. On note par exemple, une baisse de la vitesse de conduction ainsi que du nombre de motoneurones principalement de type rapide (Chase et al., 1985; Ansved et Larson, 1989; McComas, 1996). Ainsi, les motoneurones survivants devront se réorganiser pour innover davantage de cellules musculaires, ce qui va diminuer le nombre d'unités motrices et augmenter les poly-innervations (Oda, 1984; Stebbins et al., 1985). Cependant, cette réinnervation peut échouer et des fibres musculaires de type II ne seront plus innervées (Carmeli et Reznick, 1994; Vandervoort, 2002).

L'étude du rat est un bon modèle en gériatrie car il est considéré comme étant âgé à partir de l'âge de 2 ans environ (Cartee, 1994). Les tests comportementaux indiquent une diminution de leur sensori-motricité se manifestant par une altération de la motricité (Marshall, 1982; David-Jürgens et al., 2008). Il a également été rapporté une augmentation de la rigidité



musculaire (Nielsen et al., 1998) conduisant à une diminution de l'amplitude du mouvement (Gajdosik et al., 1999). Cette augmentation de la rigidité musculo-tendineuse pourrait participer à compenser la perte de sensibilité des FNM (Rosant et al., 2007).

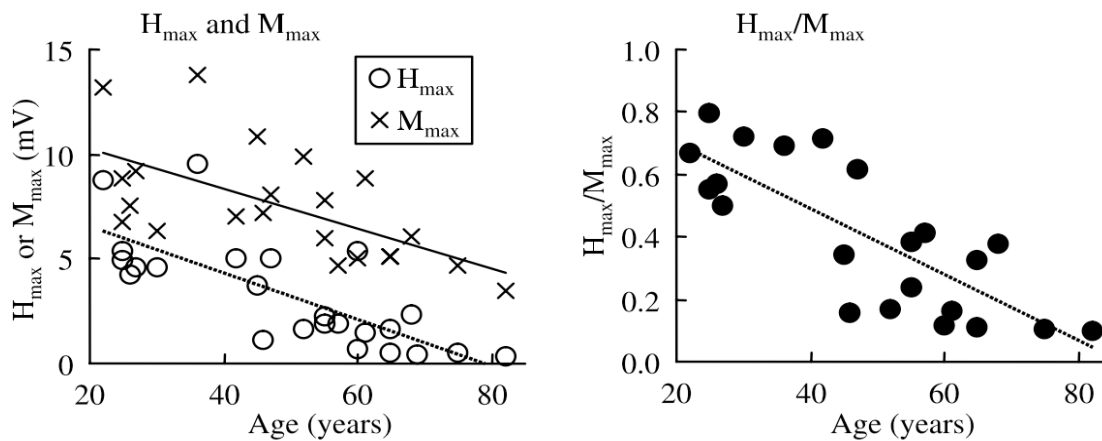
Au niveau des FNM, on observe une augmentation de l'épaisseur de la capsule (Miwa et al., 1995) ce qui conduit à une diminution de la déformation de celle-ci et donc de sa sensibilité. La diminution du nombre de fibres musculaires intrafusales peut aussi entraîner une diminution de la vitesse ou de la précision ainsi que de l'ajustement de la sensibilité des afférences fusoriales (Swash et Fox, 1972).

## **2.2. La modification de la propagation des messages afférents.**

Au cours du vieillissement, il a été montré que la fréquence de décharge des afférences originaires des FNM était diminuée lors d'une contraction dynamique (afférences de type Ia) mais pas statique (afférences de type II) (Miwa et al., 1995). La démyélinisation progressive avec l'avancée en âge serait responsable de la diminution de la vitesse de conduction des afférences (Ludatscher et al., 1985). Cependant, cette vitesse de conduction semble augmenter jusqu'à l'âge d'environ 600 jours chez le rat pour les afférences myélinisées et jusqu'à l'âge de 100 jours pour les non myélinisées. La diminution de la vitesse de conduction n'est observable pour les afférences myélinisées qu'à partir d'environ 700 jours chez le rat Wistar (Sato et al., 1985). Chez l'Homme une diminution de la vitesse de conduction d'environ 20% est observable dès l'âge de 50 ans (Lee et Oh, 1994). Ces changements au niveau de la conduction nerveuse seraient également responsables de l'altération de la réponse des FNM (Miwa et al., 1995).

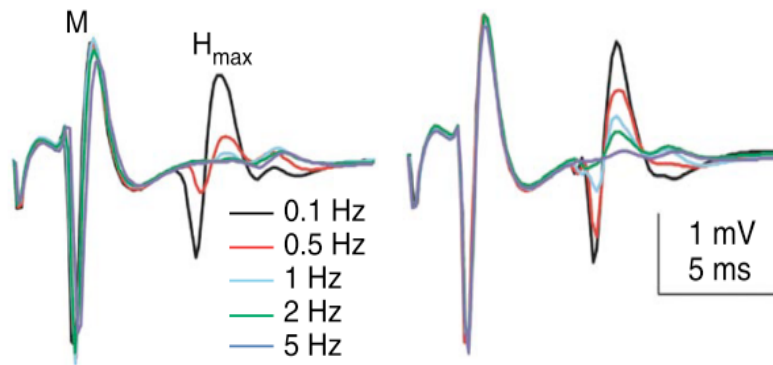
## **2.3. Les modifications de la boucle sensorimotrice.**

Il a été noté une diminution du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  au cours du vieillissement qui serait principalement due à une diminution de l'amplitude de l'onde H (Koceja et al., 1995; Scaglioni et al., 2002). (**Figure n°12**). Cette diminution du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  pourrait être attribuée à une diminution de la transmission entre les afférences Ia et les motoneurones- $\alpha$ , à une diminution de l'excitabilité motoneuronale ou à une augmentation des inhibitions présynaptiques (Schiappati, 1987; Morita et al., 1995; Koceja et Mynark, 2000b; Kido et al., 2004). Une augmentation de l'inhibition permettrait d'augmenter les influences des voies cortico-spinales dans le contrôle moteur, au détriment des informations afférentes chez la personne âgée (Baudry et al., 2014).



**Figure n°12** : La diminution du ratio  $H_{max}/M_{max}$  avec l'âge. Le tracé de gauche représente la diminution de l'amplitude des ondes  $M_{max}$  et  $H_{max}$  (mV) au cours de l'avancée en âge. Le tracé de droite représente la diminution du ratio  $H_{max}/M_{max}$  avec le vieillissement (extrait de Kido et al., 2004).

De plus, il a également été constaté une augmentation du tonus musculaire chez le rat âgé de plus de 12 mois qui pourrait s'apparenter à de la spasticité (Marshall, 1982) souvent associée à une diminution de la dépression post-activation (Nielsen et Hultborn, 1993; Nielsen et al., 1993; Grey et al., 2008). Toutefois, une étude récente chez l'Homme montre que cette dépression post-activation du réflexe H est conservée avec le vieillissement mais uniquement pour des fréquences de stimulation inférieures à 2 Hz (Trompetto et al., 2014). Cependant, aucune étude n'a été faite sur la dépression dépendante à la fréquence du réflexe H lors du vieillissement à des fréquences allant jusqu'à 10 Hz comme utilisées dans les protocoles de lésion de moelle épinière (Skinner et al., 1996; Boulenguez et al., 2010). (Figure n°13). C'est pour cette raison que l'évolution de la dépression dépendante à la fréquence lors du vieillissement fera l'objet d'une étude dans ce travail de thèse.

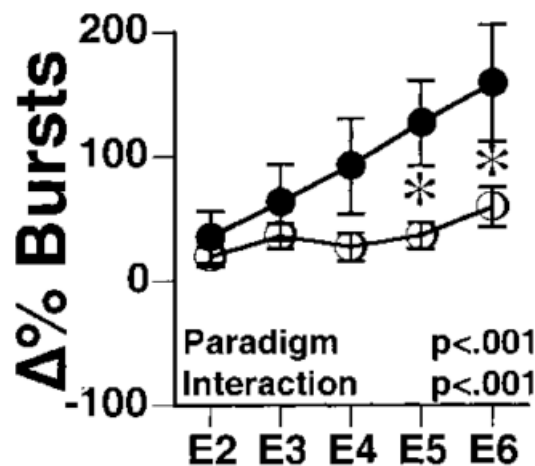


**Figure n°13 :** La dépression dépendante à la fréquence du réflexe H. Tracé de l'EMG représentant les ondes M<sub>max</sub> et H<sub>max</sub> en fonction de la fréquence de stimulation. À gauche un animal contrôlé et à droite un animal spastique qui a une diminution de la dépression liée à l'augmentation de la fréquence de stimulation (extrait de Boulenguez et al., 2010).

#### 2.4. Les afférences metabosensibles.

Les altérations de la masse, du phénotype et de la force musculaire sont à l'origine des modifications de l'EPR. En effet, il a été montré que la stimulation répétée à basse fréquence du muscle *gastrocnemius* induisait un changement phénotypique du muscle vers un phénotype plus lent et était associé à une diminution de l'EPR (Wilson et al., 1995). De plus, la typologie musculaire semble jouer un rôle dans l'amplitude de l'EPR car les muscles rapides (*gastrocnemius*) ont une amplitude de réponse plus importante que les muscles lents (*soleus*) (Petrofsky et Lind, 1980; Petrofsky et al., 1981; Iwamoto et Botterman, 1985). Ces résultats suggèrent que pour un muscle rapide dont l'amplitude de l'EPR est importante la réponse des afférences de type III et IV est importante. Ainsi, plus un muscle a une masse importante, un phénotype de type rapide et une force musculaire importante, plus l'activation du système nerveux sympathique par l'EPR est importante (Smith et al., 2014). Cependant, l'influence des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles sur la réponse des afférences metabosensibles n'a jamais été étudiée. C'est pour cela qu'une troisième étude s'intéressera à la réponse des afférences III et IV sur les muscles *tibialis anterior* (rapide), *gastrocnemius* (intermédiaire) et *soleus* (lent).

Toutefois, d'autres auteurs étudiant l'activité nerveuse sympathique musculaire (MSNA « Muscle Sympathetic Nerve Activity ») et la pression sanguine lors d'une ischémie post-exercice montrèrent que le vieillissement était associé soit à une diminution de l'EPR (Markel et al., 2003; Houssiere et al., 2006) soit à son maintien (Ng et al., 1994; Greaney et al., 2013)(Figure n°14).



**Figure n°14 :** L'effet de l'augmentation de l'ischémie sur la MSNA. Les cercles pleins représentent les sujets jeunes tandis que les cercles vides représentent les sujets âgés. Les sujets âgés ont une augmentation de la MSNA qui est inférieure aux jeunes (extrait de Markel et al., 2003).

Les différences pourraient s'expliquer par le fait qu'au repos une personne âgée a une MSNA plus élevée (Ng et al., 1993; Jones et al., 2001). De ce fait, la variation de l'EPR sera minimisée lors de l'ischémie. Une autre possibilité réside dans le fait que l'exercice utilisé lors de l'ischémie était soit rythmique (Markel et al., 2003) soit au contraire statique (Ng et al., 1994; Houssiere et al., 2006; Greaney et al., 2013). Pour finir, certaines études comportaient des participants de sexes différents (Markel et al., 2003; Houssiere et al., 2006). Étant donné qu'il a été montré que les femmes ont une MSNA inférieure par rapport aux hommes (Ettinger et al., 1996; Jarvis et al., 2011), l'inclusion de femmes et en plus grand nombre dans les groupes âgés de ces études pourrait expliquer la diminution de la variation de la MSNA observée. Toutefois, il faut garder à l'esprit que certaines pathologies cardiovasculaires peuvent également apparaître au cours du vieillissement et peuvent influencer l'EPR. Par exemple, une augmentation de l'EPR est observée chez les sujets hypertendus (Delaney et al., 2010).

Afin de combler les lacunes de la littérature, nous avons étudié, chez le rat, l'évolution de la réponse des afférences metabosensibles de type III et IV de différents muscles au cours du vieillissement.

## 2.5. Le rôle de l'activité physique sur le vieillissement neuromusculaire.

Dans la mesure où l'activité physique conditionne la typologie musculaire, la masse musculaire, et indirectement l'activité motoneuronale (Pette et Vrbova, 1999; Lomo 2003), il est indispensable de considérer la sédentarité comme étant un paramètre aggravant du vieillissement. Il a été effectivement noté une diminution de l'activité volontaire chez l'Homme (Yu et al.,

1985) et l'animal avec le vieillissement (Fitts et al., 1975; Brown et al., 1989; Gulve et al., 1993). Il est donc important de dissocier les altérations dues au vieillissement de celles dues à la sédentarité. L'inactivité est connue pour entraîner une diminution de la masse musculaire, et ce principalement pour les muscles antigravitaires lents et les muscles extenseurs (Fitts et al., 1986; Tischler et al., 1993). À cette atrophie, s'ajoutent aussi les changements de phénotype musculaire (oxydatif vers glycolytique) (Martin et al., 1988). De plus, il a été noté que la diminution de la masse musculaire liée à la sédentarité pouvait engendrer une augmentation de la masse graisseuse, une diminution de l'activité mitochondriale et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Lanza et Nair, 2009).

La pratique d'une activité physique est donc un moyen efficace pour contrecarrer les effets de la sédentarité mais cette capacité diminue avec l'avancée en âge (Cartee, 1994). Cependant, les adaptations sont spécifiques au type d'exercice pratiqué (force, endurance ou fractionné). En effet, il a été montré que le travail en force permet une hypertrophie supérieure au travail en endurance alors que celui en endurance serait plus efficace en vue d'améliorer principalement les capacités oxydatives musculaires et le système cardio-vasculaire (Cartee et Farrar, 1988; Cartee, 1994; Vandervoort, 2002) tandis que le travail intermittent améliorerait à la fois la force et les capacités oxydatives (Bogdanis, 2012).

Plus précisément, l'entraînement en endurance à partir de l'âge de 3 mois, sur un modèle murin, a été montré comme étant un facteur s'opposant à la dénervation des muscles *soleus* et *extensor digitorum longus* (EDL) à l'âge de 25 mois (Rosenheimer, 1985). Chez le rat, l'entraînement débuté à l'âge de 21 mois stimule la croissance axonale des motoneurons innervant le muscle *soleus* mais pas le muscle *gastrocnemius*, ce qui entraîne une atrophie plus importante pour le muscle *soleus* que le muscle *gastrocnemius* (Stebbins et al., 1985). De plus, un entraînement à une intensité suffisamment importante pour utiliser principalement du glycogène (environ 75% VO<sub>2</sub>max) induirait une amélioration de la masse musculaire, de la tolérance au glucose, une augmentation de l'oxydation des lipides par rapport aux glucides et retarderait l'apparition de la fatigue musculaire (Cartee et Farrar, 1988; Pasini et al., 2012). Ces changements sont corrélés à une meilleure capacité oxydative du muscle (Fitts et al., 1975).

Enfin, une étude de Kamiya et de ses collaborateurs a démontré que l'inactivité diminuait l'EPR évoqué lors d'un exercice isométrique (Kamiya et al., 2004). Cette diminution est plus prononcée pour les muscles antigravitaires que pour les muscles des membres supérieurs. Les auteurs suggèrent que la diminution de ce réflexe pourrait être attribuée soit à une atrophie musculaire, soit à une diminution de la densité des capillaires, soit à une diminution de la sensibilité ou du nombre de récepteurs des afférences de type III et IV. Ainsi, il nous a paru

intéressant de vérifier si la pratique régulière d'une activité physique contrecarrant les altérations de la masse, du changement de phénotype et de la force musculaire se produisant au cours du vieillissement pouvait modifier la réponse des afférences de type III et IV à l'origine de l'EPR.

Une dernière partie de ce travail doctoral a donc consisté à compléter l'étude de la réponse des afférences de type III et IV chez des rats vieillissants avec un entraînement incrémenté sur tapis roulant.

Historiquement, pour évaluer les effets de la pratique d'une activité physique sur la boucle sensorimotrice, le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  a été comparé entre des sujets sportifs de haut niveau de différentes disciplines. Ainsi, il a été montré que les coureurs d'endurance ont un ratio supérieur aux sprinteurs (Rochcongar et al., 1979) et aux sédentaires (Le Bars, 1976) mais que les sprinteurs et les volleyeurs ont un ratio inférieur aux sédentaires (Casabona et al., 1990). Chez des sujets âgés de 19 à 23 ans, il a également été noté une augmentation du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  après un entraînement d'endurance (Perot et al., 1991). Comme décrit précédemment, dans la mesure où le vieillissement est associé à une diminution du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  (Koceja et al., 1995; Scaglioni et al., 2002), il serait intéressant d'étudier les effets de la pratique d'une activité physique chez des sujets vieillissants. Une étude a démontré que la pratique d'une activité physique basée sur la force à un âge avancé ne modifiait pas le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  (Scaglioni et al., 2002). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a démontré les effets d'un entraînement de type endurant sur ce ratio. C'est dans ce sens que l'étude de la dépression dépendante à la fréquence du réflexe H lors du vieillissement a été complétée avec un entraînement incrémenté sur tapis roulant.

# **Matériel et Méthodes**

Ce travail, composé de 5 études, a nécessité d'utiliser 104 rats Sprague Dawley (SD) du centre d'élevage Janvier S.A (France). Les animaux ont été hébergés, opérés, anesthésiés et évalués en accord avec les principes de la loi Française et Européenne sur la protection des animaux, utilisant un protocole approuvé par le comité de protection des animaux d'Aix-Marseille Université (AMU) et du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Tous les efforts ont été faits pour minimiser les souffrances animales et pour utiliser un nombre minimum d'animaux pour produire des données scientifiques fiables, reproductibles et valorisables au sein de publications scientifiques.

## I. Études 1 et 2.

L'étude 1 a consisté à comparer 2 groupes d'animaux :

- le groupe contrôle (n=7) qui n'a subi aucune intervention.
- le groupe BoNT/A ou B0 (n=10) qui a reçu une dose de 15 U/kg de BoNT/A dans le muscle *gastrocnemius* gauche afin d'entraîner sa paralysie totale (SFI = -100).

L'étude 2 a consisté à comparer les 2 groupes expérimentaux initiaux à 2 autres groupes expérimentaux différenciés par le degré de récupération fonctionnel des animaux :

- le groupe B50 (n=7) ayant reçu une dose de 15 U/kg de BoNT/A dans le muscle *gastrocnemius* gauche et dont une récupération partielle a été observée (SFI=-47,47±0,57).
- le groupe B100 (n=5) ayant reçu une dose de 15 U/kg de BoNT/A dans le muscle *gastrocnemius* gauche et dont une récupération totale a été observée (SFI=-18,78±3,23).

### 1. Les injections de toxine botulique.

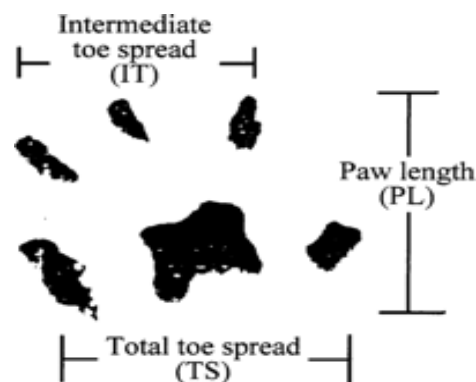
La BoNT/A est commercialisée sous les noms de Botox® (Allergan, Inc., Irvine, CA, USA), Dysport® (Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, France), Xeomin® (Merz Pharma, Francfort, Allemagne), BTXA (Lanzhou Institute of Biological Products, Lanzhou, Chine) et Neuronox® (Medy-Tox Inc., Séoul, Corée du Sud). Une unité de Botox® est équivalente à une unité de Xeomin® ou à trois unités de Dysport® (Pickett et Hambleton, 1994; Marion et al., 1995; Ranoux et al., 2002). Les animaux ayant reçu des injections de BoNT/A (Dysport 500®, Beaufour Ipsen Pharma) ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de choral hydrate



(0,5g/kg). De la BoNT/A lyophilisée a été reconstituée pour obtenir une solution ayant une concentration de 15 U/mL. Après désinfection et incision de la peau, cette solution de BoNT/A a été injectée dans les parties inférieures et supérieures des deux chefs musculaires du muscle *gastrocnemius* du membre inférieur gauche. Le muscle *gastrocnemius* droit a été laissé intact. Chaque animal s'est vu injecter une quantité totale de 15 U/kg connue pour entraîner une paralysie totale du muscle (Holds et al., 1990; Hott et al., 1998; Billante et al., 2002; Legerlotz et al., 2009). La peau a ensuite été refermée avec du fil de suture (Ethilon<sup>®</sup> 4/0) et abondamment désinfectée. Les animaux ont été placés dans une cage individuelle avec de la nourriture et de l'eau à volonté.

## 2. Analyse de la récupération fonctionnelle.

Les déficits locomoteurs ont été évalués par mesure de l'Index Fonctionnel du nerf Sciatique (SFI « *Sciatic Functional Index* ») (De Medinaceli et al., 1982). Ce test consiste à imprégner d'encre les pattes postérieures de l'animal et de le laisser marcher sur une bande de papier blanc placée dans un couloir de verre de 10 cm de largeur et de 150 cm de long. Afin d'orienter le sens du déplacement, une boîte a été placée à une extrémité du couloir et une forte source lumineuse à l'autre extrémité. Après une phase d'habituation, les animaux sont testés une fois par semaine pendant 12 semaines. Les paramètres relevés sur les empreintes sont : la distance entre le calcanéum et le 3<sup>ème</sup> orteil (PL), la distance entre le 1<sup>er</sup> et le 5<sup>ème</sup> orteil (TS) et la distance entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> orteil (IT), du côté normal (n) et du côté expérimental (e). Les mesures sont réalisées sur quatre empreintes et moyennées (Figure n°15).



**Figure n°15 :** L'index fonctionnel du nerf sciatique. Représentation d'une empreinte de rat et des paramètres relevés pour calculer le SFI.

L'index fonctionnel du nerf sciatique (Varajao et al., 2001; Bain et al., 1989) est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$SFI = -\frac{38,3(ePL - nPL)}{nPL} + \frac{109,5(eTS - nTS)}{nTS} + \frac{13,3(eIT - nIT)}{nIT} - 8,8$$

Le résultat est compris entre -100 et 0 et renseigne directement sur le degré de fonctionnalité motrice de l'animal (-100 pour un animal dont la locomotion est fortement altérée, et 0 pour une locomotion normale). Toutefois, quand le résultat calculé est inférieur à -100 ou supérieur à 0, la valeur est respectivement ramenée à -100 ou 0.

### **3. Préparation aux enregistrements électrophysiologiques.**

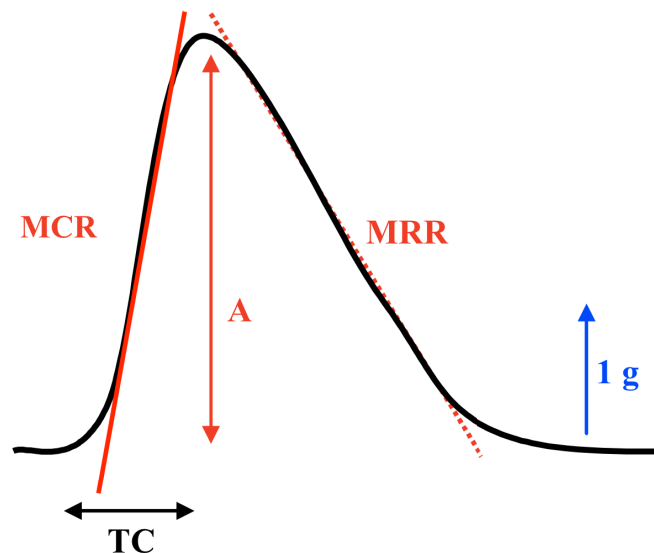
Les rats ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'uréthane (i.p. 1,1 g/kg). Une injection d'atropine (i.p. 1 ml/kg) a été réalisée afin de réduire les sécrétions qui peuvent être potentiellement obstructives dans les voies aériennes. La trachée a été canulée pour éventuellement enregistrer les variations de fréquence ventilatoire. L'artère poplitée contralatérale au muscle étudié a également été canulée afin d'y injecter les solutions stimulant les afférences métabosensibles dans les études 1 et 2. Des incisions cutanées et musculaires au niveau de la patte postérieure gauche ont permis d'accéder au nerf sciatique. Le nerf tibial (innervant le muscle *gastrocnemius*) a été dégagé des tissus avoisinants et immergé dans de l'huile de paraffine. La patte de l'animal a été solidement fixée à un support horizontal afin d'éviter tout mouvement au cours des stimulations électriques musculaires ou nerveuses. Afin de mesurer la force de contraction, l'extrémité distale du tendon distal a été attachée à une jauge de contrainte isométrique (Microdynamomètre, Ugo Basile). La température centrale de l'animal a été maintenue entre 36 et 38°C à l'aide d'une couverture chauffante asservie à une sonde thermique rectale.

### **4. Les enregistrements électrophysiologiques.**

#### **4.1. La secousse musculaire élémentaire.**

La secousse musculaire élémentaire (« *Twitch* », en anglais) a été obtenue en stimulant le nerf étudié à l'aide de deux électrodes en tungstène. Cependant, aucune réponse ne pouvant être

observée pour le groupe entièrement paralysé par la toxine botulique lors de la stimulation nerveuse, une stimulation directe du muscle, par insertion d'une paire d'électrodes intramusculaires, a été également réalisée pour évaluer les propriétés contractiles des muscles étudiés. La stimulation électrique consistait en un simple choc (durée : 0,1 ms ; fréquence : 0,5 Hz) dont le voltage a été augmenté afin d'obtenir l'amplitude de la secousse musculaire élémentaire la plus grande. Ce choc a été délivré par un stimulateur (Grass® S8800). L'analyse du mécanogramme numérisé par le logiciel Aqcknowledge® a été réalisée en terme d'amplitude maximale (A), de vitesse maximale de la relaxation (MRR « *Maximal Relaxation Rate* ») et de vitesse maximale de contraction (MCR « *Maximal Contraction Rate* ») définis respectivement comme la tangente de la pente maximale au cours de la relaxation et de la contraction (**Figure n°16**).



**Figure n°16** : La secousse musculaire élémentaire. TC : temps de contraction. A : Amplitude, MRR : Vitesse Maximale de Relaxation. MCR : Vitesse Maximale de Contraction

La MRR a été ensuite divisée par l'amplitude maximale (MRR/A) de la secousse musculaire afin de normaliser les valeurs. Le temps de contraction (TC) a été mesuré entre le début de la réponse mécanique, et le maximum de l'amplitude atteinte lors de cette secousse.

#### 4.2. Le seuil tétanique.

Des trains de courant rectangulaire (durée : 0,1 ms) dont la fréquence a été incrémentée par des paliers de 5 Hz ont été utilisés afin d'atteindre une contraction tétanique du muscle étudié

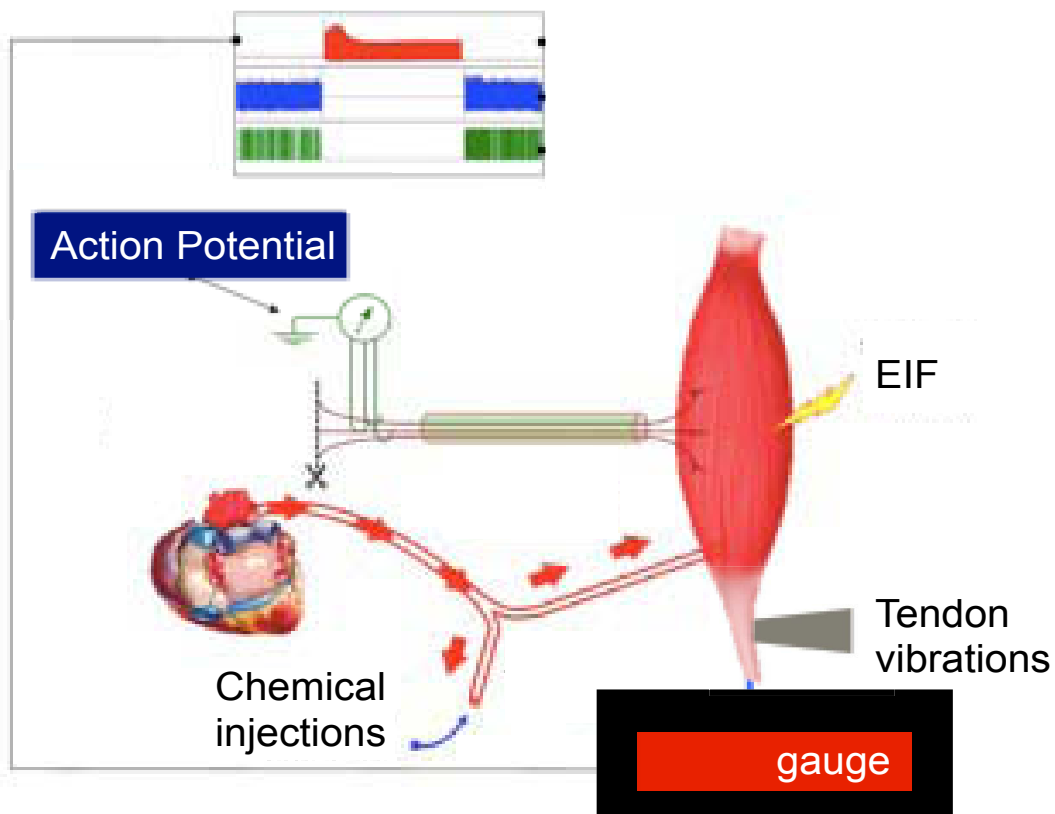
(le tétanos parfait étant le critère retenu ici). Le voltage utilisé lors de ce test correspondait à 120% du seuil obtenu lors de la détermination de la secousse musculaire élémentaire.

### **4.3. Enregistrement des fibres afférentes.**

Après section du nerf pour éliminer les informations efférentes descendantes, la partie distale a été placée sur une paire d'électrode en tungstène et plongée dans un bain de paraffine. L'activité électrique extracellulaire des fibres nerveuses afférentes a ainsi été enregistrée. Le signal a été amplifié, filtré (passe-bas à 3000 Hz), envoyé sur un intégrateur à fuite (RC=50 ms) et un discriminateur de potentiels d'action à deux voies (P2MP<sup>®</sup>). Un oscilloscope analogique (Tektronix<sup>®</sup> 2225) a servi à visualiser et à contrôler en permanence les activités unitaires enregistrées ainsi qu'à positionner les seuils haut et bas du discriminateur et du compteur de potentiels d'action. Un oscilloscope numérique à mémoire 2 voies (Gould<sup>®</sup>, DSO 1602) a permis l'affichage des différents signaux qui ont été numérisés par un convertisseur analogique digital (système d'acquisition Biopack<sup>®</sup>) sur un ordinateur pour un traitement différé.

#### **4.3.1. Les afférences mécanosensibles.**

Afin d'activer les afférences golgiennes et fusoriales (Ia, Ib et II), l'extrémité d'un vibreur a été placée au contact du tendon distal du muscle étudié. Des vibrations de 10 à 100 Hz ont été appliquées pendant une période de 5 secondes et incrémentées par paliers de 10 Hz après 5 secondes de repos entre chaque train de vibrations (**Figure n°17**).



**Figure n°17** : Dispositif expérimental de l'enregistrement des afférences musculaires métabosensibles et mécanosensibles. Représentation schématique du protocole d'enregistrement des afférences mécanosensibles lors des vibrations tendineuses et des afférences métabosensibles lors des injections intra-artérielles de métabolites et de la FIE. La force  $y$  est enregistrée avec une jauge de force (en rouge sur le tracé) et l'activité nerveuse avec des électrodes sur lesquels le nerf est placé (activité brute sur le tracé bleu et discriminée en vert).

#### 4.3.2. Les afférences métabosensibles.

Les afférences métabosensibles de type III et IV ont été examinées après des injections intra-artérielles de substances considérées comme étant des produits du métabolisme anaérobie musculaire et/ou libérées lors de la contraction musculaire. Les substances utilisées au cours de cette étude ont été le chlorure de potassium (KCl - 0,5 ml : à 1, 5, 10 et 20 mM) et l'acide lactique (AL - 0,1 ml : à 0,5, 1, 2 et 3 mM). Les injections ont été réalisées par le cathéter inséré de façon rétrograde dans l'artère fémorale contralatérale de telle manière à ce que le débit sanguin ipsilatéral au muscle étudié ne soit pas interrompu. Les substances injectées remontent ainsi jusqu'à la bifurcation de l'aorte abdominale, redescendent du côté ipsilatéral étudié et sont dissipées en suivant la diffusion sanguine naturelle vers les muscles d'intérêt. L'activité des fibres afférentes a été enregistrée avant, pendant et 3 minutes après chaque injection. Les injections ont été randomisées. Les courbes doses-réponses du KCl ou de l'AL peuvent être ainsi réalisées. Dix minutes de repos ont été laissées entre chaque injection. Ces substances et ces

concentrations ont été choisies car la contraction musculaire entraîne une augmentation de leur concentration de l'ordre de celles que l'on retrouve après les injections (Decherchi et al., 1998).

Deux électrodes en tungstène placées dans le muscle ont également été utilisées pour induire électriquement une fatigue musculaire à basse fréquence (Fatigue Induite Electriquement : FIE). Le courant appliqué était de forme rectangulaire, d'amplitude et de fréquence constantes (choc de 0,1 ms ; fréquence : 10 Hz ; trains de 500 ms séparées par 0,5 s de repos). Ce courant a été délivré pendant 3 minutes. Le voltage supramaximal utilisé correspond à 120% du seuil obtenu lors de la détermination de la secousse élémentaire. La fatigue a été objectivée par la diminution de force entre le début et la fin des stimulations. En parallèle, les afférences métabosensibles ont également été enregistrées en utilisant la même méthode pour les injections (Darques et Jammes, 1997; Darques et al., 1998)(Figure n°17).

### **5. Euthanasie et prélèvements tissulaires.**

À la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés par une injection létale d'anesthésique (3 ml à 0,6 g/kg de Pentobarbital sodique) et les muscles ont été prélevés et pesés pour évaluer l'atrophie musculaire du côté expérimental.

## **II. Étude 3.**

L'étude 3 a consisté à comparer 3 muscles aux propriétés différentes :

- le muscle *gastrocnemius* (n=7).
- le muscle *soleus* (n=12).
- le muscle *tibialis anterior* (n=12).

### **1. Préparation à l'électrophysiologie.**

La préparation à l'électrophysiologie reprend rigoureusement les mêmes procédures que celles décrites pour les études 1 et 2. Les branches nerveuses innervant les muscles *soleus*, *tibialis anterior* et *gastrocnemius*) ont été dégagés des tissus avoisinants.

## **2. Enregistrement des fibres afférentes métabosensibles.**

Après section des nerfs pour éliminer les informations efférentes descendantes, la partie distale a été placée sur une paire d'électrode en tungstène et plongée dans un bain de paraffine. L'activité électrique extracellulaire des afférences métabosensibles de type III et IV a été examinée après une FIE et des injections intra-artérielles de KCl et d'AL. La procédure et les concentrations des substances injectées sont rigoureusement les mêmes que pour les études précédentes, ainsi que pour la FIE. Cependant, les enregistrements des afférences musculaires ont été réalisés simultanée lors des injections. Les stimulations électriques de la FIE ont, quant à elles, été faites aléatoirement sur chacun des muscles étudiés.

## **3. Euthanasie et prélèvements tissulaires.**

À la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés par une injection intra-artérielle d'anesthésique surdosé (3 ml à 0,6 g/kg de Pentobarbital sodique).

## **III. Études 4 et 5.**

Les études 4 et 5 ont consisté à comparer plusieurs groupes d'animaux d'âges différents, sédentaires ou actifs :

- le groupe 3M (animaux âgés de 3 mois),
- le groupe 6M (animaux âgés de 6 mois),
- le groupe 12M (animaux âgés de 12 mois),
- le groupe 12M-EXE (animaux âgés de 12 mois ayant réalisé un exercice quotidien sur tapis roulant entre le 10<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> mois),
- le groupe 20M (animaux âgés de 20 mois),
- le groupe 20M-EXE (animaux âgés de 20 mois ayant réalisé un exercice quotidien sur tapis roulant entre le 18<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> mois).

### **1. Le vieillissement et l'exercice physique.**

Les animaux ayant été inclus dans le protocole sur le vieillissement et l'exercice physique ont vieilli en laboratoire. Ils ont été achetés à l'âge de 2 mois (250-300 g) et ont été hébergés et nourris jusqu'à l'âge souhaité.

L'activité physique a été imposée sur un tapis roulant afin de maîtriser la durée et l'intensité. Le protocole expérimental que nous avons choisi est inspiré de celui de Pasini et al. (Pasini et al., 2012) qui a démontré que la pratique de la course sur tapis roulant à un âge avancé permettait un gain de masse musculaire et d'activité du métabolisme oxydatif. Toutefois, quelques modifications au niveau des vitesses de course ont été apportées afin que nos animaux atteignant l'âge de 20 mois puissent suivre le protocole dans son intégralité. Ainsi, chez nos animaux de 18 mois, après une vitesse initiale de 13,5 m/min correspondant à environ 75 % de la  $VO_2max$ , une augmentation progressive a été imposée pour atteindre 18 m/min à la 8<sup>ème</sup> semaines d'entraînement (Cartee et Farrar, 1988). Après une phase de familiarisation, les animaux ont été entraînés pendant 8 semaines à raison de 3 séances par semaine. Au début du protocole, les animaux couraient 10 min à chaque séance, puis la durée a été augmentée pour atteindre 60 min à la fin du protocole. Les animaux ont été enregistrés dans les 48h suivant la dernière session (**Tableau n°02**).

Semaine	Durée	Vitesse
Habituation	0-10 min	0-13,5 m/min
1 <sup>ère</sup> semaine	10 min	13,5 m/min
2 <sup>ème</sup> semaine	20 min	13,5 m/min
3 <sup>ème</sup> semaine	30 min	13,5 m/min
4 <sup>ème</sup> semaine	40 min	14 m/min
5 <sup>ème</sup> semaine	50 min	15 m/min
6 <sup>ème</sup> semaine	60 min	16 m/min
7 <sup>ème</sup> semaine	60 min	17 m/min
8 <sup>ème</sup> semaine	60 min	18 m/min

**Tableau n°02** : Le protocole de course sur tapis roulant. Activité réalisée par les rats de 10 mois et 18 mois avant d'être enregistrés respectivement à 12 mois et 20 mois.

## 2. Préparation à l'électrophysiologie.

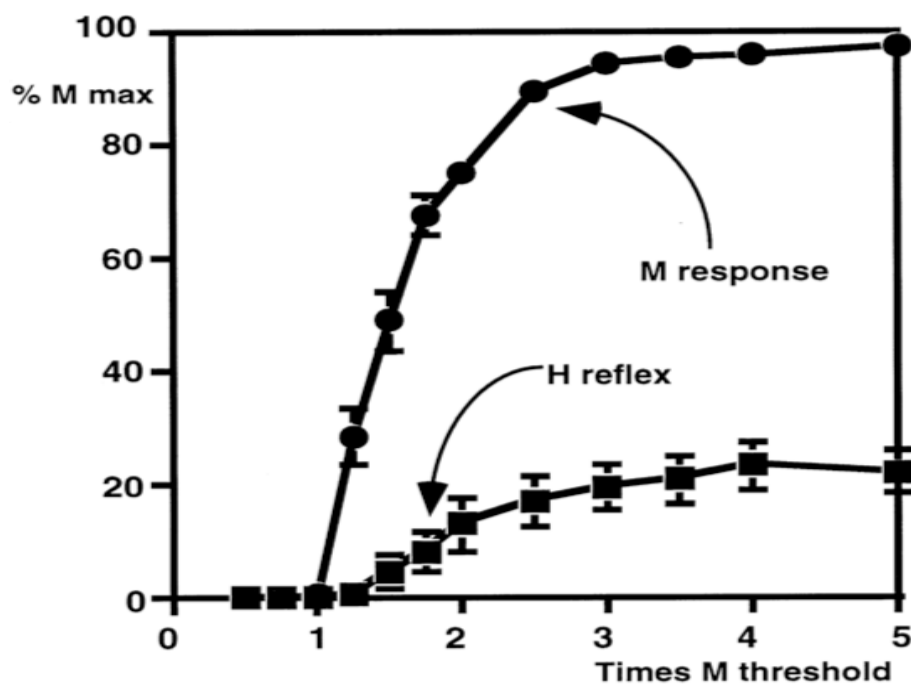
La préparation à l'électrophysiologie reprend rigoureusement les mêmes procédures que la 3<sup>ème</sup> étude. Le nerf tibial (innervant le muscle *soleus*) et le nerf péronier commun (innervant le muscle *tibialis anterior*) ont été dégagés des tissus avoisinants et immergés dans de l'huile de paraffine.

### 2.1. Le réflexe H et l'onde M.

Une paire d'électrodes reliée à un stimulateur Grass® S88 (Astro-Med, Inc.) a été placée sur le nerf pour sa stimulation (durée de 0,1 ms). Une autre paire d'électrodes a été placée sur le muscle associé au nerf stimulé pour l'enregistrement EMG. Une électrode de référence a été



placée sur un muscle à proximité. Les tissus exposés par la préparation chirurgicale étaient recouverts d'huile de paraffine afin de prévenir tout dessèchement. Les signaux enregistrés ont été amplifiés (P2MP®, 5104B), filtrés par un passe bande entre 0,1 et 10 KHz, visualisés sur un oscilloscope et envoyés vers un convertisseur A/D pour être enregistrés et traités avec un logiciel d'acquisition de données (Biopac MP150® et AcqKnowledge®). Les stimulations nerveuses ont produit deux réponses EMG. Une première onde, l'onde M, qui est l'activation directe des axones moteurs. Une deuxième onde, le réflexe H qui correspond à l'activation des afférences de gros diamètre qui font synapse avec les motoneurones- $\alpha$  du même muscle (*cf. partie introduction*). Les amplitudes des deux ondes ont été relevées et la stimulation a été augmentée progressivement afin d'obtenir des ondes M et H maximales et stables. À faible intensité, seule l'onde M était visible, puis l'onde H apparaissait quand le voltage était augmenté. Quand l'onde H était maximale, l'onde M l'était déjà (**Figure n°18**), ce qui nous a permis de calculer le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$ .



**Figure n°18** : Moyenne des courbes de recrutement des réflexes H et réponses M. Les données sont exprimées en % de la réponse  $M_{\max}$  et obtenues en fonction de l'intensité de stimulation (exprimée en intensité minimum nécessaire pour évoquer M) (extrait de [Gozariu et al., 1998](#)).

La dépression de l'onde H avec l'augmentation de la fréquence de stimulation a été étudiée dans l'étude sur le vieillissement et l'activité physique. Le protocole utilisé est inspiré de travaux précédents dans lesquels la récupération post-traumatiques suite à un protocole d'activité physique était étudiée ([Thompson et al., 1992](#); [Skinner et al., 1996](#); [Lee et al., 2005](#); [Reese et al.,](#)

2006). Il consiste à étudier la dépression post-activation (Macgladery et McDougal, 1950) qui est une diminution de la réponse à la suite d'une stimulation répétitive dont les chocs ne sont pas suffisamment espacés dans le temps avec la stimulation qui la précède. Comme nous l'avons précédemment décrit dans l'introduction, il est admis qu'un délai d'environ 3 s représente un compromis convenable pour limiter ce phénomène tout en permettant d'obtenir suffisamment de réflexes pour faire face à sa grande variabilité (Pierrot-Deseilligny et Mazevet, 2000). Ainsi quinze réponses à des stimulations délivrées à une fréquence de 0,3 Hz ont été enregistrées, et seulement les dix dernières ont été analysées afin de permettre aux ondes de se stabiliser. Par la suite, quinze autres réponses à des stimulations de fréquences 1, 5 et 10 Hz ont été enregistrées avec 5 min de repos entre chaque train de stimulations aux différentes fréquences. L'intensité de la stimulation a été la même pour toutes les fréquences et correspondait à l'intensité minimale permettant d'obtenir une onde H maximale ( $H_{\max}$ ). À la fin du protocole, une série de stimulations à 0,3 Hz a été de nouveau effectuée pour vérifier la reproductibilité des enregistrements, et si les amplitudes variaient de plus de 10% les données étaient écartées. Les ratios  $H_{\max}/M_{\max}$  à 1, 5 et 10 Hz ont été exprimés en % du ratio obtenu à 0,3 Hz.

## **2.2. Enregistrement des fibres afférentes métabosensibles.**

Après section des nerfs pour éliminer les informations efférentes descendantes, la partie distale a été placée sur une paire d'électrode en tungstène et plongée dans un bain de paraffine. L'activité électrique extracellulaire des afférences métabosensibles de type III et IV a été examinée après une FIE et des injections intra-artérielles de KCl et d'AL. La procédure et les concentrations des injections sont rigoureusement les mêmes que lors des études précédentes, ainsi que pour la FIE.

## **3. Euthanasie et prélèvements tissulaires.**

À la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés par une injection létale d'anesthésique (3 ml à 0,6g/kg de Pentobarbital sodique).

# RESULTATS

## **I. L'altération neuromusculaire suite à une injection de BoNT/A.**

L'objet principal de cette première étude a été de mesurer les effets de la BoNT/A sur la réponse des afférences mécano- et métabosensibles. Puisqu'il a été montré qu'il n'y a pas de changement du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  après injections de BoNT/A (Wiegand et Wellhoner, 1977; Phadke et al., 2013), nous nous sommes intéressés principalement à l'enregistrement de l'activité des afférences musculaires mécano- et métabosensibles. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'appliquer des vibrations tendineuses (10 à 100 Hz) connues pour activer les afférences mécanosensibles, ainsi que d'injecter des activateurs spécifiques (KCl et AL) et d'induire électriquement une fatigue (FIE : 3 min à 10 Hz) pour activer les afférences métabosensibles (Kaufman et al., 1984b). Les propriétés contractiles musculaires ont également été mesurées afin d'évaluer les changements des caractéristiques contractiles. Les déficits locomoteurs, quant à eux, ont été évalués par la mesure de l'index fonctionnel du nerf sciatique (SFI).

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés 12 jours après les injections de toxine botulique. Les principaux résultats indiquent :

- que les valeurs de SFI des animaux après injection diminuent dès le 1<sup>er</sup> jour pour atteindre la valeur minimale de -100 dans un délai de 3 jours,
- une absence de contraction en réponse aux stimulations nerveuses,
- une perte de force d'environ 50% lors de la stimulation musculaire,
- une diminution de la réponse des afférences métabosensibles à la FIE dans le groupe BoNT/A ainsi qu'une diminution de la réponse aux injections d'AL,
- une absence d'augmentation de la fréquence ventilatoire lors de la FIE pour les animaux du groupe ayant reçu la toxine,
- une altération de la réponse des afférences mécanosensibles aux vibrations tendineuses.
- une atrophie musculaire (environ 50%).

Ces résultats indiquent que la toxine botulique altère la boucle sensorimotrice et pourrait être à l'origine d'une diminution des ajustements physiologiques et moteurs chez les patients pour lesquels une dénervation a été induite avec une telle neurotoxine.

# Mechano- and Metabosensitive Alterations After Injection of Botulinum Toxin Into Gastrocnemius Muscle

Guillaume Caron,<sup>1</sup> Talifujiang Rouzi,<sup>1</sup> Laurent Grelot,<sup>1</sup> Guy Magalon,<sup>2</sup> Tanguy Marqueste,<sup>1</sup> and Patrick Decherchi<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>Aix Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7287, Institut des Sciences du Mouvement: Etienne Jules MAREY (ISM EJM) Equipe Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy Faculté des Sciences du Sport de Marseille, Marseille, France

<sup>2</sup>Services de Chirurgie de la Main, Chirurgie Plastique et Réparatrice des Membres, Assistance Publique, Hôpitaux de Marseille (AP HM), Hôpital de la Conception 147, Marseille, France

This study was designed to investigate effects of motor denervation by *Clostridium botulinum* toxin serotype A (BoNT/A) on the afferent activity of fibers originating from the gastrocnemius muscle of rats. Animals were randomized in two groups, 1) untreated animals acting as control and 2) treated animals in which the toxin was injected in the left muscle. Locomotor activity was evaluated once per day during 12 days with a test based on footprint measurements of walking rats (sciatic functional index). At the end of the functional assessment period, electrophysiological tests were used to measure muscle properties, metabosensitive afferent fiber responses to chemical (KCl and lactic acid) injections, electrically induced fatigue (EIF), and mechanosensitive responses to tendon vibrations. Additionally, ventilatory response was recorded during repetitive muscle contractions. Then, rats were sacrificed, and the BoNT/A-injected muscles were weighed. Twelve days postinjection we observed a complete motor denervation associated with a significant muscle atrophy and loss of force to direct muscle stimulation. In the BoNT/A group, the metabosensitive responses to KCl injections were unaltered. However, we observed alterations in responses to EIF and to 1 mM of lactic acid (which induces the greatest activation). The ventilatory adjustments during repetitive muscle activation were abolished, and the mechanosensitive fiber responses to tendon vibrations were reduced. These results indicate that BoNT/A alters the sensorimotor loop and may induce insufficient motor and physiological adjustments in patients in whom a motor denervation with BoNT/A was performed. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** muscular afferents; electrophysiology; rat; *Clostridium botulinum*; neurotoxin

Botulinum toxins (BoNT) are proteins and neurotoxins produced by the bacterium *Clostridium botulinum*. These clostridial neurotoxins, produced in seven serotypes (A–G), are the most lethal protein toxins for humans and

recently have been employed as versatile therapeutic agents to treat numerous human neuromuscular disorders and in plastic surgery (Lim and Seet, 2010). The toxins enter motor neurons, where they prevent the release of acetylcholine at the neuromuscular junction. More precisely, the toxicity is due to their heavy chain's tropism for neuronal receptors and their light chain's cleavage of neuron specific target proteins, called SNARE (soluble N ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors). Thereby, BoNT exert their action by preventing the fusion of neurotransmitter vesicles with the plasma membrane and then vesicle exocytosis at the neuromuscular junction, eliciting flaccid paralysis (Rizo and Sudhof, 1998). The serotype A is the most toxic serotype with an LD50 of 0.003  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  but the most common serotype used in clinical therapies. It cleaves the SNAP 25 (synaptosomal associated protein of 25 kDa), a component of the trans SNARE complex, which is proposed to account for the specificity of membrane fusion and to execute fusion directly by forming a tight complex that brings the synaptic vesicle and plasma membranes together (Rizo and Sudhof, 2002). Its effects start between 2 and 5 days

T. Marqueste and P. Decherchi contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: Aix-Marseille Université (AMU); Contract grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Contract grant sponsor: Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (AP-HM).

\*Correspondence to: Patrick Decherchi, Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7287 Institut des Sciences du Mouvement: Etienne-Jules MAREY (ISM-EJM) Equipe Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Faculté des Sciences du Sport de Marseille, CC910-163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 09, France. E-mail: patrick.decherchi@univ-amu.fr

Received 28 August 2013; Revised 14 January 2014; Accepted 16 January 2014

Published online 25 February 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23370

after injections and are maintained between 3 and 6 months (Dressler and Rothwell, 2000). The literature indicates that most studies have focused on the motor inhibitory side and the noncontraction analgesics effects, but central alterations have also been shown (Priori et al., 1995; Giladi, 1997; Abbruzzese and Berardelli, 2006) that could result in a direct afferent inhibition (Chaddock et al., 2004; Marinelli et al., 2010) and/or to a retrograde transport of the toxin to the spinal cord (Antonucci et al., 2008). Thus, the botulinum toxin serotype A (BoNT/A) may alter the central neuronal adjustments regulated by activation of group Ia, Ib, and II and group III (A $\delta$  fibers) and IV (C fibers) afferent fibers. Ia and II afferent fibers (mechanosensitive) connected to the muscle spindle detect fast change in muscle length and muscle length, respectively (Roll et al., 1989; Decherchi et al., 1998; Marqueste et al., 2002). Ib afferent fibers (mechanosensitive) connected to the Golgi tendon organ detect forces variations (Brown et al., 1967). Group III and IV afferent fibers (metabosensitive) detect change in muscle metabolism (Kaufman and Rybicki, 1987; Rotto and Kaufman, 1988) and in intramuscular pressure (Ge and Khalsa, 2003). They are selectively activated during and after muscle fatigue (Decherchi et al., 1998; Decherchi et al., 2001; Dousset et al., 2001) or by different agents, such as bradykinin (Kaufman et al., 1982), lactic acid (Rotto and Kaufman, 1988; Marqueste et al., 2002), arachidonic acid (Rotto and Kaufman, 1988), thromboxane A<sub>2</sub> (Kenagy et al., 1997), H<sup>+</sup> (Victor et al., 1988), prostaglandin (Rotto and Kaufman, 1988), and potassium chloride (Rybicki et al., 1985; Decherchi et al., 2001; Dousset et al., 2001; Marqueste et al., 2002). Thus, the metabosensitive fibers are involved in an adaptive reflex named *ergoreflex* originating in skeletal muscle sensitive to products of muscle work and activating the sympathetic system and increasing ventilation (Decherchi et al., 2007; Vinogradova et al., 2012).

The main purpose of this study was to measure, in rats, the effects of BoNT/A injection on the response of the gastrocnemius afferent fibers involved in the sensorimotor loop. The mechanosensitive afferent discharges were recorded after tendon vibration. The metabosensitive afferent discharges were recorded after direct electrical muscle stimulation inducing release of muscle metabolites, which activates, in turn, the metabosensitive afferents, after intra arterial injections of either potassium chloride or lactic acid, two strong activators of metabosensitive afferents.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Seventeen adult male Sprague Dawley rats, weighing 300–400 g (Centre d'Élevage Roger Janvier, Le Genest Saint Isle, France), were housed in smooth bottomed plastic cages at 22°C with a 12 hr light–dark cycle. Food (Safe, Augy, France) and water were available ad libitum. An acclimation period of 1 week was allowed before inclusion in the experiment. Animals were subdivided into two groups, a group in which the

BoNT/A was injected into the gastrocnemius muscle (n = 10) and another that was left intact and acted as a control (control, n = 7).

### Ethical Approval

Anesthesia and surgical procedures were performed according to the French law on animal care guidelines, and the Animal Care Committees of Aix Marseille Université (AMU) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) approved our protocols. Individuals conducting research were listed in the authorized personnel section of the animal research protocol or added to a previously approved protocol. Furthermore, experiments were performed following the recommendations provided in the *Guide for the care and use of laboratory animals* (U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health) and in accordance with the European Community's council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). No clinical signs of pain or unpleasant sensation (i.e., screech, prostration, hyperactivity, anorexia) and no paw eating behavior were observed throughout the study.

### Toxin Injection Procedure

Animals from BoNT/A group were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (0.5 g · kg<sup>-1</sup>). Lyophilized botulinum toxin serotype A (Dysport 500; Beaufour Ipsen Pharma, Boulogne Billancourt, France) was reconstituted in normal saline solution to obtain a 15 U · ml<sup>-1</sup> solution. BoNT/A solution was injected into the inferior and superior parts of the two left gastrocnemius muscle heads (four injections per rat, two injections per muscle head). The right gastrocnemius was left intact. Each animal received a total of 15 U · kg<sup>-1</sup> that ensures a full neurotransmitter release blockage (Holds et al., 1990; Hott et al., 1998; Billante et al., 2002; Legerlotz et al., 2009) and isolates the muscle from any efferent activities. For this dose, a confinement of cleaved SNAP 25 only in cellular bodies of neurons innervating the injected muscles, with no systemic spreading (Matak et al., 2011), has been reported. However, even if BoNT/A spread to surrounding muscles, because we cut all branches coming from surrounding skeletal muscles and skin, the afferent activities recorded came exclusively from the gastrocnemius muscle.

### Functional Assessment of Hind Limb Loss

All the animals were familiarized to go through a walking track apparatus (150 cm long, 9 cm wide and 40 cm high) that was used to perform the functional tests during the presurgical week. Briefly, all the animals were conditioned to walk homogeneously into the recording apparatus three times per day for 5 days during the week before surgery. Heavy lighting was provided by two 500 W spotlights, and a dark box was positioned at the chamber's end to promote walking. The sciatic functional index (SFI) is a formula ( $38.3[ePL - nPL]/nPL + 109.5[eTS - nTS]/nTS + 13.3[eIT - nIT]/nIT - 8.8$ ) adapted by Varejao et al. (2001) from the peroneal functional index (Hruska et al., 1979; de Medinaceli et al., 1982; Bain et al., 1989) to evaluate the functional condition of the sciatic



nerve based on footprint measurements of walking rats. Footprint length (PL, or longitudinal distance between the tip of the longest toe and the heel), total toe spread (TS, or cross sectional distance between the first and fifth toes), and intermediate toe spread (IT, or distance between the second and fourth toes) are the main factors modified by blocking release of acetylcholine at the neuromuscular junction resulting from motor loss of the toe flexor, foot plantarflexor, and everters. To obtain data for the evaluation, the animals' hind feet were dipped into Chinese ink (Swop Pads, Trodat, France) and the footprints were recorded on paper track. Then, data were manually analyzed by an experienced investigator. The normal/uninjected (n, right) footprints and the contralateral experimental/injected (e, left) footprints were compared. The loss rate of the SFI was defined on a score of 100 to 0, where 0 represents normal function and 100 total failure (i.e., failure of neurotransmission between nerve and muscle inducing gastrocnemius paralysis and maximal locomotor deficits). Then, a graph with a loss curve related to time was built. Footprints were obtained and analyzed on a daily basis, from the injection day (before injection) to the day 12 postoperatively.

### Electrophysiological Recordings

At the end of the functional *in vivo* assessment period, rats were anesthetized with urethane ( $1.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.), and atropine ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.) was administered to reduce airway secretions. A tracheotomy was performed, and rats were artificially ventilated (Harvard volumetric pump; rate  $40\text{--}60 \text{ min}^{-1}$ , tidal volume  $2\text{--}4 \text{ ml}$ ). A catheter was inserted into the right femoral artery from the noninjected hindlimb and pushed up to the fork of the abdominal aorta to transport supplemental doses of anaesthetic and chemicals (i.e., potassium chloride [KCl] and lactic acid [LA]) to the contralateral muscle. This catheter was positioned to let the blood flow freely to the left lower limb muscles. Animals were positioned in ventral decubitus. Dissection at the middle thigh level was carried out to expose the right common sciatic nerve. With microsurgical techniques and an operating microscope ( $\times 40$ , MZ75; Leica, Heerbrugg, Switzerland), a longitudinal incision was made along the lateral thigh and upper leg. Then, the tibial nerve, a branch of the sciatic nerve, was dissected free from surrounding tissues, including all branches coming from other muscles and skin over a  $30 \text{ mm}$  length and immersed in paraffin oil. Two tungsten stimulation electrodes (interelectrode distance  $4\text{--}5 \text{ mm}$ ) were placed on the surface of the gastrocnemius muscle. Another pair of cuff electrodes was placed on the tibial nerve for stimulation or afferent recordings. The knee and ankle were firmly held by clamps on a horizontal support to avoid disturbing movements and to maintain the  $90^\circ$  knee joint angle during electrical nerve stimulations. Animal temperature was maintained between  $36^\circ\text{C}$  and  $37^\circ\text{C}$  with a blanket controlled by rectal temperature probe. Throughout the operative procedure, continuous monitoring was used to assess both blood pressure and heart rate to ensure the level of anesthesia.

**Twitch contraction and tetanus threshold measurements.** The contractile response of the gastrocnemius to nerve and muscle stimulation (twitch contraction, which is a reflection of the tension generated in the muscle)

was performed with a neurostimulator (Grass S88K; Grass Technologies, Natus Neurology, Warwick, RI) delivering single rectangular pulses (duration  $0.1 \text{ msec}$ , frequency  $0.5 \text{ Hz}$ ) through an isolation unit and measured with an isometric strain gauge (Micromanometer 7001; Ugo Basile SRL, Comerio, Italy) fixed to the distal part of the gastrocnemius tendon (calcaneum tendon). The intensity of the stimulation was increased until the maximal response was found. Twitch contraction was analyzed in terms of peak amplitude (A in milli Newton [mN]), contraction time (CT, time interval between the beginning of the contraction curve and peak twitch tension), maximum contraction rate (MCR in  $\text{mN} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) defined as the slope of a tangent drawn to the steepest portion of the contraction curve and maximum relaxation rate (MRR in  $\text{mN} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) defined as the slope of a tangent drawn to the steepest portion of the relaxation curve. MCR and MRR were normalized to the total twitch amplitude (A;  $\text{MCR}/\text{A}$  and  $\text{MRR}/\text{A}$ , mean contraction and relaxation rate constant, respectively,  $\text{sec}^{-1}$ ; Esau et al., 1983; Chabas et al., 2008). Maximal twitch contraction was recorded with a Biopac (Goleta, CA) MP150 system (sampled at  $2,000 \text{ Hz}$ , filtered with lowpass at  $150 \text{ Hz}$ ) and analyzed in AcqKnowledge 3.7.3 software (Biopac).

Then, the intensity of stimulation was increased by 20% over stimulations evoking a "relative" maximal force. Rhythmic contractions were produced by using a  $5 \text{ Hz}$  stepwise increase frequency ( $0$  to  $100 \text{ Hz}$ ). The duration of stimulus trains was  $500 \text{ msec}$ , and trains were repeated every  $5 \text{ sec}$  to produce a series of contractions. The pulse duration was  $2 \text{ msec}$  and five single stimulations were delivered in each  $500 \text{ msec}$  train. The tetanus threshold, defined as the frequency at which we observed a sustained contraction with no relaxation between twitches, and the maximal tetanus force was recorded.

**Electrically induced fatigue.** Thirty minutes after the last stimulations were applied to evoke twitch and tetanus contractions, a  $3 \text{ min}$  electrically induced muscle fatigue (EIF) was performed. For this purpose, rhythmic muscle contractions were produced by the neurostimulator (Grass S88K) delivering rectangular pulse trains to the pair of tungsten electrodes placed on the muscle surface (pulse duration  $0.1 \text{ msec}$ , frequency  $10 \text{ Hz}$ , five shocks in each  $500 \text{ msec}$  train, duty cycle  $500/1,000 \text{ msec}$ , voltage range  $5\text{--}8 \text{ V}$ ). The intensity was supramaximal, i.e., 20% higher than that used to elicit a maximal twitch contraction. The force developed during the muscle contraction was measured from the beginning to the end of muscle electrical stimulation with the isometric strain gauge (Micromanometer 7001), and fatigue was assessed from the decay of force throughout the  $3 \text{ min}$  EIF period. Thus, the fatigue index (FI) expressed as the percentage of force loss from the beginning to the end of the stimulation was measured.

**Physiological reflexes.** During the EIF, the ventilatory frequency recorded through the canula inserted into the trachea was measured  $1 \text{ min}$  before, during, and  $1 \text{ min}$  after EIF. The experiments were performed after reversible regional circulatory occlusion, which isolated and maintained the neural drive as well as abolishing the humoral communication. It was previously shown that direct muscle low frequency stimulation inducing fatigue is a strong activator of metabosensitive afferent fibers (Darques and Jammes, 1997), which

subsequently induces a ventilation frequency and amplitude increase (McCloskey and Mitchell, 1972; Mitchell et al., 1977; Mense and Stahnke, 1983; Decherchi et al., 2007; Bianco et al., 2011). However, as previously described, these changes were limited when few metabosensitive fibers were activated.

**Metabosensitive afferent recordings.** Furthermore, during EIF, the response of afferent fibers from groups III and IV was also recorded. The neural signals were referred to a ground electrode implanted in a nearby muscle, amplified (10 to 100 K), and filtered (30 Hz to 10 kHz) with a differential amplifier (P2MP SARL, Marseille, France). The afferent discharge was recorded (Biopac MP150 in AcqKnowledge) and fed into pulse window discriminators (P2MP SARL), which simultaneously analyzed afferent populations. The output of these discriminators provided noise free tracings (discriminated units), which were counted in a data analysis system (Biopac AcqKnowledge) at 1 sec intervals (in Hz) and then displayed on a computer. Before each stimulus known to activate the metabosensitive afferent fibers, a baseline recording ( $F_{\text{impulses}} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) was achieved to ensure that the discharge rate was stable. The recording was considered stable only if the fluctuation of baseline impulse activity ranged between 100% and 103%. Consequently, variation of firing rate was related only to the stimuli applied and not to putative changes in environmental conditions. To exclude the mechanical response evoked during muscle contraction, the discharge rate was averaged for a 1 min period preceding EIF (baseline activity), and its change was measured during the first minute following EIF. Thus, variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge rate; i.e., baseline discharges corresponded to 100%.

At the end of this recording session, the circulatory occlusion was removed. After a period of rest of 1 hr, distinct concentrations of KCl (1, 5, 10, and 20 mM, 0.5 ml) and LA (0.5, 1, 2, and 3 mM, 0.1 ml) were randomly injected into the contralateral artery while nerve activity was continuously recorded. The injections, which required 5–10 sec to complete, were washed with 0.5 ml normal saline. Baseline afferent discharge was averaged for a 1 min period pre- and postinjection. As previously described (Darques and Jammes, 1997; Decherchi et al., 1998), recordings were performed immediately after injection, because afferent activity returns to its baseline level within 3 min, which permits the use by the muscle of the injected drugs and/or a washout by the blood stream, and excluding KCl or LA accumulation. The poststimulus discharge firing rate was compared with the baseline discharge rate, and variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge firing rate. There was a 10 min delay between each injection. Thus, as in previous studies (Decherchi et al., 1998; Dousset et al., 2001; Marqueste et al., 2002; Laurin et al., 2009, 2010), the dose–response curves to KCl and LA from femoral nerve were drawn.

**Mechanosensitive afferent recordings.** Tendon vibrations are known to activate muscle mechanosensitive fibers without activating group muscle metabosensitive afferents (Kaufman et al., 1984) in a range of 10–100 Hz (Burke and Schiller, 1976; Decherchi et al., 1998), depending on the animal species and also on application through the skin or directly on the muscle tendon. Low frequency mechanical vibrations seem preferentially to activate static spindle afferents (type II) and also Golgi tendon

organs (type Ib, 50% are discharging with no volunteer contraction), whereas high frequency vibrations are a well known stimulus for dynamic spindle afferents (type Ia; Brown et al., 1967; Meyer Lohmann et al., 1974; Roll et al., 1989; Decherchi et al., 1998; Jammes et al., 2000; Dousset et al., 2001). Rectangular mechanical shocks were delivered perpendicularly to the longitudinal muscle axis on the calcaneal tendon by a commercially available vibrator (Ling Dynamic Systems LDS Group, Herfordshire, United Kingdom) driven by a frequency generator (GenTrad Function Generator GF763AF; ELC, Annecy, France). Vibrations were applied for 5 sec periods. The vibration frequency was increased step by step from 10 to 100 Hz while the discharge of single afferent units was recorded. The maximal mechanosensitive afferents discharge rate elicited by tendon vibrations was considered as the reference discharge rate (100%). The discharge rates induced by the other frequencies of vibrations were expressed in percentage of the corresponding reference discharge rate. Because we cut all collaterals originating from surrounding muscles and skin, afferent responses recorded concerned only those originating from the gastrocnemius muscle.

### Muscle Atrophy

At the end of the electrophysiological recordings, rats from each group were sacrificed by a 3 ml intra arterial over dose of pentobarbital sodium solution (pentobarbital sodique, 0.6 g · kg<sup>-1</sup> Sanofi Santé animals; Sanofi France, Paris, France). The left gastrocnemius muscle was harvested and immediately weighed on a precision scale (Navigator N30330 model; Ohaus, Parsippany, NJ). Muscle mass atrophy in the BoNT/A group was measured using a muscle weight/body weight ratio and compared with the control group ratio.

### Statistical Analysis

Data processing was performed with a commercially available software program (Instat 3.0; GraphPad Software, San Diego, CA). Data were expressed as mean ± SEM. For functional assessments, data concerning each animal were individually identified, to allow followup over time. Differences were tested by two way analysis of variance (ANOVA test, factors group × timing) completed by a Student Newman Keuls post hoc test to compare the SFI score in the two experimental groups. The same tests were used to compare the ventilatory response to EIF (factors group × timing) and the metabosensitive afferent responses to KCl and LA injections (factors group × doses) between groups.

To measure the effect of EIF and drug injections on metabosensitive afferent discharges, we used a one sample *t* test for a one tailed *P* value. We used a *t* test to compare the discharge for EIF and muscle properties between the two groups. Finally, the intergroup comparison of the percentage of mechanosensitive fibers responding to mechanical vibration was examined with a  $\chi^2$  test. Results were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Functional Assessment of Hind Limb Loss

In the BoNT/A group, measurement of the SFI indicated that functional loss started on the first day



postinjection, reached the minimal value on the third day, and remained at this minimum until the electrophysiological recordings step (Fig. 1), confirming that the effect of the toxin starts within 2 days after injection (Dressler and Rothwell, 2000). In comparison with score before injection or scores measured in the control group, results indicated that the functional loss became and remained significantly lower ( $P < 0.001$ ) on the first day postinjection.

**Muscle properties**

At day 12, the left muscle weight/body weight ratio was significantly lower ( $P < 0.001$ ) in the BoNT/A group, indicating muscle atrophy. In the BoNT/A group, electrical stimulation applied to the tibial nerve did not elicit a muscle contraction, but stimulation applied directly on muscle showed a significant ( $P < 0.001$ ) decrease of the twitch contraction amplitude. However,

although the amplitude of the contraction was lower, no significant difference was found between the control and the BoNT/A groups concerning the MCR/A ratio, the MRR/A ratio, or the contraction times. The tetanus threshold obtained by increasing the muscle stimulation frequency indicated that animals from the BoNT/A group reached their plateau significantly ( $P < 0.05$ ) earlier than the control group. Moreover, the gastrocnemius muscle force developed at the tetanus plateau in the BoNT/A group was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than that in the control group. Muscle force developed during the 3 min EIF (10 Hz) was significantly lower at both the beginning ( $P < 0.01$ ) and the end ( $P < 0.05$ ) of stimulation. However, the FI expressed as the percentage of force loss was not significantly different between the two groups. Numerical data concerning these parameters are presented in Table I.

**Metabosensitive Afferent Responses**

Afferents characterized as metabosensitive fibers exhibited spontaneous tonic low frequency baseline activity (4–10 Hz) under our experimental conditions. Their responses to KCl, LA, and EIF consisted of an increase of this baseline tonic activity.

**Responses to EIF.** Air flows, recorded through the canula inserted into the trachea, represent the ventilatory activity for each animal. In the control group, the ventilatory activity significantly ( $P < 0.01$ ) increased during and the first 10 sec after muscle stimulation. For the BoNT/A group, we did not observe any ventilatory adjustment throughout the recording period (Fig. 2). However, the release of metabolites by the EIF in the muscle interstitium activated muscle free afferent endings. Thus, animals from the control and the BoNT/A groups exhibited a significant ( $P < 0.001$ ) increase in afferent discharge frequency after a 3 min stimulation of the gastrocnemius muscle. The activation of muscle afferents was immediate when the 3 min EIF stopped and persisted for another 3 min, with a maximal response in the first 2

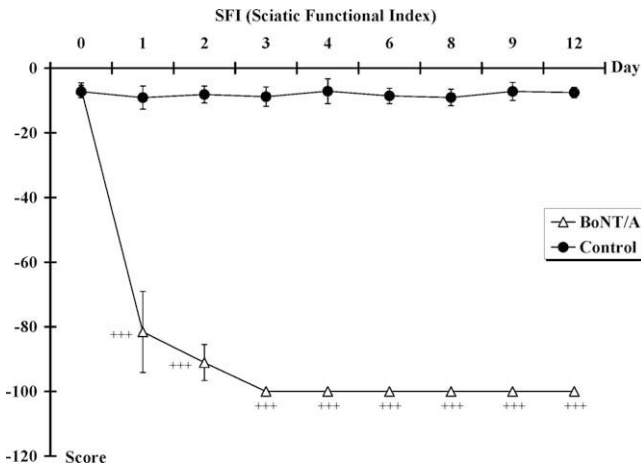


Fig. 1. Sciatic functional index (SFI). The SFI score significantly drops 1 day after the botulinum toxin serotype A injection and remains at its lowest during the following 12 days. ††† $P < 0.001$  (vs. SFI score before injection)

**TABLE I. Gastrocnemius Muscle Properties\***

		Control group	BoNT/A group	Comparison ( <i>P</i> )
Nerve stimulation	Muscle weight/body weight ratio	0.47 ± 0.01	0.24 ± 0.01	<0.001
	Twitch amplitude (mN)	238.38 ± 10.26	0	<0.001
	MRR/A (sec <sup>-1</sup> )	0.11 ± 0.03	0	<0.001
	Contraction time (msec)	4.05 ± 0.37	0	<0.001
	MCR/A (sec <sup>-1</sup> )	0.22 ± 0.02	0	<0.001
Muscle stimulation	Twitch amplitude (mN)	220.14 ± 9.32	91.43 ± 15.89	<0.001
	MRR/A (sec <sup>-1</sup> )	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	ns
	Contraction time (msec)	3.18 ± 0.34	3.51 ± 0.42	ns
	MCR/A (sec <sup>-1</sup> )	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.03	ns
Tetanus contraction (5-Hz stepwise increase frequency)	Tetanus threshold (Hz)	34.29 ± 2.30	25.00 ± 2.34	<0.05
	Maximal force (mN)	983.94 ± 216.43	312.45 ± 122.92	<0.05
Electrically induced fatigue (10 Hz)	Force at the beginning (mN)	277.62 ± 32.37	122.63 ± 33.84	<0.01
	Force at the end (mN)	65.73 ± 17.66	27.57 ± 18.15	<0.05
	Fatigue index (%)	76.13 ± 5.57	79.97 ± 7.48	ns

\*Measures were performed 12 days after BoNT/A injection.

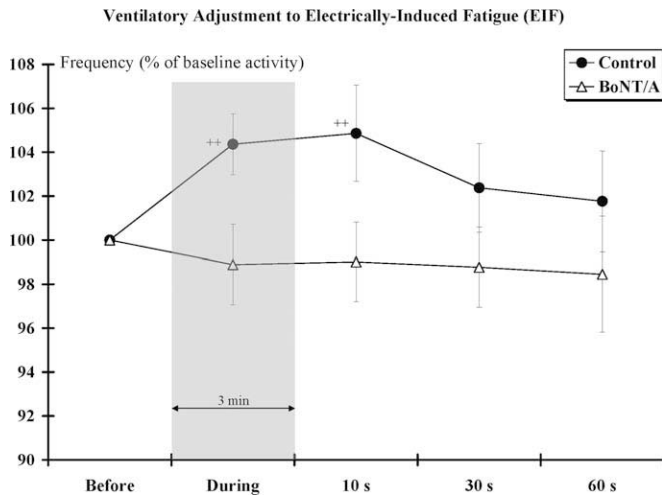


Fig. 2. Ventilatory adjustments induced by electrically induced fatigue (EIF). The ventilatory response to gastrocnemius repetitive stimulation is observed only in the control group.  $\dagger\dagger P < 0.01$  (vs. baseline frequency)

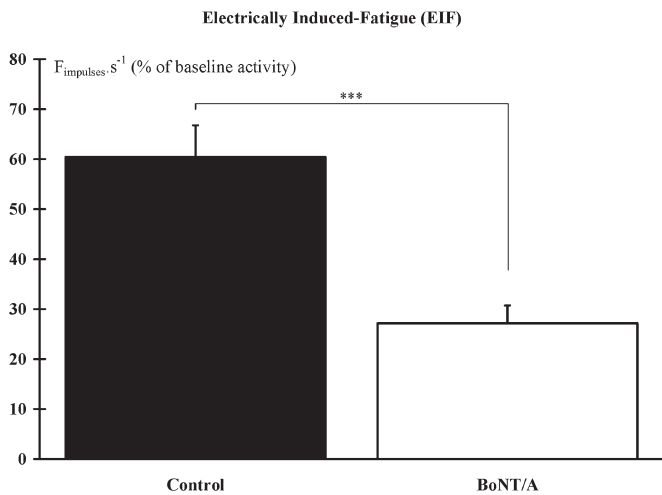


Fig. 3. Response of the metabosensitive fibers to electrically induced fatigue (EIF). The post EIF changes in afferent discharge rate originating from gastrocnemius muscle are lower in the BoNT/A group.  $***P < 0.001$  (control vs. BoNT/A group)

min. However, these discharges were significantly ( $P < 0.001$ ) lower in the BoNT/A group compared with the control group (Fig. 3).

**Responses to chemical injections.** The pattern of responses of metabosensible muscle afferents activated by increased interstitial concentrations of LA consisted of a burst of activity beginning within 5–10 sec after the bolus injection. Recovery of control spontaneous discharge rate always occurred within 3 min. In a previous experiment performed in the tibialis anterior muscle of Sprague Dawley rats, we showed that there was a relationship between the doses of KCl and the change in afferent discharge rate, whereas the activation of muscle afferents by LA culminated at the 1 mM concentration

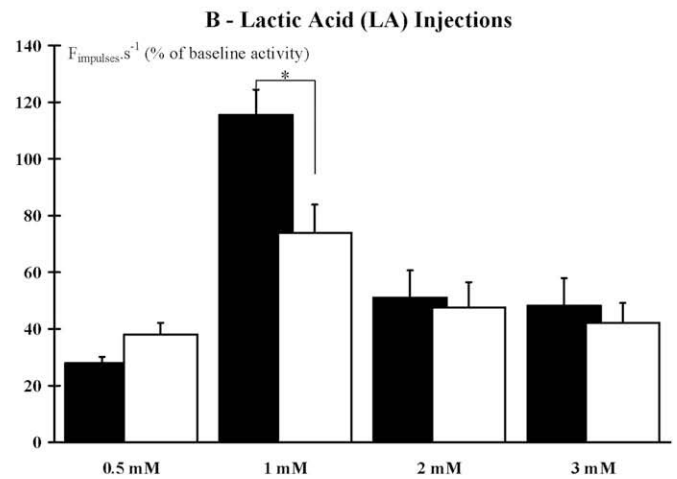
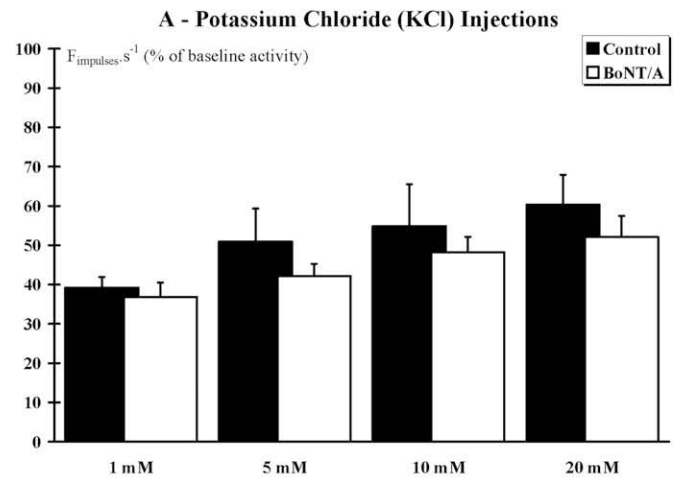


Fig. 4. Response of the metabosensitive fibers to chemicals. In the two groups, a response ( $F_{\text{impulses}\cdot\text{sec}^{-1}}$ ) of tonically active muscle afferents during stepwise increases in potassium chloride (A) and lactic acid (B) concentration in injected solutions was recorded. Note that, in the BoNT/A group, the response to 1 mM of LA, which induces the greatest activation in the control group, is decreased.  $*P < 0.05$  (control vs. BoNT/A group)

and then declined (Decherchi et al., 1998; Martin et al., 2009). Here, we showed that the gastrocnemius afferent fibers' response to KCl injections was dose dependent (Fig. 4A) and culminated at the same concentration for LA injections (Fig. 4B). Significant ( $P < 0.001$ ) increases in afferent discharge frequency were observed in the control and BoNT/A groups at all concentrations of KCl or LA solution tested. Intergroup comparison indicated that there was no difference in the KCl dose–response curve between the two groups. However, for the LA injections, the maximal response obtained for the 1 mM concentration was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the BoNT/A group compared with the control group.

#### Mechanosensitive Afferent Responses.

The afferent response to the calcaneal tendon vibrations corresponds to an abrupt increase in the discharge

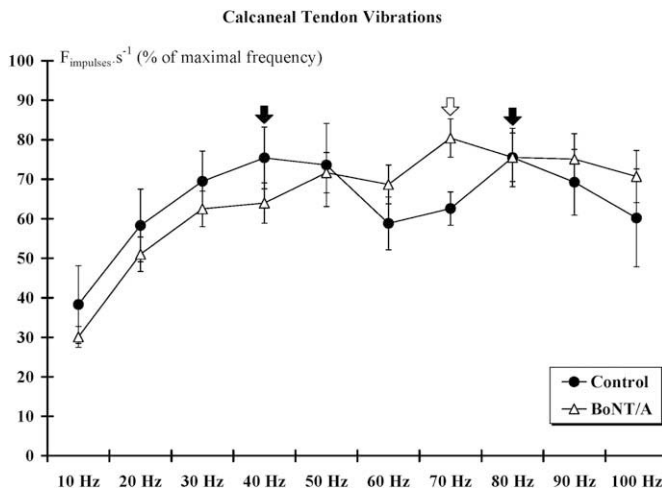


Fig. 5. Response of the mechanosensitive fibers to calcaneal tendon vibrations. In the two groups, a response ( $F_{\text{impulses}} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) persisting throughout the tendon vibration period was recorded for each vibration frequency. In the control group, the changes in afferent discharge evoked by vibration are bimodal, with peaks measured at 40 and 80 Hz (black arrows). In the BoNT/A group, only one peak was measured at 70 Hz (white arrow).

frequency, which persisted throughout the tendon vibration period. In the control group, the rate of firing units was nonlinearly related to the frequency of vibration. The changes in afferent discharge evoked by vibration were bimodal, with peaks measured at 40 and 80 Hz (Fig. 5). Thus, as previously described for the tibialis anterior muscle (Decherchi et al., 1998), two populations of muscle afferents were identified in the control group with respect to the frequency of vibration, giving an optimal activation; 67% and 33% of the units responded below and over 50 Hz, respectively. In the BoNT/A group, these proportions were 20% and 80%. Statistical analysis showed a significant ( $P < 0.001$ ) difference between the two groups.

When we consider the response to vibration frequencies only lower than 50 Hz, the maximal response was observed at 40 Hz and 50 Hz for control and BoNT/A, respectively. This maximal response was at 80 Hz and 90 Hz for units responding maximally at frequencies higher than 50 Hz.

## DISCUSSION

The present study was designed to determine the effect of motor denervation by *Clostridium botulinum* toxin serotype A on the afferent activity of metabo- and mechanosensitive fibers originating from the gastrocnemius muscle, a skeletal muscle of the hind limb. The main results indicate that alteration in some muscle properties following toxin injection is associated with specific changes in mechano- and metabosensitive responses and adaptation to physiological reflex such as ventilatory adjustment during muscle activation. Because metabosensitive fibers are involved in both pain transmission and ergoreflex (Craig, 2003; Decherchi and Dousset, 2003; Decherchi et al., 2004;

Light et al., 2008; Murphy et al., 2011), our results highlight part of the mechanism by which the pain sensation decreases after BoTN injection (Cui et al., 2004) but suggest changes in the sensorimotor loop and consequently changes in physiological adjustments during repetitive muscular contractions. Indeed, contraction adaptation is provided by central neuron activity adjustments, which are regulated by activation of group I and II (mechanosensitive) and group III and IV (metabosensitive) afferent fibers. Group IV fibers are activated mainly by exercise-induced muscular metabolism. Thus, the role played by this afferent seems to be crucial during exercise and fatigue tolerance adaptive mechanisms. However, the lack of physiological adjustments after BoTN/A injection should have minimal impact if there are no repetitive muscular contractions.

## Muscle Properties

The myocytes of the gastrocnemius are mostly type II fast twitch fibers that have an anaerobic metabolism used to create short bursts of force and are prone to rapid fatigue (Prior et al., 2001). Their typology may explain why we did not find differences in MCR/A, MRR/A, or FI between the control group and the group in which the muscle was paralyzed by BoNT/A. Although this functional motor denervation inducing paralysis is followed by marked atrophy and reduction in force output, the phenotype of the gastrocnemius muscle should not be modified sufficiently to observe changes in contraction, relaxation, or fatigue parameters. Furthermore, we observed a lowering in tetanus threshold indicating a shift to a slower contractile phenotype. This result is in accordance with previous results showing a switch from IIb to IIa (IIx) myocytes (i.e., a slight slowing of muscle contraction) after BoNT/A injection (Dodd et al., 2005; Legerlotz et al., 2009) also contributing to the reduction of force output.

## Evoked Metabosensitive Activities and Ergoreflex

Adaptation to exercise is a highly integrated, complex phenomenon that could be briefly described as an increase in oxygen and energetic metabolites supply to working muscle. It is commonly recognized that exercise induces an increase in heart rate, mean arterial blood pressure, and minute ventilation by two classes of neural mechanisms: the central command system, which involves the direct activation of brainstem locomotion, ventilatory, and autonomic networks by the cerebral processes occurring at the onset of exercise (Krogh and Lindhard, 1913; Goodwin et al., 1972; Eldridge et al., 1985), and the reflex network resulting in the activation of a complex system of feedback and feed forward through medullary and spinal pathways (Iwamoto and Botterman, 1985; Iwamoto et al., 1985; Rowell et al., 1996; Kaufman and Hayes 2002). This reflex is mediated by metabosensitive afferent fibers from groups III and IV (Decherchi et al., 2007), whose receptors are unencapsulated nerve endings found in the connective tissue and in the walls of small

vessels within the muscle, respectively (Alam and Smirk, 1937; Kao et al., 1963; Coote et al., 1971; von Düring et al., 1990; Piepoli et al., 1995; Khan and Sinoway, 2000).

Here we show that the response of metabosensitive afferent fibers to KCl injections is not altered by the BoNT/A pretreatment. As previously demonstrated (Decherchi et al., 1998; Dousset et al., 2004; Laurin et al., 2010),  $K^+$  is a specific activator of metabosensitive afferent fibers and not a nonspecific stimulus acting by depolarizing all fibers. Arterial KCl injections increase the potassium concentration in the muscular interstitium to levels similar to those evoked by static contractions known to activate metabosensitive afferents in dogs (Hník et al., 1976; Rybicki et al., 1985), cats (Mense and Prabhakar, 1986), rabbits (Darques and Jammes, 1997), and rats (Thimm and Baum, 1987; Decherchi et al., 1998). Previous authors (Rybicki et al., 1985; Decherchi et al., 1998; Martin et al., 2009) have also reported that the discharge rate of metabosensitive fibers in response to increased KCl was concentration dependent in the range of 1–20 mM. For the control and BoNT/A groups, we confirmed not only this observation but also that the metabosensitive afferents are still receptive to physiological increases in extracellular muscle KCl even if the muscle was paralyzed by a clostridial neurotoxin.

However, our results indicate that afferent responses to the LA concentration (1 mM) inducing the highest response and to EIF are altered in BoNT/A pretreatment animals. We also note that there is no ventilatory adjustment to EIF in the BoNT/A group. As previously reported, EIF evoked by a 10 Hz frequency stimulation induces production of LA and hydroxyl radicals and, to a lesser extent, the release of proinflammatory mediators that activate the metabosensitive fibers, followed by an increase in ventilatory rhythm (McCloskey and Mitchell, 1972; Jammes and Balzamo, 1992; Reid, 1996; Darques et al., 1998). Our data suggest that metabosensitive fibers originating from skeletal muscle treated with BoNT/A are unable to respond to exogenous intake or endogenous release of LA in the extracellular space. Our results also suggest that the mechanisms of activation of the metabosensitive fibers by LA and KCl differ. It must be underscored, as previously shown (Decherchi et al., 1998; Dousset et al., 2001; Marqueste et al., 2002; Martin et al., 2009), that LA induced activation of the muscle metabosensitive fibers is not concentration dependent and that their rate of discharge even declined at higher doses, probably because of the blockage of sodium channels induced by proton accumulation (Smith et al., 2011). Dose–response relationships observed in control and BoNT/A groups are similar. However, the diminished response to exogenous LA injection should be related to change in LA detection by metabosensitive afferents. Furthermore, the altered response to EIF should be explained by either changes in LA detection or changes in LA production resulting from a shift to slight slowing of anaerobic metabolism and/or to an atrophy inducing fast myocytes alteration. Indeed, it was previously shown that BoNT/A

has more pronounced deleterious effects on fast twitch muscles (Duchen, 1971a,b).

Assuming that fast muscles such as the gastrocnemius produce more LA than slow muscles, we can suppose that the metabosensitive fibers originating from the fast muscle are essentially based on the detection of LA variations. Thus, disturbance of a fast muscle (e.g., with toxin injection) will affect mainly the metabosensitive fibers responding to LA stimulus and then the ergoreflex.

### Evoked Mechanosensitive Activities

Differential effects on tonic and phasic reflexes are produced by continued vibration of skeletal muscle. Indeed, they cause the muscle slowly to develop tension (tonic contraction) from activation of anterior horn neurons by the resulting afferent spindle discharge, which reaches  $\alpha$  motoneurons via monosynaptic pathways (De Gail et al., 1966; Hagbarth and Eklund, 1966). The muscle spindle is well known to be sensitive to vibration, and this sensibility is increased by stimulation of both types of fusimotor fibers (Burke and Schiller, 1976). However, mechanical vibrations were unable to activate afferents from groups III and IV (Kaufman et al., 1984). In rat tibialis anterior muscle, we previously showed that the mechanosensitive afferent response to tendon vibration is biphasic, with maximal responses at about 50 Hz and 70 Hz (Decherchi et al., 1998, 2001). In the present experiment with the gastrocnemius muscle, we also found a biphasic response depending on the receptor sensitivity range to vibrations, but the maximal responses were at about 40 Hz and 80 Hz. We also observed that 67% and 33% of the units responded below and over 50 Hz, respectively. In the BoNT/A group, this biphasic pattern of responses was not observed, and the proportions of mechanosensitive fibers responding maximally below and over 50 Hz were 20% and 80%, respectively. Previously, in experiments in which we performed a selective destruction of metabosensitive fibers nonassociated with muscle atrophy (Dousset et al., 2004) or injury and repair of peripheral nerve associated with muscle atrophy (Decherchi et al., 2001), we observed changes in metabo- and mechanosensitive responses. In the present study, we also observed changes in metabo- and mechanosensitive responses. At this experimental step, it is difficult to establish the causal link between the discharges of the two populations. However, the literature indicates that BoNT/A inhibits acetylcholine release from  $\alpha$  and  $\gamma$  motoneurons, which in turn reduces the discharges from Ia and II fibers (Filippi et al., 1993). Another explanation could be the alteration of glutamate, substance P, or GABA transmission in the neurons involved in the sensorimotor network (Purkiss et al., 1997, 2000; Verderio et al., 2007). The alteration of the mechanosensitive activities might have repercussions for the motor command adjustment during muscle contraction, exercise, and/or fatigue.

### CONCLUSIONS

The present study shows that injection of botulinum toxin in a skeletal muscle induces changes in the metabo-



and mechanosensitive responses that probably impact the sensorimotor loop and adjustments to hypodynamia, physical training, and pathologies. Thus, motor denervation with botulinum toxin in patients suffering from movement disorders or other pathologies, and for cosmetic purposes, may present proprioception alterations that could be exacerbated during exercise and muscle fatigue. Further experiments will be needed to determine whether such alterations persist after toxin recovery or repeated injections.

## REFERENCES

- Abbruzzese G, Berardelli A. 2006. Neurophysiological effects of botulinum toxin type A. *Neurotox Res* 9:109-114.
- Alam M, Smirk FH. 1937. Observations in man upon a blood pressure raising reflex arising from the voluntary muscles. *J Physiol* 89:372-383.
- Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. 2008. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28:3689-3696.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. 1989. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83:129-138.
- Bianco J, Gueye Y, Marqueste T, Alluin O, Risso JJ, Garcia S, Lavault MN, Khrestchatisky M, Feron F, Decherchi P. 2011. Vitamin D<sub>3</sub> improves respiratory adjustment to fatigue and H-reflex responses in paraplegic adult rats. *Neuroscience* 188:182-192.
- Billante CR, Zelear DL, Billante M, Reyes JH, Sant'Anna G, Rodriguez R, Stone RE Jr. 2002. Comparison of neuromuscular blockade and recovery with botulinum toxins A and F. *Muscle Nerve* 26:395-403.
- Brown MC, Engberg I, Matthews PB. 1967. The relative sensitivity to vibration of muscle receptors of the cat. *J Physiol* 192:773-800.
- Burke D, Schiller HH. 1976. Discharge pattern of single motor units in the tonic vibration reflex of human triceps surae. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 39:729-741.
- Chabas JF, Alluin O, Rao G, Garcia S, Lavault MN, Risso JJ, Legre R, Magalon G, Khrestchatisky M, Marqueste T, Decherchi P, Feron F. 2008. Vitamin D<sub>2</sub> potentiates axon regeneration. *J Neurotrauma* 25:1247-1256.
- Chaddock JA, Purkiss JR, Alexander FC, Doward S, Fooks SJ, Friis LM, Hall YH, Kirby ER, Leeds N, Mouldsdales HJ, Dickenson A, Green GM, Rahman W, Suzuki R, Duggan MJ, Quinn CP, Shone CC, Foster KA. 2004. Retargeted clostridial endopeptidases: inhibition of nociceptive neurotransmitter release in vitro, and antinociceptive activity in in vivo models of pain. *Mov Disord* 19(Suppl 8):S42-S47.
- Coote JH, Hilton SM, Perez-Gonzalez JF. 1971. The reflex nature of the pressor response to muscular exercise. *J Physiol* 215:789-804.
- Craig AD. 2003. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol* 13:500-505.
- Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. 2004. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 107:125-133.
- Darques JL, Decherchi P, Jammes Y. 1998. Mechanisms of fatigue-induced activation of group IV muscle afferents: the roles played by lactic acid and inflammatory mediators. *Neurosci Lett* 257:109-112.
- Darques JL, Jammes Y. 1997. Fatigue-induced changes in group IV muscle afferent activity: differences between high- and low-frequency electrically induced fatigues. *Brain Res* 750:147-154.
- De Gail P, Lance JW, Neilson PD. 1966. Differential effects on tonic and phasic reflex mechanisms produced by vibration of muscles in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29:1-11.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77:634-643.
- Decherchi P, Dousset E. 2003. [Role of metabosensitive afferent fibers in neuromuscular adaptive mechanisms]. *Can J Neurol Sci* 30:91-97.
- Decherchi P, Darques JL, Jammes Y. 1998. Modifications of afferent activities from Tibialis anterior muscle in rat by tendon vibrations, increase of interstitial potassium or lactate concentration and electrically-induced fatigue. *J Peripher Nerv Syst* 3:267-276.
- Decherchi P, Vuillon-Cacchiuto G, Darques JL, Jammes Y. 2001. Changes in afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Muscle Nerve* 24:59-68.
- Decherchi P, Dousset E, Grelot L. 2004. [Metabolic stability and physiological adaptation of muscle under conditions of exercise]. *Rev Neurol* 160:297-305.
- Decherchi P, Dousset E, Jammes Y. 2007. Respiratory and cardiovascular responses evoked by tibialis anterior muscle afferent fibers in rats. *Exp Brain Res* 183:299-312.
- Dodd SL, Selsby J, Payne A, Judge A, Dott C. 2005. Botulinum neurotoxin type A causes shifts in myosin heavy chain composition in muscle. *Toxicol* 46:196-203.
- Dousset E, Decherchi P, Grelot L, Jammes Y. 2001. Effects of chronic hypoxemia on the afferent nerve activities from skeletal muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1476-1480.
- Dousset E, Marqueste T, Decherchi P, Jammes Y, Grelot L. 2004. Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferent activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. *J Neurosci Res* 76:734-741.
- Dressler D, Rothwell JC. 2000. Electromyographic quantification of the paralyzing effect of botulinum toxin in the sternocleidomastoid muscle. *Eur Neurol* 43:13-16.
- Duchen LW. 1971a. Changes in the electron microscopic structure of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse after the local injection of botulinum toxin. *J Neurol Sci* 14:61-74.
- Duchen LW. 1971b. An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J Neurol Sci* 14:47-60.
- Eldridge FL, Millhorn DE, Kiley JP, Waldrop TG. 1985. Stimulation by central command of locomotion, respiration and circulation during exercise. *Respir Physiol* 59:313-337.
- Esau SA, Bellemare F, Grassino A, Permutt S, Roussos C, Pardy RL. 1983. Changes in relaxation rate with diaphragmatic fatigue in humans. *J Appl Physiol* 54:1353-1360.
- Filippi GM, Errico P, Santarelli R, Bagolini B, Manni E. 1993. Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta Otolaryngol* 113:400-404.
- Ge W, Khalsa PS. 2003. Encoding of compressive stress during indentation by group III and IV muscle mechano-nociceptors in rat gracilis muscle. *J Neurophysiol* 89:785-792.
- Giladi N. 1997. The mechanism of action of botulinum toxin type A in focal dystonia is most probably through its dual effect on efferent (motor) and afferent pathways at the injected site. *J Neurol Sci* 152:132-135.
- Goodwin GM, McCloskey DI, Mitchell JH. 1972. Cardiovascular and respiratory responses to changes in central command during isometric exercise at constant muscle tension. *J Physiol* 226:173-190.
- Hagbarth KE, Eklund G. 1966. Tonic vibration reflexes (TVR) in spasticity. *Brain Res* 2:201-203.
- Hnik P, Holas M, Krekule I, Kuriz N, Mejsnar J, Smiesko V, Ujec E, Vyskocil F. 1976. Work-induced potassium changes in skeletal muscle and effluent venous blood assessed by liquid ion-exchanger microelectrodes. *Pflugers Arch* 362:85-94.
- Holds JB, Fogg SG, Anderson RL. 1990. Botulinum A toxin injection. Failures in clinical practice and a biomechanical system for the study of toxin-induced paralysis. *Ophthalmol Plast Reconstr Surg* 6:252-259.
- Hott JS, Dalakas MC, Sung C, Hallett M, Youle RJ. 1998. Skeletal muscle-specific immunotoxin for the treatment of focal muscle spasm. *Neurology* 50:485-491.

- Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK. 1979. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci* 25:171-179.
- Iwamoto GA, Botterman BR. 1985. Peripheral factors influencing expression of pressor reflex evoked by muscular contraction. *J Appl Physiol* 58:1676-1682.
- Iwamoto GA, Waldrop TG, Kaufman MP, Botterman BR, Rybicki KJ, Mitchell JH. 1985. Pressor reflex evoked by muscular contraction: contributions by neuraxis levels. *J Appl Physiol* 59:459-467.
- Jamnes Y, Arbogast S, De Troyer A. 2000. Response of the rabbit diaphragm to tendon vibration. *Neurosci Lett* 290:85-88.
- Jamnes Y, Balzamo E. 1992. Changes in afferent and efferent phrenic activities with electrically induced diaphragmatic fatigue. *J Appl Physiol* 73:894-902.
- Kao FF, Michel CC, Mei SS, Li WK. 1963. Somatic afferent influence on respiration. *Ann N Y Acad Sci* 109:696-711.
- Kaufman MP, Hayes SG. 2002. The exercise pressor reflex. *Clin Auton Res* 12:429-439.
- Kaufman MP, Iwamoto GA, Longhurst JC, Mitchell JH. 1982. Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with ending in skeletal muscle. *Circ Res* 50:133-139.
- Kaufman MP, Rybicki KJ. 1987. Discharge properties of group III and IV muscle afferents: their responses to mechanical and metabolic stimuli. *Circ Res* 61:160-165.
- Kaufman MP, Waldrop TG, Rybicki KJ, Ordway GA, Mitchell JH. 1984. Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents. *Cardiovasc Res* 18:663-668.
- Kenagy J, VanCleave J, Pazdernik L, Orr JA. 1997. Stimulation of group III and IV afferent nerves from the hindlimb by thromboxane A<sub>2</sub>. *Brain Res* 744:175-178.
- Khan MH, Sinoway LI. 2000. Muscle reflex control of sympathetic nerve activity in heart failure: the role of exercise conditioning. *Heart Fail Rev* 5:87-100.
- Krogh A, Lindhard J. 1913. The regulation of respiration and circulation during the initial stages of muscular work. *J Physiol* 47:112-136.
- Laurin J, Dousset E, Decherchi P. 2010. Modulation of the spinal excitability by muscle metabosensitive afferent fibers. *J Neurosci Res* 88:2755-2764.
- Laurin J, Dousset E, Mesure S, Decherchi P. 2009. Neuromuscular recovery pattern after medial collateral ligament disruption in rats. *J Appl Physiol* 107:98-104.
- Legerlotz K, Matthews KG, McMahon CD, Smith HK. 2009. Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 39:472-479.
- Light AR, Huguen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z, Lee J. 2008. Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol* 100:1184-1201.
- Lim EC, Seet RC. 2010. Use of botulinum toxin in the neurology clinic. *Nat Rev Neurol* 6:624-636.
- Marinelli S, Luvisetto S, Cobiainchi S, Makuch W, Obara I, Mezzaroma E, Caruso M, Straface E, Przewlocka B, Pavone F. 2010. Botulinum neurotoxin type A counteracts neuropathic pain and facilitates functional recovery after peripheral nerve injury in animal models. *Neuroscience* 171:316-328.
- Marqueste T, Decherchi P, Dousset E, Berthelin F, Jamnes Y. 2002. Effect of muscle electrostimulation on afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Neuroscience* 113:257-271.
- Martin V, Dousset E, Laurin J, Gondin J, Gautier M, Decherchi P. 2009. Group III and IV muscle afferent discharge patterns after repeated lengthening and shortening actions. *Muscle Nerve* 40:827-837.
- Matak I, Bach-Rojecky L, Filipovic B, Lackovic Z. 2011. Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience* 186:201-207.
- McCloskey DI, Mitchell JH. 1972. Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol* 224:173-186.
- Mense S, Prabhakar NR. 1986. Spinal termination of nociceptive afferent fibres from deep tissues in the cat. *Neurosci Lett* 66:169-174.
- Mense S, Stahnke M. 1983. Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat. *J Physiol* 342:383-397.
- Meyer-Lohmann J, Riebold W, Robrecht D. 1974. Mechanical influence of the extrafusal muscle on the static behaviour of deafferented primary muscle spindle endings in cat. *Pflügers Arch* 352:267-278.
- Mitchell JH, Reardon WC, McCloskey DI. 1977. Reflex effects on circulation and respiration from contracting skeletal muscle. *Am J Physiol* 233:H374-H378.
- Murphy MN, Mizuno M, Mitchell JH, Smith SA. 2011. Cardiovascular regulation by skeletal muscle reflexes in health and disease. *Am J Physiol* 301:H1191-H1204.
- Piepoli M, Clark AL, Coats AJ. 1995. Muscle metaboreceptors in hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in men. *Am J Physiol* 269:H1428-H1436.
- Prior BM, Ploutz-Snyder LL, Cooper TG, Meyer RA. 2001. Fiber type and metabolic dependence of T<sub>2</sub> increases in stimulated rat muscles. *J Appl Physiol* 90:615-623.
- Priori A, Berardelli A, Mercuri B, Manfredi M. 1995. Physiological effects produced by botulinum toxin treatment of upper limb dystonia. Changes in reciprocal inhibition between forearm muscles. *Brain* 118:801-807.
- Purkiss J, Welch M, Doward S, Foster K. 2000. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol* 59:1403-1406.
- Purkiss JR, Welch MJ, Doward S, Foster KA. 1997. Capsaicin stimulates release of substance P from dorsal root ganglion neurons via two distinct mechanisms. *Biochem Soc Trans* 25:542S.
- Reid MB. 1996. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol Sci* 11:114-119.
- Rizo J, Sudhof TC. 1998. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Biol* 5:839-842.
- Rizo J, Sudhof TC. 2002. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3:641-653.
- Roll JP, Vedel JP, Ribot E. 1989. Alteration of proprioceptive messages induced by tendon vibration in man: a microneurographic study. *Exp Brain Res* 76:213-222.
- Rotto DM, Kaufman MP. 1988. Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol* 64:2306-2313.
- Rowell S, Loring B, Shepherd J. 1996. Exercise: regulation and integration of multiple systems. In: Press OU, editor. *Handbook of physiology*. Bethesda, MD: American Physiological Society.
- Rybicki KJ, Waldrop TG, Kaufman MP. 1985. Increasing gracilis muscle interstitial potassium concentrations stimulate group III and IV afferents. *J Appl Physiol* 58:936-941.
- Smith ES, Omerbasic D, Lechner SG, Anirudhan G, Lapatsina L, Lewin GR. 2011. The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat. *Science* 334:1557-1560.
- Thimm F, Baum K. 1987. Response of chemosensitive nerve fibers of group III and IV to metabolic changes in rat muscles. *Pflügers Arch* 410:143-152.
- Varejao AS, Cabrita AM, Patricio JA, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Melo-Pinto P, Couto PA, Meek MF. 2001. Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: gait kinematics. *Microsurgery* 21:383-388.

- Verderio C, Grumelli C, Raiteri L, Coco S, Paluzzi S, Caccin P, Rossetto O, Bonanno G, Montecucco C, Matteoli M. 2007. Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* 8:142-153.
- Victor RG, Bertocci LA, Pryor SL, Nunnally RL. 1988. Sympathetic nerve discharge is coupled to muscle cell pH during exercise in humans. *J Clin Invest* 82:1301-1305.
- Vinogradova OL, Popov DV, Tarasova OS, Bravyi YR, Missina SS, Bersenev EY, Borovik AS. 2012. Ergoreflex: the essence and mechanisms. *Hum Physiol* 38:665-674.
- von Düring M, Bauersachs M, Bohmer B, Veh RW, Andres KH. 1990. Neuropeptide Y- and substance P-like immunoreactive nerve fibers in the rat dura mater encephali. *Anat Embryol* 182:363-373.

## **II. La récupération neuromusculaire suite à une injection de BoNT/A.**

L'objectif principal de cette deuxième étude était d'enregistrer l'activité des afférences métabosensibles et mécanosensibles chez des animaux ayant partiellement et totalement récupéré leur fonction locomotrice après injection de toxine botulique et de vérifier si la toxine avait des effets à long terme sur le fonctionnement de la boucle sensorimotrice.

Les propriétés contractiles musculaires, la réponse des afférences mécanosensibles aux vibrations tendineuses et la réponse des afférences III et IV aux injections de KCl et d'AL, et à la FIE ont été mesurées. A la fin de l'expérimentation, le muscle a été prélevé et son atrophie a été évaluée.

Les résultats indiquent:

- une perte de force dans le groupe B0 et un retour aux valeurs contrôles dans le groupe B100,
- une diminution de la réponse des afférences métabosensibles à la FIE dans le groupe B0 ainsi qu'une diminution de la réponse aux injections d'AL,
- une altération de la réponse des afférences métabosensibles aux injections de KCl uniquement dans le groupe B100 et aux injections d'AL dans les 3 groupes ayant reçu la toxine botulique,
- une altération de la réponse des afférences mécanosensibles aux vibrations dans les groupes B0 et B50.
- une atrophie musculaire significative dans les groupes B0 et B50.

Ces résultats indiquent que la toxine botulique entraîne des altérations des réponses des afférences musculaires qui persistent même lorsque le muscle semble avoir récupéré ses capacités motrices et contractiles.



# Long-Term effects of Botulinum Toxin Complex Type A Injection on Mechano- and Metabo-Sensitive Afferent Fibers Originating from *Gastrocnemius* Muscle

Guillaume CARON, Tanguy MARQUESTE, Patrick DECHERCHI✉

Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)  
UMR 7287 « Institut des Sciences du Mouvement : Etienne-Jules MAREY » (ISM-EJM)  
Equipe « Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire »  
Parc Scientifique et Technologique de Luminy  
Faculté des Sciences du Sport de Marseille  
CC910 - 163 Avenue de Luminy  
F-13288 Marseille cedex 09, France

✉ **Correspondence:**

**Patrick DECHERCHI**

Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)  
UMR 7287 « Institut des Sciences du Mouvement : Etienne-Jules MAREY » (ISM-EJM)  
Equipe « Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire »  
Parc Scientifique et Technologique de Luminy  
Faculté des Sciences du Sport de Marseille  
CC910 - 163 Avenue de Luminy  
F-13288 Marseille cedex 09, France

**E-mail:** [patrick.decherchi@univ-amu.fr](mailto:patrick.decherchi@univ-amu.fr)

**Tel./Fax:** +33 (0)4-91-82-84-14

**Web site:** [www.ism.univ-amu.fr](http://www.ism.univ-amu.fr)

**Running title:** *Afferent discharges and botulinum toxin type A.*

**Key words:** Afferent, Electrophysiology, Rat, *Clostridium botulinum*, Neurotoxin, Sensorimotor

Total word count: 7590

No conflict of interest.

## **Abstract**

The aim of the present study was to investigate long term effects of motor denervation by botulinum toxin complex type A (BoNT/A) from *Clostridium Botulinum*, on the afferent fibers originating from the *gastrocnemius* muscle of rats. Animals were divided in 2 experimental groups: 1) untreated animals acting as control and 2) treated animals in which the toxin was injected in the left muscle, the latter being itself divided into 3 subgroups according to their locomotor recovery with the help of a test based on footprint measurements of walking rats: i) no recovery (B0), ii) 50% recovery (B50) and iii) full recovery (B100). Then, muscle properties, metabosensitive afferent fiber responses to potassium chloride (KCl) and lactic acid injections and Electrically-Induced Fatigue (EIF), and mechanosensitive responses to tendon vibrations were measured. At the end of the experiment, rats were killed and the toxin injected muscles were weighted. After toxin injection, we observed a complete paralysis associated to a loss of force to muscle stimulation and a significant muscle atrophy, and a return to baseline when the animals recover. The response to fatigue was only decreased in the B0 group. The responses to KCl injections were only altered in the B100 groups while responses to lactic acid were altered in the 3 injected groups. Finally, our results indicated that neurotoxin altered the biphasic pattern of response of the mechanosensitive fiber to tendon vibrations in the B0 and B50 groups. These results indicated that neurotoxin injection induces muscle afferent activity alterations that persist and even worsen when the muscle has recovered his motor activity.

**Key words:** Muscular afferents, Electrophysiology, Rat, *Clostridium botulinum*, Neurotoxicity.

## 1. INTRODUCTION

*Botulinum* toxin complex type A (BoNT/A) is currently used to treat numerous medical conditions such as dystonia, neuromuscular disorders or pain. Its effects start between 2 and 5 days after injections and are maintained between 3 and 6 months [1]. BoNT/A exerts its action by preventing the exocytosis of acetylcholine vesicles at the neuromuscular junction eliciting flaccid paralysis [2,3]. Furthermore, BoNT/A induces central alterations [4-6] such as inhibition of glutamate [7], substance P [8,9], calcitonin gene related peptide (CGRP) [9,10] and to a lesser extent gamma-aminobutyric acid (GABA) release [11]. Those central changes could be due to indirect action of the toxin (decrease of the postsynaptic element activation following the decrease in presynaptic element activation) or to the toxin retrograde transport to the spinal cord (SC) and transcytosis [12-14].

BoNT/A also prevents acetylcholine releases by  $\gamma$ -motor endings in intrafusal muscle fibers [15,16]. The lack of  $\gamma$ -motor endings discharge in the injected muscle induce an intrafusal muscle fiber relaxation and then a decrease of afferent (Ia and II) inputs originating from spindles. At the spinal level, these changes reduce the direct excitation of agonist motoneurons and the indirect inhibition of antagonist motoneurons leading to a larger relaxation of agonist muscle (BoNT/A treated)[17]. Thus, the BoNT/A alters the central adjustments by mechanosensitive (Ia and II from muscle spindle and Ib from Golgi tendon organ)[18] and metabosensitive (III and IV) muscle afferent fibers [19]. Ia afferents detect muscle length and velocity while II afferents are mainly sensitive to instantaneous changes in muscle length [18,20]. Ib afferents are sensitive to forces variations [21-23]. Muscle afferent fibers from groups III and IV detect change in muscle metabolism [24,25] and in intramuscular pressure [26]. They are selectively stimulated during and after muscle fatigue [27] or by different agents such as bradykinin, capsaicin [28], lactic acid,  $H^+$  [25,29], arachidonic acid, prostaglandin [25], thromboxane A2 [30] and potassium chloride [31,32].

In a recent paper, we show that BoNT/A induces alterations in mechano- and metabosensitive afferent fibers when the muscle is to its paralysis apogee [19]. However, data are missing when the toxin is degraded and during muscle recovery.

The main purpose of the present study was to measure, over recovery time, the effects of *gastrocnemius* BoNT/A injection on afferent fibers involved in the sensorimotor loop. The muscle afferent discharges from groups III and IV were recorded after direct electrical muscle stimulation inducing fatigue and intra-arterial injections of potassium chloride or lactic acid while the mechanosensitive afferents discharges were recorded after tendon vibrations. The muscle properties (muscle weight, tetanus threshold, twitch amplitude and Fatigue Index) were also measured.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals.

Twenty seven adult male Sprague Dawley rats, weighting 300-400g (Centre d'Élevage Roger Janvier<sup>®</sup>, Le Genest Saint Isle, France), were housed in smooth-bottomed plastic cages at 22 °C with a 12-h light/dark cycle. Food (Safe<sup>®</sup>, Augy, France) and water were available *ad libitum*. An acclimation period of 1 week was allowed before the initiation of the experiment. Animals were randomized in 2 experimental groups: 1) untreated animals acting as control (Control, n=6) and 2) treated animals in which the toxin was injected in the left muscle, the latter being itself divided into 3 subgroups according to their locomotor recovery with the help of a test based on footprint measurements of walking rats: i) no recovery (B0, n=9, twelve days post-injection), ii) 50% recovery (B50, n=7) and iii) full recovery (B100, n=5).

### 2.2. Ethical approval.

Anesthesia and surgery were performed according to the French law on animal care guidelines. The Animal Care Committees of *Aix-Marseille Université* (AMU) and *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) approved our protocols. Individual conducting researches were listed in the authorized personnel section of the animal research protocol or added to a previously approved protocol (license n°A 13.013.06). Furthermore, experiments were performed following the recommendations provided in the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health) and in accordance with the European Community's council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Animals did not present clinical sign of pain or unpleasant sensation (i.e. screech, prostration, hyperactivity, anorexia) and no paw-eating behavior were observed through the study.

### 2.3. Toxin injection procedure.

Animals from B0, B50 and B100 groups were anesthetized by an intra-muscular injection of solution containing a ternary mixture [5 ml of ketamine, (100 mg/kg, Virbac<sup>®</sup>, Carros, France); 2.5 ml of largactyl (1.2 mg/kg, Avensis<sup>®</sup>, Paris France); 2 ml of domitor (20 mg/kg, Novartis<sup>®</sup>, Mississauga, Canada); 0.1 ml/100 g of body weight, IM]. Lyophilized botulinum toxin complex type A (Dysport 500<sup>®</sup>, Beaufour Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, France) was extemporarily reconstituted in normal saline solution to obtain a 15 U.ml<sup>-1</sup> solution. BoNT/A solution was injected in the inferior and superior parts of the two left *gastrocnemius* muscle heads (i.e., 4 injections per rat = 2 injections in the lateral and 2 injections medial muscle heads). Each animal received a total of 15 U.kg<sup>-1</sup> in order to ensure a full neurotransmitter release blockage [33-35]. As previously described, effects of this toxin start between 2 and 5 days after injection and are maintained between 3 and 6 months [1]. Furthermore, it was also described that functional loss was still maximal at the twelfth day [19].

### 2.4. Functional assessment of hind limb loss.

All the animals were familiarized to go through a walking track apparatus (150 cm long, 9 cm wide and 40 cm high) that was used to perform the functional tests during the pre-surgical week. Briefly, all the animals were conditioned to walk homogeneously into the recording apparatus three times per day and five days during the week before surgery. Heavy lighting was provided with two 500 W spots and a dark box was positioned at the chamber's end to promote walking. The Sciatic Functional Index (SFI) was calculated with the formula [-38.3(ePL-

nPL)/nPL+109.5(eTS-nTS)/nTS+13.3(eIT-nIT)/nIT-8.8] adapted by Varejao et al., [36] from the Peroneal Functional Index [37-39] to evaluate the functional integrity of the sciatic nerve based on footprint measurements of walking rats. Footprint's length (PL, or longitudinal distance between the tip of the longest toe and the heel), total toes spreading (TS, or cross-sectional distance between the first and fifth toes) and intermediate toe spread (IT, distance between the second and fourth toes) are the main factors altered by blocking release of acetylcholine at the neuromuscular junction due to motor loss of the toe flexor, foot plantarflexor and everters. In order to do so, the animal hind feet were dipped into Chinese ink (Swop-Pads<sup>®</sup>, Trodat, France) and the footprints were recorded on paper track and manually analysed. The normal/uninjected (n, right) footprints and the contralateral experimental/injected (e, left) footprints were compared. The loss rate of the SFI was defined on a score of -100 to 0, where 0 (perfect symmetry) to -20 represents a normal function and -100 a total failure. Footprints were obtained on a daily, weekly or monthly basis and analysed from the injection day (before injection) to the day when the wished functional recovery was obtained (no recovery, 50% recovery and full recovery).

## 2.5. Electrophysiological recordings.

At the end of the functional assessment period, rats were anesthetized with urethane (1.1 g.kg<sup>-1</sup> i.p.), and atropine (1 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) was administered to reduce airway secretions. Animals were tracheotomized and artificially ventilated (Harvard<sup>®</sup> volumetric pump: rate 40-60 min<sup>-1</sup>, tidal volume 2-4 ml; Southmatick, MA USA). Animal temperature was maintained between 36-37°C with a blanket controlled by rectal temperature probe. A polyethylene catheter was inserted into the right femoral artery from the non-injected hindlimb and pushed up to the fork of the abdominal aorta in order to transport supplemental dose of anaesthetic and chemicals (i.e., potassium chloride [KCl] and lactic acid [LA]) to the controlateral muscle. This catheter was positioned in order to let the blood flow freely to the left lower limb muscles. Animals were positioned in ventral *decubitus*. Dissection at the middle thigh level was carried out to expose the right common sciatic nerve. With microsurgical techniques and an operating microscope (x40, MZ75<sup>®</sup>, Leica, Heerbrugg, Switzerland), a longitudinal incision was made along the lateral thigh and upper leg. Then, the tibial nerve, a branch of the sciatic nerve, was dissected free from surrounding tissues over a 20 mm length and immersed in paraffin oil to avoid dehydration. Two tungsten stimulating electrodes (inter-electrode distance: 4-5 mm) were placed to the surface of the *gastrocnemius* muscle. The nerve was cut and pair of cuff electrodes was placed on the proximal tibial nerve end for stimulation or recordings. The ankle and the knee were firmly held by clamps on a horizontal support in order to avoid disturbing movements and to maintain the 90°knee and ankle joint angle during electrical nerve stimulations.

*Twitch contraction and tetanus threshold measurements.* The contractile response of the *gastrocnemius* to nerve or muscle stimulation (twitch contraction, which is a reflection of the tension generated in the muscle) was obtained with a neurostimulator (Grass S88K<sup>®</sup>, Grass Technologies, Natus Neurology Inc., Warwick, Rhode Island, USA) delivering single rectangular pulses (duration: 0.1 ms, frequency 0.5 Hz) through an isolation unit and measured with an isometric strain gauge (Micromanometer 7001<sup>®</sup>, Ugo Basile SRL, Comerio VA, Italy) fixed to the distal part of the *gastrocnemius* tendon (calcaneum tendon). The intensity of the stimulation was increased until the maximal response was found. Twitch contraction was recorded with Biopac MP150<sup>®</sup> system (sampled at 2000 Hz, filtered with Low Pass at 150 Hz) and analyzed (AcqKnowledge<sup>®</sup> 3.7.3 software) in terms of peak amplitude (A in Newton, N).

Then, the tetanus threshold, defined as the frequency from which we observed a sustained contraction with no relaxation between twitches, was recorded. After determining a threshold able to elicit a twitch, pulse train intensity was set to a supramaximal level. Tetanic threshold

was obtained by increasing frequency by 5 Hz steps. The voltage was 20% higher than the voltage evoking a maximal twitch. The duration of stimulus trains was 500 ms, and trains were repeated each second to produce a series of contractions. Pulse duration was 2 ms and five single stimulations were delivered in each 500 ms train (10 Hz).

*Electrically-induced fatigue.* Half an hour of rest after the last stimulations used to evoke twitch and tetanus contractions, a 3-min electrically-induced muscle fatigue (EIF) was performed. For this purpose, rhythmic muscle contractions were produced by the neurostimulator (Grass S88K<sup>®</sup>) delivering rectangular pulse trains to the pair of electrodes placed on the muscle surface (pulse duration: 0.1 ms; frequency: 10 Hz, i.e., 5 shocks in each 500 ms train; duty cycle: 500/1000 ms, voltage range: 5 to 8 volts). The voltage was supramaximal, i.e., +20 % higher than that used to elicit a maximal twitch contraction. Muscle strength was recorded from the beginning to the end of muscle electrical stimulation with the isometric strain gauge (Micromanometer 7001<sup>®</sup>) and fatigue was assessed from the decay of force throughout the 3-min EIF period. Thus, the fatigue index (FI), defined conventionally as the percentage of the force lost at the end of the 3-min EIF trial, was calculated [40,41].

*Metabosensitive afferent recordings.* Furthermore, during repetitive muscle stimulation, the response of muscle afferent fibers from groups III and IV was also recorded (Biopac MP150<sup>®</sup> and AcqKnowledge<sup>®</sup> software). The neural signals were amplified (10 to 100 K) and filtered (filtered with Low Pass at 150 Hz) with a differential amplifier (P2MP<sup>®</sup> SARL, Marseille, France) and referred to a ground electrode implanted in a nearby muscle. Signals were fed into pulse window discriminators (P2MP<sup>®</sup> SARL, Marseille, France) which simultaneously analyzed afferent spikes. The output of these discriminators provided noise-free tracings (discriminated units) which were computed using data analysis system (Biopac AcqKnowledge<sup>®</sup> software). Before applying stimulus known to activate the afferent fibers from group III and IV, a baseline recording ( $F_{\text{impulses}} \cdot s^{-1}$ ) was achieved to ensure that the discharge rate remained stable. The recording was considered suitable only if the fluctuation of baseline impulse activity ranged between 100-103%. Consequently, changes in firing rate were related only to the stimuli applied and not to environmental conditions. The discharge rate was averaged over a 1-min period preceding EIF (baseline activity), and its change was measured during the first minute period following stimulation. Thus, changes were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge rate; i.e. baseline discharges corresponded to 100%.

After a period of rest of one hour, KCl (0.5 ml; 1, 5, 10, and 20 mM) and LA (0.1 ml; 0.5, 1, 2, and 3 mM) were randomly injected into the contralateral artery while nerve discharge was continuously recorded. The injections, which required 5-10 s to be completed, were washed with 0.1 ml of normal saline. Baseline afferent activity was averaged on 1 min long period pre- and post-injection. The post-stimulus discharge firing rate was compared to the corresponding baseline discharge rate and variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge firing rate. There was a 10 min delay between each injection in order to let the afferent activity go back to its baseline activity. Thus, like in a previous study [19,27] the dose/response curves to KCl and LA from femoral nerve were drawn.

*Mechanosensitive afferent recordings.* Muscle mechanosensitive fibers are activated by tendon vibration without activating group muscle metabosensitive afferents [42] in a range of 10-100 Hz [27,43], depending on the animal species and also on application through the skin or directly on the muscle tendon. Static spindle afferents (type II) and also Golgi tendons organs (type Ib, 50% are discharging with no volunteer contraction) are activated by low-frequency vibrations, whereas dynamic spindle afferents (type Ia) are activated by high-frequency

vibrations [44]. Rectangular shocks were delivered perpendicularly to the longitudinal muscle axis on calcaneal tendon by a mechanical vibrator (Ling Dynamic System<sup>®</sup>, LDS group, Herfordshire, U.K) connected to a frequency generator (GenTrad Function Generator GF763AF, ELC<sup>®</sup>, Annecy, France). Vibrations were applied for 5-sec periods and frequency was increased step-by-step from 10 to 100 Hz, with 5-sec rest between each step, while the discharge of afferent units was recorded. The maximal mechanosensitive afferents discharge rate elicited by tendon vibrations was considered as the reference discharge rate (100%). The discharge rate induced by the others frequencies of vibrations were expressed in percentage of the corresponding reference discharge rate.

## **2.6. Muscle atrophy.**

At the end of the electrophysiological recordings, all rats were killed by a 3 ml intra-arterial overdose of pentobarbital sodium solution (Pentobarbital Sodique<sup>®</sup>, 0.6 g.kg<sup>-1</sup> Sanofi Santé Animal, Sanofi France, Paris France). Left *gastrocnemius* muscles were harvested and immediately weighted on a precision scale (Navigator<sup>™</sup> N30330 model, OHAUS Corp., Parsippany, NJ, USA). Muscle mass was measured using a muscle weight/body weight ratio and atrophy was evaluated by comparing to the Control group ratio.

## **2.7. Statistics.**

Data processing was performed using a software program (SigmaStat<sup>®</sup> 2.03, Statistical software, San Jose, CA, USA). Data were expressed as mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM).

For functional assessments, data concerning each animal were individually identified, in order to allow follow-up over time. Differences were tested by two-way repeated analysis of variance (ANOVA test, factors: group x timing) completed by a Student-Newman-Keuls *post-hoc* test to compare the SFI score, the effect of EIF and drug injections on metabosensitive afferent discharges, mechanosensitive afferent discharges to tendon vibrations and the muscle properties in the different groups. Finally, the intergroup comparison of the percentage of mechanosensitive fibers responding to mechanical vibration was examined with a Chi square test ( $\chi^2$ ).

Results were considered statistically significant if the p-value fell below 0.05.

# **3. RESULTS**

## **3.1. Functional assessment of hindlimb locomotor property.**

In the B0 group, measurement of the SFI indicated that functional loss started the first day post-injection, reached a minimal value the third day and remained at this minimum until the twelfth day (when electrophysiological recordings were performed). As previously shown [19], this functional score was significantly lower ( $p < 0.001$ ) than those recorded before injection or in Control group. No difference was observed with the B50 and B100 groups. In the B50 and B100, a functional recovery was observed at the 60<sup>th</sup> day post-injection. In the B50 group, animals reached a mean score of  $-47.47 \pm 0.57$  after  $128.43 \pm 7.43$  days. In the B100 group, animals reached a mean score of  $-18.78 \pm 3.23$  after  $371.83 \pm 24.82$  days.



### 3.2. Muscle properties.

Intergroup comparison indicated that there is a significant differences ( $p < 0.001$ ) in twitch amplitude, tetanus threshold, fatigue index (FI), muscle weight and muscle weight/body weight ratio.

In the B0 (twelve days after the injection), the electrical stimulation applied on tibial nerve did not elicit a muscle contraction (in a voltage range known to induce one). However, muscle stimulation induced a twitch with an amplitude significantly lower ( $p < 0.001$ ) than that of Control group. The tetanus threshold was also lower ( $p < 0.05$ ) than that of Control group. The FI obtained during the 3-min EIF (10 Hz) was not different than the Control group but significantly higher than the FI obtained in the B50 ( $p < 0.001$ ) and B100 ( $p < 0.01$ ) groups. Finally, the left muscle weight and the muscle weight/body weight ratio were significantly lower ( $p < 0.001$ ) than the Control group, indicating a muscle atrophy.

In the B50 group, muscle stimulation elicited a muscle contraction with a lower amplitude ( $p < 0.01$ ) than that of the Control group. The FI was significantly lower than that of the Control ( $p < 0.01$ ) and B0 ( $p < 0.001$ ) groups. Finally, the left muscle weight and the muscle weight/body weight ratio were significantly lower than that of the Control ( $p < 0.001$ ). The ratio was also significantly lower ( $p < 0.01$ ) than that of the B0 group.

In the B100 group, muscle stimulation elicited a twitch similar to Control group and significantly higher ( $p < 0.01$ ) than that of the B0 and B50 groups. The tetanus threshold was only different than that of the B0 ( $p < 0.05$ ) group. The FI was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than that of the Control and B0 groups. Finally, the left muscle weight was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than that of the B0 and B50 groups. However, the muscle weight/body weight ratio was always significantly lower ( $p < 0.001$ ) than that of the Control group but became higher ( $p < 0.001$ ) than that of the B50 group indicating a slight muscle mass recovery.

Numerical data concerning these parameters are presented in **Table 1**.

### 3.3. Metabosensitive afferent responses.

Muscle afferent fibers identified as metabosensitive fibers have spontaneous tonic low frequency baseline activity (4-10 Hz) under our experimental conditions. After potassium chloride (KCl) or lactic acid (LA) injections, or electrically-induced fatigue (EIF) an increase of the baseline tonic activity was observed.

*Responses to electrically-induced fatigue (EIF).* The metabolites release by the repetitive stimulation in the muscle interstitium activated muscle free afferent endings. Thus, animals from all groups exhibited a significant ( $p < 0.001$ ) increase in afferent discharge frequency after a 3-min stimulation of the *gastrocnemius* muscle. The activation of muscle afferents was immediate when the stimulation stopped, and persisted during 3 min with a maximal response in the 2 first minutes. Intergroup comparison indicated that there is a significant ( $p < 0.001$ ) difference between groups. Data indicate that the mean discharge rate was significantly ( $p < 0.001$ ) lower in B0 group compared to the 3 other groups (**Figure 1**).

*Responses to chemical injections.* The pattern of responses of metabosensible afferent fibers from groups III and IV to chemical stimuli consisted of a burst of discharge beginning within 5-10 s after the bolus injection and a return to baseline values within the 3 next minutes. In a previous experiment performed in the *Tibialis anterior* muscle of Sprague-Dawley rats, we showed there was a relationship between the doses of KCl and the change in afferent discharge rate, whereas the activation of muscle afferents by LA culminated for the 1 mM concentration,



and then declined [27]. Here, we showed that the *gastrocnemius* afferent fibers patterns of response were similar when KCl (**Figure 2A**) and LA (**Figure 2B**) were injected in the blood vessel irrigating the muscle. Significant ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ) increases in afferent discharge frequency, as compared to baseline recording, were observed in the Control and BoNT/A injected animals from B0 and B50 groups at all concentrations of KCl or LA solution tested.

Intergroup comparison indicated that there is a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the KCl curve dose response between groups. In the B100 group, KCl injections did not induce a significant discharge rate increase compared to baseline. Compared to the respective concentrations of the other groups, the responses were significantly ( $p < 0.05$ ) lower for 1 mM, 5 mM, 10 mM and 20 mM.

Intergroup comparison indicated that there is a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the LA curve dose response between groups. At the dose of 1 mM, the afferent response was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in the B0 and B50 groups compared to Control group. Furthermore, the B100 group exhibited a lowered response for the 1 mM compared to the Control ( $p < 0.001$ ), B0 ( $p < 0.01$ ) and B50 ( $p < 0.05$ ) groups.

### 3.4. Mechanosensitive afferent responses.

*Calcaneal* tendon vibrations resulted in an abrupt increase in the mechanosensitive afferent discharge frequency, which persisted throughout the tendon vibration period. In Control group, the rate of firing units was non-linearly related to the frequency of vibration, i.e., changes in afferent discharge evoked by vibration were bimodal with peaks measured at 40 and 80 Hz (**Figure 3**). Thus, as previously described for the *tibialis anterior* muscle [27], two populations of muscle afferents were identified in our Control group with respect to the frequency of vibration giving an optimal activation; 66% and 34% of the units responding below and over 50 Hz, respectively. In the B0 group, these proportions were 22% and 78% while in B50 and B100 groups they were equally distributed below and above 50 Hz. When we consider the response to vibration frequencies only lower than 50 Hz, the maximal response was observed at 40 Hz (Control, B50 and B100 groups) and 50 Hz (B0 group). This maximal response was at 70 Hz (B0 and B50 groups) and 80 Hz (Control and B100 groups) for units responding maximally at frequencies higher than 50 Hz.

## 4. DISCUSSION

Previously, we demonstrated that responses of mechano- and metabosensitive afferent fibers were rapidly altered after full motor denervation, occurring within 12 days after a single injection of botulinum toxin complex type A from *Clostridium Botulinum* [19]. The experiment described in the present paper was a continuation of this previous work, and was designed to study if alterations of the mechano- and metabosensitive afferent fibers persist after toxin recovery, when locomotor function was partially and fully restored with a follow-up over many months.

Recording of afferent activities at rest and after use of specific activators indicate that neurotoxin induce long lasting changes in mechano- and metabosensitive responses despite paralysis recovery. Indeed, after half recovery (B50 group), the mechanosensitive response to tendon vibrations was still altered and the metabosensitive response was not recovered for KCl and LA injections but was exaggerated for EIF. Furthermore, in the B100 group, in which we observed a full locomotor and muscle mass recovery, the metabosensitive responses to KCl and LA were even more degraded than those of the B0 and B50 groups, and the response to EIF was still excessive. Thus, our results point out that efferent recovery is not always associated with

afferent recovery.

In our study, the half and full recovery occurred at  $128.43 \pm 7.43$  and  $371.83 \pm 24.82$  days after a  $15 \text{ U.kg}^{-1}$  BoNT/A injection, respectively. This recovery time is consistent with data reported in the literature. Indeed, Sloop et al. studied the human muscle paralysis resulting from intramuscular injections of BoNT/A by measuring the *extensor digitorum brevis* M-wave amplitude after injection with 17 different doses of toxin (from 1.25 to 480 units) in healthy volunteers [45]. Two weeks post-injection, the maximal paralysis was 70 to 80% with 7.5 to 10U and at 57 weeks post-injection 22% of the original muscle paralysis was still present. In a rat model, Ma et al. reported that muscle mass, motor evoked potential and muscle force were significantly reduced during 1-2 weeks after injection of BoNT/A into the *gastrocnemius* muscle at the dose of 6 units/kg body weight but returned to nearly normal at 6 months post-injection and that the neuromuscular junction morphometry normalized at 1 year [46]. Finally, Billante et al. reported that the percentage of neuromuscular transmission was around 35% at the 200<sup>th</sup> day after injection of a dose of 10U in the *gastrocnemius* muscle of rat [35]. Duration of the toxin action is mainly determined by the life-time of the toxin's light chain in the cytosol. In the present experiment, the presence of the toxin in the cytosol of terminals innervating the *gastrocnemius* muscle appears to be at least 1 year.

#### 4.1. Muscle properties.

It was previously reported that toxin recovery depend of different factors such as the rate of toxin degradation within poisoned nerve terminals, the rate of repair of the poisoned nerve terminals, the rate of new (non-poisoned) nerve terminal growth, recruitment of resting nerve terminals that escaped poisoning and a return of normal muscle mass [47]. In the B100 group, only the muscle weight/animal weight ratio remain lower than the Control group indicating that muscle mass recovery was not linearly related to the animal weight gain over time, i.e., the animal weight increasing faster than the injected muscle.

The muscle fibers of the *gastrocnemius* are mostly type II fast-twitch fibers that have an anaerobic metabolism used to create short bursts of strength and are prone to rapid fatigue [48,49]. The fall of the FI values over time should indicated a phenotype switch toward a less fast phenotype. However, the tetanus threshold and strength decreased for B50 and returned to value similar to Control when the recovery was full. These results are in accordance with previous studies showing a switch from IIb to IIa/x muscle fibers (i.e. a slight slowing of muscle contraction) associated with muscle atrophy and a reduction of force output after BoNT/A injection [50,51]. Because a higher oxidative activity for IIa/x compared to I muscle fibers was previously shown in the rat [52], this switch induces both a greater strength and fatigue resistance. BoNT/A injection impaired acetylcholine release at the neuromuscular junction leading to partial or full muscle paralysis that induces changes in contractile material and decrease in muscle cell cross sectional area. As previously suggested, changes in muscle phenotype and decrease in motor inputs (and motor units recruitment) lead to reduce muscle strength [53].

All explanations based on aging process should be excluded because the literature indicates that muscles reach their maturity by 12 months of age then decline after 18 months of age in rat [54-56].

#### 4.2. Evoked metabosensitive activities.

Group III myelinated and group IV unmyelinated afferents act primarily as mechano- and metabosensory nerve endings respectively. However, some group III fibers respond to metabolic stimuli and some group IV fibers respond to mechanical stimuli [57]. As previously demonstrated, potassium is a specific activator of metabosensitive afferent fibers and not a non-

specific stimulus acting by depolarizing all fibers [27,58,59]. Furthermore, arterial KCl injections increase the potassium concentration in the muscular interstitium to levels similar to those evoked by static contractions known to activate metabosensitive afferents in rats [60], rabbits [61], cats [62] and dogs [31,63]. Lactic acid (LA) is also known to activate metabosensitive afferents via acid-sensing (proton-gated) ion channel 3 (ASIC3) and/or transient receptor potential vanilloide 1 (TRPV1) receptors [64]. Previous works [27,31] also reported that the discharge rate of metabosensitive fibers in response to increased [KCl] was concentration-dependent or culminated at 1 mM for LA. In Control and in BoNT/A injected groups, we confirmed not only this observation but also that the response of metabosensitive afferent fibers to KCl and LA injections is not (KCl) or slightly ([1 mM LA]) altered in the B0 and B50 groups. The altered response to LA injections could be explained by a reduced expression of the TRPV1 receptor into the afferent terminals which is not due to transcriptional downregulation but to the inhibition of the TRPV1 trafficking to the plasma membrane and proteasome-mediated degradation in the cytoplasm [65,66].

The unaltered responses to KCl injections in the B0 and B50 groups should be explain by the fact that ASIC3 and TRPV1 receptors are not involved in the activation of metabosensitive fibers by KCl. Unexpectedly, we observed altered responses in the B100 group with a full motor recovery after KCl and LA injections. Two explanations should be proposed. First, this mismatch between fall in metabosensible activity and increase in motor activity indicate that there is no link between the recovery of the two pathways. Second, the switch in muscle typology, as suggested above, should be responsible of this alteration, i.e., the afferents innervating a IIa/x phenotype muscle being less sensitive to KCl and LA or the discharge rate of these afferents was already near maximal at rest with no possible further activation by KCl and LA. Furthermore, we observed that EIF still induced a response in the B50 and B100 groups contrary to the B0 group. In the B0 group, the slight response of the III and IV afferent fibers should be explained by either a strong muscular atrophy altering metabolic production and then a lesser afferent activation, either by the decrease of the neurogenic inflammation (the BoNT/A impairing the substance P and CGRP release) participating to the production of inflammatory products known to activate the afferent fibers [67-69]. In the B50 and B100 groups, we can suggest that the altered metabosensitive response from group IV afferents was over compensated by group III afferents during repetitive contractions as suggested by Smith et al. [70,71] when metabosensitive afferent fibers from group IV were silent. We can conclude that the alteration observed in the B100 group is due to the group IV metabosensitive afferent fibers. This alteration could probably impact the exercise pressor reflex (EPR) adjusting the heart rate, ventilation and blood pressure during the performance of normal, daily tasks and ambulation and then indirectly the muscle mass. As previously described, skeletal muscles seem to be innervated by autonomic nervous system [72-74] and it was observed the presence of 1) adrenergic  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -receptor phenotypes expressed in higher proportion in muscles that are highly vascularized [75] or  $\alpha_1$ -receptor subtype in atrophied slow muscles of hypokalemic rats [76] and 2) adrenergic  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -receptor phenotypes in slow and fast-twitch muscles with an abundance of the  $\beta_2$  subtype on slow muscles [72,77-81]. Adrenergic  $\alpha$ -receptor phenotypes seem to be implicated in vasoconstriction [82] while activation of adrenergic  $\beta$ -receptors induce muscle hypertrophy [83-86], vasodilatation [87] and are thought responsible for skeletal muscle apoptosis [88,89]. Furthermore, recently, it was shown that EPR mediated by III and IV afferent fibers [90] induces adrenergic activation [91]. In our experiment, because responses of III and IV afferents were changed after *gastrocnemius* BoNT/A injection, we cannot exclude an EPR down regulation in the B0 group and then a diminution of catecholamine release also contributing to muscle atrophy. In the B50 and B100 groups, the exaggerated response to EIF that could up-regulate the EPR recovery and then participate to the muscle mass recovery.

### 4.3. Evoked mechanosensitive activities.

It is well known that muscle vibrations induce several effects on tonic and phasic reflexes [92]. Indeed, vibrations induce the muscle to slowly develop tension (tonic contraction) due to activation of anterior horn cells by the resulting afferent spindle discharge, which reaches  $\alpha$ -motoneurons *via* monosynaptic pathways [93,94]. The literature describes that muscle spindle discharges to vibrations, and its sensibility is increased by stimulation of both types of fusimotor fibers [43]. However, mechanical vibrations were unable to activate metabosensitive afferent fibers from groups III and IV [42]. In the present study, the B0 and B50 groups presented an altered response to vibrations. This alteration was observed for frequencies of 50 and 80 Hz known to induce the greatest response in the control animals [19]. In the B0 and B50 groups, the incomplete  $\alpha$ - and  $\gamma$ -motoneurons acetylcholine release induced by BoNT/A impairs the muscle spindle adjustments and then Ia and II afferents response. This decrease of influx transmission to the spinal level should, in turn, decrease the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -motoneurons discharge and so on, and then increasing the muscle paralysis. This vicious cycle, which is the opposite of the vicious cycle inducing hyperexcitability should delay the recovery.

Several explanations can be advanced to explain the alterations observed in the response of mechanosensitive afferents. Indeed, the literature reported that motor denervation by botulinum toxin such as with nerve injury induces a decrease in M-wave amplitude [45] and a depolarization of the resting membrane potential in the denervated muscle [95-98]. This resting membrane depolarization is associated to a reduced quantal content of subthreshold end-plate potentials and an increase in muscle fatigue [99]. The recovery is associated by a slow recovery of the quantal release and decrease of acetylcholine receptor sensitivity. More recently, Paterson et al. hypothesized about the cellular mechanisms that could be responsible for the altered mechanotransduction after BoNT/A injection [100]. Indeed, in cultured rodent primary sensory neurons, they reported a decreased in the proportion of neurons expressing slowly adapting mechanically gated currents linked to mechanical pain transduction [101]. They suggested that TRPA1 channel is required for the generation of a slowly adapting current in a subset of peptidergic dorsal root ganglion neurons [102] because its blockade reduces action potential firing in response to noxious peripheral mechanical stimulation [103] but TRPA1 channel is not sufficient alone for mechanotransduction [104]. They also suggested that there is probably no direct pharmacological action on mechanosensitive channels but an effect of BoNT-A on the trafficking of mechanosensitive channels, i.e., the tetanus toxin suppress the mechanically gated currents by blocking vesicle trafficking [105]. Vesicular trafficking plays also a role in the transmission of nerve influx at the terminals of the mechanosensitive afferent fibers [106]. Indeed, it is involved in the insertion of ion channels into the cell membrane and transport of proteins such as proteins of SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) complex [107]. Thus, the alteration of the vesicular trafficking by the toxin could affect the genesis of nerve impulses at the nerve endings of mechanosensitive neurons.

Finally, we observed a complete recovery in the B100 group indicating normal muscle spindle adjustments and then Ia and II afferents response, and suggesting a recovery in vesicle trafficking and muscle membrane conduction. However, although we observed a complete recovery in the B100 group at  $371.83 \pm 24.82$  days after BoNT/A injection we can not claim that there was no trace of toxin in the nerve endings. Following administration, only a minority of the toxin enters nerve cells. The remaining portion remains in the extracellular compartment. When the toxin enters in the terminals, it undergoes an immediate metabolic transformation. During its translocation in the cytosol, the disulfide bridge linking the heavy and light chains is broken, releasing the light chain to express its catalytic activity in the cytosol [108,109]. This process marks the end of the intracellular existence of the intact and biologically molecule. Even if the light chain or heavy chain were to be exported from the cell, only the holotoxin possesses the ability to process through the multiple steps that culminate in blockade of transmission [110]. To date, although several mechanisms of metabolism and elimination of the toxin have been

hypothesized, the literature does not reported a full understanding of these mechanisms in either the extracellular or intracellular compartments [110]. A pharmacokinetic study indicated that the half-life of the toxin is about 255 min in the blood of rats [111]. However some active toxin can be detected in serum 25 days after the onset of botulism in human [110]. It seems that the persistence of BoNT intoxication can be influenced both by the ability of the toxin protease or its cleaved SNARE protein substrate to resist turnover. Finally, Shoemaker and Oyler explained the several reasons why it is not practically possible to measure the remarkable persistence BoNT/A intoxication which results from retention of active BoNT/A protease within the terminals [112].

#### 4.4. Conclusion.

In the present experiment, we showed that injection of BoNT/A in a *gastrocnemius* muscle induced an early decrease of the metabosensitive afferent response that is aggravated or exaggerated even when locomotor activity and muscle mass recovered contrary to the mechanosensitive afferent response that seemed to recover over time. This pattern of response should be due to a down regulation of afferents from group IV associated with an up regulation of afferents from group III, as suggested in other pathology [71]. This change of operating mode could interfere with the functioning of the sensorimotor loop and then adjustment of muscle contractions and physiological reflexes during motor activities leading to an early fatigue. As previously described, an EPR overactivity is associated to a chronic hypertension that induces a pathological hypertrophic cardiac remodeling leading to heart failure [113]. Furthermore, the toxin transports along motor (retrograde) and sensory (anterograde) axons [114,115] could induced a direct alteration of the glutamate, substance P or GABA transmission in the central neurons [11,116,117] that could contribute further to disturb the spinal networks involved in sensorimotor activity and also to reduce pain sensation [118] and neurogenic inflammation [69].

Motor denervation with *botulinum* toxin in patients suffering of movement disorders or other pathologies, and in whom it was injected neurotoxin for cosmetic purposes, may still present proprioception and physiological alterations several months after the motor effects of the toxin have disappeared. Clinicians should keep in mind that the effects of *botulinum* toxin are sustainable and it induces alterations that are still present even after a complete motor recovery.

## 5. ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by funding from *Aix-Marseille Université* (AMU) and the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS).

## 6. REFERENCES

1. Dressler D, Rothwell JC (2000) Electromyographic quantification of the paralyzing effect of botulinum toxin in the sternocleidomastoid muscle. *Eur Neurol* 43: 13-16.
2. Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3: 641-653.
3. Hallett M, Glocker FX, Deuschl G (1994) Mechanism of action of botulinum toxin. *Ann Neurol* 36: 449-450.
4. Curra A, Trompetto C, Abbruzzese G, Berardelli A (2004) Central effects of botulinum toxin type A: evidence and supposition. *Mov Disord* 19 Suppl 8: S60-64.
5. Abbruzzese G, Berardelli A (2006) Neurophysiological effects of botulinum toxin type A. *Neurotox Res* 9: 109-114.
6. Caleo M, Schiavo G (2009) Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon* 54: 593-599.
7. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR (2004) Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 107: 125-133.



8. Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA (2000) Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon* 38: 245-258.
9. Lucioni A, Bales GT, Lotan TL, McGehee DS, Cook SP, et al. (2008) Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int* 101: 366-370.
10. Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO (2007) Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J Cell Sci* 120: 2864-2874.
11. Verderio C, Grumelli C, Raiteri L, Coco S, Paluzzi S, et al. (2007) Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* 8: 142-153.
12. Wiegand H, Erdmann G, Wellhoner HH (1976) 125I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 292: 161-165.
13. Kim DY, Oh BM, Paik NJ (2006) Central effect of botulinum toxin type A in humans. *Int J Neurosci* 116: 667-680.
14. Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M (2008) Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28: 3689-3696.
15. Filippi GM, Errico P, Santarelli R, Bagolini B, Manni E (1993) Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta Otolaryngol* 113: 400-404.
16. Rosales RL, Arimura K, Takenaga S, Osame M (1996) Extrafusal and intrafusal muscle effects in experimental botulinum toxin-A injection. *Muscle Nerve* 19: 488-496.
17. Priori A, Berardelli A, Mercuri B, Manfredi M (1995) Physiological effects produced by botulinum toxin treatment of upper limb dystonia. Changes in reciprocal inhibition between forearm muscles. *Brain* 118 (Pt 3): 801-807.
18. Rosales RL, Dressler D (2010) On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur J Neurol* 17 Suppl 1: 71-80.
19. Caron G, Rouzi T, Grelot L, Magalon G, Marqueste T, et al. (2014) Mechano- and metabosensitive alterations after injection of botulinum toxin into gastrocnemius muscle. *J Neurosci Res* 92: 904-914.
20. Pierrot-Deseilligny E, Burke D (2005) *The circuit of the Human Spinal Cord : Its Role in Motor Control and Movement Disorders*. New York: Cambridge University Press.
21. Brown MC, Engberg I, Matthews PB (1967) The relative sensitivity to vibration of muscle receptors of the cat. *J Physiol* 192: 773-800.
22. Brown AG, Iggo A (1967) A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J Physiol* 193: 707-733.
23. Brown AG, Iggo A, Miller S (1967) Myelinated afferent nerve fibers from the skin of the rabbit ear. *Exp Neurol* 18: 338-349.
24. Kaufman MP, Rybicki KJ (1987) Discharge properties of group III and IV muscle afferents: their responses to mechanical and metabolic stimuli. *Circ Res* 61: I60-65.
25. Rotto DM, Kaufman MP (1988) Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol* 64: 2306-2313.
26. Ge W, Khalsa PS (2003) Encoding of compressive stress during indentation by group III and IV muscle mechano-nociceptors in rat gracilis muscle. *J Neurophysiol* 89: 785-792.
27. Decherchi P, Darques JL, Jammes Y (1998) Modifications of afferent activities from Tibialis anterior muscle in rat by tendon vibrations, increase of interstitial potassium or lactate concentration and electrically-induced fatigue. *J Peripher Nerv Syst* 3: 267-276.
28. Kaufman MP, Iwamoto GA, Longhurst JC, Mitchell JH (1982) Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with ending in skeletal muscle. *Circ Res* 50: 133-139.
29. Victor RG, Bertocci LA, Pryor SL, Nunnally RL (1988) Sympathetic nerve discharge is coupled to muscle cell pH during exercise in humans. *J Clin Invest* 82: 1301-1305.
30. Kenagy J, VanCleave J, Pazdernik L, Orr JA (1997) Stimulation of group III and IV afferent nerves from the hindlimb by thromboxane A2. *Brain Res* 744: 175-178.
31. Rybicki KJ, Waldrop TG, Kaufman MP (1985) Increasing gracilis muscle interstitial potassium concentrations stimulate group III and IV afferents. *J Appl Physiol* 58: 936-941.
32. Decherchi P, Vuillon-Cacciuto G, Darques JL, Jammes Y (2001) Changes in afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Muscle Nerve* 24: 59-68.
33. Holds JB, Fogg SG, Anderson RL (1990) Botulinum A toxin injection. Failures in clinical practice and a biomechanical system for the study of toxin-induced paralysis. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 6: 252-259.

34. Hott JS, Dalakas MC, Sung C, Hallett M, Youle RJ (1998) Skeletal muscle-specific immunotoxin for the treatment of focal muscle spasm. *Neurology* 50: 485-491.
35. Billante CR, Zeale DL, Billante M, Reyes JH, Sant'Anna G, et al. (2002) Comparison of neuromuscular blockade and recovery with botulinum toxins A and F. *Muscle Nerve* 26: 395-403.
36. Varejao AS, Cabrita AM, Patricio JA, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, et al. (2001) Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: gait kinematics. *Microsurgery* 21: 383-388.
37. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 83: 129-138.
38. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 77: 634-643.
39. Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK (1979) Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci* 25: 171-179.
40. Kostyukov AI, Hellstrom F, Korchak OE, Radovanovic S, Ljubisavljevic M, et al. (2000) Fatigue effects in the cat gastrocnemius during frequency-modulated efferent stimulation. *Neuroscience* 97: 789-799.
41. Lopez-Guajardo A, Sutherland H, Jarvis JC, Salmons S (2001) Induction of a fatigue-resistant phenotype in rabbit fast muscle by small daily amounts of stimulation. *J Appl Physiol* (1985) 90: 1909-1918.
42. Kaufman MP, Waldrop TG, Rybicki KJ, Ordway GA, Mitchell JH (1984) Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents. *Cardiovasc Res* 18: 663-668.
43. Burke D, Schiller HH (1976) Discharge pattern of single motor units in the tonic vibration reflex of human triceps surae. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 39: 729-741.
44. Roll JP, Vedel JP, Ribot E (1989) Alteration of proprioceptive messages induced by tendon vibration in man: a microneurographic study. *Exp Brain Res* 76: 213-222.
45. Sloop RR, Cole BA, Escutin RO (1997) Human response to botulinum toxin injection: type B compared with type A. *Neurology* 49: 189-194.
46. Ma J, Elsaidi GA, Smith TL, Walker FO, Tan KH, et al. (2004) Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection: an animal model study. *Am J Phys Med Rehabil* 83: 774-780; quiz 781-773.
47. Keller JE (2006) Recovery from botulinum neurotoxin poisoning in vivo. *Neuroscience* 139: 629-637.
48. Duchen LW (1971) Changes in the electron microscopic structure of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse after the local injection of botulinum toxin. *J Neurol Sci* 14: 61-74.
49. Duchen LW (1971) An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J Neurol Sci* 14: 47-60.
50. Dodd SL, Selsby J, Payne A, Judge A, Dott C (2005) Botulinum neurotoxin type A causes shifts in myosin heavy chain composition in muscle. *Toxicon* 46: 196-203.
51. Legerlotz K, Matthews KG, McMahon CD, Smith HK (2009) Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* 39: 472-479.
52. Delp MD, Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* (1985) 80: 261-270.
53. Duchateau J, Hainaut K (1990) Effects of immobilization on contractile properties, recruitment and firing rates of human motor units. *J Physiol* 422: 55-65.
54. Yu BP, Masoro EJ, Murata I, Bertrand HA, Lynd FT (1982) Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J Gerontol* 37: 130-141.
55. Cartee GD (1994) Aging skeletal muscle: response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 22: 91-120.
56. Chiu CS, Weber H, Adamski S, Rauch A, Gentile MA, et al. (2011) Non-invasive muscle contraction assay to study rodent models of sarcopenia. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 246.
57. Kaufman MP, Forster H (1996) Reflexes controlling circulatory, ventilatory and airway responses to exercise.; Rowell LB, Shepherd JT, editors. New York: Oxford University Press.
58. Marqueste T, Decherchi P, Dousset E, Berthelin F, Jammes Y (2002) Effect of muscle electrostimulation on afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Neuroscience* 113: 257-271.

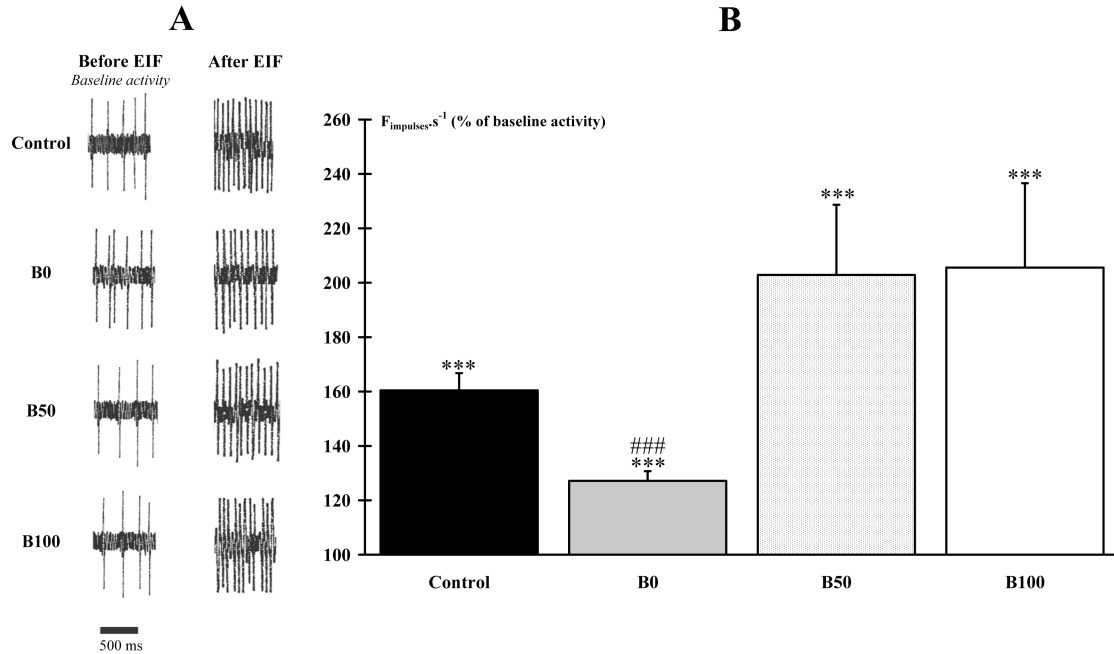
59. Dousset E, Marqueste T, Decherchi P, Jammes Y, Grelot L (2004) Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferent activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. *J Neurosci Res* 76: 734-741.
60. Thimm F, Baum K (1987) Response of chemosensitive nerve fibers of group III and IV to metabolic changes in rat muscles. *Pflugers Arch* 410: 143-152.
61. Darques JL, Jammes Y (1997) Fatigue-induced changes in group IV muscle afferent activity: differences between high- and low-frequency electrically induced fatigues. *Brain Res* 750: 147-154.
62. Mense S, Prabhakar NR (1986) Spinal termination of nociceptive afferent fibres from deep tissues in the cat. *Neurosci Lett* 66: 169-174.
63. Hnik P, Holas M, Krekule I, Kuriz N, Mejsnar J, et al. (1976) Work-induced potassium changes in skeletal muscle and effluent venous blood assessed by liquid ion-exchanger microelectrodes. *Pflugers Arch* 362: 85-94.
64. Gao Z, Henig O, Kehoe V, Sinoway LI, Li J (2006) Vanilloid type 1 receptor and the acid-sensing ion channel mediate acid phosphate activation of muscle afferent nerves in rats. *J Appl Physiol* (1985) 100: 421-426.
65. Apostolidis A, Papat R, Yiangou Y, Cockayne D, Ford AP, et al. (2005) Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity. *J Urol* 174: 977-982; discussion 982-973.
66. Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Iwashita T, Funakubo M, et al. (2012) Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A. *Neurobiol Dis* 48: 367-378.
67. Darques JL, Decherchi P, Jammes Y (1998) Mechanisms of fatigue-induced activation of group IV muscle afferents: the roles played by lactic acid and inflammatory mediators. *Neurosci Lett* 257: 109-112.
68. Marqueste T, Decherchi P, Messan F, Kipson N, Grelot L, et al. (2004) Eccentric exercise alters muscle sensory motor control through the release of inflammatory mediators. *Brain Res* 1023: 222-230.
69. Carmichael NM, Dostrovsky JO, Charlton MP (2010) Peptide-mediated transdermal delivery of botulinum neurotoxin type A reduces neurogenic inflammation in the skin. *Pain* 149: 316-324.
70. Smith SA, Mitchell JH, Garry MG (2006) The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. *Exp Physiol* 91: 89-102.
71. Smith SA, Mitchell JH, Naseem RH, Garry MG (2005) Mechanoreflex mediates the exaggerated exercise pressor reflex in heart failure. *Circulation* 112: 2293-2300.
72. Lynch GS, Ryall JG (2008) Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev* 88: 729-767.
73. Caswell AH, Baker SP, Boyd H, Potter LT, Garcia M (1978) beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in transverse tubules of skeletal muscle. *J Biol Chem* 253: 3049-3054.
74. Barker D, Saito M (1981) Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 212: 317-332.
75. Rattigan S, Appleby GJ, Edwards SJ, McKinstry WJ, Colquhoun EQ, et al. (1986) Alpha-adrenergic receptors in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 1071-1077.
76. Akaike N, Hirata A, Kiyohara T, Oyama Y (1983) Neural regulation on the active sodium-potassium transport in hypokalaemic rat skeletal muscles. *J Physiol* 341: 245-255.
77. Kim YS, Sainz RD, Molenaar P, Summers RJ (1991) Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem Pharmacol* 42: 1783-1789.
78. Williams RS, Caron MG, Daniel K (1984) Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *Am J Physiol* 246: E160-167.
79. Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS (2002) Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1386-1394.
80. Ryall JG, Plant DR, Gregorevic P, Sillence MN, Lynch GS (2004) Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *J Physiol* 555: 175-188.
81. Martin WH, 3rd, Murphree SS, Saffitz JE (1989) Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. *Circ Res* 64: 1096-1105.
82. Buckwalter JB, Clifford PS (2001) The paradox of sympathetic vasoconstriction in exercising skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 29: 159-163.



83. Apseloff G, Girten B, Walker M, Shepard DR, Krecic ME, et al. (1993) Aminohydroxybutane bisphosphonate and clenbuterol prevent bone changes and retard muscle atrophy respectively in tail-suspended rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 1071-1078.
84. Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, et al. (2002) Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve* 25: 729-734.
85. Mersmann HJ (1998) Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci* 76: 160-172.
86. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K (2011) Muscle plasticity and beta(2)-adrenergic receptors: adaptive responses of beta(2)-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011: 729598.
87. Berecek KH, Brody MJ (1982) Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla. *Am J Physiol* 242: H593-601.
88. Burniston JG, Tan LB, Goldspink DF (2005) beta2-Adrenergic receptor stimulation in vivo induces apoptosis in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol* (1985) 98: 1379-1386.
89. Burniston JG, Clark WA, Tan LB, Goldspink DF (2006) Dose-dependent separation of the hypertrophic and myotoxic effects of the beta(2)-adrenergic receptor agonist clenbuterol in rat striated muscles. *Muscle Nerve* 33: 655-663.
90. McCloskey DI, Mitchell JH (1972) Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol* 224: 173-186.
91. Kaur J, Spranger MD, Hammond RL, Krishnan AC, Alvarez A, et al. (2014) Muscle metaboreflex activation during dynamic exercise evokes epinephrine release resulting in beta2-mediated vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: ajpheart 00648 02014.
92. Fromm C, Haase J, Wolf E (1977) Depression of the recurrent inhibition of extensor motoneurons by the action of group II afferents. *Brain Res* 120: 459-468.
93. Hagbarth KE, Eklund G (1966) Tonic vibration reflexes (TVR) in spasticity. *Brain Res* 2: 201-203.
94. De Gail P, Lance JW, Neilson PD (1966) Differential effects on tonic and phasic reflex mechanisms produced by vibration of muscles in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29: 1-11.
95. Albuquerque EX, Thesleff S (1968) A comparative study of membrane properties of innervated and chronically denervated fast and slow skeletal muscles of the rat. *Acta Physiol Scand* 73: 471-480.
96. Albuquerque EX, Schuh FT, Kauffman FC (1971) Early membrane depolarization of the fast mammalian muscle after denervation. *Pflugers Arch* 328: 36-50.
97. Lewis GE (1981) *Biomedical aspects of botulism*. London: Academic Press Inc.
98. Sellin LC, Thesleff S (1981) Pre- and post-synaptic actions of botulinum toxin at the rat neuromuscular junction. *J Physiol* 317: 487-495.
99. Tonge DA (1974) Chronic effects of botulinum toxin on neuromuscular transmission and sensitivity to acetylcholine in slow and fast skeletal muscle of the mouse. *J Physiol* 241: 127-139.
100. Paterson K, Lolignier S, Wood JN, McMahan SB, Bennett DL (2014) Botulinum toxin-A treatment reduces human mechanical pain sensitivity and mechanotransduction. *Ann Neurol* 75: 591-596.
101. Drew LJ, Rugiero F, Cesare P, Gale JE, Abrahamsen B, et al. (2007) High-threshold mechanosensitive ion channels blocked by a novel conopeptide mediate pressure-evoked pain. *PLoS One* 2: e515.
102. Vilceanu D, Stucky CL (2010) TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons. *PLoS One* 5: e12177.
103. Kerstein PC, del Camino D, Moran MM, Stucky CL (2009) Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Mol Pain* 5: 19.
104. Rugiero F, Wood JN (2009) The mechanosensitive cell line ND-C does not express functional thermoTRP channels. *Neuropharmacology* 56: 1138-1146.
105. Di Castro A, Drew LJ, Wood JN, Cesare P (2006) Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4699-4704.
106. Bewick GS, Banks RW (2015) Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch* 467: 175-190.
107. Aguado F, Majo G, Ruiz-Montasell B, Llorens J, Marsal J, et al. (1999) Syntaxin 1A and 1B display distinct distribution patterns in the rat peripheral nervous system. *Neuroscience* 88: 437-446.
108. Koriazova LK, Montal M (2003) Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol* 10: 13-18.

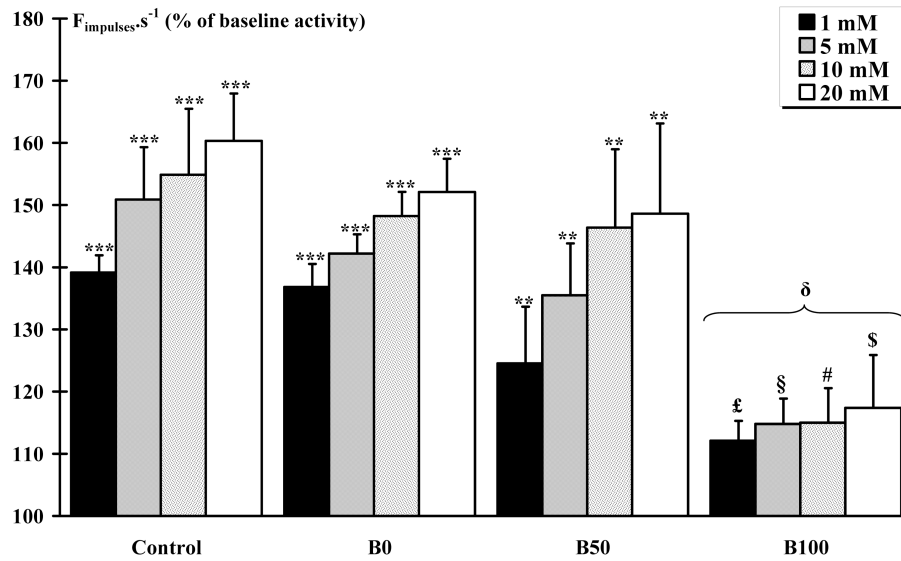
109. Fischer A, Montal M (2007) Crucial role of the disulfide bridge between botulinum neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *J Biol Chem* 282: 29604-29611.
110. Simpson L (2013) The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon* 68: 40-59.
111. Ravichandran E, Gong Y, Al Saleem FH, Ancharski DM, Joshi SG, et al. (2006) An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 1343-1351.
112. Shoemaker CB, Oyler GA (2013) Persistence of Botulinum neurotoxin inactivation of nerve function. *Curr Top Microbiol Immunol* 364: 179-196.
113. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, et al. (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11: 214-222.
114. Akaike N, Shin MC, Wakita M, Torii Y, Harakawa T, et al. (2013) Transsynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. *J Physiol* 591: 1031-1043.
115. Koizumi H, Goto S, Okita S, Morigaki R, Akaike N, et al. (2014) Spinal Central Effects of Peripherally Applied Botulinum Neurotoxin A in Comparison between Its Subtypes A1 and A2. *Front Neurol* 5: 98.
116. Purkiss JR, Welch MJ, Doward S, Foster KA (1997) Capsaicin stimulates release of substance P from dorsal root ganglion neurons via two distinct mechanisms. *Biochem Soc Trans* 25: 542S.
117. Purkiss J, Welch M, Doward S, Foster K (2000) Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol* 59: 1403-1406.
118. Aoki KR (2005) Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* 26: 785-793.

## Electrically Induced-Fatigue (EIF)

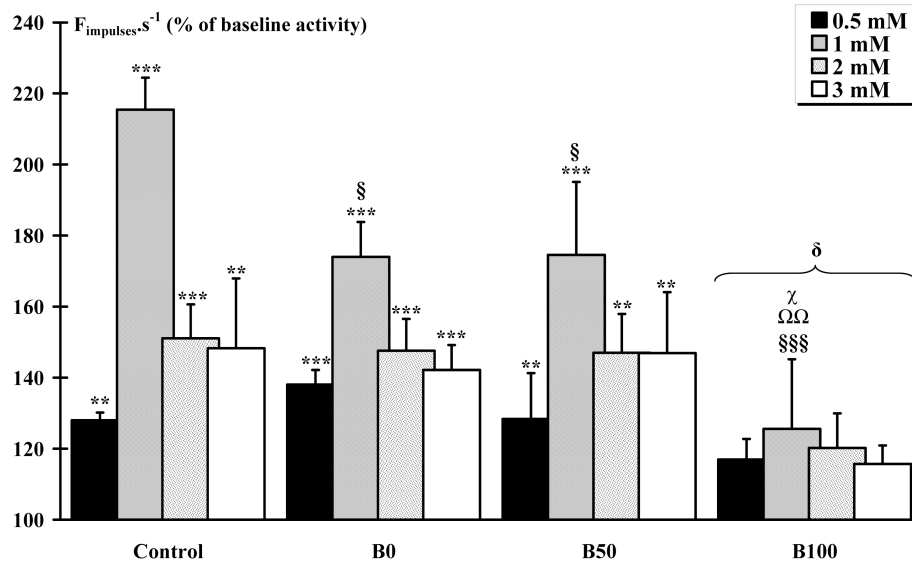


**Figure 1:** Response of the metabosensitive fibers to electrically induced fatigue (EIF). Animals from all groups exhibited a significant (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) increase in afferent discharge frequency after a 3-min stimulation of the *gastrocnemius* muscle. **A.** Examples of recordings before (baseline activity) and after EIF. **B.** Comparison between the post-EIF changes indicates that the mean discharge rate was significantly (###,  $p < 0.001$ ) lower in the B0 group compared to the 3 other groups.

### A - Potassium Chloride (KCl) Injections

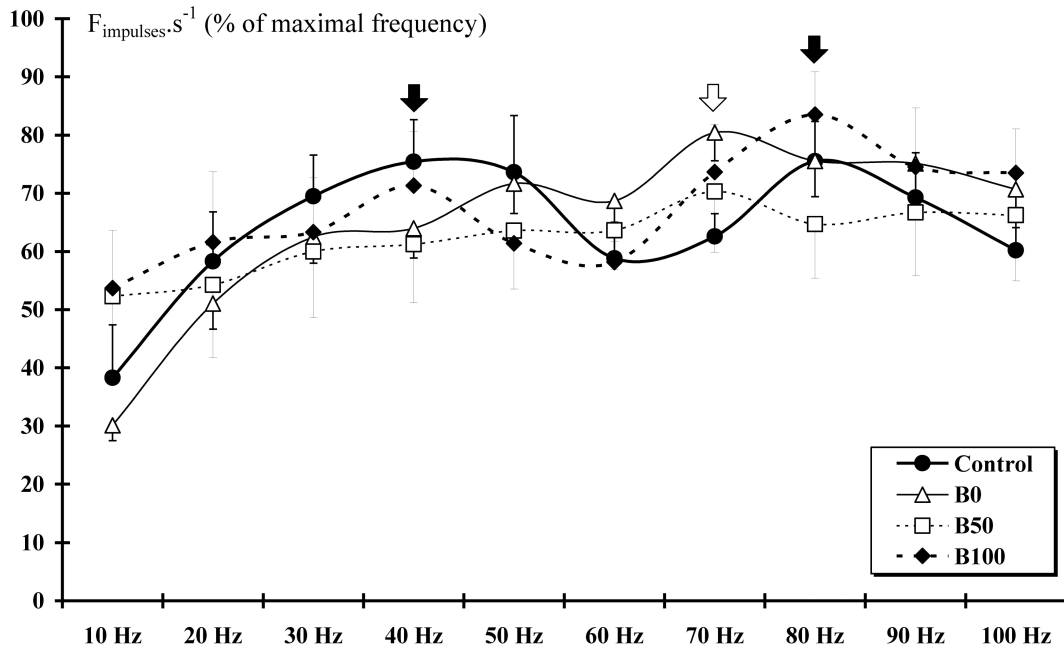


### B - Lactic Acid (LA) Injections



**Figure 2:** Response of the metabosensitive fibers to chemicals. Responses ( $F_{\text{impulses}\cdot\text{s}^{-1}}$ ) of tonically active muscle afferents during stepwise increase in potassium chloride (A) and lactic acid (B) concentration in injected solutions were recorded. Significant (\*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ) increases in afferent discharge frequency, as compared to baseline recording, were observed in the Control and BoNT/A injected animals from B0 and B50 groups at all concentrations of KCl or LA solution tested. **A.** Intergroup comparison indicated that there is a significant difference ( $\delta$ ,  $p < 0.05$ ) in the KCl curve dose response for B100 group compared to other groups. Responses to KCl were significantly decreased in the B100 group for all concentrations. Compared to the respective concentrations of the other groups, the responses were significantly lower for 1 mM (£,  $p < 0.05$ ), 5 mM (§,  $p < 0.05$ ), 10 mM (#,  $p < 0.05$ ) and 20 mM (\$,  $p < 0.05$ ). **B.** Intergroup comparison indicated that there is a significant difference ( $\delta$ ,  $p < 0.05$ ) in the LA curve dose response for B100 group compared to other groups. Responses to LA were significantly decreased for the 1 mM concentration in all BoNT/A groups (B0: §,  $p < 0.05$ ; B50: §,  $p < 0.05$  and B100: §§§,  $p < 0.001$ ) compared to the respective concentration of the Control group. Moreover, at the concentration of 1 mM, the B100 group also exhibited significant differences with B0 ( $\Omega\Omega$ ,  $p < 0.01$ ) and B50 ( $\chi$ ,  $p < 0.05$ ) groups.

## Calcaneal Tendon Vibrations



**Figure 3:** Response of the mechanosensitive fibers to calcaneal tendon vibrations. In all groups, a response ( $F_{\text{impulses}\cdot\text{s}^{-1}}$ ) persisting throughout the tendon vibration period was recorded for each vibration frequency. In Control and B100 groups, the changes in afferent discharge evoked by vibration are bimodal with peaks measured at 40 and 80 Hz (black arrows). In the B0 and B50 groups, only one peak is measured at 70 Hz (white arrow).

		Control group	BoNT/A injected groups			Comparison
			B0 group	B50 group	B100 group	
<b>Muscle Stimulation</b>	Twitch Amplitude (mN)	222.34±8.94	92.17±16.01 ***	125.20±27.08 **	203.80±5.97 ## \$\$	p<0.001
<b>Tetanus Contraction</b> (5 Hz stepwise increase frequency)	Tetanus Threshold (Hz)	33.75±2.26	24.95±2.29 *	29.29±1.70	36.25±1.25 #	p<0.001
<b>Electrically Induced Fatigue</b> (10 Hz)	Fatigue Index (Δ%)	75.92±5.47	80.07±7.37	43.07±1.87 ** ###	38.64±7.78 ** ##	p<0.001
<b>Muscle Properties</b>	Muscle Weight (g)	2.25±0.04	1.07±0.04 ***	1.07±0.07 ***	2.09±0.17 ### \$\$\$	p<0.001
	Muscle Weight/ Body Weight ratio	0.48±0.01	0.25±0.02 ***	0.16±0.01 *** ##	0.26±0.02 *** \$\$\$	p<0.001

**Table 1:** *Gastrocnemius muscle properties.*

Comparison were performed versus Control (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001), B0 (##, p<0.01; ###, p<0.001) or B50 (\$, p<0.05; \$\$\$, p<0.001) group.

### III. La réponse métabosensible de différents muscles.

Le lien entre la typologie musculaire et l'activité neuronale efférente a souvent été étudiée (Lomo, 2003; Pette et Vrbova, 1999). Cependant, la réponse des afférences musculaires métabosensibles en fonction de la typologie musculaire l'a moins été. Des études ont toutefois montré que l'activation de muscles à tendance rapide induisait un EPR (« *Exercice Pressor Reflex* ») plus important que celui induit par l'activation de muscles lents (Petrofsky et Lind, 1980; Petrofsky et al., 1981; Iwamoto et Botterman, 1985). Dans notre étude, nous avons choisi de comparer l'activité des afférences métabosensibles issues des muscles *gastrocnemius* (intermédiaire rapide) et *soleus* (lent) avec leur muscle antagoniste, le *tibialis anterior* (rapide). Les afférences métabosensibles de chacun de ces trois muscles ont été activées avec des injections de KCl ou d'AL, et par une stimulation électrique musculaire répétitive de basse fréquence connue pour induire une fatigue musculaire (FIE : Fatigue Induite Electriquement).

Les principaux résultats montrent que la réponse aux injections d'AL est en forme de cloche pour les trois muscles, avec une réponse maximale pour la concentration de 1 mM. De plus, l'amplitude de la réponse des afférences métabosensibles à l'AL et la FIE semble être plus importante pour le muscle *gastrocnemius* que pour les muscles *tibialis anterior* et *soleus*, qui présentent une même amplitude de réponse malgré leurs différences de masse et de phénotype. La réponse aux injections de KCl, quant à elle, semble être dose dépendante mais ne comportent pas de différences entre les différents muscles étudiés.

Ces résultats indiquent que la réponse des afférences métabosensibles peut varier selon les différences anatomiques (masse, phénotype, vascularisation, densité de récepteurs et d'afférences) et fonctionnelles (fléchisseur, extenseur) des muscles étudiés.



# Does metabosensitive afferent fibers activity differ from slow- and fast-twitch muscles?

Guillaume Caron<sup>1</sup> · Patrick Decherchi<sup>1</sup> · Tanguy Marqueste<sup>1</sup>

Received: 31 March 2015 / Accepted: 12 May 2015 / Published online: 21 May 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** This study was designed to investigate the metabosensitive afferent response evoked by electrically induced fatigue (EIF), lactic acid (LA) and potassium chloride (KCl) in three muscle types. We recorded the activity of groups III–IV afferents originating from soleus, gastrocnemius and tibialis anterior muscles. Our data showed a same pattern of response in the three muscles after chemical injections, i.e., a bell curve with maximal discharge rate at 1 mM for LA injections and a linear relationship between KCl concentrations and the afferent discharge rate. Furthermore, a stronger response was recorded after EIF in the gastrocnemius muscle compared to the two other muscles. The change in afferent discharge after 1 mM LA injection was higher for the gastrocnemius muscle compared to the response obtained with the corresponding concentration applied in the two other muscles, whereas changes to KCl injections did not dramatically differ between the three muscles. We conclude that anatomical (mass, phenotype, vascularization, receptor and afferent density...) and functional (flexor vs. extensor) differences between muscles could explain the amplitude of these responses.

**Keywords** Electrophysiology · Rat · C fiber · Ergoreceptor · Metabosensitivity · Proprioception

## Introduction

Muscle contractions produce metabolites and reactive oxygen species (ROS), modifies pH and ionic balance. These metabolites are known to be released out of muscle fibers and are accumulated within the skeletal muscle interstitium during repetitive contractions. They activate chemosensitive nerve endings (part of group III and most of group IV afferent fibers) called muscle ‘ergoreceptors,’ ‘metaboreceptors’ or ‘exercise receptors’ because they detect the changes in muscle metabolism and they are selectively activated during and after muscle repeated contractions. They can also be activated by different agents such as lactic acid (LA), potassium chloride (KCl), bradykinin, arachidonic acid, thromboxane A<sub>2</sub>, prostaglandin and capsaicin (Decherchi and Douset 2003). These muscle afferents project to the spinal cord and brain levels to provide an exercise pressor reflex (EPR), which mainly results in increasing the arterial blood pressure, heart and ventilation rate to adjust the oxygenated blood flow to activated muscles (McCloskey and Mitchell 1972).

Many studies have investigated the relationship of the efferent motor activity with the expression of skeletal muscle phenotypes (Pette and Vrbova 1999; Lømo 2003a, b). Schematically, the fast-twitch fatigable muscle cells are mainly innervated by large motoneurons presenting high firing frequency within a large motor unit, whereas smaller motoneurons having a low firing frequency innervate few slow-twitch resistant muscle cells (Burke et al. 1973; Kernell 1979; Bakels and Kernell 1993). Thus, it was admitted that the cell type profile is mainly controlled by nerve

---

Patrick Decherchi and Tanguy Marqueste have equally supervising authors.

✉ Tanguy Marqueste  
tanguy.marqueste@univ-amu.fr

<sup>1</sup> Aix-Marseille Université (AMU) - Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7287 «Institut des Sciences du Mouvement: Etienne-Jules MAREY» (ISM-EJM), Equipe «Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire», Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Faculté des Sciences du Sport de Marseille, CC910 - 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France

activity (Lømo 2003a, b). Nevertheless, contractile and metabolic properties can also be influenced by specific signaling pathways (Schiaffino et al. 2007) and by epigenetic-related activities modifying the genomic expression in response to environmental factors, such as hypoxia, cold or physical constraints (Gelfi et al. 2011; Rasmussen et al. 2014). In a previous study, the stimulation of the gastrocnemius with a low-frequency protocol induced a switch of the phenotype from fast oxidative to more oxidative phenotype resulting in reduced EPR (Wilson et al. 1995). In addition, the effect of muscle cell-type composition on the EPR resulted in a greater response for type II fast-twitch glycolytic cells (gastrocnemius) compared to type I slow-twitch oxidative cells (soleus) (Petrofsky and Lind 1980; Petrofsky et al. 1981; Iwamoto and Botterman 1985).

Because mechanosensitivity and EPR can differ considering muscle cell properties, our study aims to investigate the response of metabosensitive afferents from various skeletal muscle phenotypes by recording nerve afferent activities from tibialis, soleus and gastrocnemius muscles, during standardized tests known to specifically activate the III and IV afferent fibers in rats (Decherchi et al. 1998). We hypothesized that tibialis and gastrocnemius muscle responses to the repetitive muscle contraction would be higher than the soleus ones and that chemicals injections (KCl and LA) would also induce a higher response for those muscles.

## Materials and methods

Nineteen adult male Sprague–Dawley rats, 2–3 month old (Janvier<sup>®</sup>, Le Genest Saint Isle, France), were housed in smooth-bottomed plastic cages at 22 °C with a 12-h light/dark cycle. Food (Safe<sup>®</sup>, Augy, France) and water were available ad libitum. An acclimation period of 1 week was allowed before the recording of afferent fibers activity. Anesthesia with urethane (1.1 g kg<sup>-1</sup> i.p.) and surgical procedures were performed according to the French law. The principles and guidelines for scientific experiments on animals and of laboratory animal care were respected throughout the study in accordance with the 2010/63/EU Directive. The experimental model was approved by the expert committee Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Briefly, surgery consisted in the insertion of a catheter into the right femoral artery and pushed up to the fork of the abdominal aorta in order to transport chemicals (i.e., KCl and LA) to the contralateral lower limb muscles. This catheter was positioned in order to let the blood flow freely to the left lower limb muscles. Animals were positioned in ventral decubitus. Dissection on the left side, at the middle thigh level, was carried out to expose the common sciatic

nerve and its trifurcation at the knee level. Then, either the peroneal nerve branch innervating the tibialis anterior muscle ( $n = 12$ ) or the tibial nerve branch innervating the gastrocnemius and soleus muscles was dissected free from surrounding tissues. Further dissection of the tibial nerve was gently performed to separate thin branches, respectively, innervating the gastrocnemius ( $n = 7$ ) or the soleus muscle ( $n = 12$ ). Sciatic nerve branches were cut, and distal stumps were immersed in paraffin oil to prevent dehydration and to preserve tissue. Two tungsten stimulation electrodes (inter-electrode distance: 5 mm) were placed on the soleus, the tibialis anterior or the gastrocnemius muscle. Other pair of cuff electrodes was also placed on their respective nerves for stimulation or afferent recordings. The knee and ankle were firmly held by clamps on a horizontal support in order to avoid disturbing movements and to maintain the knee joint angle at 90° (a mid-position of the agonist and antagonist muscles) during electrical nerve stimulations. Animal temperature was maintained between 36 and 37 °C with a blanket controlled by rectal temperature probe.

In order to identify innervation of each muscle, twitch contraction was induced by electrical stimulation of nerve branches, performed with a neurostimulator (Grass S88K<sup>®</sup>, Grass Technologies, Natus Neurology Inc., Warwick, Rhode Island, USA) delivering single rectangular pulses (duration: 0.1 ms, frequency 0.5 Hz) through an isolation unit, and force was measured with an isometric strain gauge (Micromanometer 7001<sup>®</sup>, Ugo Basile SRL, Comerio, VA, Italy) fixed to the distal part of the soleus, gastrocnemius or tibialis tendon. To induce the fatiguing repetitive muscle contractions (electrically induced fatigue: EIF), the electrodes were placed on the muscle belly. The intensity of the stimulation was increased until the maximal response was found. Then, the voltage was increased by 20 % in order to perform a 3-min EIF (Darques et al. 1998). For this purpose, rhythmic muscle contractions were produced by the neurostimulator (Grass S88K<sup>®</sup>) delivering rectangular pulse trains to the pair of steel electrodes placed in the muscle surface (pulse duration: 0.1 ms; frequency: 10 Hz, i.e., five shocks in each 500 ms train; duty cycle: 500/1000 ms, voltage range: 5–9 V).

Furthermore, during EIF, the response of afferent fibers from groups III and IV was also recorded. The neural signals were referred to a ground electrode implanted in a nearby muscle, amplified (10–100 K) and filtered (filtered with low pass at 150 Hz) with a differential amplifier (P2MP<sup>®</sup> SARK, Marseille, France). The afferent discharge was recorded (Biopac MP150<sup>®</sup> and AcqKnowledge<sup>®</sup> software, Biopac Systems Inc., CA, USA) and fed into pulse window discriminators (P2MP<sup>®</sup> SARK), which simultaneously analyzed afferent populations. The output of these discriminators provided noise-free tracings (discriminated units), which were counted using Biopac AcqKnowledge<sup>®</sup>

software at 1-s intervals (expressed in Hz). Before each stimulus known to activate the metabosensitive afferent fibers, a baseline recording ( $F_{\text{impulses s}^{-1}}$ ) was achieved to ensure that the discharge rate was stable. The recording was considered available only if the fluctuation of baseline impulse activity ranged between 100 and 103 %. Consequently, variation of firing rate was related only to the stimuli applied and not to environmental conditions. The discharge rate was averaged for a 1-min period preceding EIF (baseline activity), and its change was measured during the first minute period following EIF. Thus, variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge rate, i.e., baseline discharges corresponded to 100 %.

After a 30-min resting period, distinct concentrations of KCl (1, 5, 10 and 20 mM/0.5 ml) and LA (0.5, 1, 2 and 3 mM/0.1 ml) were randomly injected into the contralateral artery, while nerve activity was continuously recorded. The injections, which required 5–10 s to be completed, were washed with 0.1 ml of normal saline. Baseline afferent discharge was averaged on 1-min-long period pre- and post-injection. The post-stimulus discharge firing rate was compared to the baseline discharge rate, and variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge firing rate. There was a 10-min delay between each injection in order to let the afferent activity go back to its baseline activity.

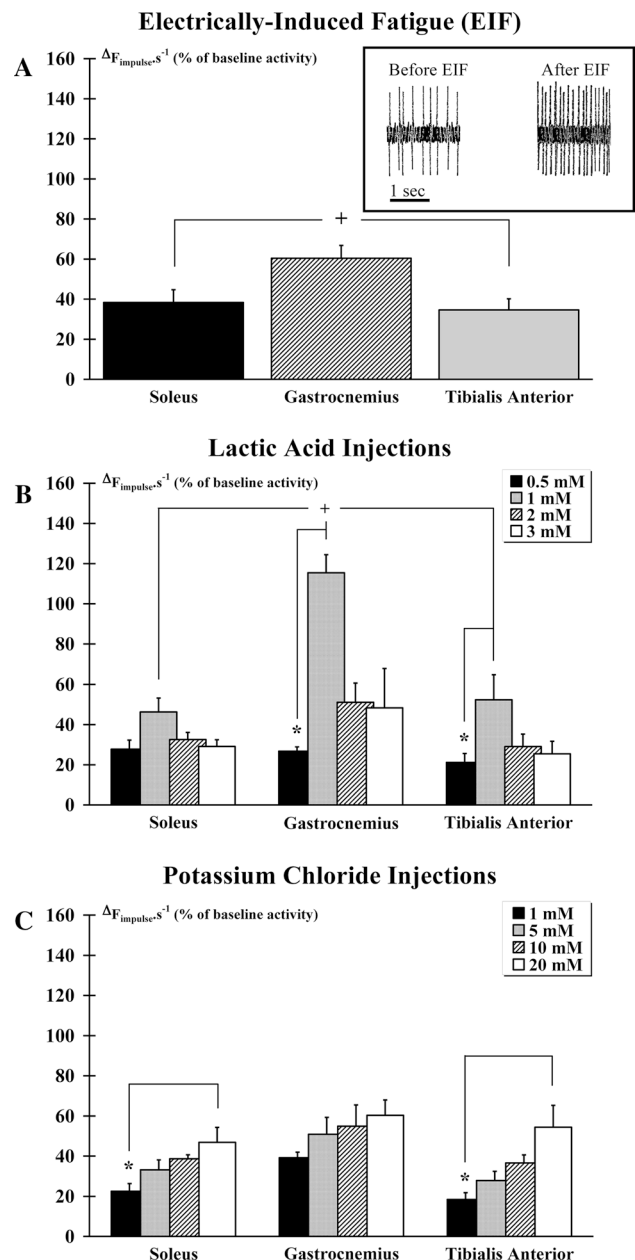
Data processing was performed using a statistical software program (Sigmastat<sup>®</sup> 2.03 SPSS, Systat Software Inc., CA, USA). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences were tested by Wilcoxon test using raw data before and after stimulus. Kruskal–Wallis test completed by a Dunn's post hoc test was used to compare response to EIF, LA and KCl between the three muscles and to compare response to different LA and KCl concentrations. Results were considered statistically significant if the  $p < 0.05$ .

## Results

Whatever the stimulus and the dose used (EIF, LA or KCl), a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the raw afferent activity was recorded as compared to baseline activity within each type of muscle (Fig. 1).

Three minutes of EIF (Fig. 1a) induced a significant increase in group III and IV afferent activity from soleus ( $+38.35 \pm 6.35$  %), tibialis ( $+34.61 \pm 5.52$  %) and gastrocnemius ( $+60.43 \pm 6.37$  %) muscles. However, this increased response was significantly higher ( $p < 0.05$ ) for the gastrocnemius muscle compared to the two other muscle types.

For LA injections (Fig. 1b), results indicated that the higher ( $p < 0.05$ ) responses were obtained for



**Fig. 1** Response of the metabosensitive fibers to electrically induced fatigue (EIF) and to chemicals (LA and KCl). Whatever the stimulus applied (EIF, LA and KCl), a significant increase in the raw afferent activity is recorded as compared to baseline activity in the three groups. **a** The post-EIF changes [ $\Delta F_{\text{impulses s}^{-1}}$  % control level (baseline activity)] in afferent discharge rate originating from the gastrocnemius muscle are significantly ( $^+p < 0.05$ ) higher than the changes in afferent discharge rate originating from soleus and tibialis anterior muscles. An example of recording obtained in the gastrocnemius muscle before and after the 3-min repetitive stimulation is given in the box. **b** The response of tonically active muscle afferents after 1 mM lactic acid injection is significantly higher ( $^+p < 0.05$ ) for the gastrocnemius muscle compared to the two other muscles. Furthermore, 1 mM LA injection induces in gastrocnemius and tibialis anterior muscles a response significantly higher ( $*p < 0.05$ ) than the response induced by the 0.5 mM dose. **c** In the gastrocnemius and tibialis anterior muscles, the response of tonically active muscle afferents after 20 mM KCl injection is significantly higher ( $*p < 0.05$ ) compared to the response induced by the 1 mM dose

concentration of 1 mM in gastrocnemius and tibialis anterior muscles compared to 0.5 mM. Moreover, the response ( $+115.5 \pm 8.9 \%$ ) obtained for concentration of 1 mM in gastrocnemius muscle was significantly ( $p < 0.05$ ) higher than the responses measured in soleus ( $+46.6 \pm 6.9 \%$ ) and tibialis anterior ( $+52.3 \pm 12.5 \%$ ) muscles.

For KCl injections (Fig. 1c), results indicated that the response induced by the highest (20 mM) concentration of KCl was significantly ( $p < 0.05$ ) greater than the response induced by the concentration of 1 mM in soleus and in tibialis anterior muscles.

## Discussion

Consistent with our previous findings (Decherchi et al. 1998; Marqueste et al. 2002; Caron et al. 2014), the present study showed that the discharge rate of metabosensitive fibers in response to increased KCl was concentration dependent in the investigated range, or afferent discharge culminated at 1 mM for LA. The afferent responsiveness to EIF and metabolites injections was greater for the gastrocnemius muscle compared to the soleus muscle as previously reported using muscle contractions to induce an EPR (Petrofsky and Lind 1980; Petrofsky et al. 1981; Iwamoto and Botterman 1985). Moreover, the response of the tibialis anterior muscle to the same stimuli was unexpectedly similar to the soleus muscle in our study, providing evidence that metabosensitive afferent response is not only muscle phenotype dependent.

Skeletal muscles are innervated by afferent fibers, which mainly detect metabolite variations for group IV afferents by TRPV-1, ASIC3 and P2X receptors (Decherchi et al. 1998; Gao et al. 2006, 2007) but also mainly detect mechanical deformations for group III afferents. Metabolite receptors seemed to act in a synergic way (Light et al. 2008), and some of the afferents responding to chemicals can also respond to mechanical stimuli (Kaufman and Forster 1996). When chemicals such as LA or KCl are injected, or when the muscle is stimulated with an EIF known to increase the metabolites production, the metabosensitive afferent response increases their firing rate (Decherchi et al. 1998) and then induces an EPR (Decherchi et al. 2007). Muscle electrical stimulations also induce muscle deformations that will stimulate the group III mechanosensitive afferents (Stebbins et al. 1988; Williamson et al. 1994). In our study, we recorded afferent activity from groups III and IV following chemical injections and after EIF (in the absence of any movements and muscle deformations) on soleus, gastrocnemius and tibialis anterior muscles.

Most of the studies that compared the EPR response between muscles conclude that the specificity of the response depends on the muscle cell-type composition.

Indeed, it was shown an EPR response during the gastrocnemius muscle stimulation but not for the soleus muscle (Petrofsky and Lind 1980; Petrofsky et al. 1981). In opposition, another study reported an EPR response during the soleus muscle stimulation, but it was lower compared to the gastrocnemius muscle stimulation (Iwamoto and Botterman 1985). When the gastrocnemius muscle phenotype is switched from fast oxidative to more oxidative phenotype by chronic low-frequency muscle stimulation protocol, it also induces a reduced EPR response (Wilson et al. 1995). Our study confirms that the muscle stimulation using an EIF induced a higher III and IV afferent responses originating from the gastrocnemius muscle compared to the soleus muscle, but unexpectedly the tibialis anterior muscle responses to EIF are not different from the soleus muscle response. This result is in opposition with the fact that contraction of type I slow-twitch oxidative cells induces a lower response than contraction of type II fast-twitch glycolytic cells. One explanation could be found in the frequency of the electrical stimulation used in our experiment.

Indeed, in our study, the 10 Hz frequency for the EIF was chosen in accordance with previous study (Darques and Jammes 1997), showing that the stimulation at low frequency induced a higher metabosensitive response compared to the high frequency (100 Hz). Other studies investigating the tibialis anterior muscle fatigue on rabbits used a stimulation of 50 Hz (Wilson et al. 1995) or ranging between 20 and 50 Hz (Iwamoto and Botterman 1985). Furthermore, it was shown that when the stimulation frequency was below the tetanus threshold, the EPR response was reduced (Perez-Gonzalez 1981; Kaufman et al. 1984). According to their muscle cell-type composition (Delp and Duan 1996), the soleus muscle has the lowest tetanus threshold, while the tibialis anterior muscle has the highest; the gastrocnemius muscle should be considered as an intermediate muscle. Thus, the 10 Hz stimulation used in our experiment was closer to the tetanus threshold for the soleus muscle, but was relatively lower to the one of the tibialis anterior muscles. This difference between the frequency used and the tetanus muscle threshold could explain why the metabosensitive response is lower for the tibialis anterior muscle. Finally, it was also described that the muscle mass influences the magnitude of the afferent response: Higher responses were observed for heavy muscles (McCloskey and Streatfeild 1975; Iwamoto and Botterman 1985; Iellamo et al. 1999) such as the gastrocnemius muscle, explicating why in our experiment we observed the largest response in the gastrocnemius muscle compared to the two other muscles with lighter masses.

Considering the chemicals injections, as previously shown for tibialis anterior and gastrocnemius muscles, there is a relationship between the doses of KCl and the change in afferent discharge rate, whereas the activation of muscle afferents by LA culminated for the 1 mM



concentration and then declined (Decherchi et al. 1998). These results confirmed that the metabosensitive fibers response to LA and KCl are not similar (Caron et al. 2014) and then differs from the study of Xing et al. (2008) that showed that response to low pH was higher for glycolytic muscle cells compared to more oxidative one. This difference could be explained as discussed above by the mass difference between the studied muscles (McCloskey and Streatfeild 1975; Iwamoto and Botterman 1985; Iellamo et al. 1999). Another explanation could be found in receptor, afferent fiber and vascular density, and metabolites release following EIF between soleus, gastrocnemius and tibialis anterior muscles. Because some differences have been previously reported in the afferent response between flexor and extensor muscle (Woolf and Wall 1986; Bosch et al. 2012), the functional difference between muscles could also be involved in the response observed.

## Conclusions

This study provides evidence that metabosensitive afferent response has a quite similar firing pattern between soleus, gastrocnemius and tibialis anterior muscles, but some differences in metabosensitive response changes are observed between muscles. Because there are some anatomical (mass, phenotype, vascularization, receptor and afferent density...) and functional (flexor vs. extensor) differences between muscles, it is important to take into consideration the specificity of each muscle and not to generalize the metabosensitive influence on sensorimotor loop and supraspinal structures to all skeletal muscles.

**Acknowledgments** This work was supported by funding from Aix-Marseille Université (AMU) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

## References

Bakels R, Kernell D (1993) Matching between motoneurone and muscle unit properties in rat medial gastrocnemius. *J Physiol* 463:307–324

Bosch KD, Bradbury EJ, Verhaagen J, Fawcett JW, McMahon SB (2012) Chondroitinase ABC promotes plasticity of spinal reflexes following peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 238:64–78

Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE III (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234:723–748

Caron G, Rouzi T, Grelot L, Magalon G, Marqueste T, Decherchi P (2014) Mechano- and metabosensitive alterations after injection of botulinum toxin into gastrocnemius muscle. *J Neurosci Res* 92:904–914

Darques JL, Jammes Y (1997) Fatigue-induced changes in group IV muscle afferent activity: differences between high- and low-frequency electrically induced fatigues. *Brain Res* 750:147–154

Darques JL, Decherchi P, Jammes Y (1998) Mechanisms of fatigue-induced activation of group IV muscle afferents: the roles played by lactic acid and inflammatory mediators. *Neurosci Lett* 257:109–112

Decherchi P, Dousset E (2003) Role of metabosensitive afferent fibers in neuromuscular adaptive mechanisms. *Can J Neurol Sci* 30:91–97

Decherchi P, Darques JL, Jammes Y (1998) Modifications of afferent activities from tibialis anterior muscle in rat by tendon vibrations, increase of interstitial potassium or lactate concentration and electrically-induced fatigue. *J Peripher Nerv Syst* 3:267–276

Decherchi P, Dousset E, Jammes Y (2007) Respiratory and cardiovascular responses evoked by tibialis anterior muscle afferent fibers in rats. *Exp Brain Res* 183:299–312

Delp MD, Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* (1985) 80:261–270

Gao Z, Henig O, Kehoe V, Sinoway LI, Li J (2006) Vanilloid type 1 receptor and the acid-sensing ion channel mediate acid phosphate activation of muscle afferent nerves in rats. *J Appl Physiol* (1985) 100:421–426

Gao Z, Li JD, Sinoway LI, Li J (2007) Effect of muscle interstitial pH on P2X and TRPV1 receptor-mediated pressor response. *J Appl Physiol* (1985) 102:2288–2293

Gelfi C, Vasso M, Cerretelli P (2011) Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *J Proteomics* 74:774–795

Iellamo F, Massaro M, Raimondi G, Peruzzi G, Legramante JM (1999) Role of muscular factors in cardiorespiratory responses to static exercise: contribution of reflex mechanisms. *J Appl Physiol* (1985) 86:174–180

Iwamoto GA, Botterman BR (1985) Peripheral factors influencing expression of pressor reflex evoked by muscular contraction. *J Appl Physiol* (1985) 58:1676–1682

Kaufman MP, Forster HV (1996) Reflexes controlling circulatory, ventilatory and airway responses to exercise. *American Physiological Society, Bethesda*

Kaufman MP, Rybicki KJ, Waldrop TG, Mitchell JH (1984) Effect on arterial pressure of rhythmically contracting the hindlimb muscles of cats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 56:1265–1271

Kernell D (1979) Rhythmic properties of motoneurons innervating muscle fibres of different speed in m. gastrocnemius medialis of the cat. *Brain Res* 160:159–162

Light AR, Hughen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z, Lee J (2008) Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol* 100:1184–1201

Lømø T (2003a) Nerve–muscle interactions. In: Stålberg E (ed) *Clinical neurophysiology of disorders of muscle and the neuromuscular junction in adults and children*. IFSCN handbook of clinical neurophysiology. Elsevier, Amsterdam, pp 47–65

Lømø T (2003b) What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers? *J Neurocytol* 32:835–848

Marqueste T, Decherchi P, Dousset E, Berthelin F, Jammes Y (2002) Effect of muscle electrostimulation on afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Neuroscience* 113:257–271

McCloskey DI, Mitchell JH (1972) Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol* 224:173–186

McCloskey DI, Streatfeild KA (1975) Muscular reflex stimuli to the cardiovascular system during isometric contractions of muscle groups of different mass. *J Physiol* 250:431–441

- Perez-Gonzalez JE (1981) Factors determining the blood pressure responses to isometric exercise. *Circ Res* 48:176–186
- Petrofsky JS, Lind AR (1980) The blood pressure response during isometric exercise in fast and slow twitch skeletal muscle in the cat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 44:223–230
- Petrofsky JS, Phillips CA, Sawka MN, Hanpeter D, Lind AR, Stafford D (1981) Muscle fiber recruitment and blood pressure response to isometric exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 50:32–37
- Pette D, Vrbova G (1999) What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 22:666–677
- Rasmussen M, Zierath JR, Barres R (2014) Dynamic epigenetic responses to muscle contraction. *Drug Discov Today* 19:1010–1014
- Schiaffino S, Sandri M, Murgia M (2007) Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)* 22:269–278
- Stebbins CL, Brown B, Levin D, Longhurst JC (1988) Reflex effect of skeletal muscle mechanoreceptor stimulation on the cardiovascular system. *J Appl Physiol* (1985) 65:1539–1547
- Williamson JW, Mitchell JH, Olesen HL, Raven PB, Secher NH (1994) Reflex increase in blood pressure induced by leg compression in man. *J Physiol* 475:351–357
- Wilson LB, Dyke CK, Parsons D, Wall PT, Pawelczyk JA, Williams RS, Mitchell JH (1995) Effect of skeletal muscle fiber type on the pressor response evoked by static contraction in rabbits. *J Appl Physiol* (1985) 79:1744–1752
- Wolf CJ, Wall PD (1986) Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci* 6:1433–1442
- Xing J, Sinoway L, Li J (2008) Differential responses of sensory neurons innervating glycolytic and oxidative muscle to protons and capsaicin. *J Physiol* 586:3245–3252

#### **IV. Les effets du vieillissement et de l'exercice physique sur le fonctionnement de la boucle sensori-motrice des muscles *tibialis anterior* et *soleus*.**

Le vieillissement semble être accompagné par une diminution de l'influence des afférences issues des FNM lors de l'activation musculaire, ainsi que par une plus grande influence des voies cortico-spinales (Kocejja et Mynark, 2000; Mynark et Kocejja, 2002; Baudry et al., 2014). Cependant, à ces changements fonctionnels vient s'ajouter une augmentation du tonus musculaire qui pourrait s'apparenter à de la spasticité (Marshall, 1982) souvent associée à une diminution de la dépression post-activation (Nielsen et Hultborn, 1993; Nielsen et al., 1993; Grey et al., 2008). Notre étude a donc eu pour objectif d'analyser les effets du vieillissement et de l'exercice physique sur le fonctionnement de la boucle sensorimotrice et plus particulièrement sur la dépression dépendante à la fréquence du réflexe H. Les ondes M et H ont été enregistrées pour les deux muscles étudiés (*soleus* et *tibialis anterior*) et le ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  a été calculé pour des fréquences de stimulation de 0,3, 1, 5 et 10 Hz.

Les principaux résultats indiquent :

- une diminution de la dépression dépendante à la fréquence dès 12 mois pour le muscle *tibialis anterior* et à partir de 20 mois pour le muscle *soleus*,
- une absence de diminution de la dépression dépendante à la fréquence uniquement pour le muscle *tibialis anterior* chez les animaux pratiquant un exercice physique.

Cette étude montre une modification du fonctionnement de la boucle sensori-motrice avec le vieillissement. Par ailleurs, les résultats indiquent que les effets de l'exercice physique sont différents selon la typologie musculaire considérée. Pour le muscle *tibialis anterior*, ayant un phénotype rapide, les effets sont plus marqués que pour le muscle *soleus* au phénotype lent. Ainsi, l'exercice physique endurant régulier permettrait de contrecarrer partiellement les altérations nerveuses liées au vieillissement, tout au moins, pour les muscles rapides dont les propriétés contractiles seraient préservées.



# **Restoration of Post-Activation Depression of the H-Reflex by Treadmill Exercise in Aged Rats**

**Guillaume CARON, Tanguy MARQUESTE, Patrick DECHERCHI**

Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)  
UMR 7287 « Institut des Sciences du Mouvement : Etienne-Jules MAREY » (ISM-EJM)  
Equipe « Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire » (PSNM)  
Parc Scientifique et Technologique de Luminy  
Faculté des Sciences du Sport de Marseille  
CC910 - 163 Avenue de Luminy  
F-13288 Marseille cedex 09, France

**Corresponding author:**

Patrick DECHERCHI

**E-mail:** [patrick.decherchi@univ-amu.fr](mailto:patrick.decherchi@univ-amu.fr)

**Tel./Fax:** +33 (0)4-91-82-84-14

**Web site:** [www.ism.univ-amu.fr](http://www.ism.univ-amu.fr)

**Short title:** *Changes in Spinal Excitability with Age and After Physical Activity.*

No conflict of interest.

## **Abstract**

The purpose of this study was to evaluate the effects of aging and chronic physical activity on the post-activation depression of the Hoffman reflex. The  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio was measured and the H-reflex rate sensitive depression was assessed. Measurements were performed on sedentary rats aged of 3, 6, 12 and 20 months and on animals aged of 12 and 20 months performing an incremental treadmill exercise protocol during the last 8 weeks preceding the recordings. At the end of the experiment, the muscle mass/body mass ratio was calculated. Results indicated that the H-reflex depression of the *tibialis anterior* and *soleus* muscles was present until age of 6 and 12 months, respectively. For the *tibialis anterior* muscle, results also pointed out a decrease in the relative muscle mass with age only but that the exercise allowed to restore the H-reflex rate sensitive depression and to increase the relative muscle mass compared to sedentary animals. These findings clearly demonstrate that neural alteration of the spinal cord is prevented by activity in aged rats.

**Key words:** Ageing, Extensor, Flexor, H-reflex, Post-activation depression.

## 1. Introduction

Aging is associated with progressive decline in muscle function and mass leading to a decrease in mobility and metabolic disturbances (Vandervoort and McComas, 1986; Narici et al., 1991; Lindle et al., 1997; Metter et al., 1997; Macaluso and De Vito, 2004; Reeves et al., 2006; Lanza and Nair, 2009; Pasini et al., 2011). It was shown a muscle progressive weakness (force loss) generally attributed to change in muscle architecture, collagenous structures (including tendon) and neural drive (Enoka, 1997; Roos et al., 1997; Tuite et al., 1997; Yue et al., 1999; Scaglioni et al., 2002; Narici et al., 2003; Kjaer, 2004; Macaluso and De Vito, 2004; Unhjem et al., 2015). Muscle architecture alterations consist in a muscle fascicule shortening, change in pennation angles and a decrease number of type I (slow) and II (fast) muscle cells (muscle cell apoptosis), associated with type II cell atrophy (Lexell et al., 1988; Narici et al., 2003; Morse et al., 2004). Tendon alterations consist in cross-sectional area change with age leading to a thicker tendon which would be subjected to smaller tensile stresses and would be less likely to rupture on tension (Magnusson et al., 2003). Neural alterations consist in loss of motoneurons, reduction of motor unit recruitment and firing frequency (Lexell et al., 1988; Kamen et al., 1995; Yue et al., 1999), and decrease in motoneuron excitability and thus in nerve conduction velocity (Sabbahi and Sedgwick, 1982; deVries et al., 1985; Vandervoort and Hayes, 1989; Falco et al., 1994a; Huang et al., 2009). Because the muscle phenotype depends of its innervation (Pette and Vrbova, 1985; Lomo, 2003), the decrease of the number of action potentials sent to the muscle could accelerate muscle phenotype changes with age and, then, associated with loss of motoneurons, alter the sensorimotor loop (and motor and physiological adjustments). Indeed, in a recent paper, we concluded that the response of metabosensitive muscle afferent fibers which is involved in the activation of the sensorimotor loop (and motor and physiological adjustments) depends of anatomical (mass, phenotype, vascularization, receptor and afferent density...) and functional (flexor vs. extensor) characteristics of their originating muscles (Caron et al., 2015).

Muscle afferent activation in the exercising muscles is responsible of motoneuronal and cardiorespiratory adjustments (Mitchell et al., 1977; Decherchi and Dousset, 2003; Decherchi et al., 2004; Decherchi et al., 2007). Indeed, Golgi tendon organ (afferents Ib), muscle spindles (afferents Ia and II or A $\beta$ ) (Rosales and Dressler, 2010) and muscle afferents from groups III (A $\delta$ ) and IV (C) (Kniffki et al., 1978) send proprioceptive information to the spinal cord and supraspinal structures to adjust the neuron excitability.

Concerning the motor system, reflexes are involved in the control of posture and balance (Houk et al., 1981). The Hoffmann reflex (H-reflex) is a valuable tool to assess the modulation of monosynaptic reflex loop in the spinal cord (Hoffmann, 1910; Magladery and McDougal, 1950; Magladery et al., 1951a; Pierrot-Deseilligny and Mazevet, 2000). It is an estimate of  $\alpha$ -motoneurons excitability when their intrinsic excitability (Capaday, 1997) and presynaptic inhibitions (Zehr, 2002) remain stable. The H-reflex, that is evoked by the direct activation of the Ia afferent nerve fibers, measures the efficacy of synaptic transmission through the  $\alpha$ -motoneuron pool; i.e., it is an indication of the number of motor units that are reflexively activated at a given stimulus intensity and any change in H-reflex amplitude reflects changes in the excitability of the sensorimotor loop. Thus, the H-reflex is used to study the sensorimotor integration (ascending peripheral and descending central influences) and plasticity of the central nervous system (Knikou, 2008).

The neuromuscular system of old subjects has been considered as less plastic and, therefore, less adaptive compared to that young adults and the integrity of the spinal stretch reflex system has been demonstrated to significantly degrade over time (Koceja et al., 1995; Mynark and Koceja, 2001).

In a human study, it was shown that the  $H_{max}/M_{max}$  ratio (proportion of the entire motoneuron pool capable of being recruited) decreased with age (Koceja and Mynark, 2000)

and that the muscle tone increase (Marshall, 1982). Angulo-Kinzler et al. reported that the resting  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio of the *soleus* muscle increases in elderly subjects when standing compared to younger subjects in whose the ratio decrease and no gain modulation of the reflex from prone to standing in elderly subjects (Angulo-Kinzler et al., 1998). Other study, examining the modulation of the soleus H-reflex in response to the Jendrassik maneuver in standing positions showed some difference between young and elderly people (Tsuruike et al., 2003). It was also indicated that aging increases the between-leg variability of H-reflex latency in individuals (Falco et al., 1994b). Other authors reported some difference in the *soleus* H-reflex post-activation depression between young and elderly (Robertson and Koceja, 2003). More recently, Raffalt et al. indicated that the H-reflex amplitude measured during walking was affected by aging (Raffalt et al., 2015) and Trompetto et al., assessing the post-activation depression, reported that the frequency-related depression of the *flexor carpi radialis* H-reflex is similar in young ( $28\pm 3$  years) and elderly ( $69\pm 6$  years) subjects at stimulation frequencies of 0.33, 0.5 and 1 Hz, with the exception of 2 Hz (Trompetto et al., 2013). In view of the scientific literature, it appears that no information has been reported concerning changes at rest in the post-activation depression with age depending on the muscle phenotype.

It was suggested that physical activity retards alterations linked to aging by inducing neural adaptations, muscle mass increase and muscle phenotype change from fast fatigable to more fatigue resistant fibers (Cartee, 1994). Indeed, regular physical activity produces marked adaptations in both the muscular and nervous systems in young and elderly (Mazzocchio et al., 2006; Christie and Kamen, 2014; Piirainen et al., 2014). The excitability of the reflex arc could be modulated by physical training, even in old age. Thus, was reported that physically active elderly preserved a faster reflex response compared to sedentary elderly (Hart, 1986). Furthermore, it was shown that strength gain observed in elderly was associated to changes in neural drive (distribution of the motor command to the muscles, modulation of neural excitability, ...)(Enoka, 1997; Hakkinen et al., 2000). Finally, Lauber et al. observed that 12 weeks of alpine skiing increase the H-reflex excitability and maximal force and decrease the postural sway in elderly (Lauber et al., 2011). However, other authors showed no modulation of the H-reflex ( $H_{\max}/M_{\max}$  ratio) of plantar flexor after a 16 weeks strengthening program in elderly men (Scaglioni et al., 2002). Likewise, Unhjem et al. reported no change in H/M ratio after 8 weeks of heavy resistance training despite an increase in maximal voluntary contraction, in rate of force development and in V/M ratio (reflecting the magnitude of efferent output to the muscle during maximal contraction) of the *triceps surae* muscles in elderly males (Unhjem et al., 2015). Nevertheless, as suggest by some authors, influences on the neuromuscular system are the result of the type and quantity of physical activity (Koceja et al., 2004). Furthermore, the H-reflex rate sensitive depression that allow to assess the post-activation depression has never been studied in slow and fast muscles after a chronic training in older.

In light of these considerations, the present study was designed to compare the frequency-dependent depression of the H-reflex on predominantly glycolytic (*tibialis anterior*) and oxidative (*soleus*) muscles in sedentary rats aged of 3, 6, 12 and 20 months and in rats aged of 12 and 20 months performing a treadmill training during the 8 weeks preceding the electrophysiological recordings. Thus, we explored the modulation of the H-reflex and changes in the homosynaptic depression in young and aged sedentary and active animals.

## 2. Materials and Methods.

### 2.1. Animals.

Seventy male Sprague Dawley rats were used in the study (Janvier<sup>®</sup>, Le Genest Saint Isle, France). Forty-eight were subdivided into four experimental groups depending to their age at the time of electrophysiological recordings: 3 months old (3M, n=12), 6 months old (6M, n=12), 12 months old (12M, n=12) and 20 months old (20M, n=12). The twenty-two other rats were divided into two experimental groups and performed a treadmill training during 8 weeks before the electrophysiological session: 12 months old (M12-EXE, n=10) and 20 months old (M20-EXE, n=12). Animals were housed in smooth-bottomed plastic cages at 22 °C with a 12-h light/dark cycle. Food (Safe<sup>®</sup>, Augy, France) and water were available *ad libitum*.

### 2.2. Ethical approval.

Anaesthesia and surgical procedures were performed according to the French law on animal care guidelines and the Animal Care Committees of University Aix-Marseille (*Aix-Marseille Université*) and CNRS (*Centre National de la Recherche Scientifique*) approved our protocols (license n°A 13.013.06). Furthermore, experiments were performed following the recommendations provided in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health) and in accordance with the European Community's council directive of 24 November 1986 (86/609/ EEC).

### 2.3. Exercise training protocol.

Animals from the groups M12-EXE and M20-EXE were first familiarized with the treadmill for 1 week. Then, during the next eight weeks, animals performed an incremental treadmill exercise protocol adapted from Pasini et al., (Pasini et al., 2011). Physical exercise training was performed 3 days per week during 8 weeks. Briefly, during the first week, the running speed was fixed at 13.5 m/min for 10 min. During the second week, the duration of the exercise was increased to 20 min but the running speed was kept unchanged. From the third to the fifth week, the training time was progressively increase to reach 50 min and the running speed was fixed at 15 m/min. Finally, for the last 3 weeks, the duration of the exercise was set at 60 min and the running speed to 18 m/min. Electrophysiological recordings were performed within 48h after the end of the exercise training protocol.

### 2.4. Electrophysiological recordings.

Rats were anesthetized with urethane (1.1 g/kg, i.p.). Dissection at the middle thigh level was carried out to expose the right tibial and peroneal nerves. They were dissected free from surrounding tissues and immersed in paraffin oil. The knee and ankle were firmly held by clamps on a horizontal support in order to avoid disturbing movements and to maintain the 90°knee joint angle during electrical nerve stimulations. Animal temperature was maintained between 36-37°C with a blanket controlled by rectal temperature probe. M- and H-waves, were recorded as previously described (Bianco et al., 2011; Pertici et al., 2013).

Briefly, bipolar fine wire electrodes (inter-electrode distance: 1 mm) were placed subcutaneously on the *soleus* and *tibialis anterior* muscles for electromyographic (EMG) recordings. Two tungsten bipolar cuff electrodes (inter-electrode distance: 2 mm) were placed on branch of nerve innervating the *soleus* and *tibialis anterior* muscles for stimulation (0.1 ms pulse duration). The cathodes (positive electrodes) were oriented proximally. A ground electrode was place in a nearby muscle. Exposed tissue was covered with paraffin oil to prevent drying. The

recorded signal was passed to a differential amplifier (P2MP<sup>®</sup>, 5104B, Marseille, France) and bandpass filtered at 0.1 Hz and 10 kHz. The analog signal was then sent to an A/D converter and the digital waveform was stored and displayed (sampled at 20 KHz, filtered with High Pass at 150 Hz) online using data acquisition software (Biopac MP150<sup>®</sup> and AcqKnowledge<sup>®</sup> software, Biopac System Inc., Goleta, CA, USA). Stimulation of the nerves produced two EMG responses. The earlier response (< 4 ms latency), the M-wave, was due to direct activation of the motor axons in the stimulated nerve and did not involve a spinal circuit. The second response (> 4 ms latency), the monosynaptic H-reflex, was due to the activation of muscle Ia afferents in the stimulated nerve that synapse on spinal  $\alpha$ -motoneurons.

In a first step, threshold and maximal response amplitudes were determined. Intensity of the stimulus delivered by a Grass<sup>®</sup> S88 stimulator (Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA) was gradually increased until both M- and H-waves were maximal and stable: in the low stimulus intensity, only M-wave was evoked whereas the H-wave was observable at higher intensity. Thus, when the  $H_{\max}$  was reached, the M-wave amplitude was already maximal (Gozariu et al., 1998). The total motor unit response was determined by supramaximal stimulation of the nerve axons to produce a maximal M-wave.

In a second step, the H-reflex rate sensitive depression (also called frequency-related depression, frequency-dependent depression, rate-dependent depression or low-frequency depression, i.e., the decrease in reflex magnitude relative to repetition rate) was studied (Thompson et al., 1992; Hultborn et al., 1996; Skinner et al., 1996; Lee et al., 2005; Reese et al., 2006; Lee et al., 2009; Bianco et al., 2011; Pertici et al., 2013). This method was used to assess post-activation depression that refers to the inhibition of the H-reflex, elicited in a given muscle at rest, induced by a preceding conditioning electrical stimulation able to activate the Ia afferents mediating the H-reflex (Crone and Nielsen, 1989; Hultborn et al., 1996). Indeed, in young healthy animals or subjects, the amplitude of the H-reflex is decreased, due to marked frequency-dependent depression, when stimulus frequencies reach or exceed 1 Hz (Lloyd and Wilson, 1957; Ishikawa et al., 1966; Schindler-Ivens and Shields, 2000). However, the depressive effect is decreased or absent in spastic subjects (Calancie et al., 1993). Thus, this method has been used by many investigators as a quantitative measure of hyperreflexia.

As originally described, a control repetition rate of 0.3 Hz was used (Eccles and Rall, 1951). Although a small depression was subsequently shown to outlast this period, 3.0 s provided a practical compromise between recovery and efficient performance of the protocols (Lloyd and Wilson, 1957). The amplitudes of the M- and H-waves, determined by the peak-to-peak values of each waveform, were used to calculate the average  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio, an index that estimate the level of reflex excitability of the motor pool (Maffiuletti et al., 2001), that depends on the facilitation of the transmission between the Ia fibers and  $\alpha$ -motoneurons, the presynaptic inhibitions and oligosynaptic contributions (Schieppati, 1987). More precisely, this ratio represent the proportion of the entire motoneuron pool capable of being recruited (Magladery et al., 1951a; Magladery et al., 1951b; Taborikova, 1966). Thereafter, stimulation was performed at frequencies of 1, 5 and 10 Hz, with a 5-min inter-rate interval. The stimulus intensity previously defined to elicit maximal H-wave was used across the applied frequencies. Immediately after changing to a new test frequency, the magnitude of the initial two or three reflexes progressively reached a new plateau. To decrease the variability that could be due to this transition, the signal average, at each test frequency, was recorded after the initial reflexes to exclude responses with the most acute transition. Fifteen consecutive waveforms were recorded at each frequency and an average of 10 responses was stored after discarding the first 5 responses in order to obtain an average of the stabilized reflex. The  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio at 1, 5 and 10 Hz was expressed as a percent of 0.3 Hz baseline frequency ratio in order to calculate H-reflex rate sensitive depression. Following the frequency series testing, the H-reflex amplitude was confirmed at 0.3 Hz for consistency. If the amplitude at recheck was less than 90% of the initial amplitude, data were



discarded. This protocol was repeated for *soleus* and *tibialis anterior* muscles of each group of rats.

## 2.5. Muscle mass.

At the end of the experiments, animals were sacrificed by an intra-arterial overdose (3 ml, i.v) of sodium pentobarbital solution (Nembutal<sup>®</sup>, Sanofi Santé Animale, Libourne, France - 0.6 g/kg). Left *soleus* and *tibialis anterior* muscles were harvested and immediately weighted on a precision scale. Then, comparisons of relative muscle mass using a muscle mass/body mass ratio between groups were performed.

## 2.6. Statistics.

Data processing was performed using a commercially available software program (SigmaStat<sup>®</sup> 2.03 SPSS, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences were tested by two-way analysis of variance completed by a Newman-Keuls *post-hoc* test to compare the H-reflex rate sensitive depression between groups. Muscle weights were analyzed with one-way analysis of variance for aging, or t-test for physical activity effects. Results were considered statistically significant if the p-value fell below 0.05.

## 3. Results.

### 3.1. M-Wave and H-Reflex.

H-reflex rate sensitive depression of the H-reflex at 0.3 Hz was designated as 100%. For the *soleus* muscle, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency in the 3M, 6M and 12M groups. No change was observed in 20M groups (**Figure 1A**). In the 3M group, the ratio was significantly lower at the frequency of 10 Hz ( $p < 0.05$ ) compared to than that of 0.3 Hz. In the 6M group, the ratio was significantly lower at the frequency of 5 Hz ( $p < 0.05$ ) and 10 Hz ( $p < 0.05$ ) compared to than that of 0.3 Hz. In the 12M group, the ratio was significantly lower at the frequency of 10 Hz ( $p < 0.01$ ) compared to than that of 0.3 Hz. After 8 weeks of treadmill training, in the 12M-EXE group, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio was significantly lower at the frequency of 5 Hz ( $p < 0.01$ ) and 10 Hz ( $p < 0.01$ ) compared to than that of 0.3 Hz but no difference was found between this trained group and the untrained group (12M). No H-reflex rate sensitive depression was found in the 20M-EXE (**Figure 2B**).

For the *tibialis anterior* muscle, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency only in the 3M and 6M groups. No change was observed in the older groups (12M and 20M) indicating a loss of the H-reflex rate sensitive depression in sedentary animals (**Figure 1B**). In the 3M and 6M groups, the ratio was significantly lower at the frequency of 5 Hz ( $p < 0.05$ ) and 10 Hz ( $p < 0.01$ ) compared to than that of 0.3 Hz. After 8 weeks of treadmill training, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency in the older groups (12M-EXE and 20M-EXE) indicating a recovery of the H-reflex rate sensitive depression in trained animals (**Figure 2B**). In the 12M-EXE, the ratio was significantly lower at the frequency of 1 Hz ( $p < 0.01$ ), 5 Hz ( $p < 0.001$ ) and 10 Hz ( $p < 0.001$ ) compared to than that of 0.3 Hz. In the 20M-EXE, the ratio was significantly lower at the frequency of 1 Hz ( $p < 0.05$ ), 5 Hz ( $p < 0.001$ ) and 10 Hz ( $p < 0.001$ ) compared to than that of 0.3 Hz.

### 3.2. Muscle properties.

For the *soleus* muscle, the muscle mass/body mass ratio remained unchanged from the 3<sup>rd</sup> to the 20<sup>th</sup> month of age whatever the group considered (sedentary or active animals) indicating



an increase of the muscle mass linearly to the body mass increase with age and no gain of muscle mass after the training protocol.

For the *tibialis anterior* muscle, the muscle mass/body mass ratio significantly decreased ( $p < 0.001$ ) from the 3<sup>rd</sup> to the 20<sup>th</sup> month of age in the sedentary groups indicating a that the muscle mass remains constant or a loss of muscle mass with aging despite the increase of body mass. Indeed, in the 3M group the ratio was significantly higher than the ratio calculated for the 6M ( $p < 0.01$ ), 12M ( $p < 0.001$ ) and 20M ( $p < 0.001$ ) groups. The ratio in the 6M group was significantly higher than that of 12M ( $p < 0.01$ ) and 20M ( $p < 0.001$ ) groups and the ratio in the 12M group was significantly ( $p < 0.05$ ) higher than that of 20M group. Finally, in trained groups, the muscle mass/body mass ratios were significantly higher than that untrained groups (12 M vs. 12 M-EXE,  $p < 0.001$ ; 20 M. vs. 20 M-EXE,  $p < 0.001$ ) indicating a gain of muscle mass after the training protocol.

All data are resumed in **Table 1**.

#### 4. Discussion.

This study was designed to evaluate the effects of aging and chronic physical activity on the H-reflex rate sensitive depression. Our results indicated that the H-reflex depression of the *soleus* muscle was present until age of 12 months (no depression was observed at age of 20 months) while the H-reflex depression of the *tibialis anterior* was present until age of 6 months (no depression was observed at age of 12 and 20 months). Results also pointed out a decrease in the muscle mass/body mass ratio with age only in the *tibialis anterior* muscle. Furthermore, for the *tibialis anterior* muscle, we observed that an 8 weeks treadmill exercise allowed to restore the H-reflex rate sensitive depression and a higher muscle mass/body mass ratio compared to sedentary animals. However, no change was observed for the H-reflex rate sensitive depression and the muscle mass/body mass ratio of the *soleus* muscle that could suggest as mentioned in an earlier study that weekly exercise duration was insufficient to oppose muscular alterations of this predominantly oxidative muscle (Pasini et al., 2012). Because, afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord (Gomez-Pinilla et al., 2004), an insufficient exercise duration/intensity could not sufficiently reverse the effects of aging.

It is now admitted that the H-reflex rate sensitive depression is a presynaptic phenomenon acting on the Ia terminals that decrease motoneuron excitability and that does not involve the GABAergic depolarization of the Ia terminals (Schieppati and Crenna, 1984; Hultborn et al., 1996; Kohn et al., 1997) although Butchart et al. reported that the efficacy of GABAergic presynaptic inhibition decreases with aging (Butchart et al., 1993) corroborating that ageing affects to synaptic efficacy (Kanda and Hashizume, 1989). Robertson et al. showed that the H-reflex rate sensitive depression decreases in elderly people (Robertson and Koceja, 2003). Other studies reported an increase in Ia afferent presynaptic inhibition with aging (Morita et al., 1995; Koceja and Mynark, 2000; Mynark and Koceja, 2001) which was attributed in human to a lower efficacy of Ia afferents to activate motoneurons and an increase in the contribution of descending supraspinal influences (Baudry et al., 2014). The population of primary afferent terminals containing substance P and calcitonin gene-related peptide has been shown to be slightly decreased in the dorsal horn of the aged rats (Bergman et al., 1996). Finally, it was shown that there was a significant loss of noradrenergic fibers in the spinal dorsal horn in aged rats (Iwata et al., 2002) that could contribute to a decrease in the H-reflex rate sensitive depression. Indeed, after spinal cord injury (SCI), it was observed a decrease in the H-reflex depression that was reversed by L-dopa injections (Liu et al., 2010).

In the present animal study, the decrease of the H-reflex rate sensitive depression with aging could suggest an alteration of the descending pathways (Iwata et al., 2002) and of the level of reflex excitability of the motor pool, i.e., a decrease of the proportion of the entire motoneuron

pool capable of being recruited that could be due, as suggested in human and animal, to a decrease in the efficacy of the transmission (a decreased probability of transmitter release) between the Ia afferents and  $\alpha$ -motoneurons, an increase in the presynaptic inhibitions and oligosynaptic contributions (Curtis and Eccles, 1960; Capek and Esplin, 1977; Nielsen et al., 1993; Bergman et al., 1996; Hultborn et al., 1996; Lundbye-Jensen and Nielsen, 2008; Trompetto et al., 2013). All of these alterations could lead to a functional impairment of sensorimotor loop and consequently to an impairment of motor and physiological adjustments during movement in elderly.

The effect of exercise on the H-reflex rate sensitive depression was mainly study after SCI. Indeed, in lesioned animals, it was shown a decrease in this depression that was associated to hyperreflexia and spasticity below the level of the lesion (Thompson et al., 1992; Skinner et al., 1996; Schindler-Ivens and Shields, 2000; Lee et al., 2005; Reese et al., 2006; Lee et al., 2009; Bianco et al., 2011; Pertici et al., 2013; Gueye et al., 2015). However, a study reported that passive exercise for 3 months with a motorized bicycle, performed in episodes of 1h/day, 5 days/week, in rats with a complete spinal cord transection, restored frequency-dependent depression of the H-reflex to a level of intact animals (Skinner et al., 1996). The same authors also reported that this type of exercise restored the depression of spinals reflexes in a time-dependent manner with an evident depression by 30 days of exercise (Reese et al., 2006). Similarly, it was shown that this methodology induced a similar effect in human (Kiser et al., 2005). However, more recent studies reported a return of H-reflex depression in individuals with incomplete SCI (Trimble et al., 1998; Phadke et al., 2009) while a other study indicated no difference between a trained and untrained muscle in subject with a complete SCI despite adaptations in torque and fatigue resistance (Shields et al., 2011).

The results described herein show that the H-reflex rate sensitive depression is restored after an 8 weeks treadmill exercise in *tibialis anterior* muscle in aged animals indicating changes in spinal circuitry. This restoration is associated to a higher muscle mass/body mass ratio compared to than that of sedentary animals. Although decreased presynaptic inhibition (lost of inputs from descending pathways) is frequently linked with decreased H-reflex rate sensitive depression after SCI (Pierrot-Deseilligny, 1990; Trimble et al., 1998; Chen et al., 2001), several hypotheses could be advanced to explain the recovery observed in our aged trained animals including changes 1) in  $\alpha$ -motoneurons excitability, 2) in the intrinsic properties of  $\alpha$ -motoneurons, 3) in synaptic transmission between the Ia fibers and the  $\alpha$ -motoneurons, 4) in the morphology of  $\alpha$ -motoneurons and 5) synapse growth. As suggested for SCI (Ollivier-Lanvin et al., 2010), activity in proprioceptive pathways may be a key trigger for H-reflex rate sensitive depression return. It may induce a plastic reorganization in spinal circuitry that may be sustained by retrograde transport of neurotrophic factors from exercising muscle (Gomez-Pinilla et al., 2001; Dupont-Versteegden et al., 2004).

The role of the potassium-chloride co-transporter (KCC2), which is involved in the chloride homeostasis, may also be pointed out because its down-regulation in motoneurons membranes after SCI is associated to a decrease of the H-reflex rate sensitive depression and its up-regulation by physical activity (Côté et al., 2014) or brain-derived neurotrophic factor (BDNF) injection (Boulenguez et al., 2010) is accompanied to a restoration of the depression. Exercised tended to increase trkB expression suggesting a role for BDNF expression in modulating KCC2 expression (Côté et al., 2014). However, in intact rats, intrathecal BDNF injection down-regulates KCC2 and induces a decrease of the rate-dependent depression of the H-reflex (Boulenguez et al., 2010). With age, it was described a fall in neurotrophin receptor (trkA, trkB and trkC) expression in primary sensory neurons that could contribute to the alteration of the H-reflex rate sensitive depression (McMahon et al., 1994; Bergman et al., 1999). Finally, in rat spinal cord transection model, it was noted that passive cycling increased the KCC2 expression only in extensor (lateral *gastrocnemius*, *soleus*) but not in flexor (*extensor*

*digitorum longus, tibialis anterior*) motoneurons (Chopek et al., 2015). In our study, we observed a return of the H-reflex rate sensitive depression only in the *tibialis anterior* muscle.

At this stage of our knowledge and of our thoughts, it is difficult to establish a link between the KCC2 expression/chloride homeostasis/neurotrophin and the H-reflex regulation for each muscle type and more generally to determine exactly which mechanism is involved in the alteration of the H-reflex rate sensitive depression and recovery after an exercise protocol in aged animals. However, although mechanisms are not clear, these findings clearly demonstrate that neural plasticity of the spinal cord is modulated by chronic treadmill training in aged rats.

## 5. Acknowledgment.

This work was supported by funding from *Aix-Marseille Université* (AMU) and the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS).

## 6. References.

- Angulo-Kinzler, R.M., Mynark, R.G., Koceja, D.M., 1998. Soleus H-reflex gain in elderly and young adults: modulation due to body position. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53, M120-125.
- Baudry, S., Penzer, F., Duchateau, J., 2014. Input-output characteristics of soleus homonymous Ia afferents and corticospinal pathways during upright standing differ between young and elderly adults. *Acta physiologica (Oxford, England)* 210, 667-677.
- Bergman, E., Fundin, B.T., Ulfhake, B., 1999. Effects of aging and axotomy on the expression of neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *The Journal of comparative neurology* 410, 368-386.
- Bergman, E., Johnson, H., Zhang, X., Hokfelt, T., Ulfhake, B., 1996. Neuropeptides and neurotrophin receptor mRNAs in primary sensory neurons of aged rats. *The Journal of comparative neurology* 375, 303-319.
- Bianco, J., Gueye, Y., Marqueste, T., Alluin, O., Risso, J.J., Garcia, S., Lavault, M.N., Khrestchatsky, M., Feron, F., Decherchi, P., 2011. Vitamin D(3) improves respiratory adjustment to fatigue and H-reflex responses in paraplegic adult rats. *Neuroscience* 188, 182-192.
- Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., Marsala, M., Vinay, L., 2010. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nature medicine* 16, 302-307.
- Butchart, P., Farquhar, R., Part, N.J., Roberts, R.C., 1993. The effect of age and voluntary contraction on presynaptic inhibition of soleus muscle Ia afferent terminals in man. *Experimental physiology* 78, 235-242.
- Calancie, B., Broton, J.G., Klose, K.J., Traad, M., Difini, J., Ayyar, D.R., 1993. Evidence that alterations in presynaptic inhibition contribute to segmental hypo- and hyperexcitability after spinal cord injury in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 89, 177-186.
- Capaday, C., 1997. Neurophysiological methods for studies of the motor system in freely moving human subjects. *J Neurosci Methods* 74, 201-218.
- Capek, R., Esplin, B., 1977. Homosynaptic depression and transmitter turnover in spinal monosynaptic pathway. *J Neurophysiol* 40, 95-105.
- Caron, G., Decherchi, P., Marqueste, T., 2015. Does metabosensitive afferent fibers activity differ from slow- and fast-twitch muscles? *Exp Brain Res*.
- Cartee, G.D., 1994. Aging skeletal muscle: response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 22, 91-120.

- Chen, X.Y., Feng-Chen, K.C., Chen, L., Stark, D.M., Wolpaw, J.R., 2001. Short-Term and medium-term effects of spinal cord tract transections on soleus H-reflex in freely moving rats. *Journal of neurotrauma* 18, 313-327.
- Chopek, J.W., Sheppard, P.C., Gardiner, K., Gardiner, P.F., 2015. Serotonin receptor and KCC2 gene expression in lumbar flexor and extensor motoneurons posttransection with and without passive cycling. *J Neurophysiol* 113, 1369-1376.
- Christie, A., Kamen, G., 2014. Cortical inhibition is reduced following short-term training in young and older adults. *Age (Dordr)* 36, 749-758.
- Côté, M.P., Gandhi, S., Zambrotta, M., Houlé, J.D., 2014. Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury. *J Neurosci* 34, 8976-8987.
- Crone, C., Nielsen, J., 1989. Methodological implications of the post activation depression of the soleus H-reflex in man. *Exp Brain Res* 78, 28-32.
- Curtis, D.R., Eccles, J.C., 1960. Synaptic action during and after repetitive stimulation. *The Journal of physiology* 150, 374-398.
- Decherchi, P., Dousset, E., 2003. [Role of metabosensitive afferent fibers in neuromuscular adaptive mechanisms]. *Can J Neurol Sci* 30, 91-97.
- Decherchi, P., Dousset, E., Grelot, L., 2004. [Metabolic stability and physiological adaptation of muscle under conditions of exercise]. *Rev Neurol (Paris)* 160, 297-305.
- Decherchi, P., Dousset, E., Jammes, Y., 2007. Respiratory and cardiovascular responses evoked by tibialis anterior muscle afferent fibers in rats. *Exp Brain Res* 183, 299-312.
- deVries, H.A., Wiswell, R.A., Romero, G.T., Heckathorne, E., 1985. Changes with age in monosynaptic reflexes elicited by mechanical and electrical stimulation. *Am J Phys Med* 64, 71-81.
- Dupont-Versteegden, E.E., Houle, J.D., Dennis, R.A., Zhang, J., Knox, M., Wagoner, G., Peterson, C.A., 2004. Exercise-induced gene expression in soleus muscle is dependent on time after spinal cord injury in rats. *Muscle Nerve* 29, 73-81.
- Eccles, J.C., Rall, W., 1951. Effects induced in a monosynaptic reflex path by its activation. *J Neurophysiol* 14, 353-376.
- Enoka, R.M., 1997. Neural strategies in the control of muscle force. *Muscle Nerve Suppl* 5, S66-69.
- Falco, F.J., Hennessey, W.J., Goldberg, G., Braddom, R.L., 1994a. H reflex latency in the healthy elderly. *Muscle Nerve* 17, 161-167.
- Falco, F.J., Hennessey, W.J., Goldberg, G., Braddom, R.L., 1994b. Standardized nerve conduction studies in the lower limb of the healthy elderly. *Am J Phys Med Rehabil* 73, 168-174.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Opazo, P., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 2001. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *The European journal of neuroscience* 13, 1078-1084.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R.R., Hodgson, J., Edgerton, V.R., 2004. Afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord. *J Neurophysiol* 92, 3423-3432.
- Gozariu, M., Roth, V., Keime, F., Le Bars, D., Willer, J.C., 1998. An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Res* 782, 343-347.
- Gueye, Y., Marqueste, T., Maurel, F., Khrestchatsky, M., Decherchi, P., Feron, F., 2015. Cholecalciferol (vitamin D) improves functional recovery when delivered during the acute phase after a spinal cord trauma. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 154, 23-31.
- Hakkinen, K., Alen, M., Kallinen, M., Newton, R.U., Kraemer, W.J., 2000. Neuromuscular adaptation during prolonged strength training, detraining and re-strength-training in middle-aged and elderly people. *Eur J Appl Physiol* 83, 51-62.
- Hart, B.A., 1986. Fractionated myotatic reflex times in women by activity level and age. *J Gerontol* 41, 361-367.

- Hoffmann, P., 1910. Beiträge zur Kenntnis der menschlichen Reflexe mit besonderer Berücksichtigung der elektrischen Erscheinungen. *Arch Anat Physiol* 1, 223-246.
- Houk, J.C., Rymer, W.Z., Crago, P.E., 1981. Dependence of dynamic response of spindle receptors on muscle length and velocity. *J Neurophysiol* 46, 143-166.
- Huang, C.R., Chang, W.N., Chang, H.W., Tsai, N.W., Lu, C.H., 2009. Effects of age, gender, height, and weight on late responses and nerve conduction study parameters. *Acta Neurol Taiwan* 18, 242-249.
- Hultborn, H., Illert, M., Nielsen, J., Paul, A., Ballegaard, M., Wiese, H., 1996. On the mechanism of the post-activation depression of the H-reflex in human subjects. *Exp Brain Res* 108, 450-462.
- Ishikawa, K., Ott, K., Porter, R.W., Stuart, D., 1966. Low frequency depression of the H wave in normal and spinal man. *Exp Neurol* 15, 140-156.
- Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tsuboi, Y., Tashiro, A., Noguchi, K., Masuda, Y., Morimoto, T., Kanda, K., 2002. Plastic changes in nociceptive transmission of the rat spinal cord with advancing age. *J Neurophysiol* 87, 1086-1093.
- Kamen, G., Sison, S.V., Du, C.C., Patten, C., 1995. Motor unit discharge behavior in older adults during maximal-effort contractions. *J Appl Physiol* (1985) 79, 1908-1913.
- Kanda, K., Hashizume, K., 1989. Changes in properties of the medial gastrocnemius motor units in aging rats. *J Neurophysiol* 61, 737-746.
- Kiser, T.S., Reese, N.B., Maresh, T., Hearn, S., Yates, C., Skinner, R.D., Pait, T.G., Garcia-Rill, E., 2005. Use of a motorized bicycle exercise trainer to normalize frequency-dependent habituation of the H-reflex in spinal cord injury. *The journal of spinal cord medicine* 28, 241-245.
- Kjaer, M., 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84, 649-698.
- Kniffki, K.D., Mense, S., Schmidt, R.F., 1978. Responses of group IV afferent units from skeletal muscle to stretch, contraction and chemical stimulation. *Exp Brain Res* 31, 511-522.
- Knikou, M., 2008. The H-reflex as a probe: pathways and pitfalls. *J Neurosci Methods* 171, 1-12.
- Koceja, D.M., Davison, E., Robertson, C.T., 2004. Neuromuscular characteristics of endurance- and power-trained athletes. *Res Q Exerc Sport* 75, 23-30.
- Koceja, D.M., Markus, C.A., Trimble, M.H., 1995. Postural modulation of the soleus H reflex in young and old subjects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 97, 387-393.
- Koceja, D.M., Mynark, R.G., 2000. Comparison of heteronymous monosynaptic Ia facilitation in young and elderly subjects in supine and standing positions. *Int J Neurosci* 103, 1-17.
- Kohn, A.F., Floeter, M.K., Hallett, M., 1997. Presynaptic inhibition compared with homosynaptic depression as an explanation for soleus H-reflex depression in humans. *Exp Brain Res* 116, 375-380.
- Lanza, I.R., Nair, K.S., 2009. Muscle mitochondrial changes with aging and exercise. *Am J Clin Nutr* 89, 467S-471S.
- Lauber, B., Keller, M., Gollhofer, A., Muller, E., Taube, W., 2011. Spinal reflex plasticity in response to alpine skiing in the elderly. *Scand J Med Sci Sports* 21 Suppl 1, 62-68.
- Lee, H.J., Jakovcevski, I., Radonjic, N., Hoelters, L., Schachner, M., Irintchev, A., 2009. Better functional outcome of compression spinal cord injury in mice is associated with enhanced H-reflex responses. *Exp Neurol* 216, 365-374.
- Lee, J.K., Emch, G.S., Johnson, C.S., Wrathall, J.R., 2005. Effect of spinal cord injury severity on alterations of the H-reflex. *Exp Neurol* 196, 430-440.
- Lexell, J., Taylor, C.C., Sjostrom, M., 1988. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 84, 275-294.
- Lindle, R.S., Metter, E.J., Lynch, N.A., Fleg, J.L., Fozard, J.L., Tobin, J., Roy, T.A., Hurley, B.F., 1997. Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. *J Appl Physiol* (1985) 83, 1581-1587.

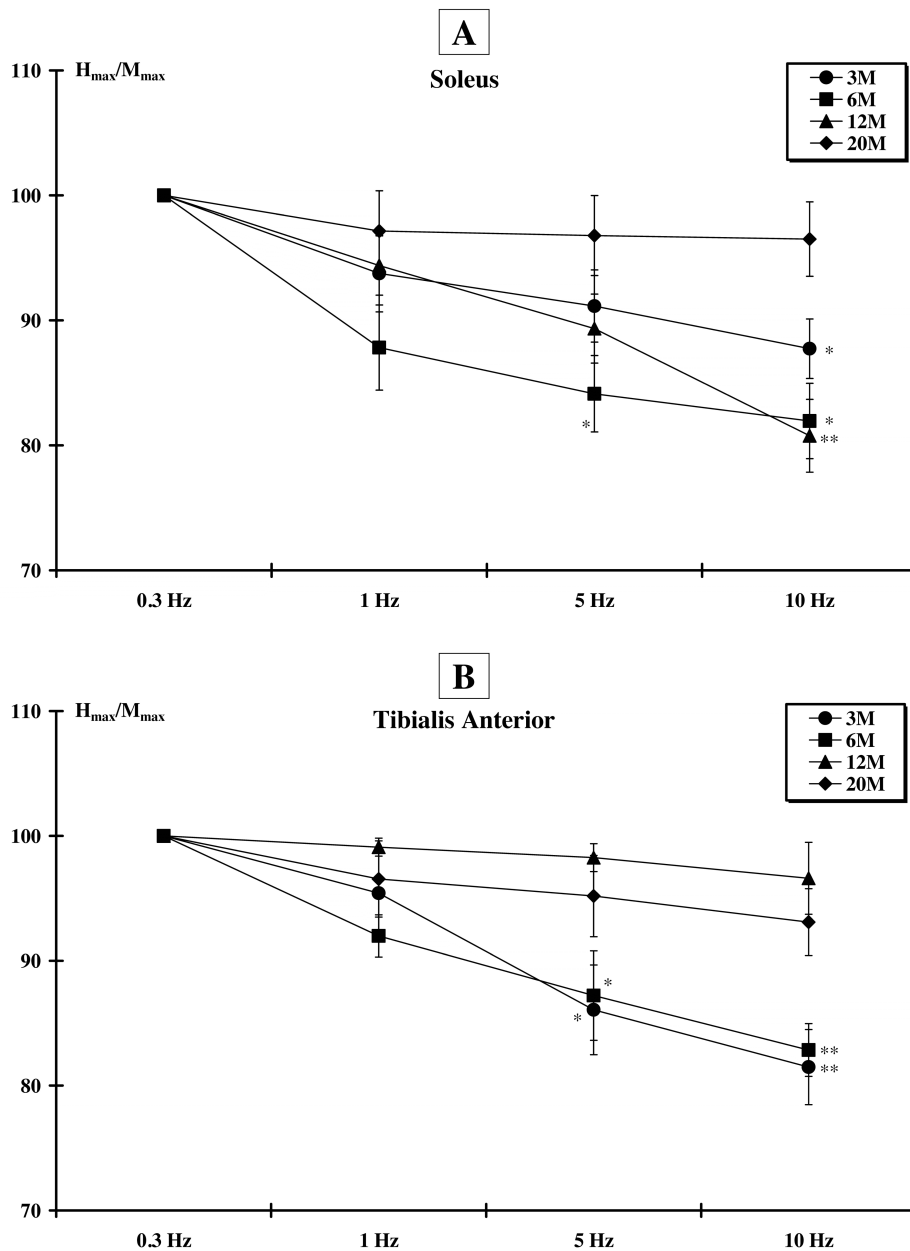
- Liu, H., Skinner, R.D., Arfaj, A., Yates, C., Reese, N.B., Williams, K., Garcia-Rill, E., 2010. L-Dopa effect on frequency-dependent depression of the H-reflex in adult rats with complete spinal cord transection. *Brain research bulletin* 83, 262-265.
- Lloyd, D.P., Wilson, V.J., 1957. Reflex depression in rhythmically active monosynaptic reflex pathways. *J Gen Physiol* 40, 409-426.
- Lomo, T., 2003. What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers? *J Neurocytol* 32, 835-848.
- Lundbye-Jensen, J., Nielsen, J.B., 2008. Immobilization induces changes in presynaptic control of group Ia afferents in healthy humans. *The Journal of physiology* 586, 4121-4135.
- Macaluso, A., De Vito, G., 2004. Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people. *Eur J Appl Physiol* 91, 450-472.
- Maffiuletti, N.A., Martin, A., Babault, N., Pensini, M., Lucas, B., Schieppati, M., 2001. Electrical and mechanical H(max)-to-M(max) ratio in power- and endurance-trained athletes. *J Appl Physiol* (1985) 90, 3-9.
- Magladery, J.W., McDougal, D.B., 1950. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. I. Identification of certain reflexes in the electromyogram and the conduction velocity of peripheral nerve fibers. *Bull Johns Hopkins Hosp* 86, 265-290.
- Magladery, J.W., Porter, W.E., Park, A.M., Teasdall, R.D., 1951a. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. IV. The two-neurone reflex and identification of certain action potentials from spinal roots and cord. *Bull Johns Hopkins Hosp* 88, 499-519.
- Magladery, J.W., Teasdall, R.D., Park, A.M., Porter, W.E., 1951b. Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. V. Excitation and inhibition of two-neurone reflexes by afferent impulses in the same trunk. *Bull Johns Hopkins Hosp* 88, 520-537.
- Magnusson, S.P., Beyer, N., Abrahamsen, H., Aagaard, P., Neergaard, K., Kjaer, M., 2003. Increased cross-sectional area and reduced tensile stress of the Achilles tendon in elderly compared with young women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, 123-127.
- Marshall, J.F., 1982. Sensorimotor disturbances in the aging rodent. *J Gerontol* 37, 548-554.
- Mazzocchio, R., Kitago, T., Liuzzi, G., Wolpaw, J.R., Cohen, L.G., 2006. Plastic changes in the human H-reflex pathway at rest following skillful cycling training. *Clin Neurophysiol* 117, 1682-1691.
- McMahon, S.B., Armanini, M.P., Ling, L.H., Phillips, H.S., 1994. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron* 12, 1161-1171.
- Metter, E.J., Conwit, R., Tobin, J., Fozard, J.L., 1997. Age-associated loss of power and strength in the upper extremities in women and men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52, B267-276.
- Mitchell, J.H., Reardon, W.C., McCloskey, D.I., 1977. Reflex effects on circulation and respiration from contracting skeletal muscle. *Am J Physiol* 233, H374-378.
- Morita, H., Shindo, M., Yanagawa, S., Yoshida, T., Momoi, H., Yanagisawa, N., 1995. Progressive decrease in heteronymous monosynaptic Ia facilitation with human ageing. *Exp Brain Res* 104, 167-170.
- Morse, C.I., Thom, J.M., Davis, M.G., Fox, K.R., Birch, K.M., Narici, M.V., 2004. Reduced plantarflexor specific torque in the elderly is associated with a lower activation capacity. *Eur J Appl Physiol* 92, 219-226.
- Mynark, R.G., Kocreja, D.M., 2001. Effects of Age on the Spinal Stretch Reflex. *J Appl Biomech* 17, 188-203.
- Narici, M.V., Bordini, M., Cerretelli, P., 1991. Effect of aging on human adductor pollicis muscle function. *J Appl Physiol* (1985) 71, 1277-1281.
- Narici, M.V., Maganaris, C.N., Reeves, N.D., Capodaglio, P., 2003. Effect of aging on human muscle architecture. *J Appl Physiol* (1985) 95, 2229-2234.
- Nielsen, J., Petersen, N., Ballegaard, M., Biering-Sorensen, F., Kiehn, O., 1993. H-reflexes are less depressed following muscle stretch in spastic spinal cord injured patients than in healthy subjects. *Exp Brain Res* 97, 173-176.



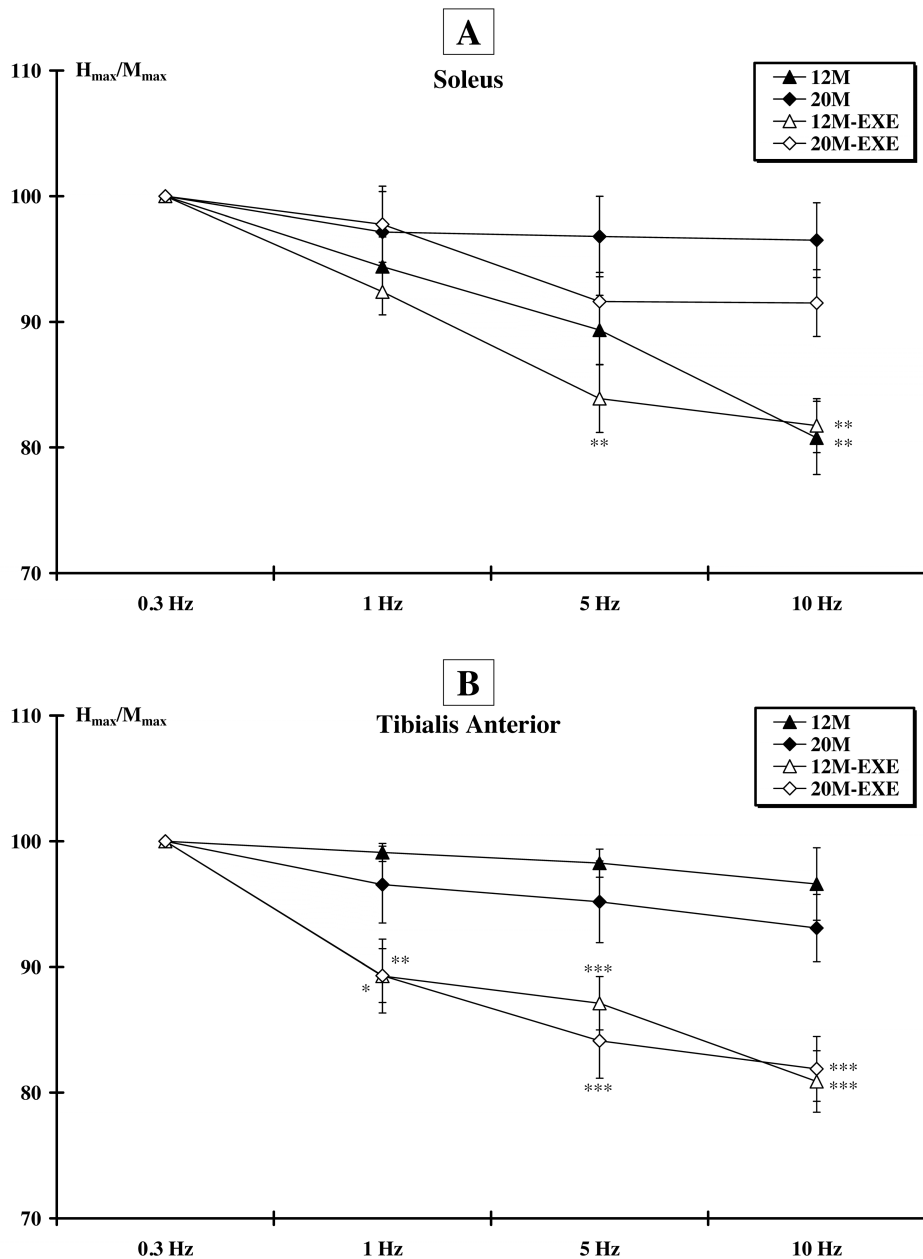
- Ollivier-Lanvin, K., Keeler, B.E., Siegfried, R., Houle, J.D., Lemay, M.A., 2010. Proprioceptive neuropathy affects normalization of the H-reflex by exercise after spinal cord injury. *Exp Neurol* 221, 198-205.
- Pasini, E., Le Douairon Lahaye, S., Flati, V., Assanelli, D., Corsetti, G., Specca, S., Bernabei, R., Calvani, R., Marzetti, E., 2011. Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol* 47, 23-28.
- Pasini, E., Le Douairon Lahaye, S., Flati, V., Assanelli, D., Corsetti, G., Specca, S., Bernabei, R., Calvani, R., Marzetti, E., 2012. Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol* 47, 23-28.
- Pertici, V., Amendola, J., Laurin, J., Gignes, D., Madaschi, L., Carelli, S., Marqueste, T., Gorio, A., Decherchi, P., 2013. The use of poly(N-[2-hydroxypropyl]-methacrylamide) hydrogel to repair a T10 spinal cord hemisection in rat: a behavioural, electrophysiological and anatomical examination. *ASN Neuro* 5, 149-166.
- Pette, D., Vrbova, G., 1985. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve* 8, 676-689.
- Phadke, C.P., Flynn, S.M., Thompson, F.J., Behrman, A.L., Trimble, M.H., Kukulka, C.G., 2009. Comparison of single bout effects of bicycle training versus locomotor training on paired reflex depression of the soleus H-reflex after motor incomplete spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 90, 1218-1228.
- Pierrot-Deseilligny, E., 1990. Electrophysiological assessment of the spinal mechanisms underlying spasticity. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 41, 264-273.
- Pierrot-Deseilligny, E., Mazevet, D., 2000. The monosynaptic reflex: a tool to investigate motor control in humans. Interest and limits. *Neurophysiol Clin* 30, 67-80.
- Piirainen, J.M., Cronin, N.J., Avela, J., Linnamo, V., 2014. Effects of plyometric and pneumatic explosive strength training on neuromuscular function and dynamic balance control in 60-70-year old males. *J Electromyogr Kinesiol* 24, 246-252.
- Raffalt, P.C., Alkjaer, T., Simonsen, E.B., 2015. Changes in soleus H-reflex during walking in middle-aged, healthy subjects. *Muscle Nerve* 51, 419-425.
- Reese, N.B., Skinner, R.D., Mitchell, D., Yates, C., Barnes, C.N., Kiser, T.S., Garcia-Rill, E., 2006. Restoration of frequency-dependent depression of the H-reflex by passive exercise in spinal rats. *Spinal Cord* 44, 28-34.
- Reeves, N.D., Narici, M.V., Maganaris, C.N., 2006. Musculoskeletal adaptations to resistance training in old age. *Man Ther* 11, 192-196.
- Robertson, C.T., Koceja, D.M., 2003. Post-activation depression of the soleus H-reflex in the elderly. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 43, 103-111.
- Roos, M.R., Rice, C.L., Vandervoort, A.A., 1997. Age-related changes in motor unit function. *Muscle Nerve* 20, 679-690.
- Rosales, R.L., Dressler, D., 2010. On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur J Neurol* 17 Suppl 1, 71-80.
- Sabbahi, M.A., Sedgwick, E.M., 1982. Age-related changes in monosynaptic reflex excitability. *J Gerontol* 37, 24-32.
- Scaglioni, G., Ferri, A., Minetti, A.E., Martin, A., Van Hoecke, J., Capodaglio, P., Sartorio, A., Narici, M.V., 2002. Plantar flexor activation capacity and H reflex in older adults: adaptations to strength training. *J Appl Physiol* (1985) 92, 2292-2302.
- Schieppati, M., 1987. The Hoffmann reflex: a means of assessing spinal reflex excitability and its descending control in man. *Progress in neurobiology* 28, 345-376.
- Schieppati, M., Crenna, P., 1984. From activity to rest: gating of excitatory autogenetic afferences from the relaxing muscle in man. *Exp Brain Res* 56, 448-457.
- Schindler-Ivens, S., Shields, R.K., 2000. Low frequency depression of H-reflexes in humans with acute and chronic spinal-cord injury. *Exp Brain Res* 133, 233-241.
- Shields, R.K., Dudley-Javoroski, S., Oza, P.D., 2011. Low-frequency H-reflex depression in trained human soleus after spinal cord injury. *Neurosci Lett* 499, 88-92.



- Skinner, R.D., Houle, J.D., Reese, N.B., Berry, C.L., Garcia-Rill, E., 1996. Effects of exercise and fetal spinal cord implants on the H-reflex in chronically spinalized adult rats. *Brain Res* 729, 127-131.
- Taborikova, H., 1966. Fraction of the motoneurone pool activated in the monosynaptic H-reflexes in man. *Nature* 209, 206-207.
- Thompson, F.J., Reier, P.J., Lucas, C.C., Parmer, R., 1992. Altered patterns of reflex excitability subsequent to contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 68, 1473-1486.
- Trimble, M.H., Kukulka, C.G., Behrman, A.L., 1998. The effect of treadmill gait training on low-frequency depression of the soleus H-reflex: comparison of a spinal cord injured man to normal subjects. *Neurosci Lett* 246, 186-188.
- Trompetto, C., Marinelli, L., Mori, L., Canneva, S., Colombano, F., Traverso, E., Curra, A., Abbruzzese, G., 2013. The effect of age on post-activation depression of the upper limb H-reflex. *Eur J Appl Physiol* 114, 359-364.
- Tsuruike, M., Kocejka, D.M., Yabe, K., Shima, N., 2003. Age comparison of H-reflex modulation with the Jendrassik maneuver and postural complexity. *Clin Neurophysiol* 114, 945-953.
- Tuite, D.J., Renstrom, P.A., O'Brien, M., 1997. The aging tendon. *Scand J Med Sci Sports* 7, 72-77.
- Unhjem, R., Lundestad, R., Fimland, M.S., Mosti, M.P., Wang, E., 2015. Strength training-induced responses in older adults: attenuation of descending neural drive with age. *Age (Dordr)* 37, 9784.
- Vandervoort, A.A., Hayes, K.C., 1989. Plantarflexor muscle function in young and elderly women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 58, 389-394.
- Vandervoort, A.A., McComas, A.J., 1986. Contractile changes in opposing muscles of the human ankle joint with aging. *J Appl Physiol* (1985) 61, 361-367.
- Yue, G.H., Ranganathan, V.K., Siemionow, V., Liu, J.Z., Sahgal, V., 1999. Older adults exhibit a reduced ability to fully activate their biceps brachii muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54, M249-253.
- Zehr, E.P., 2002. Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *Eur J Appl Physiol* 86, 455-468.



**Figure 1:** Evolution of the H-reflex rate sensitive depression with aging. H-reflex rate sensitive depression of the H-reflex at 0.3 Hz was designated as 100%. **A.** For the *soleus* muscle, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency only in the 3M, 6M and 12M groups. No change was observed in 20M group. **B.** For the *tibialis anterior* muscle, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency only in the 3M and 6M groups. No change was observed in the 12M and 20M groups. (vs ratio at 0.3 Hz, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).



**Figure 2:** Comparison of the H-reflex rate sensitive depression between sedentary and active aged animals. The  $H_{max}/M_{max}$  ratio at 0.3 Hz frequency was assigned as 100% response. **A.** For the *soleus* muscle, the  $H_{max}/M_{max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency only in the 12M and 12M-EXE groups. No change was observed in the 20M and 20M-EXE groups. **B.** For the *tibialis anterior* muscle, the  $H_{max}/M_{max}$  ratio decreased with increasing stimulation frequency only in the 12M-EXE and 20M-EXE groups. No change was observed in the 12M and 20M groups. (vs ratio at 0.3 Hz, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

<b>Soleus</b>	<b>3M</b>	<b>6M</b>	<b>12M</b>	<b>20M</b>
	0.058±0.002	0.054±0.002	0.058±0.002	0.059±0.002
			<b>12M-EXE</b>	<b>20M-EXE</b>
			0.060±0.001	0.057±0.002
<b>Tibialis Anterior</b>	<b>3M</b>	<b>6M</b>	<b>12M</b>	<b>20M</b>
	0.181±0.006	0.164±0.004 **	0.148±0.004 *** ##	0.125±0.007 *** ### +
			<b>12M-EXE</b>	<b>20M-EXE</b>
			0.170±0.007 §§§	0.149±0.005 §§§

**Table n°01: Muscle mass/body mass ratio.** For the *soleus* muscle, the ratio remains constant with aging even after the treadmill exercise protocol during the last 8 weeks preceding the recordings. For the *tibialis anterior* muscle, the ratio significantly decreases with aging but this decrease was reversed after the exercise protocol. For each muscle, comparison between groups was performed. vs. 3M group: \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; vs. 6M group: ##, p<0.01, ###, p<0.001; vs. 12M group: +, p<0.05; 12M vs. 12M-EXE: §§§, p<0.001; 20M vs. 20M-EXE: §§§, p<0.001;

## V. Les effets du vieillissement et de l'exercice physique sur l'activité des afférences métabosensibles des muscles *tibialis anterior* et *soleus*.

Le vieillissement entraîne un changement de phénotype musculaire vers un phénotype plus lent ainsi qu'une atrophie et une diminution de la force musculaire (Vandervoort et McComas, 1986; Lexell, 1995). Ces différences phénotypiques pourraient être responsables de l'altération de la réponse des afférences métabosensibles qui dépend des caractéristiques musculaires (Iwamoto et Botterman, 1985; Wilson et al., 1995; Xing et al., 2008; Caron et al., 2015). Toutefois, les travaux étudiant l'évolution de l'EPR lors du vieillissement montrent soit une diminution (Markel et al., 2003; Houssiere et al., 2006), soit une conservation de ce réflexe (Ng et al., 1994; Greaney et al., 2013). Ainsi, en parallèle de notre premier objectif, nous avons étudié la réponse des afférences métabosensibles de type III et IV des muscles *tibialis anterior* et *soleus* à différents stimuli (KCL, AL et FIE) au cours du vieillissement chez des animaux sédentaires et actifs.

Les principaux résultats indiquent :

- une diminution de la réponse des afférences métabosensibles aux injections de KCL et d'AL au cours du vieillissement pour les deux muscles,
- une altération de la réponse des afférences métabosensibles du muscle *soleus* à la stimulation répétitive fatigante (FIE),
- une absence d'effet de l'exercice physique sur les altérations de l'activité des afférences métabosensibles au cours du vieillissement.

Cette étude montre une altération de la réponse des afférences musculaires au cours du vieillissement. De plus, cette altération est plus marquée pour le muscle *soleus* que pour le muscle *tibialis anterior*. Par ailleurs, les résultats indiquent que l'exercice physique ne permet pas de contrecarrer les altérations liées au vieillissement, notamment en ce qui concerne la réponse aux substances activatrices d'origine exogène (KCl et AL) pour les deux muscles aux phénotypes différents mais également lors de la libération de métabolites endogènes suite à la FIE pour le muscle à phénotype lent.

## **Metabosensitive Afferents Response is Down-Regulated by Aging Process: Exercised *versus* Sedentary rats.**

**Guillaume CARON, Patrick DECHERCHI\*<sup>✉</sup>, Tanguy MARQUESTE\***

*\* equally supervising authors*

Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)  
UMR 7287 « Institut des Sciences du Mouvement: Etienne-Jules MAREY » (ISM-EJM)  
Equipe « Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire »  
Parc Scientifique et Technologique de Luminy  
Faculté des Sciences du Sport de Marseille  
CC910 - 163 Avenue de Luminy  
F-13288 Marseille cedex 09, France

✉ Corresponding author:

**E-mail:** patrick.decherchi@univ-amu.fr

**Tel./Fax:** +33 (0)4-91-82-84-12

**Web site:** www.ism.univmed.fr

**Short title:** *Effects of exercise on metabosensitive afferent fibers in old rats.*

## **Abstract**

This study was designed to evaluate the effect of aging on the activity of metabosensitive afferent fibers (thin muscle afferents from group III and IV) and to determine the effect of physical activity at old age. Afferents from *tibialis anterior* and *soleus* muscles were recorded on sedentary rats aged of 3, 6, 12 and 20 months and on animals aged of 12 and 20 months performing a daily incremental treadmill exercise protocol during the last 8 weeks preceding the recordings. Metabosensitive afferent fibers were activated with potassium chloride (KCl) and lactic acid (LA) injections into the blood stream or by muscle electrically-induced fatigue (EIF). We observed that aging is associated with a decrease in the response to chemical injections and EIF. Moreover, physical activity did not allow a recovery of metabosensitive afferents activity. These results indicate an alteration of the thin afferent fibers with aging. These data should be taken into account regarding potential alterations of muscle fatigue, exercise pressor reflex (EPR) or pain occurring with aging.

**Key words:** Age, Fatigue, Flexor, Extensor, Electrophysiology, Muscle.



## 1. Introduction.

Muscle contractions enhance neuronal adjustments regulated by activation of afferents. Metabosensitive afferent fibres known as fibres type III and IV, can be activated by metabolic, mechanical and thermal modification of their receptive field (for review: [Laurin et al., 2015](#)). Metabolic agents such as lactic acid (LA) and potassium chloride (KCl) are known to be specific activators of these thin afferences ([Rotto and Kaufman, 1988](#); [Victor et al., 1988](#); [Decherchi et al., 1998, 2001](#)). When stimulated, groups III and IV afferents response will project to the spinal cord to alter motoneuron excitability ([Dousset et al., 2004](#); [Laurin et al., 2010](#)). They are responsible for the sensation of muscle pain ([Mense, 2009](#)) and also project to brainstem level to induce an exercise pressor reflex (EPR), resulting in an increased sympathetic activity associated with up regulation of heart and ventilation rate and arterial blood pressure ([McCloskey and Mitchell, 1972](#)).

Neuromuscular system is highly malleable at young age, but this plasticity tends to be reduced at old age. Muscle showing a progressive decline in strength ([Vandervoort and McComas, 1986](#)), that is attributed to sarcopenia and is linked to a diminished number of muscle type I and type II fibers, associated with a type II fiber atrophy ([Lexell, 1995](#)). Muscle mass and phenotypes were shown to take part in determining the size of the EPR and in the magnitude of the metabosensitive afferents response ([Iwamoto and Botterman, 1985](#); [Wilson et al., 1995](#); [Xing et al., 2008](#); [Caron et al., 2015](#)). Suggesting that the response from afferents III and IV could be altered with aging, especially since it has been conversely shown that the pressor reflex could be down regulated ([Markel et al., 2003](#); [Houssiere et al., 2006](#)) or maintain with aging ([Ng et al., 1994](#); [Greaney et al., 2013](#)).

In addition, exercise training has been proposed as an effective solution to restore a “normal” EPR associated with hypertension, heart failure or muscular dystrophy (for review [Murphy et al., 2011](#); [Smith et al., 2014](#)). However past studies reported no significant differences in the response of the pressor response for young healthy rats after treadmill ([Wang et al., 2010, 2012](#)). In opposition, a period of inactivity induced a lower EPR during leg isometric exercise and during post exercise ischemia ([Kamiya et al., 2004](#)).

To our knowledge no data are available concerning metabosensitive afferents alterations with aging, and exercise training, as a potential modulator was not tested. Therefore, we studied the responsiveness of sensory neurons innervating *tibialis anterior* and *soleus* muscles to chemical injections of LA and KCl, electrically induced fatigue (EIF) at 3M, 6M, 12M and 20M of age and at 12M-EXE and 20M-EXE of age after 8weeks of incremental treadmill running protocol. We hypothesized that group III and IV afferents response would have a lower response at old age and that physical activity could partially reverse this alteration.

## 2. Materials and Methods.

### 2.1. Animals.

Sixty-nine male Sprague Dawley rats (Janvier<sup>®</sup>, France) were housed in smooth-bottomed plastic cages at 22 °C in a room maintain on a 12-h light/dark cycle. Food (Safe<sup>®</sup>, France) and water were available *ad libitum*. Forty-eight were subdivided into four groups depending to their age: 3 months (3M, n=12), 6 month (6M, n=12), 12 month (12M, n=12) and 20 month (20M, n=12). Two other groups received a 8-week physical activity protocol and were recorded at 12 month (12mM-EXE, n=10) and 20 month (20M-EXE, n=11). Animals received *soleus* and *tibialis* anterior muscle electrophysiological tests. All procedures outlined in this study were approved by the animal ethics committee of *Aix-Marseille University* (AMU) and *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS).

### 2.2. Exercise training protocol.

Rats were first familiarized with the treadmill for 1 week. After what, animals were trained 3 times per week on a treadmill with a progressive 8 weeks program. The protocol was inspired from Pasini et al., with modifications (Pasini et al., 2012). During the first and the second week the running speed was adjusted at 13.5 m/min for 10 min and 20min respectively. For the next 3 weeks, running time and speed were progressively increased to reach an exercise duration of 50 min at 15 m/min speed, the 5<sup>th</sup> week. Finally, for the last 3 weeks, exercise was performed for 60 min and speed increased up to 18 m/min until the 8<sup>th</sup> week. All animals ran steadily on the treadmill. Rats were anaesthetized for electrophysiological recording in the 48h after the end of the exercise training protocol.

### 2.3. Electrophysiological recordings.

When animals reach the age of their respective group, they were anesthetized with urethane (1.1 g.kg<sup>-1</sup> i.p.), and atropine (1 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) was administered to reduce airway secretions. The surgery and the afferent recordings were performed as previously describe (Decherchi et al., 1998; Caron et al., 2014, 2015). Briefly, a catheter was inserted into the right femoral artery to let the blood flow freely to the left lower limb muscles and pushed up to the fork of the abdominal aorta in order to transport supplemental dose of anaesthetic and chemicals (i.e., potassium chloride [KCl] and lactic acid [LA]) to the controlateral muscle., Tibial and the peroneal nerves were dissected free from surrounding tissues and immersed in paraffin oil. Two pairs of cuff electrodes were placed on the peroneal nerve and a branch of the tibial nerve that innervate the *soleus* muscle for stimulation or afferents recordings. The knee and ankle were firmly held by clamps on a horizontal support in order to avoid disturbing movements and to maintain the 90°knee joint angle during electrical nerve stimulations. Animal temperature was maintained between 36-37°C with a blanket controlled by rectal temperature probe.

The response of afferent fibers from groups III and IV was recorded for chemicals injections and electrically induced fatigue (EIF). The neural signals were referred to a ground electrode implanted in a nearby muscle, amplified (10 to 100 K) and filtered (30 Hz to 10 kHz) with a differential amplifier (P2MP<sup>®</sup> SARL, Marseille, France). The afferent discharge was recorded (Biopac MP150<sup>®</sup> and AcqKnowledge<sup>®</sup> software) and fed into pulse window discriminators (P2MP<sup>®</sup> SARL, Marseille, France), which simultaneously analyzed afferent populations. The output of these discriminators provided noise-free tracings (discriminated units), which were counted using data analysis system (Biopac AcqKnowledge<sup>®</sup> software) at 1s intervals (in Hz) and then displayed on a computer. Baseline discharge was calculated during the 1-min period preceding EIF or injections (baseline activity), and its change was measured

following specific activations. Afferent response variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge rate; i.e. baseline discharges corresponded to 100%. Distinct concentrations of KCl (1, 5, 10, and 20 mM / 0.5 ml) and LA (0.5, 1, 2, and 3 mM / 0.1 ml) were randomly injected into the catheter and were washed with 0.1 ml of normal saline. Each injection was separate by 10min of recovery in order to let the afferent activity go back to its baseline activity.

After a 30-min resting period, a 3-min electrically-induced muscle fatigue (EIF) was performed. For this purpose, rhythmic muscle contractions were produced by the neurostimulator (Grass S88K<sup>®</sup>, USA) delivering rectangular pulse trains to the pair of steel electrodes placed on the muscle surface (pulse duration: 0.1 ms; frequency: 10 Hz, i.e., 5 shocks in each 500 ms train; duty cycle: 500/1000 ms). The voltage used was 20 % higher than that used to elicit a maximal contraction. At the end of the experiments, animals were sacrificed by an intra-arterial overdose (3 ml i.v) of sodium pentobarbital solution (Nembutal<sup>®</sup>, Sanofi Santé Animale, 60 mg.kg<sup>-1</sup>).

#### **2.4. Statistics.**

Data processing was performed using Sigmastat<sup>®</sup> 2.03 SPSS. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences were tested by two-way analysis of variance (ANOVA test, factors: group x timing) completed by a Student-Newman-Keuls *post-hoc* test to compare the metabosensitive afferent responses to KCl and LA injections during aging process and after treadmill training (factors: age x doses). One way ANOVA were used to compare EIF and muscle properties during aging process, while t-test were used to evaluate the differences after the training protocol. Results were considered statistically significant if the p-value fell below 0.05.

### 3. Results.

Afferents characterized as metabosensitive fibers exhibit spontaneous tonic low frequency baseline activity (4-10 Hz) under our experimental conditions. Whatever the stimulus and the dose used (EIF, LA or KCl), a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the raw afferent activity was recorded as compared to baseline activity within each type of muscle and experimental groups. In a previous experiment performed in the *tibialis anterior* and *soleus* muscles of Sprague-Dawley rats, we showed that the activation of muscle afferents by LA culminated for the 1 mM concentration and then declined whereas there was a relationship between the doses of KCl and the change in afferent discharge rate (Caron et al., 2015; Decherchi et al., 1998; Martin et al., 2009).

#### *Response to LA and KCl injections.*

The pattern of responses of metabosensible muscle afferents activated by increased interstitial concentrations of LA or KCl consisted of a burst of activity beginning within 5-10 s after the bolus injection. Recovery of control spontaneous discharge rate value always occurred within 3 minutes. For the *tibialis anterior* muscle, the response to LA injections was decreased only for the concentration of 1 mM in animals aged of 12 and 20 months (Figure 1A). The response to KCl injections was also decreased for the highest concentration of 20 mM in the 12M and 20M groups (Figure 1C). For the *soleus* muscle, only the response to 1 mM LA concentration was decreased in the animals from the 20M group (Figure 1B). The response to KCl injections was also decreased for the 20 mM concentration in the 20M group. Exercise training did not change the responses to KCl and LA injections for both muscles compared to the corresponding sedentary animals (Figure 2).

#### *Response to EIF.*

An alteration of the response to EIF was observed with aging. Indeed, for both muscles, a significant ( $p < 0.05$ ) decreased was observed in the 20M groups (Figure 3A). Physical activity did not induce notable changes in the afferents response to EIF in aged animals although, for the both *tibialis anterior* and *soleus* muscles there is an increasing tendency for 12M groups (Figure 3B).

#### 4. Discussion.

Results from this study confirm previous work reporting the same concentration-dependent increase in metabosensitive response discharging rate with KCl injections and the largest response for the concentration of 1mM of LA (Decherchi et al., 1998; Caron et al., 2014, 2015) observed in our youngest group. This response shape is maintained in *tibialis anterior* and *soleus* muscles, but we reported an age-dependent decreased response for the highest responses for both KCl and LA injections. Namely, the dose of KCl and LA that induced the highest afferents response (KCl 20mM and LA 1mM) were reduced from the age of 12 months for the *tibialis anterior* muscle and from the age of 20 months for the *soleus* muscle. Afferents response to electrically induced fatigue (EIF) was only reduced for the *soleus* muscle at 20 month of age. Trained animals with 8 weeks of incremental treadmill running protocol and recorded at the age of 12M (12M-EXE group) or 20M (20M-EXE group) did not reverse these alterations.

Afferents response recorded in our study should have been influenced by the amount of produced chemicals during EIF and by the number of receptors on afferents terminals, the number of afferents fibers and their discharge frequency for both EIF and chemical injections. Repeated contraction and chemical injections of KCl and LA are detected by groups III and IV afferents which express TRPV1, ASIC3 and P2X receptors, and are thought to be synergically responsible of their firing rate variations (Gao et al., 2006, 2007; Light et al., 2008).

Anatomical studies have conversely indicated that aging is either associated to a loss of thinly- and unmyelinated afferents fibers or not (Bergman and Ulfhake, 1998; Ceballos et al., 1999). This loss could start in the tibial nerve at 12 months (-15% of unmyelinated and -59% of thinly-myelinated) of age and could raise 50% loss in very old animals (33 months) (Ceballos et al., 1999). Another study founded no significant difference in the total number of neurons in fourth lumbar DRG between young (n=4) and 30 months animals (n=3) (Bergman and Ulfhake, 1998). However, electrophysiological study in human indicated that aging is also associated with relative atypical C-fiber increase, which could be count as an unmyelinated afferents but will show no clear response to any stimuli (Namer, 2010). The reduced number of functional afferents fibers with increasing age could be responsible for the reduced response observed in our study.

Regarding the receptor expression, an elegant study from Wang et al., reported a decline in TRPV1 expression in DRG and in nerve afferents innervating hind-limbs with aging (Wang et al., 2006). The TRPV1 reduction in DRG neurons was associated with no change in the number of TRPV1-positive neurons at middle age indicating a lower protein expression. Reduced levels of TRPV1 were also found in tibial nerve of aged animals, suggesting that TRPV1 transport is also less efficient. The lower density of immunolabeled TRPV1-positive fibers would support this possibility because only a modest afferents loss would be expected for middle-aged rats. TRPV1 expression is suggested to be modulating by the level of trophic factors, especially artemin, which receptor (GFR $\alpha$ 3) is highly co-localized with TRPV1 (Orozco et al., 2001; Elitt et al., 2006). The reduction in TRPV1 may result from decreased trophic factor support, as GFR $\alpha$ 3 was reduced with aging (Wang et al., 2006). In opposition to these observations, a study found that the numbers of discharges induced by chemical (pH 5.5, ATP and bradykinin) and thermal (cold and heat) stimuli were not different with the increasing age (Taguchi and Mizumura, 2011). However, authors admitted that only three recorded afferents fibers were able to detect acidic stimuli, which could not enough to observe any significant changes. Conduction velocity could also be decreased with age, which could induce a lower density of recorded action potentials (Sato et al., 1985). Even though, it remains a possibility that afferents receptors and/or neurons loss could contribute to the reduction in metabosensitive response observed in our study.

The EIF response should also depend on metabolite production, then the observed decreased could be associated with a reduced metabolite production and/or receptors and

neurons alteration as previously described. In our study, the EIF response significantly diminished only for the *soleus* muscle. Because *tibialis anterior* muscle has a higher tetanus threshold than *soleus*, a higher response could have been expected with higher frequency stimulation (30-40Hz) during EIF (Kaufman et al., 1984). Further study using stimulation at muscle tetanus frequency would be needed to investigate an eventual EIF response alteration associated with aging process for *tibialis anterior* muscle.

A previous study has shown that exercise training partially prevented the decreased of TRPV1 on group IV afferents in rats with chronic heart failure (Wang et al., 2012). Moreover, physical activity has been shown to regulate levels of artemin and GDNF after spinal cord injury (Detloff et al., 2014), but physical activity did not induce a recovery of metabosensitive afferents activity in 12M-EXE and 20M-EXE groups compared respectively to 12M and 20M groups in our study. Many studies have shown benefit after aerobic exercise training on neuropathic pain (for review: Dobson et al., 2014). For example, exercise can reduce hyperglycemia and the risk to develop diabetes associated illness (Balducci et al., 2010; Li and Hondzinski, 2012), or can help to recover from peripheral nerve injury (Keeler et al., 2012; Wilhelm et al., 2012). As previously mentioned exercise training can also be an effective strategy to normalize the EPR in case of hypertension, heart failure or muscular dystrophy (Murphy et al., 2011; Smith et al., 2014). However, EPR and pain can be modulated at central levels (Mazzone and Geraghty, 1999; Coull et al., 2003; Edwards et al., 2003; Cole et al., 2010) suggesting that alterations recorded in our study could induce various central responses. Further studies are needed to evaluate if any modulations occurred at spinal cord level.

The lower metabosensitive response observed in our study could explain the EPR reduction associated with aging (Markel et al., 2003; Houssiere et al., 2006). We cannot exclude that the diminished afferents III and IV response observed in our study could be influenced by a higher muscle sympathetic nerve activity at rest (Ng et al., 1994; Markel et al., 2003). However, the reduced increase in III and IV afferences response could still not be enough to increase the oxygenated blood flow to the exercised muscle (Musch et al., 2004), limiting oxidative muscle energy production. Treadmill running training did not induce specific recovery of metabosensitive afferences response during aging process but is known to induce so many positive outputs on the neuromuscular functions.

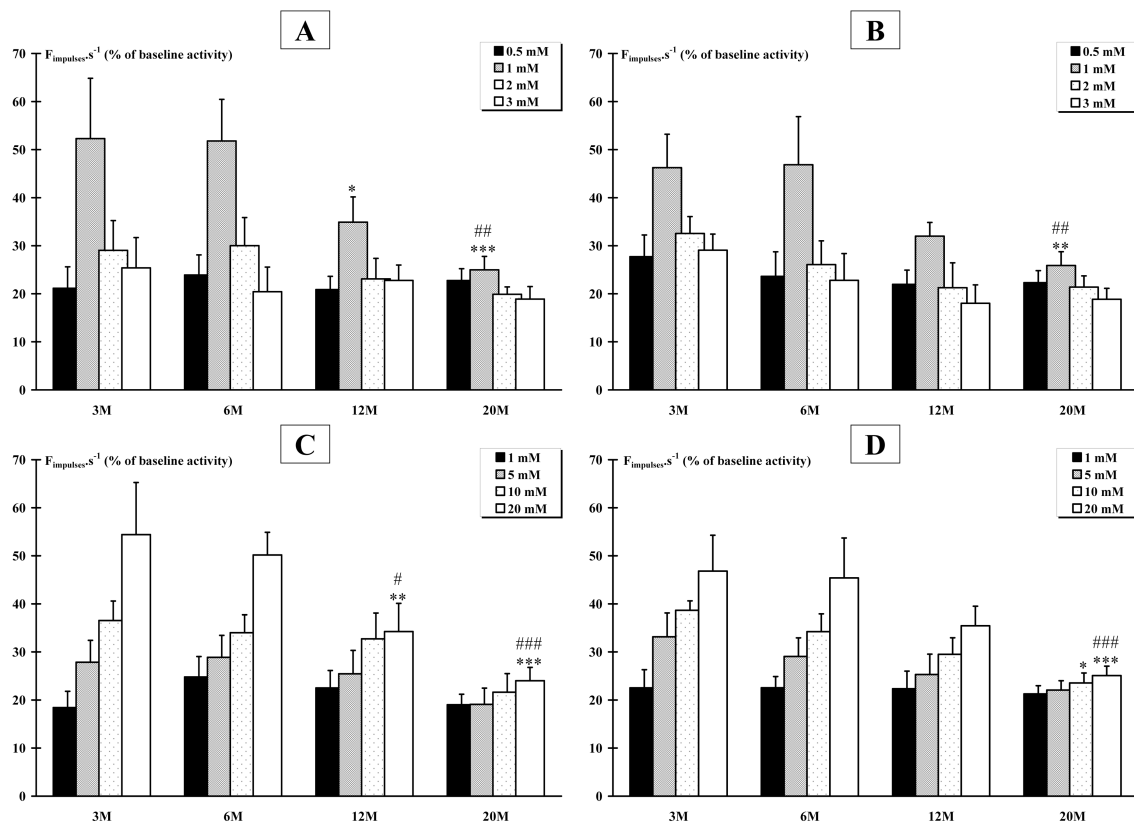
## 5. References.

- Balducci, S., Zanuso, S., Nicolucci, a., Fernando, F., Cavallo, S., Cardelli, P., ... Pugliese, G. (2010). Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(8), 608–617.
- Bergman, E., & Ulfhake, B. (1998). Loss of primary sensory neurons in the very old rat: neuron number estimates using the disector method and confocal optical sectioning. *The Journal of Comparative Neurology*, 396(2), 211–222.
- Caron, G., Decherchi, P., & Marqueste, T. (2015). Does metabosensitive afferents fibers activity differ from slow and fast twitch muscles ? *Experimental Brain Research*, 233(9), 2549–2554.
- Caron, G., Rouzi, T., Grelot, L., Magalon, G., Marqueste, T., & Decherchi, P. (2014). Mechano- and metabosensitive alterations after injection of botulinum toxin into gastrocnemius muscle. *Journal of Neuroscience Research*, 92(7), 904–914.
- Ceballos, D., Cuadras, J., Verdu, E., & Navarro, X. (1999). Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat*, 195 (Pt 4), 563–576.
- Cole, L. J., Farrell, M. J., Gibson, S. J., & Egan, G. F. (2010). Age-related differences in pain sensitivity and regional brain activity evoked by noxious pressure. *Neurobiology of Aging*, 31, 494–503.
- Coull, J. A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sik, A., ... De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951), 938–942.
- Decherchi, P., Darques, J. L., & Jammes, Y. (1998). Modifications of afferents activities from Tibialis anterior muscle in rat by tendon vibrations, increase of interstitial potassium or lactate concentration and electrically-induced fatigue. *J Peripher Nerv Syst*, 3(4), 267–276.
- Decherchi, P., Vuillon-Cacciutolo, G., Darques, J. L., & Jammes, Y. (2001). Changes in afferents activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Muscle Nerve*, 24(1), 59–68.
- Detloff, M. R., Smith, E. J., Quiros Molina, D., Ganzer, P. D., & Houle, J. D. (2014). Acute exercise prevents the development of neuropathic pain and the sprouting of non-peptidergic (GDNF- and artemin-responsive) c-fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 255, 38–48.
- Dobson, J. L., McMillan, J., & Li, L. (2014). Benefits of exercise intervention in reducing neuropathic pain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(April), 102.
- Dousset, E., Marqueste, T., Decherchi, P., Jammes, Y., & Grelot, L. (2004). Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferents activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. *J of Neurosci Res*, 76(5), 734–741.
- Edwards, R. R., Fillingim, R. B., & Ness, T. J. (2003). Age-related differences in endogenous pain modulation: a comparison of diffuse noxious inhibitory controls in healthy older and younger adults. *Pain*, 101(1-2), 155–165.
- Elitt, C. M., McIlwrath, S. L., Lawson, J. J., Malin, S. a, Molliver, D. C., Cornuet, P. K., ... Albers, K. M. (2006). Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *The Journal of Neuroscience*, 26(33), 8578–8587.
- Gao, Z., Henig, O., Kehoe, V., Sinoway, L. I., & Li, J. (2006). Vanilloid type 1 receptor and the acid-sensing ion channel mediate acid phosphate activation of muscle afferents nerves in rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(2), 421–426.
- Gao, Z., Li, J. D., Sinoway, L. I., & Li, J. (2007). Effect of muscle interstitial pH on P2X and TRPV1 receptor-mediated pressor response. *J Appl Physiol (1985)*, 102(6), 2288–2293.

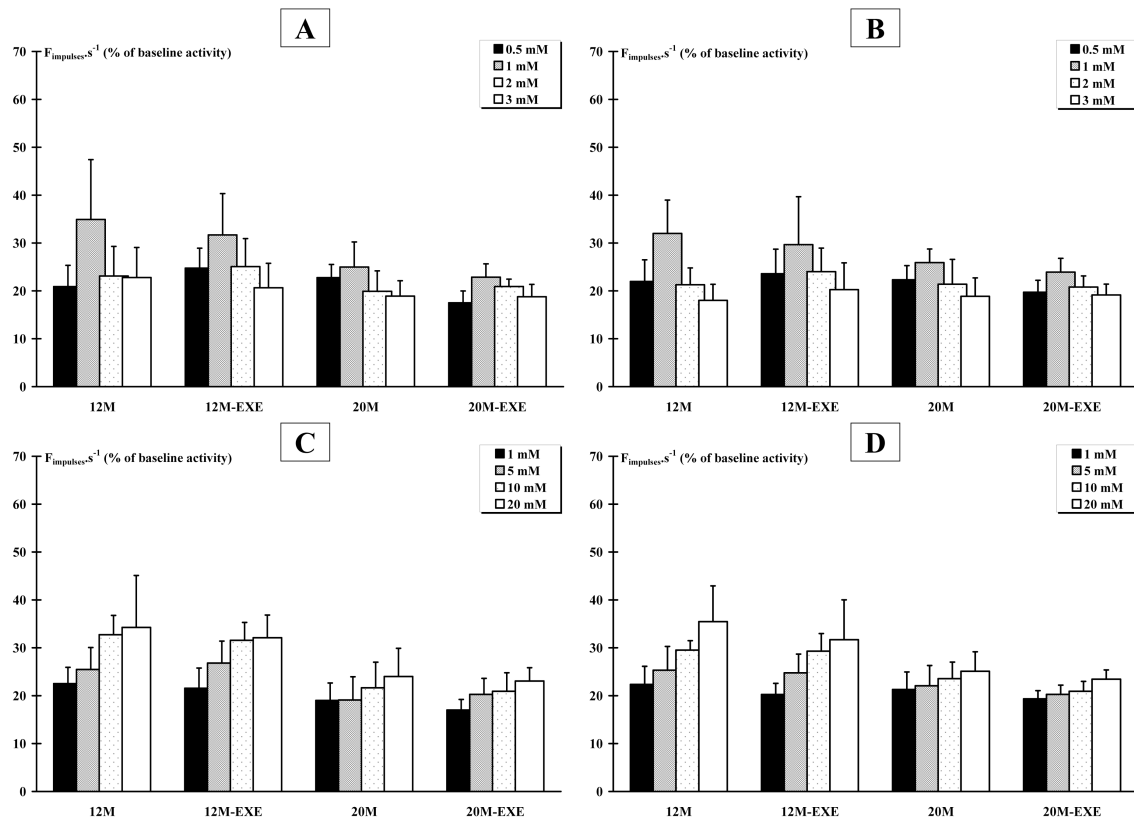


- Greaney, J. L., Schwartz, C. E., Edwards, D. G., Fadel, P. J., & Farquhar, W. B. (2013). The neural interaction between the arterial baroreflex and muscle metaboreflex is preserved in older men. *Experimental Physiology*, 98(10), 1422–1431.
- Houssiere, A., Najem, B., Pathak, A., Xhaet, O., Naeije, R., & Van De Borne, P. (2006). Chemoreflex and metaboreflex responses to static hypoxic exercise in aging humans. *Med Sci Sports Exerc*, 38(2), 305–312.
- Iwamoto, G. A., & Botterman, B. R. (1985). Peripheral factors influencing expression of pressor reflex evoked by muscular contraction. *J Appl Physiol*, 58(5), 1676–1682.
- Kamiya, A., Michikami, D., Shiozawa, T., Iwase, S., Hayano, J., Kawada, T., ... Mano, T. (2004). Bed rest attenuates sympathetic and pressor responses to isometric exercise in antigravity leg muscles in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(5), R844–R850.
- Kaufman, M. P., Waldrop, T. G., Rybicki, K. J., Ordway, G. A., & Mitchell, J. H. (1984). Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents. *Cardiovasc Res*, 18(11), 663–668.
- Keeler, B. E., Liu, G., Siegfried, R. N., Zhukareva, V., Murray, M., & Houlié, J. D. (2012). Acute and Prolonged Hindlimb Exercise Elicits Different Gene Expression in Motoneurons than Sensory Neurons after Spinal Cord Injury. *Brain Res*, 15(1438), 8–21.
- Laurin, J., Dousset, E., & Decherchi, P. (2010). Modulation of the spinal excitability by muscle metabosensitive afferents fibers. *J Neurosci Res*, 88(12), 2755–2764.
- Laurin, J., Pertici, V., Dousset, E., Marqueste, T., & Decherchi, P. (2015). Group III and IV muscle afferents: Role on central motor drive and clinical implications. *Neuroscience*, 290, 543–551.
- Lexell, J. (1995). Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 50 Spec No, 11–16.
- Li, L., & Hondzinski, J. M. (2012). Select Exercise Modalities May Reverse Movement Dysfunction due to Peripheral Neuropathy. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 40(3), 133–137.
- Light, A. R., Huguen, R. W., Zhang, J., Rainier, J., Liu, Z., & Lee, J. (2008). Response to: Dorsal Root Ganglion Neurons Innervating Skeletal Muscle Respond to Physiological Combinations of Protons , ATP , and Lactate Mediated by ASIC, P2X and TRPV1. *Journal of Neurophysiology*, 100, 1184–1201.
- Markel, T. a. (2003). Aging and the Exercise Pressor Reflex in Humans. *Circulation*, 107(5), 675–678.
- Mazzone, S. B., & Geraghty, D. P. (1999). Altered respiratory response to substance P and reduced NK1 receptor binding in the nucleus of the solitary tract of aged rats. *Brain Res*, 826(1), 139–142.
- McCloskey, D. I., & Mitchell, J. H. (1972). Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol*, 224(1), 173–186.
- Mense, S. (2009). Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res*, 196(1), 89–100.
- Murphy, M., & Mizuno, M. (2011). Cardiovascular regulation by skeletal muscle reflexes in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, (301), H1191–H1204.
- Musch, T. I., Eklund, K. E., Hageman, K. S., & Poole, D. C. (2004). Altered regional blood flow responses to submaximal exercise in older rats. *Journal of Applied Physiology*, 96(1), 81–8.
- Namer, B. (2010). Age related changes in human C-fiber function. *Neurosci Lett*, 470(3), 185–187.
- Ng, A. V., Callister, R., Johnson, D. G., & Seals, D. R. (1994). Sympathetic neural reactivity to stress does not increase with age in healthy humans. *Am J Physiol*, 267(1 Pt 2), H344–H353.
- Orozco, O. E., Walus, L., Sah, D. W., Pepinsky, R. B., & Sanicola, M. (2001). GFRalpha3 is expressed predominantly in nociceptive sensory neurons. *Eur J Neurosci*, 13(11), 2177–2182.

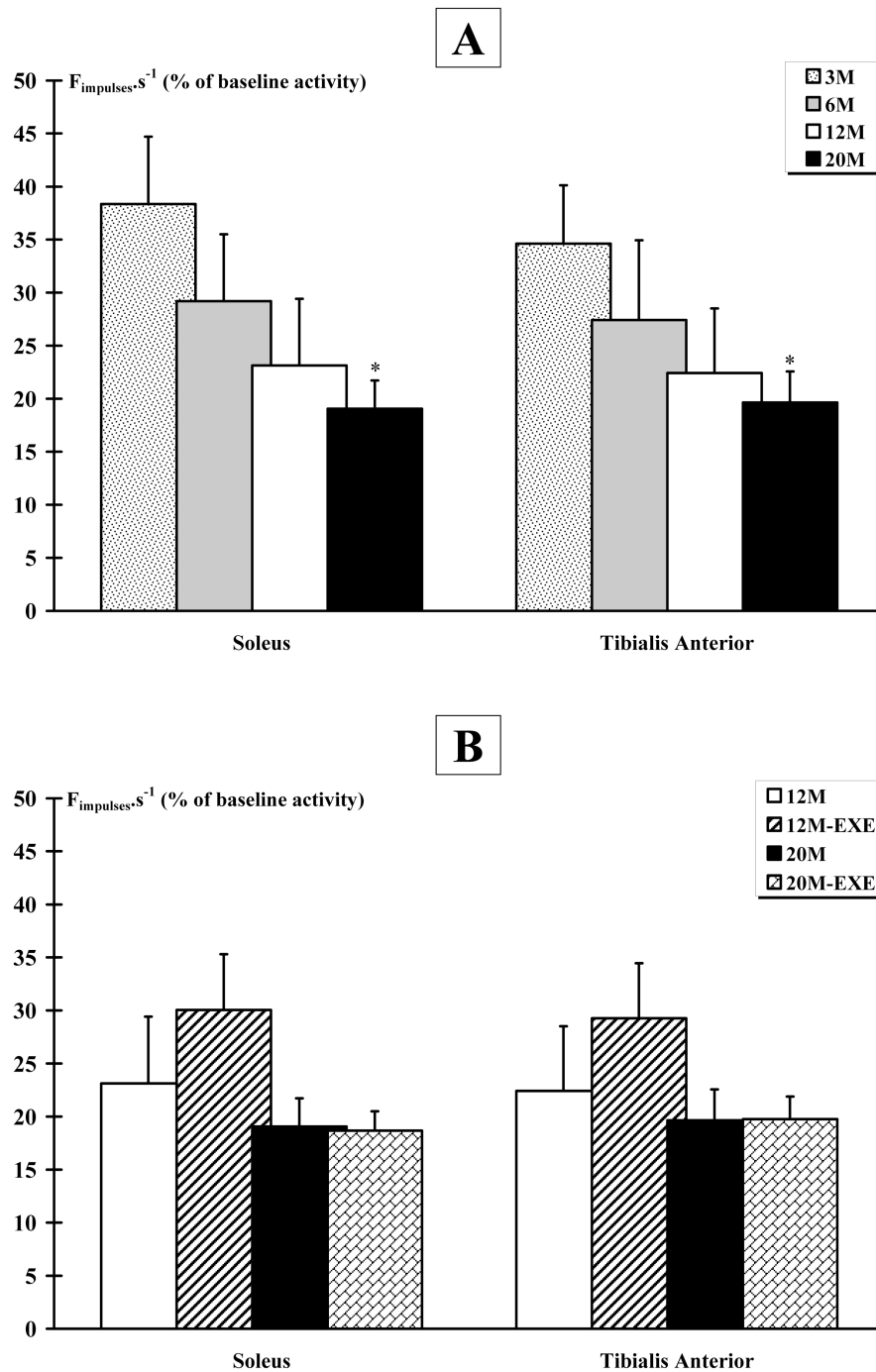
- Pasini, E., Le Douairon Lahaye, S., Flati, V., Assanelli, D., Corsetti, G., Specca, S., ... Marzetti, E. (2012). Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Experimental Gerontology*, 47(1), 23–28.
- Rotto, D. M., & Kaufman, M. P. (1988). Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol*, 64, 2306–2313.
- Sato, A., Sato, Y., & Suzuki, H. (1985). Aging effects on conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of peripheral nerves. *Neurosci Lett*, 53(1), 15–20.
- Smith, S. a, Downey, R. M., Williamson, J. W., & Mizuno, M. (2014). Autonomic dysfunction in muscular dystrophy: a theoretical framework for muscle reflex involvement. *Frontiers in Physiology*, 5(February), 47.
- Taguchi, T., & Mizumura, K. (2011). Augmented mechanical response of muscular thin-fiber receptors in aged rats recorded in vitro. *European Journal of Pain (London, England)*, 15(4), 351–358.
- Vandervoort, A. A., & McComas, A. J. (1986). Contractile changes in opposing muscles of the human ankle joint with aging. *J Appl Physiol* (1985), 61(1), 361–367.
- Victor, R. G., Bertocci, L. a, Pryor, S. L., & Nunnally, R. L. (1988). Sympathetic nerve discharge is coupled to muscle cell pH during exercise in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(4), 1301–1305.
- Wang, H. J., Li, Y. L., Gao, L., Zucker, I. H., & Wang, W. (2010). Alteration in skeletal muscle afferents in rats with chronic heart failure. *J Physiol*, 588(Pt 24), 5033–5047.
- Wang, H.-J., Li, Y.-L., Zucker, I. H., & Wang, W. (2012). Exercise training prevents skeletal muscle afferents sensitization in rats with chronic heart failure. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(11), R1260–R1270.
- Wang, S., Davis, B. M., Zwick, M., Waxman, S. G., & Albers, K. M. (2006). Reduced thermal sensitivity and Nav1.8 and TRPV1 channel expression in sensory neurons of aged mice. *Neurobiol Aging*, 27(6), 895–903.
- Wilhelm, J. C., Xu, M., Cucoranu, D., Chmielewski, S., Holmes, T., Lau, K., ... English, A. W. (2012). Cooperative Roles of BDNF Expression in Neurons and Schwann Cells Are Modulated by Exercise to Facilitate Nerve Regeneration. *Journal of Neuroscience*. 32(14), 5002-5009
- Wilson, L. B., Dyke, C. K., Parsons, D., Wall, P. T., Pawelczyk, J. A., Williams, R. S., & Mitchell, J. H. (1995). Effect of skeletal muscle fiber type on the pressor response evoked by static contraction in rabbits. *J Appl Physiol* (1985), 79(5), 1744–1752.
- Xing, J., Sinoway, L., & Li, J. (2008). Differential responses of sensory neurones innervating glycolytic and oxidative muscle to protons and capsaicin. *J Physiol*, 586(13), 3245–3252.



**Figure 1:** Response of metabosensitive afferent fibers to chemical injections (LA and KCl). Whatever the dose injected, a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the raw afferent activity was recorded as compared to baseline activity in all groups. **A.** The response of afferent fibers from the *tibialis anterior* muscle to 1mM LA injection was significantly ( $*$ ,  $p < 0.05$ ) lower in the 12M group compared to the 3M group, and in 20M group compared to the 3M ( $***$ ,  $p < 0.001$ ) and to the 6M ( $##$ ,  $p < 0.01$ ) groups. **B.** The response of afferent fibers from the *soleus* muscle to 1mM LA injections was significantly lower in the 20M group compared to the 3M ( $**$ ,  $p < 0.01$ ) and the 6M ( $##$ ,  $p < 0.01$ ) groups. **C.** The response afferent fibers from the *tibialis anterior* muscle to 20 mM KCl injection was significantly lower in the 12M group compared to the 3M ( $**$ ,  $p < 0.01$ ) and the 6M ( $#$ ,  $p < 0.05$ ) groups, and in the 20M group compared to the 3M ( $***$ ,  $p < 0.001$ ) and to the 6M ( $####$   $p < 0.001$ ) groups. **D.** The response of afferent fibers from the *soleus* muscle to 10 mM KCl injection was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in the 20M group compared to the 3M group. Furthermore, the response to 20mM KCl injection was significantly lower in the 20M group compared to the 3M ( $***$ ,  $p < 0.001$ ) and to the 6M ( $####$ ,  $p < 0.001$ ), and the response to 10mM KCl injection is significantly lower ( $* p = 0.015$ ) for the 20M compared to 3M group.



**Figure 2:** Comparison of the response of metabosensitive afferent fibers to chemical injections (LA and KCl) between sedentary and active aged rats. Whatever the dose injected, a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the raw afferent activity was recorded as compared to baseline activity in all groups. The response of afferent fibers from *tibialis anterior* muscle to LA (A) and KCl (C) injections did not show any difference between old sedentary and old trained animals. The response of *soleus* muscle afferents to LA (B) and to KCl (D) injections also did not show any difference between old sedentary and old trained animals.



**Figure 3:** Comparison of the response of metabosensitive afferents fibers to muscle electrically-induced fatigue (EIF) between sedentary and active aged rats. In all groups, a significant ( $p < 0.05$ ) increase in activity was recorded after 3-min EIF. **A.** In sedentary groups, the response to EIF decrease with age and was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in the 20M group compared to the 3M group whatever the muscle considered. **B.** In the older animals (12M and 20M groups), whatever the muscle considered and although we observed an increasing tendency for 12M group, no difference were noted.

# Discussion

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le fonctionnement de la boucle sensorimotrice et l'activité des afférences (mécano- et métabosensibles) musculaires suite 1) à une paralysie musculaire réversible induite par la toxine botulique (BoTN/A), 2) au vieillissement et 3) à l'exercice physique imposé pendant le vieillissement. Ces études invasives, réalisées chez le rat, ont permis de compléter nos connaissances, notamment en ce qui concerne le fonctionnement des réseaux de neurones mis en jeu dans la locomotion et dans les adaptations physiologiques qui y sont associées. Ces données s'ouvrent aussi sur des terrains d'application clinique, notamment en ce qui concerne la prise en charge des spasticités, des dystonies, des douleurs neurologiques et des patients vieillissants.

## **I. Les afférences musculaires.**

### **1. La réponse des afférences métabosensibles.**

L'originalité de nos études a été d'enregistrer directement les afférences métabosensibles musculaires en les activant avec des activateurs spécifiques (AL, KCl et EIF). Toutefois, dans la mesure où les enregistrements ont été réalisés à partir d'électrodes extracellulaires sur un nerf entier, il ne nous a pas été possible d'accéder à certains paramètres neurophysiologiques comme par exemple l'excitabilité des neurones afférents.

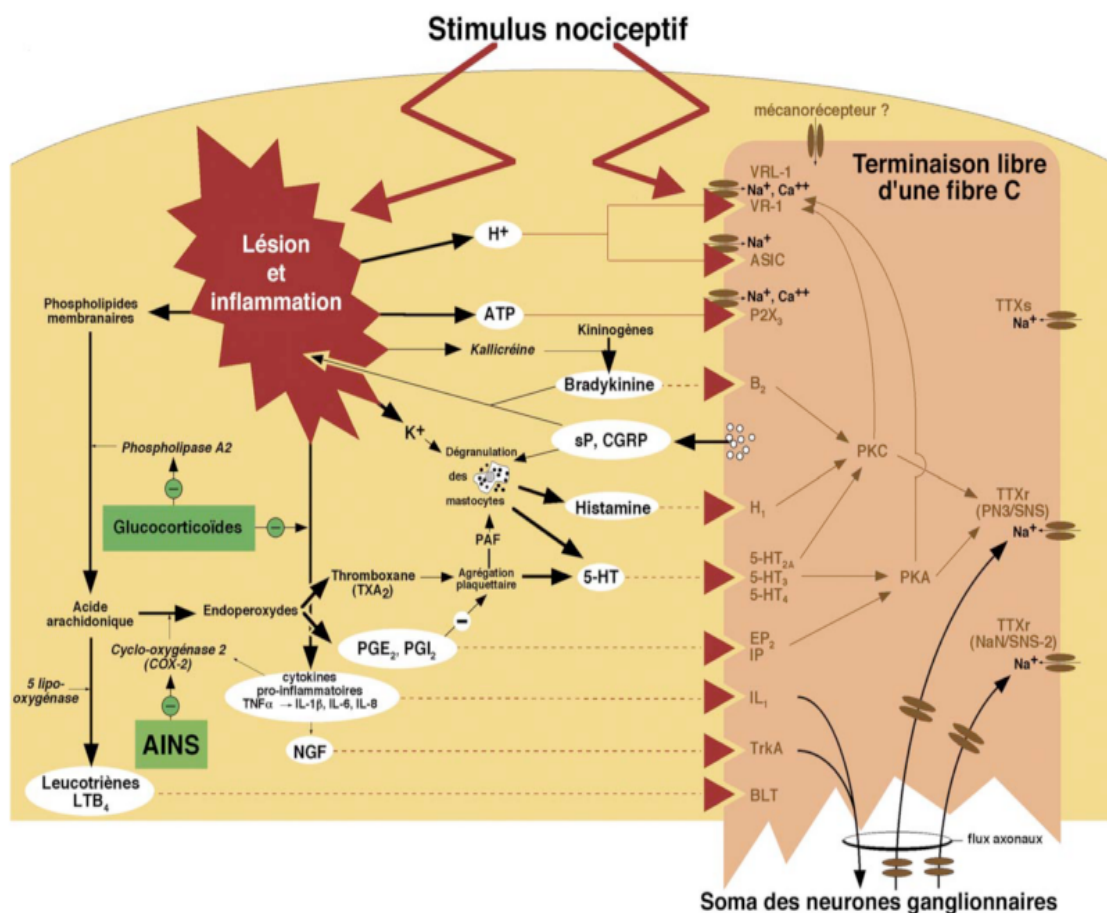
Par ailleurs, historiquement, la plupart des études se sont concentrées sur les conséquences de l'activation des afférences métabosensibles de type III et IV, notamment en ce qui concerne l'EPR, avec parfois des difficultés pour interpréter les résultats observés. En effet, une étude récente a montré que l'activation des afférences de type III et IV, par injection intraveineuse de substances connues pour activer ces afférences, entraînait une augmentation de l'EPR même lorsque les racines dorsales et ventrales lombaires et sacrées (de L2 à S3) étaient sectionnées (Yamauchi et al., 2014). L'EPR étant induit par une activation des afférences de type III et IV issues des muscles, des tendons et des articulations (McCloskey et Mitchell, 1972), la section des racines dorsales aurait normalement dû supprimer le réflexe observé. Ces résultats montrent que le réflexe de pression n'est pas uniquement initié par les afférences métabosensibles de type III et IV mais que d'autres structures doivent certainement être impliquées dans sa genèse, montrant ainsi la complexité des mécanismes sous-jacents.

Dans le même registre, une étude a montré que chez les animaux âgés, il y avait une diminution de la réponse ventilatoire quand les neurones du NTS étaient stimulés avec une injection de SP. Les auteurs conclurent à une diminution du nombre de récepteur NK1 (récepteur à la SP) au niveau du tronc cérébral avec le vieillissement (Mazzone et Geraghty, 1999), ce qui



démontre, là encore, la complexité des mécanismes et la nécessité d'étudier, de manière indépendante, les différentes structures impliquées dans l'activation de l'EPR.

Dans l'ensemble de nos études, la réponse des afférences métabosensibles aux injections de KCl était dose-dépendante tandis que la réponse aux injections d'AL culminait pour la dose de 1 mM. L'augmentation de la concentration extracellulaire de potassium stimulerait les afférences non encapsulées en bloquant par pression osmotique la sortie d'ions potassium par les canaux potassiques. La réponse en cloche aux injections d'AL est plus difficile à expliquer puisqu'elle passerait par une phase de sensibilisation des récepteurs ASIC3 aux ions  $H^+$  et au lactate et des récepteurs TRPV1 aux ions  $H^+$  et à la chaleur (Julius et Basbaum, 2001; Li et al., 2004b). Une inhibition des canaux sodiques voltage-dépendants (Nav1.7) (par l'accumulation d'ions  $H^+$ ) (Khan et al., 2002, 2006), alors qui sont impliqués dans la conduction des potentiels d'action des afférences sensibles à la douleur, pourrait également être envisagée. Ainsi, l'activation des récepteurs ASIC3 et TRPV1 est mise en compétition avec le blocage des canaux sodiques Nav1.7, ce qui peut expliquer pourquoi certaines mutations de ces canaux diminuent la perception de la douleur engendrée par l'acidité (Smith et al., 2011)(Figure n°19).



**Figure n°19** : L'activation d'une afférence de type C/IV. Schéma illustrant les mécanismes douloureux activant les fibres sensibles non myélinisées, lors d'une lésion tissulaire suivie d'une phase d'inflammation (d'après Le Bars et Willer, 2004).

La littérature reporte qu'il existe deux populations d'afférences métabosensibles : celles répondant aux faibles changements métaboliques non douloureux et celles répondant aux forts changements métaboliques douloureux (Light et al., 2008). Au cours d'une contraction musculaire ou de la pratique d'un exercice, et selon l'intensité et la durée de la contraction, la libération de métabolites dans l'environnement musculaire active l'une ou les deux populations d'afférences métabosensibles. Il existe donc toute une gamme de réponse selon le type et la quantité de métabolites libérés par le muscle fatigué, ce qui produira une réponse des afférences métabosensibles plus ou moins complexe. Par ailleurs, les métabolites libérés par le muscle sensibilisent les afférences mécanosensibles de type III (Kaufman et Forster, 1996), complexifiant davantage l'interprétation de l'EPR.

Ainsi, s'il est facile de quantifier la réponse des afférences métabosensibles de type III et IV lors d'injections de KCl et d'AL ou à la suite d'une FIE; il est plus difficile de prédire leur réponse lors d'une contraction musculaire prolongée ou d'un exercice variant en intensité au cours de sa durée.

Comme nous l'avons décrit précédemment, il a également été montré que la stimulation électrique à basse fréquence du muscle *gastrocnemius* entraînait un changement phénotypique du muscle vers un phénotype ayant pour conséquence une diminution de l'EPR (Wilson et al., 1995). De plus, la typologie des cellules musculaires semble influencer l'amplitude de l'EPR. En effet, les muscles principalement composés de cellules musculaires de type II ont une réponse plus importante que les muscles principalement composés de cellules musculaires de type I (Petrofsky et Lind, 1980; Petrofsky et al., 1981; Iwamoto et Botterman, 1985). Ces résultats laissent penser que plus un muscle a un phénotype rapide plus le réflexe de pression est important et donc que la réponse des afférences de type III et IV, qui médient la réponse de l'EPR, est importante. Cependant, les résultats de notre 3<sup>ème</sup> étude (Caron et al., 2015) indiquent que la réponse des afférences aux injections d'AL et à la FIE du muscle *gastrocnemius* (muscle à tendance rapide) est plus importante que celle du muscle *soleus* (lent) mais que la réponse des afférences du muscle *tibialis anterior* (rapide) à celle du muscle *soleus*. Ces résultats inattendus pourraient être expliqués par la fréquence de stimulation utilisée dans le protocole de FIE. La fréquence de 10 Hz a été choisie car il a été montré qu'elle induisait une plus grande réponse des afférences de type III et IV qu'une fréquence de 100 Hz (Darques et Jammes, 1997). D'autres études portant sur la fatigue du muscle *tibialis anterior* ont utilisé des stimulations de 50 Hz (Wilson et al., 1995) ou allant de 20 à 50 Hz (Iwamoto et Botterman, 1985). De plus, il a également été montré qu'une stimulation à une fréquence inférieure au seuil tétanique diminuait

l'EPR (Perez-Gonzalez, 1981; Kaufman et al., 1984b). Dans notre étude, le muscle *soleus* a le seuil tétanique le plus bas tandis que le muscle *tibialis anterior* a le plus élevé (Delp et Duan, 1996) ; le *gastrocnemius* étant considéré comme un muscle intermédiaire. Ainsi, la délivrance de chocs électriques à une fréquence de 10 Hz est plus proche du seuil tétanique du muscle *soleus* que du muscle *tibialis anterior*. Cette différence entre la fréquence de stimulation utilisée et la fréquence tétanique des muscles étudiés pourrait expliquer pourquoi la réponse du muscle *tibialis anterior* est plus faible lors de la FIE.

Des études reportent également que la masse musculaire influence également la réponse des afférences métabosensibles (McCloskey et Streatfeild, 1975; Iwamoto et Botterman 1985; Iellamo et al. 1999). Le fait que muscle *gastrocnemius* ait la masse la plus importante parmi les muscles enregistrés pourrait expliquer pourquoi la réponse la plus importante ait été enregistrée pour ce muscle. Toutefois, d'autres facteurs tels que la densité des récepteurs, des fibres nerveuses afférentes et de la vascularisation du muscle pourraient intervenir dans la réponse enregistrée lors de la FIE. Enfin, des différences dans la réponse des afférences des muscles extenseurs et fléchisseurs ont aussi été reportées (Woolf et Wall, 1986; Bosh et al., 2012) ce qui ajouterait une possible influence fonctionnelle sur la réponse enregistrée.

## **2. La réponse des afférences mécanosensibles.**

Il semblerait que le mécanisme initial responsable de l'activation des afférences mécanosensibles débute par l'entrée de  $\text{Na}^+$  et dans une moindre mesure de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire (Hunt et al., 1978). Par ailleurs, il semblerait que la sensibilité à l'étirement des afférences mécanosensibles soit augmentée par la sécrétion autocrine de glutamate (Bewick et al., 2005). Toutefois, bien que les canaux ioniques à ouverture mécanique ne soient pas encore bien connus, il semblerait que trois grandes familles de canaux interviennent dans l'entrée du  $\text{Na}^+$  suite à une déformation mécanique. Ainsi, les familles des canaux  $\text{Na}^+$  degenerin/épithélial (DEG/ENaC) (Simon et al., 2010), des TRP (Padinjat et Andrew, 2004) et les piezos (Coste et al., 2010) sont aujourd'hui les plus décrits. À celles-ci pourrait s'ajouter la famille des ASIC qui participe également à la détection de la déformation mécanique (Lingueglia, 2007). En effet, il a été montré que la proprioception était perturbée chez des souris n'exprimant pas les récepteurs ASIC3 ou ASIC2 au niveau des neurones afférents (Price et al., 2000).

Concernant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  suite à une déformation mécanique, les principaux candidats seraient les récepteurs ASIC1, TRP et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants. Les canaux potassiques calcium-dépendants ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), quant à eux, réguleraient la fréquence de décharge des afférences mécanosensibles (El Manira et al., 1994). Le fait que la proprioception ne soit pas

dramatiquement altérée après la suppression d'un gène codant pour une protéine membranaire spécifique, indique que la mécanotransduction est dépendante de l'interaction de plusieurs récepteurs/canaux membranaires (Bewick et Banks, 2015).

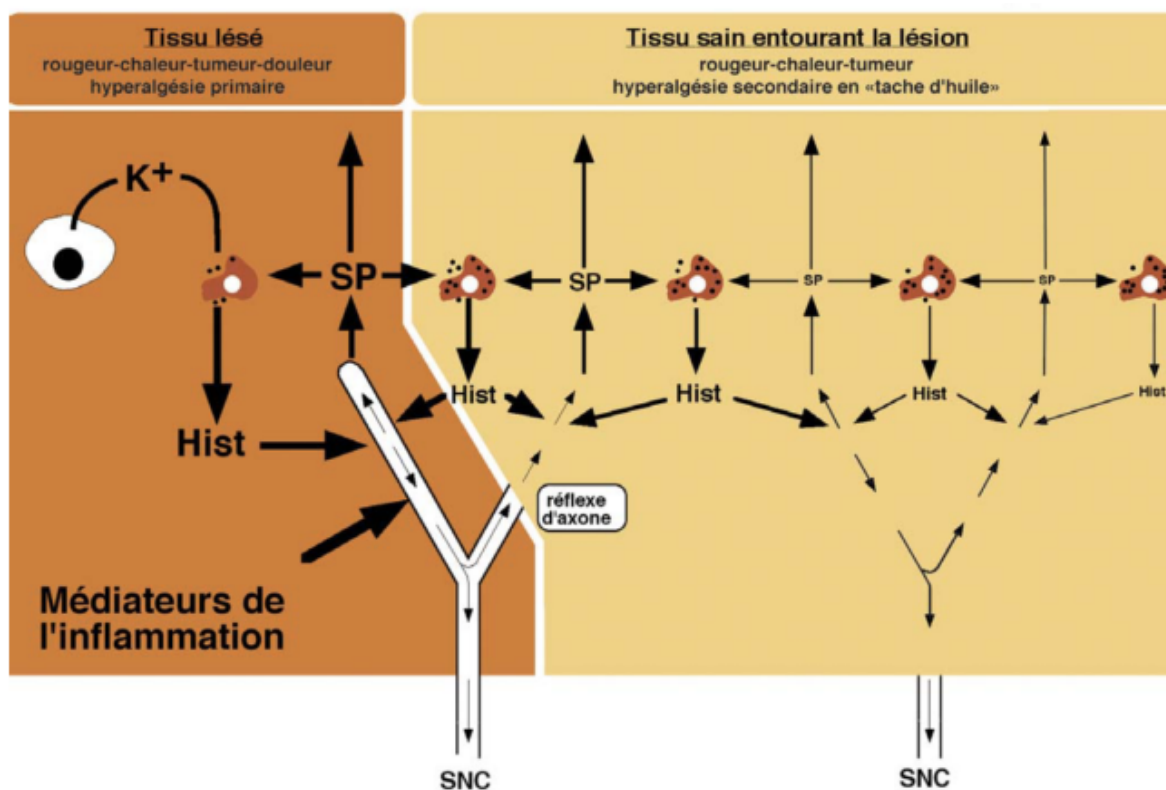
## II. La toxine botulique de type A (BoNT/A).

### 1. La réponse des afférences metabosensibles après paralysie induite par de la BoNT/A.

La compréhension de la réponse des afférences de type III et IV est indispensable pour pouvoir mieux interpréter les études qui ont démontré les effets bénéfiques de la BoNT/A sur la diminution de l'inflammation et de la perception de la douleur (Jabbari, 2008).

La BoNT/A a des effets aux niveaux central et périphérique. Au niveau central, elle entraîne une diminution de la libération de glutamate (Cui et al., 2004), mais aussi de SP (Welch et al., 2000; Lucioni et al., 2008), de CGRP (Meng et al., 2007; Lucioni et al., 2008) et dans une moindre mesure de GABA (Verderio et al., 2007). Au niveau périphérique, la BoNT/A diminue la libération de SP et de CGRP (Cui et al., 2004; Lucioni et al., 2008; Carmichael et al., 2010) par les afférences cutanées et musculaires. Ainsi, la BoNT/A permettrait de diminuer l'inflammation neurogénique présente dans tous les tissus innervés par des afférences non myélinisées.

L'inflammation neurogénique est un processus complexe qui se situe à la frontière de trois domaines de la physiologie que sont la neurologie, l'immunologie et l'angiologie. En effet, de nombreux types cellulaires comme les nocicepteurs, les mastocytes et les cellules endothéliales vasculaires sont impliqués dans ce processus. De plus, les terminaisons sensorielles qui représentent l'élément moteur de ce type d'inflammation sont activées par une quantité de substances algogènes et pro-inflammatoires allant de la substance P aux cytokines en passant par les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs classiques, les acides aminés et même les protons. Ainsi, la stimulation des afférences de type III et IV pourrait être à l'origine de la libération de la SP et du CGRP conduisant à une vasodilatation et une extravasation de plasma (Figure n°20). Le stress pourrait être également à l'origine du dérèglement de ce réflexe (Liu et al., 2013).



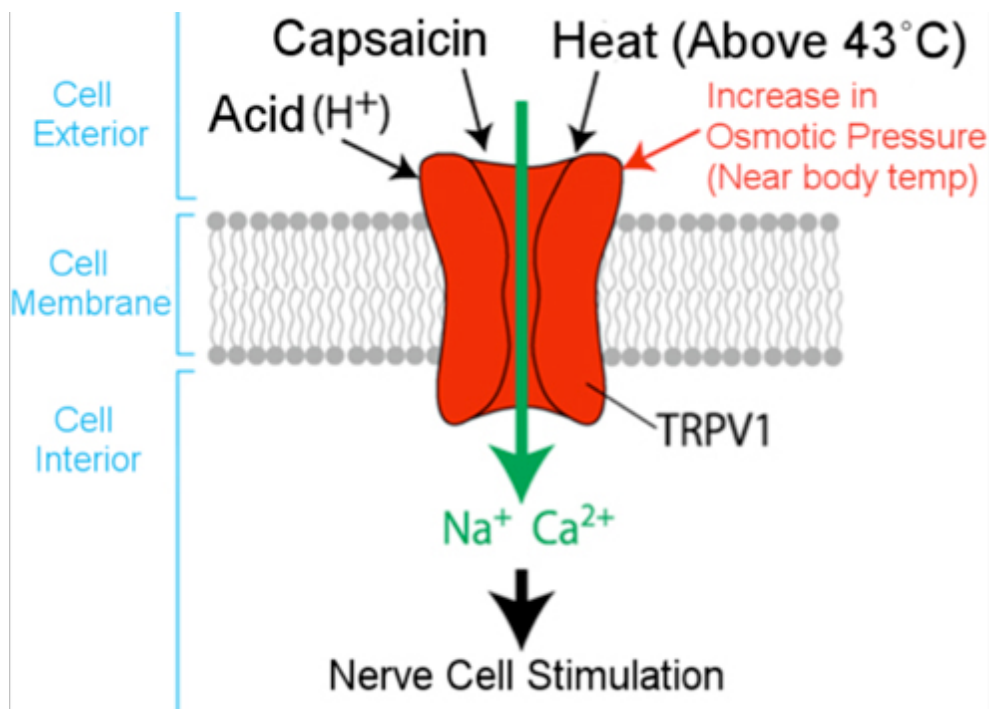
**Figure n°20** : *L'inflammation neurogénique*. Schéma illustrant les mécanismes faisant intervenir les fibres sensibles non myélinisées, la SP et l'histamine (Hist.), et la réaction immunitaire par le réflexe d'axone dans l'inflammation neurogénique (d'après [Le Bars et Willer, 2004](#)).

De nombreuses pathologies comme le syndrome de douleur régionale complexe (CRPS I et II) ([Weber et al., 2001](#); [Kingery et al., 2003](#); [Leis et al., 2003, 2004](#)), l'arthrite ([Keeble et Brain, 2004](#)), certaines pancréatites ([Vera-Portocarrero et Westlund, 2004](#)) ou le syndrome du colon irritable ([Wessermann, 2001](#); [O'Connor et al., 2004](#)) auraient pour origine cette inflammation neurogénique suite à une augmentation de la libération périphérique de SP. L'augmentation de la libération de CGRP serait également à l'origine de migraine, d'arthrite et de troubles de l'articulation temporo-mandibulaire ([Bring et al., 2005](#); [Fernihough et al., 2005](#); [Spears et al., 2005](#)). Toutefois, bien que le CGRP soit connu pour être un vasodilatateur puissant, il n'induit ni extravasation plasmatique ni sensation douloureuse ; il n'est donc pas un médiateur directement impliqué dans l'inflammation neurogénique bien qu'il soit co-localisé avec la substance P dans les afférences amyéliniques ([Reinert et al., 1998](#)). Il pourrait néanmoins renforcer les effets de la SP.

Les premières stratégies utilisées pour traiter l'inflammation neurogénique furent orientées vers l'utilisation d'antagonistes de la SP, et en particulier, les anti-NK1, mais les résultats de certaines études n'ont pas été à la hauteur des attentes ([Hill, 2000](#)). Qui plus est, une étude récente a montré que la réponse des afférences exprimant les canaux ASIC3 était diminuée

après injection d'une solution acide avec de la SP quand le récepteur NK1 était co-exprimé. Le couplage d'une protéine G avec la phosphotyrosine kinase (PTK) permettrait l'ouverture de canaux potassiques conduisant à une hyperpolarisation du neurone (Lin et al., 2012).

L'inflammation neurogénique conduit à une vasodilatation locale qui s'oppose à la vasoconstriction sympathique. En cas de diminution, voire d'absence des réflexes entraînant cette inflammation, il se produit une accumulation des métabolites libérés par le muscle durant l'exercice, et donc une stimulation accrue des afférences métabosensibles associée à une sensibilisation des afférences mécanosensibles (Kaufman et al., 1984b). Dans notre première étude (Caron et al., 2014), nous avons observé une diminution de la réponse aux injections d'AL mais pas au KCl chez les animaux dont le muscle *gastrocnemius* avait été paralysé par la toxine botulique. Sachant que les récepteurs ASIC3 et cationiques TRPV1 (Morenilla-Palao et al., 2004; Apostolidis et al., 2005) qui sont exprimés au niveau des afférences métabosensibles répondent à la diminution de pH et peuvent être sensibilisés en présence de lactate (Immke et McCleskey, 2001), nous aurions dû observer une augmentation de la réponse des afférences métabosensibles lors des injections d'AL chez les animaux traités avec de la BoNT/A. La diminution de la réponse pourrait être expliquée en partie par une diminution du nombre de récepteurs TRPV1 exprimés au niveau membranaire ou une altération de leur fonctionnement (Apostolidis et al., 2005) (Figure n°21).



**Figure n°21** : Le récepteur TRPV1. Schéma illustrant le fonctionnement du récepteur TRPV1. Ce récepteur est sensible à l'acidité, la capsaïcine et aux changements de température supérieure à 43°C. Son ouverture permet de laisser passer les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire (d'après le *National Institute of Basic Biology*)



Dans la mesure où les différents récepteurs (TRPV1, ASIC3 et P2X) exprimés au niveau des afférences métabosensibles semblent fonctionner en synergie, la diminution de l'expression de l'un d'entre eux pourrait diminuer la réponse des afférences auxquelles ils appartiennent (Light et al., 2008).

Après récupération de la fonction neuromusculaire suivant l'injection de BoNT/A, nos résultats font ressortir une diminution globale des réponses aux injections d'AL et de KCl, et une augmentation de la réponse à la FIE. Ce profil de réponse a déjà été observé dans les cas d'insuffisance cardiaque (Smith et al., 2005). Les auteurs suggèrent que la diminution de la réponse des afférences métabosensibles de type IV était compensée par une suractivation des afférences de type III (Smith et al., 2006; Wang et al., 2010). Dans notre étude, nous pouvons envisager qu'il y ait eu une modification de l'excitabilité des afférences de type III après injection de BoNT/A qui pourrait même être liée à la récupération de la masse musculaire. En effet, il a été montré que l'activation des récepteurs musculaires  $\beta$ -adrénergiques par le système nerveux sympathique (Williams et al., 1984; Martin et al., 1989; Kim et al., 1991; Ryall et al., 2002, 2004; Lynch et Ryall, 2008) suite à l'activation de l'EPR (Kaur et al., 2015) pouvait entraîner une hypertrophie musculaire (Apseloff et al., 1993; Mersmann, 1998; Hinkle et al., 2002; Sato et al., 2011). Ainsi, la récupération de la masse musculaire que nous avons observée malgré les altérations persistantes de la réponse des afférences musculaires pourrait résulter de cette activité exacerbée des afférences de type III. Afin de confirmer notre hypothèse, il sera nécessaire de vérifier dans une étude ultérieure si l'augmentation de la réponse à la FIE est associée à une augmentation de l'EPR. Dans la mesure où l'EPR est induit par des injections d'antagonistes GABA-A et GABA-B dans la corne dorsale de la moelle épinière (Wang et al., 2013), il serait intéressant de vérifier si de telles injections chez des animaux récupérant d'une paralysie induite par la toxine botulique présentent des modifications du réflexe de pression.

Selon une étude récente, les champs d'actions et les méthodes d'utilisation de la toxine botulique ne semblent pas encore totalement exploités (Matak et Lackovic, 2014). C'est pour cette raison qu'il serait intéressant d'étudier le rôle de l'EPR et des traitements à base de toxine botulique dans des pathologies comme l'hypertension artérielle et les insuffisances cardiaques. Il serait également intéressant d'évaluer les effets de la toxine sur les phénomènes de sensibilisation centrale (Aoki et Francis, 2011) et de potentialisation à long terme (Lledo et al., 1998; Jurado, 2014) qui semblent avoir des mécanismes en commun (Ji et al., 2003), ou encore



d'étudier ses effets sur les courants entrant persistants qui seraient impliqués dans les potentiels en plateau des motoneurones (Bouhadfane et al., 2013).

## **2. La réponse des afférences mécanosensibles après paralysie induite par la BoNT/A.**

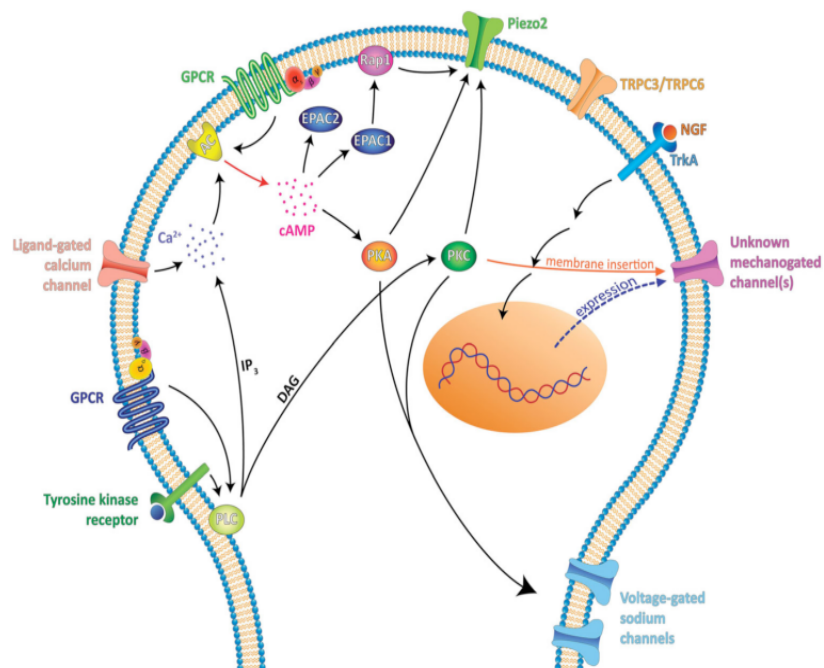
Les vibrations tendineuses sont connues comme étant une méthode de choix pour stimuler les FNM et les OTG (Brown et al., 1967a, b et c; Roll et al., 1989). Cependant, il reste difficile de déterminer exactement quelles sont les afférences qui sont stimulées pour une fréquence de vibration donnée. À cela vient s'ajouter l'intensité de la stimulation qui peut faire varier les types d'afférences recrutées. En effet, il semble établi que des vibrations de faible intensité (0,1 à 0,2 mm d'amplitude) à une fréquence d'au moins 50 Hz entraînent principalement une décharge des afférences de type Ia et dans une moindre mesure des autres afférences mécanosensibles (De-Doncker et al., 2003). Dans nos études, le vibreur utilisé impactait le tendon avec des oscillations d'environ 2 mm d'amplitude dans une gamme de fréquences de vibration allant de 10 à 100 Hz (palier de 10 Hz pendant 5 secondes). Il est donc très difficile de conclure que la baisse de réponse observée à une fréquence de vibration donnée était due à une altération de la réponse des afférences Ia, Ib ou II. La mesure d'un potentiel d'action complexe nous aurait permis de déterminer s'il existait une altération de la vitesse de conduction pour les différents diamètres de fibres nerveuses mais ne nous aurait toujours pas permis de déterminer précisément quelle catégorie était réellement altérée par la BoNT/A.

Nos résultats montrent que la réponse mécanosensible est altérée pour le groupe des animaux ayant partiellement récupéré leur motricité (groupe B50) (Caron et al., *en révision*) suggérant, comme cela avait déjà été évoqué, que malgré un retour partiel de la motricité, les effets de la toxine botulique persistent plus longtemps sur les récepteurs mécanosensibles que sur le muscle (Kim et al., 2006; Trompetto et al., 2006). De même, il a été montré que la réversibilité des effets est plus lente au niveau central que périphérique (Kim et al., 2006). Ce délai dans la récupération pourrait s'expliquer par le fait que les mécanorécepteurs sont encapsulés et par le transport de la toxine dans le système nerveux central.

La récupération de la motricité (groupe B100) est associée non seulement à une récupération de la réponse des afférences mécanosensibles mais aussi à une récupération de la force musculaire mesurée sur la secousse élémentaire induite. Les afférences mécanosensibles, notamment les afférences fusoriales, jouent un rôle important dans l'activation des motoneurones- $\alpha$  lors d'une contraction musculaire (Taylor et al., 2000; Gandevia, 2001). Une étude très ancienne avait déjà montré qu'une section de la racine dorsale, lieu de passage des afférences fusoriales entre autres, entraînait une diminution de la force du muscle étudié

(Matthews, 1964). De plus, une suppression de leur réponse entraîne une diminution de la fréquence de décharge des motoneurones- $\alpha$  (Macefield et al., 1993). Ces résultats mettent en évidence que les afférences mécanosensibles sont impliquées dans la production de force et que la récupération de leur réponse est liée à la récupération de la fonction musculaire (Palmieri et al., 2005; Santilli et al., 2005; Palmieri-Smith et al., 2009).

Au niveau cellulaire, les effets de la BoNT/A sur la mécanosensibilité ont été étudiés principalement sur des modèles d'animaux ayant une hypersensibilité mécanique. Une étude a mis en avant une diminution du nombre de neurones ayant des courants lents mécaniquement activés impliqués dans la nociception mécanique (Paterson et al., 2014). Ces auteurs ont expliqué que le récepteur TRPA1 était nécessaire mais pas suffisant pour générer ce courant lent dans les neurones afférents (Vilceanu et Stucky, 2010) et que son blocage diminuait leur décharge lors d'une stimulation mécanique douloureuse (Kerstein et al., 2009). Ces mêmes auteurs ont conclu que la BoNT/A altérerait le trafic de vésicules et donc le trafic des récepteurs TRPA1 (Di Castro et al., 2006). En effet, il semblerait que l'excitabilité des afférences soit régulée par des vésicules comme au niveau des synapses. Ces vésicules contiendraient des protéines membranaires qui sont incorporés à la membrane plasmique après fusion avec cette dernière (Qi et al., 1994; Bewick et Banks, 2015). Si les mécanismes de fusion de ces vésicules dépendent de la protéine SNAP25, la BoNT/A devrait alors diminuer l'excitabilité des afférences en inhibant l'insertion de récepteurs membranaires (Figure n°22).



**Figure n°22** : Les voies de la sensibilisation des afférences mécanosensibles. Des voies différentes mais interconnectées ont été décrites comme contribuant à la sensibilisation des afférences mécanosensibles (d'après Lolignier et al., 2015).

### III. Le vieillissement et l'activité physique.

#### 1. La réponse des afférences métabosensibles.

Nos études sur la réponse des afférences métabosensibles après paralysie musculaire réversible avec la BoNT/A ont montré qu'il y a une diminution de la réponse aux injections de KCl et d'AL. Cette diminution est associée à une augmentation de la réponse à la FIE après que le muscle ait récupéré sa motricité. Cependant, comme cette récupération de la motricité a mis environ 12 mois, il était important de vérifier que les altérations observées ne soient pas dues au vieillissement de l'animal. Une analyse des données de la littérature sur l'évolution de l'EPR mis en jeu par les afférences métabosensibles lors du vieillissement montre qu'elles sont relativement contradictoires : certains auteurs indiquent une altération de l'EPR, tandis que d'autres ne notent aucune modification (Ng et al., 1994; Markel et al., 2003; Houssiere et al., 2006; Greaney et al., 2013).

La pratique d'activité physique étant proposée comme un moyen efficace pour traiter les troubles de l'EPR (Murphy et al., 2011; Smith et al., 2014), nous avons également fait l'hypothèse qu'à un âge avancé elle pourrait permettre de préserver la réponse des afférences métabosensibles (et donc de l'EPR) si ces dernières étaient altérées par le vieillissement.

Les résultats de notre dernière étude ont mis en évidence que la réponse aux injections d'activateurs des afférences métabosensibles de type III et IV comme à la FIE diminuait chez nos animaux dès l'âge de 12 mois, pour le muscle *soleus* ainsi que pour le muscle *tibialis anterior* indiquant une altération du fonctionnement des afférences métabosensibles avec le vieillissement. Par la même occasion, ces données confirment que l'augmentation de la réponse à la FIE chez nos animaux ayant récupéré leur motricité le 12<sup>ème</sup> mois post-injection de BoNT/A (âge des animaux 15 mois environ) était bien la conséquence de la toxine. Toutefois, cette étude ne nous permet pas de déterminer les raisons de l'altération des afférences métabosensibles. Au regard de la littérature, plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- *Une diminution du nombre d'afférences métabosensibles.* La littérature reporte une diminution du nombre de fibres amyéliniques lors du vieillissement (Nakayama et al., 1998; Ceballos et al., 1999; Namer, 2010). Certains auteurs ont reporté que les fibres cutanées de type C répondant aux stimuli mécaniques et à la chaleur diminuaient avec l'âge et que celles insensibles à ces stimuli augmentaient. Par ailleurs, le seuil de réponse aux stimuli mécaniques tend à être plus haut avec des amplitudes de réponse plus basses et une vitesse de conduction altérée (Taguchi et al., 2010). Toutefois, les mêmes auteurs ont également montré que les

afférences musculaires de type C/IV avaient un seuil mécanique plus bas et une amplitude de réponse plus importante chez les animaux âgés (Taguchi et al., 2011).

- *Une diminution du nombre de récepteurs TRPV1.* Certaines études indiquent que le nombre de ces récepteurs exprimés au niveau des afférences amyéliniques diminue lors du vieillissement (Wang et al., 2006; Wang et Albers, 2009). Dans la mesure où il existe une synergie entre les récepteurs TRPV1, ASIC3 et P2X (Light et al., 2008), la diminution de l'expression de l'un d'entre eux pourrait affecter largement la sensibilité des afférences métabosensibles aux métabolites activateurs utilisés dans nos protocoles.

- *Une modification du phénotype musculaire.* Les modifications de l'EPR observées au cours du vieillissement pourraient être attribuées à un changement du phénotype musculaire (diminution du nombre et du diamètre des cellules musculaires de type II), une diminution de la masse musculaire (sarcopénie) et une modification des structures associées au muscle (capillaires ...). En effet, bien qu'il ait été montré que les muscles rapides soient à l'origine d'une plus grande réponse de l'EPR que les muscles lents (Iwamoto and Botterman, 1985; Wilson et al., 1995; Xing et al., 2008), chez les sujets alités, l'atrophie musculaire associée à une diminution de la densité des capillaires musculaires, serait à l'origine de sa diminution (Kamiya et al., 2004). Ainsi, nous pouvons supposer que les modifications qui se produisent au niveau du tissu musculaire au cours de vieillissement (Vandervoort, 2002) pourraient être à l'origine de la moindre réponse des afférences métabosensibles.

Dans notre étude, la pratique de l'activité physique n'a pas permis de contrecarrer les effets du vieillissement sur la réponse des afférences métabosensibles. A ce stade de l'expérimentation, il est difficile de trouver une explication sur les raisons de cette absence d'effet. Cependant, il a été noté une activité du système nerveux sympathique plus élevée au repos chez la personne âgée (Ng et al., 1993; Jones et al., 2001) et montré que l'activité physique diminuait la pression artérielle de repos et permettait également une meilleure redistribution du flux sanguin pendant l'activité physique (Tipton, 1991; Rowell, 1993; Pescatello et al., 2004; Carter et Ray, 2015). Il est possible que l'augmentation relative de la réponse des afférences métabosensibles (entre la phase de repos et après les injections ou la FIE) reste inchangée mais que l'écart de cette même réponse exprimée en valeur absolue, soit plus important si la valeur de repos est plus faible après la pratique d'un entraînement. De plus, le type, dans notre étude, l'intensité et la durée de l'entraînement pourrait ne pas être complètement appropriés. C'est pour cette raison qu'il serait intéressant, dans un premier temps, de faire varier ces différents paramètres et d'en étudier les conséquences sur la réponse relative et absolue des afférences métabosensibles.

## 2. La dépression fréquence dépendante du réflexe H.

Le réflexe H est une composante de la réponse électromyographique (EMG) évoquée par l'activation synaptique des motoneurons par les afférences musculaires suite à leur stimulation (Magladery et al. 1951). L'amplitude du réflexe H est un indicateur du nombre d'unités motrices activées à une intensité de stimulation donnée. Chez les individus dont la moelle épinière est intacte, l'amplitude du réflexe H est diminuée lorsque la fréquence de stimulation des afférences atteint ou dépasse 1 Hz (Ishikawa et al., 1966; Kiser et al., 2005). La mesure de la dépression du réflexe H avec l'augmentation de la fréquence de stimulation est une méthode qui a permis d'apprécier la spasticité et la plasticité sensorimotrice après lésion de la moelle épinière (Schindler-Ivens and Shields, 2000; Pertici et al., 2013; Bandaru et al., 2015). Il a été proposé que la perte progressive des inhibitions présynaptiques contribuait significativement au développement d'une hyperréflexie des voies mises en jeu dans le réflexe d'étirement et que l'exercice permettait de restaurer la dépression du réflexe H associée à l'augmentation de la fréquence de stimulation (Skinner et al., 1996; Reese et al., 2006; Shields et al., 2011). Il a également été noté une augmentation du rapport  $H_{\max}/M_{\max}$  après une lésion de la moelle épinière (Côté et al., 2014). Toutefois, cette méthode n'a été qu'une seule fois jusqu'à présent pour évaluer les éventuelles modifications de la boucle sensorimotrice au cours du vieillissement. Les auteurs ont observé que le vieillissement entraînait une diminution du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  (Koceja et al., 1995; Scaglioni et al., 2002) et que la dépression fréquence dépendante était présente uniquement pour des fréquences de stimulation allant jusqu'à 2 Hz, suggérant une diminution de l'inhibition pré-synaptique GABAergique (Trompetto et al., 2014). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la diminution du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  avec le vieillissement :

- *Une diminution de l'information afférente.* La fréquence de décharge des afférences fusoriales diminue chez le rat âgé lors de sollicitations musculaires statiques et dynamiques. Cette diminution serait induite par un épaississement de la capsule fusoriale ainsi que pour une diminution du nombre de fibres musculaires intrafusales (Miwa et al., 1995).

- *La diminution de la transmission entre les afférences Ia et les motoneurons-a.* Chez le chat âgé, il a été montré que les PPSE enregistrés au niveau du motoneurone après stimulation des afférences Ia nécessitaient plus de temps pour atteindre leur amplitude maximale et que la demi-largeur de ceux-ci était également augmentée. Cependant, aucun changement dans leur amplitude n'a été relevé mais il a été observé une augmentation du temps nécessaire pour atteindre la valeur seuil du potentiel d'action (Boxer et al., 1988).

- *Une diminution de l'excitabilité spinale.* L'inhibition présynaptique serait diminuée au repos et son augmentation serait limitée chez les sujets âgés (Morita et al., 1995; Earles et al., 2001). Cette diminution de l'inhibition présynaptique a également été observée avec une diminution de la facilitation hétéronyme (Morita et al., 1995) et une diminution de l'inhibition réciproque (Kido et al., 2004). Ces résultats suggèrent une altération générale de l'excitabilité du réseau spinal et des centres supérieurs (Schieppati, 1987; Kido et al., 2004; Baudry et al., 2014), ce qui conduit à une diminution des réflexes spinaux avec l'âge.

Dans ce travail doctoral, nous n'avons pas observé de diminution significative du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$  au cours du vieillissement. Cependant, les amplitudes des ondes  $H_{\max}$  et  $M_{\max}$  étaient diminuées. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que, chez le rat, la vitesse de conduction diminue pour les afférences myélinisées à partir de l'âge de 700 jours (24 mois) (Sato et al., 1985). Nos rats, qui ont été enregistré à l'âge de 20 mois, ne seraient « pas assez âgés » pour observer une diminution du ratio  $H_{\max}/M_{\max}$ .

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, la diminution de la dépression fréquence dépendante du réflexe H pourrait être due à augmentation de l'excitabilité motoneuronale (Li et al., 2004b) et des afférences du réflexe de flexion (Rémy-Néris et al., 1999) et/ou à une diminution de l'inhibition récurrente (Mazzocchio et Rossi, 1997), de l'inhibition réciproque (Boorman et al., 1996; Crone et al., 2007), de l'inhibition présynaptique par les interneurons inhibiteurs Ia (Lloyd et Wilson, 1957; Kohn et al., 1997; Katz, 1999) et de l'inhibition des voies descendantes des centres supérieurs agissant au niveau pré- et post-synaptique (Andersen et al., 1962; Jimenez et al., 1988; Rudomin, 1994; Boulenguez et al., 2010; Côté et al., 2014).

Après une lésion de la moelle épinière, il a été montré une augmentation de la sensibilité à la 5-HT au niveau sous-lésionnel (Bédard et al., 1979; Barbeau et Bédard, 1981) probablement due à une augmentation du nombre de ses récepteurs (Kong et al., 2010, 2011; Ren et al., 2013). La 5-HT est connue pour faciliter les courants persistants entrants (Li et al., 2004; Harvey et al., 2006) à l'origine d'une activité musculaire anormale et de spasticités. Par ailleurs, après une activité physique passive, il a été montré une augmentation du nombre de récepteurs 5-HT-2A (Chopek et al., 2015) qui serait à l'origine d'une augmentation du nombre de co-transporteurs  $K^+-Cl^-$  (KCC2) au niveau des motoneurons (Bos et al., 2013) ce qui permet de diminuer la concentration d'ions chlorure intracellulaire ( $[Cl^-]_i$ ), de réduire l'hyperexcitabilité post-lésionnelle et pourrait intervenir dans la récupération de la locomotion après une lésion de la moelle épinière (Boulenguez et al., 2010; Côté et al., 2014; Gackière et Vinay, 2014). Il a également été noté que l'activité physique passive augmentait l'expression de KCC2 uniquement

sur les motoneurons des muscles extenseurs, expliquant ainsi pourquoi les bénéfices d'une telle activité n'étaient visibles que sur les muscles extenseurs (Chopek et al., 2015).

Les résultats de notre étude ont montré que le vieillissement était associé à une diminution de la dépression du réflexe H dès l'âge de 12 mois pour le muscle *tibialis anterior* (dorso-fléchisseur du pied sur la jambe) et à partir de 20 mois pour le muscle *soleus* (extenseur du pied, fléchisseur plantaire de la cheville). Une restauration de la dépression a été observée uniquement pour le muscle *tibialis anterior* chez les animaux ayant pratiqué un protocole d'activité physique. Contrairement aux travaux de Chopek et ses collaborateurs réalisés après une lésion de la moelle épinière (Chopek et al., 2015), nos travaux indiquent que le bénéfice de l'activité physique réelle s'exerce uniquement sur les muscles fléchisseurs au cours du vieillissement. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences : 1) le modèle expérimental utilisé (animal vieillissant sain vs. animal plus jeune ayant une lésion de la moelle épinière dont les voies descendantes ont été interrompues) et 2) le type d'exercice (exercice actif sur tapis roulant vs. exercice passif). Enfin, il faut noter que dans notre étude nous n'avons pas observé de récupération de la réponse des afférences métabosensibles chez les animaux ayant pratiqué l'exercice sur tapis roulant ce qui pourrait laisser suggérer que la récupération de la dépression du réflexe H est indépendante de l'activité des afférences métabosensibles de type III et IV. Il serait donc intéressant d'étudier si la dépression fréquence dépendante du réflexe H est sensible à l'activation (par injections de KCl, d'AL ou par une FIE) des afférences métabosensibles mais aussi de vérifier si le rapport  $H_{max}/M_{max}$  qui est altéré par l'activation de ces afférences (Laurin et al., 2010) l'est toujours au cours du vieillissement et après un protocole d'activité physique. Les données recueillies nous permettraient de mieux comprendre l'implication des afférences de type III et IV dans le fonctionnement de la boucle sensori-motrice au cours du vieillissement et lors de la pratique d'un exercice physique.



# Conclusion

L'objectif de ce travail doctoral a été d'étudier la plasticité de la boucle sensorimotrice et de l'activité des afférences musculaires (mécano- et/ou métabosensibles) au cours de différentes situations que sont la paralysie réversible par la BoNT/A et le vieillissement associé ou non à de l'activité physique. Il en ressort tout d'abord que l'injection de BoNT/A dans le muscle *gastrocnemius* entraîne une altération des afférences métabo- et mécanosensibles (Caron et al., 2014). Cette altération est suivie d'une récupération de la réponse des afférences mécanosensibles aux vibrations tendineuses tandis que la réponse métabosensible aux injections de KCl et d'AL reste diminuée au cours de la récupération et, de manière inattendue, la réponse à la FIE est exacerbée (Caron et al., *sous presse*). Ce type de réponse a déjà été observé chez les patients présentant des faiblesses cardiaques (Smith et al., 2005) et serait due à une diminution de la réponse des afférences de type IV, surcompensée par une augmentation de la réponse des afférences de type III (Smith et al., 2006). Cependant, lors de la récupération, les caractéristiques contractiles du muscle *gastrocnemius* ont changé laissant suggérer une évolution vers un phénotype plus lent. De plus, la récupération totale des animaux aux injections de BoNT/A a nécessité environ 12 mois. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la réponse des afférences métabosensibles sur des muscles aux phénotypes différents au cours du vieillissement.

L'étude de la réponse des afférences métabosensibles des muscles *soleus* (lent et fléchisseur), *gastrocnemius* (intermédiaire/rapide et fléchisseur) et *tibialis anterior* (rapide et extenseur) indique que le muscle *gastrocnemius* présente une amplitude de réponse aux injections d'AL et à la FIE supérieure aux muscles *tibialis anterior* et *soleus* malgré le fait que le muscle *tibialis anterior* ait une masse plus importante et un phénotype plus rapide que le muscle *soleus*. Ces résultats suggèrent que la réponse des afférences métabosensibles pourrait être déterminée par des caractéristiques anatomiques (phénotype et masse musculaire; densité des récepteurs, des fibres afférentes et de la vascularisation du muscle) mais aussi fonctionnelles (fléchisseurs ou extenseurs) (Caron et al., 2015).

En ce qui concerne les effets du vieillissement, il est important de les différencier des effets de la sédentarité. Nous avons donc fait le choix de compléter le protocole d'étude sur le vieillissement avec un entraînement incrémenté sur tapis roulant de 8 semaines (à environ 75% VO<sub>2</sub>max) qui permet une augmentation de la masse musculaire, de l'oxydation des lipides par rapport aux glucides et un retard de l'apparition de la fatigue (Cartee et Farrar, 1988; Pasini et al., 2012). La mesure du ratio H<sub>max</sub>/M<sub>max</sub> au cours du vieillissement des muscles *tibialis anterior* et *soleus* indique que dépression dépendante à la fréquence du réflexe H s'altère (diminution) avec l'avancée en âge pour ces deux muscles. Toutefois, la pratique de l'entraînement sur tapis roulant dans les 8 semaines précédant les enregistrements électrophysiologiques a permis de restaurer la dépression dépendante à la fréquence pour le muscle *tibialis anterior* (extenseur)

mais pas pour le muscle *soleus*. La littérature indique que le vieillissement est accompagné d'une altération générale de l'excitabilité du réseau spinal et des centres supérieurs (Schieppati, 1987; Kido et al., 2004; Baudry et al., 2014), ce qui conduit à une diminution des réflexes spinaux avec l'âge. Cependant, contrairement aux travaux montrant que l'activité physique passive chez des animaux dont la moelle épinière est endommagée entraîne une récupération de la dépression dépendante à fréquence uniquement pour les fléchisseurs (Chopek et al. 2015), nous montrons que les effets de l'exercice sur la dépression dépendante à fréquence s'appliquent sur un muscle extenseur au cours du vieillissement.

Enfin, les résultats indiquent que la réponse des afférences métabosensibles aux injections d'AL, de KCl et à la FIE est diminuée lors du vieillissement pour les muscles *tibialis anterior* et *soleus* et que la pratique d'une activité physique ne permet pas de retrouver les valeurs obtenues sur des rats plus jeunes. Le fait que la réponse métabosensible diminue avec l'âge et que cette diminution n'est pas modifiée par l'entraînement confirme que l'augmentation de la réponse à la FIE observée lors de la 2<sup>ème</sup> étude sur la BoNT/A est bien liée à la récupération aux injections de BoNT/A.

Les travaux menés au cours de ce travail doctoral ont donc apporté des connaissances sur la compréhension de l'altération et la récupération de la réponse des afférences métabosensibles de type III et IV, ainsi que sur les afférences de plus gros diamètres impliquées dans le fonctionnement de la boucle sensorimotrice. Les résultats observés dans ces études pourraient avoir des répercussions sur le fonctionnement de toutes les structures sur lesquelles ces afférences se projettent directement et indirectement.

# Perspectives

Depuis plusieurs années, il a été montré que l'activation des afférences en provenance des muscles agonistes, antagonistes, de la peau et des articulations mais aussi des informations originaires des voies motrices descendantes est responsable de la modulation de l'excitabilité motoneuronale et/ou des mécanismes d'inhibition pré-synaptique des afférences (Iles et Pisini, 1992; Zehr, 2002; Knikou, 2008). Ainsi, les perspectives de ce travail de recherche pourront s'orienter soit vers l'étude des structures sur lesquelles ces afférences se projettent, soit vers les mécanismes intrinsèques de fonctionnement de ces afférences.

#### *Les conséquences du dysfonctionnement des afférences musculaires.*

Les afférences de type III et IV sont impliquées dans la transmission des messages nociceptifs du muscle vers le système nerveux central. Elles sont également impliquées dans les ajustements réflexes du système nerveux autonome et plus particulièrement dans les ajustements cardiovasculaires et respiratoires au cours de la contraction musculaire répétitive. Ces afférences seraient également à l'origine d'un mécanisme de protection du muscle contre la fatigue en modulant la commande motrice centrale au niveau spinal et supraspinal. Enfin, elles pourraient être impliquées dans le couplage entre la ventilation et la locomotion (Decherchi et al., 2003, 2004; Giraudin et al., 2012; Wienecke et al., 2015).

Ainsi, les changements de réponse des afférences métabosensibles lors du vieillissement ou après une paralysie provoquée par la toxine botulique pourraient avoir des conséquences non négligeables sur la douleur et sur les adaptations respiratoires, cardiovasculaires et motrices. C'est pour cette raison que dans la continuité de ce travail doctoral, il serait dans un premier temps intéressant d'étudier le fonctionnement du NTS et des centres de la douleur chez des animaux vieillissant ou traités avec la BoNT. Si l'altération de la réponse des afférences métabosensibles était responsable de l'altération des ajustements respiratoires, cardiovasculaires et moteurs, nous ne pourrions pas exclure que ces altérations contribuent aux dysfonctionnements physiologiques qui se produisent chez le sujet vieillissant. C'est pour cette raison que, dans un second temps, il sera nécessaire d'étudier les effets de différents programmes d'entraînement et/ou de traitements pharmacologiques dans l'optique de contrecarrer les altérations observées au niveau central et périphérique lors du vieillissement ou après injection de BoNT. Il serait également intéressant de vérifier s'il existe un lien entre l'absence de réponse des afférences métabosensibles et les dysfonctionnements physiologiques observés au cours du vieillissement.

### *L'excitabilité des structures de la boucle sensorimotrice.*

Les études portant sur les spasticités et les dystonies ou encore les douleurs neuropathiques pourraient répondre de phénomènes identiques qui seraient liés à des déséquilibres ioniques en  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ... (Cramer et al., 2008; Boulenguez et al., 2010; Bardoni et al., 2013; Waxman et Zamponi, 2014). Un déséquilibre ionique semble être une des causes de la dérégulation de l'expression des protéines membranaires (récepteurs, transporteurs, canaux). À son tour, l'expression des protéines membranaires semble jouer un rôle prépondérant dans le maintien de l'excitabilité neuronale. Par exemple, l'activation du récepteur NMDA diminuerait l'expression de KCC2 à la surface des neurones par l'intermédiaire d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Lee et al., 2011). Ainsi, l'activation du récepteur NMDA entraînerait indirectement une augmentation de la  $[\text{Cl}^-]_i$ , ce qui augmenterait les probabilités pour les neurones de générer un PPSE plutôt qu'un PPSI lors de l'activation du récepteur GABA-A (Coull et al., 2003). La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  jouerait donc un rôle prépondérant dans l'excitabilité des neurones car, en plus d'être déterminante dans le mécanisme d'exocytose (Lawrence et al., 2002; Grumelli et al., 2010) et de réguler indirectement l'expression de KCC2 (Lee et al., 2011), elle serait impliquée dans la potentialisation à long terme et la sensibilisation centrale (Ji et al., 2003). Il serait donc intéressant d'évaluer si l'altération du fonctionnement de la boucle-sensori-motrice (réflexivité spinale) serait dépendante de changements d'expression de protéines membranaires ou d'équilibres ioniques au niveau central. Il serait aussi intéressant d'étudier les courants entrants persistants de  $\text{Na}^+$  (PIC « *Persistent Inward Currents* ») qui semblent être déterminants lors de dépolarisations soutenues observées dans les motoneurones innervant les muscles posturaux (Bouhadfane et al., 2013).

Au niveau périphérique, la déformation mécanique du muscle et l'accumulation de métabolites dans son interstitium ont pour conséquence l'élévation de l'activité des afférences qui en retour induisent des réponses physiologiques. Par ailleurs, la transduction de la déformation mécanique ou des changements métaboliques en un signal sensoriel nerveux électrique semble être déterminante dans les réponses observées. Ainsi, afin de mieux comprendre les résultats que nous avons obtenus chez les animaux ayant reçu une injection de BoNT/A et vieillissant, il serait intéressant d'étudier la cascade d'événements qui pourrait intervenir dans les changements de sensibilité des afférences III et IV. Par exemple, si l'expression du nombre de récepteurs TRPV1 au niveau des afférences amyéliniques est diminuée par les injections de BoNT/A (Apostolidis et al., 2005), il serait intéressant d'évaluer si leur expression est rétablie en même temps que la récupération fonctionnelle. En effet, il a été montré que l'expression des récepteurs TRPV1 au

niveau périphérique était directement liée au relargage de CGRP et donc liée à l'extravasation plasmatique (Dolly et O'Connell, 2012). Pour rappel, en cas de diminution voire d'absence des mécanismes entraînant une extravasation plasmatique, il se produit une accumulation des métabolites libérés par le muscle durant l'exercice et donc une stimulation accrue des afférences métabosensibles associée à une sensibilisation des afférences mécanosensibles (Kaufman et al., 1984b). Ce phénomène pourrait diminuer la réponse des afférences de type IV tout en sensibilisant les afférences de type III, comme cela a été observé chez les sujets insuffisants cardiaques (Smith et al., 2006; Wang et al., 2010) et suggéré dans notre étude portant sur la BoNT/A. De plus, la diminution de l'expression du récepteur TRPV1 observée lors du vieillissement (Wang et al., 2006; Wang et Albers, 2009) pourrait être contrée par la pratique de l'activité physique. Dans nos études, l'entraînement sur tapis roulant n'a pas permis de contrecarrer les effets du vieillissement sur la réponse des afférences métabosensibles. Cependant, il a été montré que la pratique d'exercices physiques permettait une augmentation de la libération d'artémine ou encore de facteurs trophiques dérivés des cellules gliales (GDNF)(Detloff et al., 2014). L'artémine est un facteur trophique dont le récepteur GFR $\alpha$ 3 régule l'expression de TRPV1 sur les afférences (Orozco et al., 2001; Elitt et al., 2006) et une trop faible concentration de ce récepteur au niveau de la corne dorsale semble entraîner l'apparition de douleurs neuropathiques (Boucher et al., 2000; Gardell et al., 2003; Hao et al., 2003; Wang et al., 2003, 2008; Pezet et al., 2006; Harvey et al., 2010). Il serait donc également intéressant de déterminer quels sont les facteurs (activité physique, ...) qui régulent la libération de neurotrophines, l'expression des récepteurs présents sur les afférences musculaires, les équilibres ioniques aux niveaux périphérique et central, afin de moduler l'excitabilité/activité des afférences et donc d'agir sur le fonctionnement de la boucle sensori-motrice.



# **Bibliographie**

- Abbruzzese, G., & Berardelli, A. (2006). Neurophysiological effects of botulinum toxin type A. *Neurotox Res*, 9(2-3), 109–114.
- Akaike, N., Hirata, A., Kiyohara, T., & Oyama, Y. (1983). Neural regulation on the active sodium-potassium transport in hypokalaemic rat skeletal muscles. *J Physiol*, 341, 245–255.
- Akaike, N., Shin, M.-C., Wakita, M., Torii, Y., Harakawa, T., Ginnaga, A., Kato, K., Kaji, R., & Kozaki, S. (2013). Transsynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 4), 1031–1043.
- Alam, M., & Smirk, F. H. (1937). Observations in man upon a blood pressure raising reflex arising from the voluntary muscles. *J Physiol*, 89(4), 372–383.
- Alvarez-Leefmans, F. J., Nani, A., and Marquez, S. (1998). Chloride transport, osmotic balance, and presynaptic inhibition. In: *Presynaptic Inhibition and Neural Control*, edited by Rudomin P, Romo R, and Mendell LM. New York: Oxford, p. 225–246.
- Andersen, P., Eccles, J. C., & Sears, T. A. (1962). Presynaptic inhibitory action of cerebral cortex on the spinal cord. *Nature*, 194, 740–741.
- Andres, K. H., von Düring, M., & Schmidt, R. F. (1985). Sensory innervation of the Achilles tendon by group III and IV afferent fibers. *Anat Embryol (Berl)*, 172(2), 145–156.
- Andresen, M. C., & Kunze, D. L. (1994). Nucleus tractus solitarius-gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol*, 56, 93–116.
- Ansved, T., & Larsson, L. (1989). Effects of ageing on enzyme-histochemical, morphometrical and contractile properties of the soleus muscle in the rat. *J Neurol Sci*, 93(1), 105–124.
- Antonucci, F., Rossi, C., Gianfranceschi, L., Rossetto, O., & Caleo, M. (2008). Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci*, 28(14), 3689–3696.
- Aoki, K. R. (2005). Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology*, 26(5), 785–793.
- Aoki, K. R., & Francis, J. (2011). Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism & Related Disorders*, 17 Suppl 1, S28–S33.
- Aoki, M., Mori, S., Kawahara, K., Watanabe, H., & Ebata, N. (1980). Generation of spontaneous respiratory rhythm in high spinal cats. *Brain Res*, 202(1), 51–63.
- Apostolidis, a, Popat, R., Yiangou, Y., Cockayne, D., Ford, a P. D. W., Davis, J. B., Dasgupta, P., Fowler, C. J., Anand, P. (2005). Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity. *J Urol*, 174(3), 973–977.
- Apseloff, G., Girtten, B., Walker, M., Shepard, D. R., Krecic, M. E., Stern, L. S., & Gerber, N. (1993). Aminohydroxybutane bisphosphonate and clenbuterol prevent bone changes and retard muscle atrophy respectively in tail-suspended rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 264(3), 1071–1078.
- Arendt-Nielsen, L. (1997). Induction and assessment of experimental pain from human skin, muscle, and viscera. In: Jensen TS, Turner JA, Wiesenfeld- Hallin Z, editors. 8th World congress on pain. Seattle: IASP Press. p. 393–425.
- Arnon, S. S., Schechter, R., Inglesby, T. V, Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Swerdlow, D. L., & Tonat, K. (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, 285(8), 1059–1070.

- Bain, J. R., Mackinnon, S. E., & Hunter, D. A. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83(1), 129–138.
- Bakels, R., & Kernell, D. (1993). Matching between motoneurone and muscle unit properties in rat medial gastrocnemius. *J Physiol*, 463, 307–324.
- Bandaru, S. P., Liu, S., Waxman, S. G., & Tan, A. M. (2015). Dendritic spine dysgenesis contributes to hyperreflexia after spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology*, 113(5), 1598–1615.
- Barbeau, H., & Bedard, P. (1981). Denervation supersensitivity to 5-hydroxytryptophan in rats following spinal transection and 5,7-dihydroxytryptamine injection. *Neuropharmacology*, 20(6), 611–616.
- Bardoni, R., Takazawa, T., Tong, C. K., Choudhury, P., Scherrer, G., & Macdermott, A. B. (2013). Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Ann N Y Acad Sci*, 1279, 90–96.
- Barker, D., & Saito, M. (1981). Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 212(1188), 317–332.
- Baudry, S., & Duchateau, J. (2012). Age-related influence of vision and proprioception on Ia presynaptic inhibition in soleus muscle during upright stance. *J Physiol*, 590(Pt 21), 5541–5554.
- Baudry, S., Penzer, F., & Duchateau, J. (2014). Input-output characteristics of soleus homonymous Ia afferents and corticospinal pathways during upright standing differ between young and elderly adults. *Acta Physiol (Oxf)*, 210(3), 667–677.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2007). *Neurosciences à la découverte du cerveau*. 3ème ed: Éditions Pradel.
- Bedard, P., Barbeau, H., Barbeau, G., & Filion, M. (1979). Progressive increase of motor activity induced by 5-HTP in the rat below a complete section of the spinal cord. *Brain Res*, 169(2), 393–397.
- Berardelli, A., Day, B. L., Marsden, C. D., & Rothwell, J. C. (1987). Evidence favouring presynaptic inhibition between antagonist muscle afferents in the human forearm. *J Physiol*, 391, 71–83.
- Berecek, K. H., & Brody, M. J. (1982). Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla. *Am J Physiol*, 242(4), H593–H601.
- Bewick, G. S., & Banks, R. W. (2015). Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch*, 467(1), 175–190.
- Bewick, G. S., Reid, B., Richardson, C., & Banks, R. W. (2005). Autogenic modulation of mechanoreceptor excitability by glutamate release from synaptic-like vesicles: evidence from the rat muscle spindle primary sensory ending. *J Physiol*, 562(Pt 2), 381–394.
- Bianco, J., Gueye, Y., Marqueste, T., Alluin, O., Risso, J. J., Garcia, S., Lavault, M. N., Khrestchatisky, M., Feron, F., & Decherchi, P. (2011). Vitamin D(3) improves respiratory adjustment to fatigue and H-reflex responses in paraplegic adult rats. *Neuroscience*, 188, 182–192.
- Billante, C. R., Zealear, D. L., Billante, M., Reyes, J. H., Sant'Anna, G., Rodriguez, R., & Stone Jr., R. E. (2002). Comparison of neuromuscular blockade and recovery with botulinum toxins A and F. *Muscle Nerve*, 26(3), 395–403.
- Binder, M. D., Kroin, J. S., Moore, G. P., & Stuart, D. G. (1977). The response of Golgi tendon organs to single motor unit contractions. *J Physiol*, 271(2), 337–349.

- Binder, M. D., & Osborn, C. E. (1985). Interactions between motor units and Golgi tendon organs in the tibialis posterior muscle of the cat. *J Physiol*, 364, 199–215.
- Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (2009). Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci*, 32(1), 41–47.
- Bogdanis, G. C. (2012). Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. *Front Physiol*, 3, 142.
- Boorman, G. I., Lee, R. G., Becker, W. J., & Windhorst, U. R. (1996). Impaired “natural reciprocal inhibition” in patients with spasticity due to incomplete spinal cord injury. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 101(2), 84–92.
- Bos, R., Sadlaoud, K., Boulenguez, P., Buttigieg, D., Liabeuf, S., Brocard, C., Haase, G., Bras, H., & Vinay, L. (2013). Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(1), 348–353.
- Bosch, K. D., Bradbury, E. J., Verhaagen, J., Fawcett, J. W., & McMahon, S. B. (2012). Chondroitinase ABC promotes plasticity of spinal reflexes following peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*, 238(1), 64–78.
- Boucher, T. J., Okuse, K., Bennett, D. L., Munson, J. B., Wood, J. N., & McMahon, S. B. (2000). Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science*, 290(5489), 124–127.
- Bouhadfane, M., Tazerart, S., Moqrich, A., Vinay, L., & Brocard, F. (2013). Sodium-mediated plateau potentials in lumbar motoneurons of neonatal rats. *J Neurosci*, 33(39), 15626–15641.
- Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., Marsala, M., & Vinay, L. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 16(3), 302–307.
- Boxer, P. A., Morales, F. R., & Chase, M. H. (1988). Alterations of group Ia-motoneuron monosynaptic EPSPs in aged cats. *Exp Neurol*, 100(3), 583–595.
- Bring, D. K., Heidgren, M. L., Kreichbergs, A., & Ackermann, P. W. (2005). Increase in sensory neuropeptides surrounding the Achilles tendon in rats with adjuvant arthritis. *J Orthop Res*, 23(2), 294–301.
- Brown, A. G., & Iggo, A. (1967). A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J Physiol*, 193(3), 707–733.
- Brown, A. G., Iggo, A., & Miller, S. (1967). Myelinated afferent nerve fibers from the skin of the rabbit ear. *Exp Neurol*, 18(3), 338–349.
- Brown, M. (1989). Resistance exercise effects on aging skeletal muscle in rats. *Phys Ther*, 69(1), 46–53.
- Brown, M. C., Engberg, I., & Matthews, P. B. (1967). The relative sensitivity to vibration of muscle receptors of the cat. *J Physiol*, 192(3), 773–800.
- Brunelli, M., Castellucci, V., & Kandel, E. R. (1976). Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science*, 194(4270), 1178–1181.
- Buckwalter, J. B., & Clifford, P. S. (2001). The paradox of sympathetic vasoconstriction in exercising skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, 29(4), 159–163.
- Burgess, P. R., Wei, J. Y., Clark, F. J., & Simon, J. (1982). Signaling of kinesthetic information by peripheral sensory receptors. *Annu Rev Neurosci*, 5, 171–187.

- Burke, D., Hagbarth, K. E., Lofstedt, L., & Wallin, B. G. (1976). The responses of human muscle spindle endings to vibration of non-contracting muscles. *J Physiol*, *261*(3), 673–693.
- Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P., & Zajac 3rd, F. E. (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol*, *234*(3), 723–748.
- Burke, D. (1983) Critical examination of the case for or against fusimotor involvement in disorders of muscle tone. In: Desmedt JE, ed. *Advances in Neurology*. New York: Raven Press. p. 133-150.
- Burniston, J. G., Clark, W. A., Tan, L. B., & Goldspink, D. F. (2006). Dose-dependent separation of the hypertrophic and myotoxic effects of the beta(2)-adrenergic receptor agonist clenbuterol in rat striated muscles. *Muscle Nerve*, *33*(5), 655–663.
- Burniston, J. G., Tan, L. B., & Goldspink, D. F. (2005). beta2-Adrenergic receptor stimulation in vivo induces apoptosis in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol (1985)*, *98*(4), 1379–1386.
- Burstein, R., Dado, R. J., Cliffer, K. D., & Giesler Jr., G. J. (1991). Physiological characterization of spinohypothalamic tract neurons in the lumbar enlargement of rats. *J Neurophysiol*, *66*(1), 261–284.
- Caleo, M., & Schiavo, G. (2009). Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon*, *54*(5), 593–599.
- Capaday, C., & Stein, R. B. (1989). The effects of postsynaptic inhibition on the monosynaptic reflex of the cat at different levels of motoneuron pool activity. *Exp Brain Res*, *77*(3), 577–584.
- Carmichael, N. M., Dostrovsky, J. O., & Charlton, M. P. (2010). Peptide-mediated transdermal delivery of botulinum neurotoxin type A reduces neurogenic inflammation in the skin. *Pain*, *149*(2), 316–324.
- Caron, G., Decherchi, P., & Marqueste, T. (2015). Does metabosensitive afferent fibers activity differ from slow - and fast - twitch muscles ? *Experimental Brain Research*, *233*(9), 2549–2554.
- Caron, G., Rouzi, T., Grelot, L., Magalon, G., Marqueste, T., & Decherchi, P. (2014). Mechano- and metabosensitive alterations after injection of botulinum toxin into gastrocnemius muscle. *Journal of Neuroscience Research*, *92*(7), 904–914.
- Cartee, G. D. (1994). Aging skeletal muscle: response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, *22*, 91–120.
- Cartee, G. D., & Farrar, R. P. (1988). Exercise training induces glycogen sparing during exercise by old rats. *J Appl Physiol (1985)*, *64*(1), 259–265.
- Carter, J. R., & Ray, C. a. (2015). Sympathetic neural adaptations to exercise training in humans. *Autonomic Neuroscience*, *188*, 36–43.
- Casabona, A., Polizzi, M. C., & Perciavalle, V. (1990). Differences in H-reflex between athletes trained for explosive contractions and non-trained subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, *61*(1-2), 26–32.
- Caswell, A. H., Baker, S. P., Boyd, H., Potter, L. T., & Garcia, M. (1978). beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in transverse tubules of skeletal muscle. *J Biol Chem*, *253*(9), 3049–3054.
- Cattaert, D., Libersat, F., & El Manira, A. A. (2001). Presynaptic inhibition and antidromic spikes in primary afferents of the crayfish: a computational and experimental analysis. *J Neurosci*, *21*(3), 1007–1021.

- Ceballos, D., Cuadras, J., Verdu, E., & Navarro, X. (1999). Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat*, *195*(Pt 4), 563–576.
- Chabas, J. F., Alluin, O., Rao, G., Garcia, S., Lavaut, M. N., Risso, J. J., Legre, R., Magalon, G., Khrestchatsky, M., Marqueste, T., Decherchi, P., & Feron, F. (2008). Vitamin D2 potentiates axon regeneration. *J Neurotrauma*, *25*(10), 1247–1256.
- Chaddock, J. A., Purkiss, J. R., Alexander, F. C., Doward, S., Fooks, S. J., Friis, L. M., Hall, Y. H., Kirby, E. R., Leeds, N., Moulds, H. J., Dickenson, A., Green, G. M., Rahman, W., Suzuki, R., Duggan, M. J., Quinn, C. P., Shone, C. C., & Foster, K. A. (2004). Retargeted clostridial endopeptidases: inhibition of nociceptive neurotransmitter release in vitro, and antinociceptive activity in in vivo models of pain. *Mov Disord*, *19 Suppl 8*, S42–S47.
- Chase, M. H., Morales, F. R., Boxer, P. A., & Fung, S. J. (1985). Aging of motoneurons and synaptic processes in the cat. *Exp Neurol*, *90*(2), 471–478.
- Chiu, C. S., Weber, H., Adamski, S., Rauch, A., Gentile, M. A., Alves, S. E., Dubin, A. E., & Wilkinson, H. A. (2011). Non-invasive muscle contraction assay to study rodent models of sarcopenia. *BMC Musculoskelet Disord*, *12*, 246.
- Chopek, J. W., Sheppard, P. C., Gardiner, K., & Gardiner, P. F. (2015). Serotonin receptor and KCC2 gene expression in lumbar flexor and extensor motoneurons posttransection with and without passive cycling. *J Neurophysiol*, *113*(5), 1369–1376.
- Coote, J. H., Hilton, S. M., & Perez-Gonzalez, J. F. (1971). The reflex nature of the pressor response to muscular exercise. *J Physiol*, *215*(3), 789–804.
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., ... Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels. *Science*, *330*(6000), 55–60.
- Cote, M. P., Gandhi, S., Zambrotta, M., & Houle, J. D. (2014). Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury. *J Neurosci*, *34*(27), 8976–8987.
- Cote, M. P., & Gossard, J. P. (2003). Task-dependent presynaptic inhibition. *J Neurosci*, *23*(5), 1886–1893.
- Coull, J. a M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. a, Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, *424*(6951), 938–942.
- Craig, A. D. (2003). Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr Opin Neurobiol*, *13*(4), 500–505.
- Craig, A. D., & Kniffki, K. D. (1985). Spinothalamic lumbosacral lamina I cells responsive to skin and muscle stimulation in the cat. *J Physiol*, *365*, 197–221.
- Craig, A. D., & Mense, S. (1983). The distribution of afferent fibers from the gastrocnemius-soleus muscle in the dorsal horn of the cat, as revealed by the transport of horseradish peroxidase. *Neurosci Lett*, *41*(3), 233–238.
- Cramer, S. W., Baggott, C., Cain, J., Tilghman, J., Allcock, B., Miranpuri, G., Rajpal, S., Sun, D., & Resnick, D. (2008). The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain*, *17*(4), 36.
- Crone, C., Hultborn, H., Jespersen, B., & Nielsen, J. (1987). Reciprocal Ia inhibition between ankle flexors and extensors in man. *J Physiol*, *389*, 163–185.
- Crone, C., Petersen, N. T., Gimenez-Roldan, S., Lungholt, B., Nyborg, K., & Nielsen, J. B. (2007). Reduced reciprocal inhibition is seen only in spastic limbs in patients with neurolathyrism. *Exp Brain Res*, *181*(1), 193–197.

- Cui, M., Khanijou, S., Rubino, J., & Aoki, K. R. (2004). Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*, *107*(1-2), 125–133.
- Curra, A., Trompetto, C., Abbruzzese, G., & Berardelli, A. (2004). Central effects of botulinum toxin type A: evidence and supposition. *Mov Disord*, *19 Suppl 8*, S60–S64.
- Curtis, D. R., & Lacey, G. (1998). Prolonged GABA(B) receptor-mediated synaptic inhibition in the cat spinal cord: an in vivo study. *Exp Brain Res*, *121*(3), 319–333.
- Dampney, R. A., Horiuchi, J., Tagawa, T., Fontes, M. A., Potts, P. D., & Polson, J. W. (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand*, *177*(3), 209–218.
- Darques, J. L., Decherchi, P., & Jammes, Y. (1998). Mechanisms of fatigue-induced activation of group IV muscle afferents: the roles played by lactic acid and inflammatory mediators. *Neurosci Lett*, *257*(2), 109–112.
- Darques, J. L., & Jammes, Y. (1997). Fatigue-induced changes in group IV muscle afferent activity: differences between high- and low-frequency electrically induced fatigues. *Brain Research*, *750*(1-2), 147–154.
- David, S., & Aguayo, A. J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science*, *214*(4523), 931–933.
- David-Jurgens, M., Churs, L., Berkefeld, T., Zepka, R. F., & Dinse, H. R. (2008). Differential effects of aging on fore- and hindpaw maps of rat somatosensory cortex. *PLoS One*, *3*(10), e3399.
- De Gail, P., Lance, J. W., & Neilson, P. D. (1966). Differential effects on tonic and phasic reflex mechanisms produced by vibration of muscles in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *29*(1), 1–11.
- De Medinaceli, L., Freed, W. J., & Wyatt, R. J. (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, *77*(3), 634–643.
- De Paiva, A., Meunier, F. A., Molgo, J., Aoki, K. R., & Dolly, J. O. (1999). Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(6), 3200–3205.
- De-Doncker, L., Picquet, F., Petit, J., & Falempin, M. (2003). Characterization of spindle afferents in rat soleus muscle using ramp-and-hold and sinusoidal stretches. *J Neurophysiol*, *89*(1), 442–449.
- Decherchi, P., Darques, J. L., & Jammes, Y. (1998). Modifications of afferent activities from Tibialis anterior muscle in rat by tendon vibrations, increase of interstitial potassium or lactate concentration and electrically-induced fatigue. *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS*, *3*(4), 267–276.
- Decherchi, P., & Dousset, E. (2003). [Role of metabosensitive afferent fibers in neuromuscular adaptive mechanisms]. *Can J Neurol Sci*, *30*(2), 91–97.
- Decherchi, P., Dousset, E., & Grelot, L. (2004). [Metabolic stability and physiological adaptation of muscle under conditions of exercise]. *Rev Neurol (Paris)*, *160*(3), 297–305.
- Decherchi, P., Dousset, E., & Jammes, Y. (2007). Respiratory and cardiovascular responses evoked by tibialis anterior muscle afferent fibers in rats. *Experimental Brain Research*, *183*(3), 299–312.



- Decherchi, P., Vuillon-Cacchiutolo, G., Darques, J. L., & Jammes, Y. (2001). Changes in afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Muscle Nerve*, 24(1), 59–68.
- Delaney, E. P., Greaney, J. L., Edwards, D. G., Rose, W. C., Fadel, P. J., & Farquhar, W. B. (2010). Exaggerated sympathetic and pressor responses to handgrip exercise in older hypertensive humans: role of the muscle metaboreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(5), H1318–H1327.
- Delp, M. D., & Duan, C. (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 80(1), 261–70.
- Delpire, E., & Mount, D. B. (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol*, 64, 803–843.
- Desmedt, J. E., & Franken, L. (1958). [Experimental lesions in the brain of the cat: method and anatomic control]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 114(3-4), 487–490.
- Detloff, M. R., Smith, E. J., Quiros Molina, D., Ganzer, P. D., & Houle, J. D. (2014). Acute exercise prevents the development of neuropathic pain and the sprouting of non-peptidergic (GDNF- and artemin-responsive) c-fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 255, 38–48.
- Di Castro, A., Drew, L. J., Wood, J. N., & Cesare, P. (2006). Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(12), 4699–4704.
- Ditunno, J. F., Little, J. W., Tessler, A., & Burns, A. S. (2004). Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*, 42(7), 383–395.
- Dodd, S. L., Selsby, J., Payne, A., Judge, A., & Dott, C. (2005). Botulinum neurotoxin type A causes shifts in myosin heavy chain composition in muscle. *Toxicon*, 46(2), 196–203.
- Doherty, T. J., Vandervoort, A. A., & Brown, W. F. (1993). Effects of ageing on the motor unit: a brief review. *Can J Appl Physiol*, 18(4), 331–358.
- Dolly, J. O., & Connell, M. A. O. (2012). Neurotherapeutics to inhibit exocytosis from sensory neurons for the control of chronic pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(1), 100–108.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R., & Chapman, E. R. (2006). SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, 312(5773), 592–596.
- Dong, X. D., Mann, M. K., Sessle, B. J., Arendt-Nielsen, L., Svensson, P., & Cairns, B. E. (2006). Sensitivity of rat temporalis muscle afferent fibers to peripheral N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neuroscience*, 141(2), 939–945.
- Dousset, E., Decherchi, P., Grelot, L., & Jammes, Y. (2001). Effects of chronic hypoxemia on the afferent nerve activities from skeletal muscle. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(8 Pt 1), 1476–1480.
- Dousset, E., Marqueste, T., Decherchi, P., Jammes, Y., & Grelot, L. (2004). Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferent activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. *Journal of Neuroscience Research*, 76(5), 734–741.
- Dressler, D., & Rothwell, J. C. (2000). Electromyographic quantification of the paralyzing effect of botulinum toxin in the sternocleidomastoid muscle. *European Neurology*, 43, 13–16.
- Dressler, D., & Saberi, F. A. (2005). Botulinum toxin: Mechanisms of action. *European Neurology*, 53(1), 3–9.

- Duchateau, J., & Hainaut, K. (1990). Effects of immobilization on contractile properties, recruitment and firing rates of human motor units. *J Physiol*, *422*, 55–65.
- Duchen, L. W. (1971a). An electron microscopic study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J Neurol Sci*, *14*(1), 47–60.
- Duchen, L. W. (1971b). Changes in the electron microscopic structure of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse after the local injection of botulinum toxin. *J Neurol Sci*, *14*(1), 61–74.
- Dykes, R. W., & Craig, A. D. (1998). Control of size and excitability of mechanosensory receptive fields in dorsal column nuclei by homolateral dorsal horn neurons. *J Neurophysiol*, *80*(1), 120–129.
- Earles, D., Vardaxis, V., & Koceja, D. (2001). Regulation of motor output between young and elderly subjects. *Clinical Neurophysiology*, *112*(7), 1273–1279.
- Eccles, J. C., Eccles, R. M., & Magni, F. (1961). Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. *J Physiol*, *159*, 147–166.
- Edin, B. B., & Johansson, N. (1995). Skin strain patterns provide kinaesthetic information to the human central nervous system. *J Physiol*, *487*(Pt 1), 243–251.
- El Manira, A., Tegner, J., & Grillner, S. (1994). Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *J Neurophysiol*, *72*(4), 1852–1861.
- Eldridge, F. L., Millhorn, D. E., Kiley, J. P., & Waldrop, T. G. (1985). Stimulation by central command of locomotion, respiration and circulation during exercise. *Respir Physiol*, *59*(3), 313–337.
- Elitt, C. M., Malin, S. A., Koerber, H. R., Davis, B. M., & Albers, K. M. (2008). Overexpression of artemin in the tongue increases expression of TRPV1 and TRPA1 in trigeminal afferents and causes oral sensitivity to capsaicin and mustard oil. *Brain Res*, *1230*, 80–90.
- Enoka, R. M. (1997). Neural adaptations with chronic physical activity. *Journal of Biomechanics*, *30*(5), 447–455.
- Enoka, R. M. (2015). *Neuromechanics of human movement*. 5th ed: Human Kinetics.
- Esau, S. A., Bellemare, F., Grassino, A., Permutt, S., Roussos, C., & Pardy, R. L. (1983). Changes in relaxation rate with diaphragmatic fatigue in humans. *J Appl Physiol*, *54*(5), 1353–1360.
- Ettinger, S. M., Silber, D. H., Collins, B. G., Gray, K. S., Sutliff, G., Whisler, S. K., McClain, J. M., Smith, M. B., Yang, Q. X., & Sinoway, L. I. (1996). Influences of gender on sympathetic nerve responses to static exercise. *J Appl Physiol* (1985), *80*(1), 245–251.
- Fallon, J. B., & Macefield, V. G. (2007). Vibration sensitivity of human muscle spindles and Golgi tendon organs. *Muscle Nerve*, *36*(1), 21–29.
- Fernihough, J., Gentry, C., Bevan, S., & Winter, J. (2005). Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci Lett*, *388*(2), 75–80.
- Fetz, E. E., Jankowska, E., Johannisson, T., & Lipski, J. (1979). Autogenetic inhibition of motoneurons by impulses in group Ia muscle spindle afferents. *J Physiol*, *293*, 173–195.
- Filippi, G. M., Errico, P., Santarelli, R., Bagolini, B., & Manni, E. (1993). Botulinum A toxin effects on rat jaw muscle spindles. *Acta Otolaryngol*, *113*(3), 400–404.
- Fitts, R. H., Booth, F. W., Winder, W. W., & Holloszy, J. O. (1975). Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am J Physiol*, *228*(4), 1029–1033.

- Fitts, R. H., Metzger, J. M., Riley, D. A., & Unsworth, B. R. (1986). Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol* (1985), 60(6), 1946–1953.
- Frank K., Fuortes M.G.F., Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes, *Fed. Proc.* 16 (1957) 39–40.
- Fromm, C., Haase, J., & Wolf, E. (1977). Depression of the recurrent inhibition of extensor motoneurons by the action of group II afferents. *Brain Res*, 120(3), 459–468.
- Gackiere, F., & Vinay, L. (2014). Serotonergic modulation of post-synaptic inhibition and locomotor alternating pattern in the spinal cord. *Front Neural Circuits*, 8, 102.
- Gajdosik, R. L., Vander Linden, D. W., & Williams, A. K. (1999). Influence of age on length and passive elastic stiffness characteristics of the calf muscle-tendon unit of women. *Phys Ther*, 79(9), 827–838.
- Gandevia, S. (2001). Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiological Reviews*, 81(4), 1726–1771.
- Gandevia, S. C., McCloskey, D. I., & Burke, D. (1992). Kinaesthetic signals and muscle contraction. *Trends Neurosci*, 15(2), 62–65.
- Gao, Z., Henig, O., Kehoe, V., Sinoway, L. I., & Li, J. (2006). Vanilloid type 1 receptor and the acid-sensing ion channel mediate acid phosphate activation of muscle afferent nerves in rats. *Journal of Applied Physiology* (1985), 100(2), 421–6.
- Gao, Z., Li, J. D., Sinoway, L. I., & Li, J. (2007). Effect of muscle interstitial pH on P2X and TRPV1 receptor-mediated pressor response. *J Appl Physiol* (1985), 102(6), 2288–2293.
- Garcia-Nicas, E., Laird, J. M., & Cervero, F. (2001). Vasodilatation in hyperalgesic rat skin evoked by stimulation of afferent A beta-fibers: further evidence for a role of dorsal root reflexes in allodynia. *Pain*, 94(3), 283–291.
- Gardell, L. R., Wang, R., Ehrenfels, C., Ossipov, M. H., Rossomando, A. J., Miller, S., ... Porreca, F. (2003). Multiple actions of systemic artemin in experimental neuropathy. *Nat Med*, 9(11), 1383–1389.
- Ge, W., & Khalsa, P. S. (2003). Encoding of compressive stress during indentation by group III and IV muscle mechano-nociceptors in rat gracilis muscle. *J Neurophysiol*, 89(2), 785–792.
- Gelfi, C., Vasso, M., & Cerretelli, P. (2011). Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *J Proteomics*, 74(6), 774–795.
- Giladi, N. (1997). The mechanism of action of botulinum toxin type A in focal dystonia is most probably through its dual effect on efferent (motor) and afferent pathways at the injected site. *J Neurol Sci*, 152(2), 132–135.
- Giraudin, A., Le Bon-jégo, M., Cabirol, M., Simmers, J., & Morin, D. (2012). Spinal and Pontine Relay Pathways Mediating Respiratory Rhythm Entrainment by Limb Proprioceptive Inputs in the Neonatal Rat. *Journal of Neuroscience*, 32(34), 11841–11853.
- Goodwin, G. M., McCloskey, D. I., & Matthews, P. B. (1972). The contribution of muscle afferents to kinaesthesia shown by vibration induced illusions of movement and by the effects of paralysing joint afferents. *Brain*, 95(4), 705–748.
- Goulart, F., Valls-Sole, J., & Alvarez, R. (2000). Posture-related changes of soleus H-reflex excitability. *Muscle Nerve*, 23(6), 925–932.
- Gozariu, M., Roth, V., Keime, F., Le Bars, D., & Willer, J. C. (1998). An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Research*, 782(1-2), 343–7.

- Granit, R. (1950). Reflex self-regulation of muscle contraction and autogenetic inhibition. *J Neurophysiol*, 13(5), 351–372.
- Greaney, J. L., Schwartz, C. E., Edwards, D. G., Fadel, P. J., & Farquhar, W. B. (2013). The neural interaction between the arterial baroreflex and muscle metaboreflex is preserved in older men. *Experimental Physiology*, 98(10), 1422–31.
- Grey, M. J., Klinge, K., Crone, C., Lorentzen, J., Biering-Sorensen, F., Ravnborg, M., & Nielsen, J. B. (2008). Post-activation depression of soleus stretch reflexes in healthy and spastic humans. *Exp Brain Res*, 185(2), 189–197.
- Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(7), 573–586.
- Grumelli, C., Corradini, I., Matteoli, M., & Verderio, C. (2010). Intrinsic calcium dynamics control botulinum toxin A susceptibility in distinct neuronal populations. *Cell Calcium*, 47(5), 419–424.
- Gulve, E. A., Rodnick, K. J., Henriksen, E. J., & Holloszy, J. O. (1993). Effects of wheel running on glucose transporter (GLUT4) concentration in skeletal muscle of young adult and old rats. *Mech Ageing Dev*, 67(1-2), 187–200.
- Guttman, M. (1992). Dopamine receptors in Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 10(2), 377–386.
- Hagbarth, K. E., & Eklund, G. (1966). Tonic vibration reflexes (TVR) in spasticity. *Brain Res*, 2(2), 201–203.
- Hallett, M., Glocker, F. X., & Deuschl, G. (1994). Mechanism of action of botulinum toxin. *Ann Neurol*, 36(3), 449–450.
- Hamill, O. P., & McBride, D. W. J. (1996). The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev*, 48, 231–252.
- Hand, G. A., Kramer, G. L., Petty, F., Ordway, G. A., & Wilson, L. B. (1996). Excitatory amino acid concentrations in the spinal dorsal horn of cats during muscle contraction. *J Appl Physiol (1985)*, 81(1), 368–373.
- Hanna, R. L., Hayes, S. G., & Kaufman, M. P. (2002). alpha,beta-Methylene ATP elicits a reflex pressor response arising from muscle in decerebrate cats. *J Appl Physiol (1985)*, 93(3), 834–841.
- Hao, S., Mata, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J. C., & Fink, D. J. (2003). HSV-mediated gene transfer of the glial cell-derived neurotrophic factor provides an antiallodynic effect on neuropathic pain. *Mol Ther*, 8(3), 367–375.
- Haouzi, P., Hill, J. M., Lewis, B. K., & Kaufman, M. P. (1999). Responses of group III and IV muscle afferents to distension of the peripheral vascular bed. *J Appl Physiol (1985)*, 87(2), 545–553.
- Harkema, S. J., Hurley, S. L., Patel, U. K., Requejo, P. S., Dobkin, B. H., & Edgerton, V. R. (1997). Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping. *J Neurophysiol*, 77(2), 797–811.
- Harvey, P., Gong, B., Rossomando, A. J., & Frank, E. (2010). Topographically specific regeneration of sensory axons in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(25), 11585–11590.
- Harvey, P. J., Li, X., Li, Y., & Bennett, D. J. (2006). 5-HT<sub>2</sub> receptor activation facilitates a persistent sodium current and repetitive firing in spinal motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology*, 96(3), 1158–1170.

- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory. A Wiley book in clinical psychology*. New York,: Wiley.
- Henneman, E., & Mendell, L. M. (1981) Functional organization of moto- neurone pool and its inputs. In: Brooks VB. *Handbook of Physiology, Section I, The Nervous System, vol. II, Motor Control, Part 1*. Bethesda: American Physiological Society. p. 423-507.
- Hertel, H. C., Howaldt, B., & Mense, S. (1976). Responses of group IV and group III muscle afferents to thermal stimuli. *Brain Res, 113*(1), 201–205.
- Hill, R. (2000). NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci, 21*(7), 244–246.
- Hinkle, R. T., Hodge, K. M., Cody, D. B., Sheldon, R. J., Kobilka, B. K., & Isfort, R. J. (2002). Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve, 25*(5), 729–734.
- Hnik, P., Holas, M., Krekule, I., Kuriz, N., Mejsnar, J., Smiesko, V., Ujec, E., & Vyskocil, F. (1976). Work-induced potassium changes in skeletal muscle and effluent venous blood assessed by liquid ion-exchanger microelectrodes. *Pflugers Arch, 362*(1), 85–94.
- Hoffmann, P. (1918) Über die Beriehungen der Sehnenreflexe zur willkürlichen Bewegung und zum Tonus. *Zeitsch Biol. 68* : 351-370.
- Holdts, J. B., Fogg, S. G., & Anderson, R. L. (1990). Botulinum A toxin injection. Failures in clinical practice and a biomechanical system for the study of toxin-induced paralysis. *Ophthal Plast Reconstr Surg, 6*(4), 252–259.
- Holloszy, J. O., Chen, M., Cartee, G. D., & Young, J. C. (1991). Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing Dev, 60*(2), 199–213.
- Hott, J. S., Dalakas, M. C., Sung, C., Hallett, M., & Youle, R. J. (1998). Skeletal muscle-specific immunotoxin for the treatment of focal muscle spasm. *Neurology, 50*(2), 485–491.
- Houssiere, A., Najem, B., Pathak, A., Xhaet, O., Naeije, R., & Van De Borne, P. (2006). Chemoreflex and metaboreflex responses to static hypoxic exercise in aging humans. *Med Sci Sports Exerc, 38*(2), 305–312.
- Hruska, R. E., Kennedy, S., & Silbergeld, E. K. (1979). Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci, 25*(2), 171–179.
- Hultborn, H., Illert, M., Nielsen, J., Paul, A., Ballegaard, M., & Wiese, H. (1996). On the mechanism of the post-activation depression of the H-reflex in human subjects. *Experimental Brain Research., 108*(3), 450–462.
- Hultborn, H., Meunier, S., Morin, C., & Pierrot-Deseilligny, E. (1987). Assessing changes in presynaptic inhibition of I a fibres: a study in man and the cat. *J Physiol, 389*, 729–756.
- Hultborn, H., Meunier, S., Pierrot-Deseilligny, E., & Shindo, M. (1987). Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man. *J Physiol, 389*, 757–772.
- Hultborn, H., & Pierrot-Deseilligny, E. (1979). Changes in recurrent inhibition during voluntary soleus contractions in man studied by an H-reflex technique. *J Physiol, 297*(0), 229–251.
- Hunt, C. C., Wilkinson, R. S., & Fukami, Y. (1978). Ionic basis of the receptor potential in primary endings of mammalian muscle spindles. *J Gen Physiol, 71*(6), 683–698.
- Hursh, J. B. (1939). Conduction velocity and diameter of nerve fibres. *Am J Physiol, 127*, 131–139.
- Iellamo, F., Massaro, M., Raimondi, G., Peruzzi, G., & Legramante, J. M. (1999). Role of muscular factors in cardiorespiratory responses to static exercise: contribution of reflex mechanisms. *J Appl Physiol (1985), 86*(1), 174–180.

- Ignarro, L. J., Napoli, C., & Loscalzo, J. (2002). Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. *Circulation Research*, 90(1), 21–28.
- Iles, J. F., & Pisini, J. V. (1992). Cortical modulation of transmission in spinal reflex pathways of man. *J Physiol*, 455, 425–446.
- Immke, D. C., & McCleskey, E. W. (2001). Lactate enhances the acid-sensing Na<sup>+</sup> channel on ischemia-sensing neurons. *Nature Neuroscience*, 4(9), 869–70.
- Ishide, T., Mancini, M., Maher, T. J., Chayaikul, P., & Ally, A. (2000). Rostral ventrolateral medulla opioid receptor activation modulates glutamate release and attenuates the exercise pressor reflex. *Brain Res*, 865(2), 177–185.
- Ito, M., Sakurai, M., & Tongroach, P. (1982). Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*, 324, 113–134.
- Iwamoto, G. a, & Botterman, B. R. (1985). Peripheral factors influencing expression of pressor reflex evoked by muscular contraction. *Journal of Applied Physiology* (1985), 58(5), 1676–1682.
- Iwamoto, G. A., Botterman, B. R., & Waldrop, T. G. (1984). The exercise pressor reflex: evidence for an afferent pressor pathway outside the dorsolateral sulcus region. *Brain Res*, 292(1), 160–164.
- Iwamoto, G. A., & Kaufman, M. P. (1987). Caudal ventrolateral medullary cells responsive to muscular contraction. *J Appl Physiol* (1985), 62(1), 149–157.
- Iwamoto, G. A., Kaufmann, M. P., Botterman, B. R., & Mitchell, J. H. (1982). Effects of lateral reticular nucleus lesions on the exercise pressor reflex in cats. *Circ Res*, 51(3), 400–403.
- Jabbari, B. (2008). Botulinum neurotoxins in the treatment of refractory pain. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(12), 676–685.
- Jami, L. (1992). Golgi Tendon Organs in Mammalian Skeletal Muscle : Functional Properties and Central Actions. *Physiological Reviews*, 72(3), 623–666.
- Jammes, Y., Arbogast, S., & De Troyer, A. (2000). Response of the rabbit diaphragm to tendon vibration. *Neurosci Lett*, 290(2), 85–88.
- Jammes, Y., & Balzamo, E. (1992). Changes in afferent and efferent phrenic activities with electrically induced diaphragmatic fatigue. *J Appl Physiol*, 73(3), 894–902.
- Janssen, I., Shepard, D. S., Katzmarzyk, P. T., & Roubenoff, R. (2004). The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc*, 52(1), 80–85.
- Jarvis, S. S., VanGundy, T. B., Galbreath, M. M., Shibata, S., Okazaki, K., Reelick, M. F., Levine, B. D., & Fu, Q. (2011). Sex differences in the modulation of vasomotor sympathetic outflow during static handgrip exercise in healthy young humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(1), R193–R200.
- Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. a, & Woolf, C. J. (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences*, 26(12), 696–705.
- Jimenez, I., Rudomin, P., & Solodkin, M. (1988). PAD patterns of physiologically identified afferent fibres from the medial gastrocnemius muscle. *Exp Brain Res*, 71(3), 643–657.
- Johansson, H., Djupsjobacka, M., & Sjolander, P. (1993). Influences on the gamma-muscle spindle system from muscle afferents stimulated by KCl and lactic acid. *Neurosci Res*, 16(1), 49–57.

- Jones, P. P., Shapiro, L. F., Keisling, G. A., Jordan, J., Shannon, J. R., Quaipe, R. A., & Seals, D. R. (2001). Altered autonomic support of arterial blood pressure with age in healthy men. *Circulation*, *104*(20), 2424–2429.
- Jovanovic, K., Anastasijevic, R., & Vuco, J. (1990). Reflex effects on gamma fusimotor neurones of chemically induced discharges in small-diameter muscle afferents in decerebrate cats. *Brain Res*, *521*(1-2), 89–94.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, *413*(September), 203–210.
- Jurado, S. (2014). The dendritic SNARE fusion machinery involved in AMPARs insertion during long-term potentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(December), 1–10.
- Kamiya, A., Michikami, D., Shiozawa, T., Iwase, S., Hayano, J., Kawada, T., Sunagawa, K., & Mano, T. (2004). Bed rest attenuates sympathetic and pressor responses to isometric exercise in antigravity leg muscles in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *286*(5), R844–50.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science* (4th ed.). New York, NY ; London: McGraw-Hill.
- Kao, F. F., Michel, C. C., Mei, S. S., & Li, W. K. (1963). Somatic afferent influence on respiration. *Ann N Y Acad Sci*, *109*, 696–711.
- Katz, R. (1999). Presynaptic inhibition in humans: a comparison between normal and spastic patients. *J Physiol Paris*, *93*(4), 379–385.
- Kaufman, M. P., & Forster, H. V. (1996). *Reflexes controlling circulatory, ventilatory and airway responses to exercise*. (L. B. Rowell & J. T. Sheperd, Eds.) *Regulation and Integration of Multiples Systems*. Bethesda, MD: American Physiological Society.
- Kaufman, M. P., & Hayes, S. G. (2002). The exercise pressor reflex. *Clin Auton Res*, *12*(6), 429–439.
- Kaufman, M. P., Iwamoto, G. A., Longhurst, J. C., & Mitchell, J. H. (1982). Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with ending in skeletal muscle. *Circ Res*, *50*(1), 133–139.
- Kaufman, M. P., Longhurst, J. C., Rybicki, K. J., Wallach, J. H., & Mitchell, J. H. (1983). Effects of static muscular contraction on impulse activity of groups III and IV afferents in cats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, *55*(1 Pt 1), 105–112.
- Kaufman, M. P., & Rybicki, K. J. (1987). Discharge properties of group III and IV muscle afferents: their responses to mechanical and metabolic stimuli. *Circ Res*, *61*(4 Pt 2), I60–I65.
- Kaufman, M. P., Rybicki, K. J., Waldrop, T. G., & Mitchell, J. H. (1984). Effect on arterial pressure of rhythmically contracting the hindlimb muscles of cats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, *56*(5), 1265–1271.
- Kaufman, M. P., Waldrop, T. G., Rybicki, K. J., Ordway, G. A., & Mitchell, J. H. (1984). Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents. *Cardiovasc Res*, *18*(11), 663–668.
- Kaur, J., Spranger, M. D., Hammond, R. L., Krishnan, A. C., Alvarez, A., Augustyniak, R. A., & O’Leary, D. S. (2015). Muscle metaboreflex activation during dynamic exercise evokes epinephrine release resulting in beta2-mediated vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *308*(5), H524–H529.
- Keeble, J. E., & Brain, S. D. (2004). A role for substance P in arthritis? *Neurosci Lett*, *361*(1-3), 176–179.

- Keller, J. E. (2006). Recovery from botulinum neurotoxin poisoning in vivo. *Neuroscience*, *139*(2), 629–637.
- Kenagy, J., VanCleave, J., Pazdernik, L., & Orr, J. A. (1997). Stimulation of group III and IV afferent nerves from the hindlimb by thromboxane A<sub>2</sub>. *Brain Res*, *744*(1), 175–178.
- Kernell, D. (1979). Rhythmic properties of motoneurons innervating muscle fibres of different speed in m. gastrocnemius medialis of the cat. *Brain Res*, *160*(1), 159–162.
- Kerstein, P. C., del Camino, D., Moran, M. M., & Stucky, C. L. (2009). Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Molecular Pain*, *5*, 19.
- Khan, A., Kyle, J. W., Hanck, D. A., Lipkind, G. M., & Fozzard, H. A. (2006). Isoform-dependent interaction of voltage-gated sodium channels with protons. *J Physiol*, *576*(Pt 2), 493–501.
- Khan, A., Romantseva, L., Lam, A., Lipkind, G., & Fozzard, H. A. (2002). Role of outer ring carboxylates of the rat skeletal muscle sodium channel pore in proton block. *J Physiol*, *543*(Pt 1), 71–84.
- Khan, M., & Sinoway, M. (2000). Muscle Reflex Control of Sympathetic Nerve Activity in Heart Failure : The Role of Exercise Conditioning. *Heart Failure Reviews*, *5*(1), 87–100.
- Kido, A., Tanaka, N., & Stein, R. B. (2004). Spinal excitation and inhibition decrease as humans age. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *82*(4), 238–248.
- Kim, D. Y., Oh, B. M., & Paik, N. J. (2006). Central effect of botulinum toxin type A in humans. *Int J Neurosci*, *116*(6), 667–680.
- Kim, Y. S., Sainz, R. D., Molenaar, P., & Summers, R. J. (1991). Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem Pharmacol*, *42*(9), 1783–1789.
- Kingery, W. S., Davies, M. F., & Clark, J. D. (2003). A substance P receptor (NK1) antagonist can reverse vascular and nociceptive abnormalities in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Pain*, *104*(1-2), 75–84.
- Knikou, M. (2008). The H-reflex as a probe: pathways and pitfalls. *J Neurosci Methods*, *171*(1), 1–12.
- Koceja, D. M., Markus, C. A., & Trimble, M. H. (1995). Postural modulation of the soleus H reflex in young and old subjects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, *97*(6), 387–393.
- Koceja, D. M., & Mynark, R. G. (2000). Comparison of heteronymous monosynaptic Ia facilitation in young and elderly subjects in supine and standing positions. *Int J Neurosci*, *103*(1-4), 1–17.
- Koceja, D. M., Trimble, M. H., & Earles, D. R. (1993). Inhibition of the soleus H-reflex in standing man. *Brain Res*, *629*(1), 155–158.
- Kohn, A. F., Floeter, M. K., & Hallett, M. (1997). Presynaptic inhibition compared with homosynaptic depression as an explanation for soleus H-reflex depression in humans. *Exp Brain Res*, *116*(2), 375–380.
- Koizumi, H., Goto, S., Okita, S., Morigaki, R., Akaike, N., Torii, Y., Harakawa, T., Ginnaga, A., & Kaji, R. (2014). Spinal Central Effects of Peripherally Applied Botulinum Neurotoxin A in Comparison between Its Subtypes A1 and A2. *Front Neurol*, *5*, 98.
- Kong, X. Y., Wienecke, J., Chen, M., Hultborn, H., & Zhang, M. (2011). The time course of serotonin 2A receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, *177*, 114–126.



- Kong, X. Y., Wienecke, J., Hultborn, H., & Zhang, M. (2010). Robust upregulation of serotonin 2A receptors after chronic spinal transection of rats: an immunohistochemical study. *Brain Res*, 1320, 60–68.
- Kostyukov, A. I., Hellstrom, F., Korchak, O. E., Radovanovic, S., Ljubisavljevic, M., Windhorst, U., & Johansson, H. (2000). Fatigue effects in the cat gastrocnemius during frequency-modulated efferent stimulation. *Neuroscience*, 97(4), 789–799.
- Kozelka, J. W., & Wurster, R. D. (1985). Ascending spinal pathways for somatoautonomic reflexes in the anesthetized dog. *J Appl Physiol* (1985), 58(6), 1832–1839.
- Krogh, A., & Lindhard, J. (1913). The regulation of respiration and circulation during the initial stages of muscular work. *J Physiol*, 47(1-2), 112–136.
- Kruger, L., Silverman, J. D., Mantyh, P. W., Sternini, C., & Brecha, N. C. (1989). Peripheral patterns of calcitonin-gene-related peptide general somatic sensory innervation: cutaneous and deep terminations. *J Comp Neurol*, 280(2), 291–302.
- Kumazawa, T., & Mizumura, K. (1977). Thin-fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog. *J Physiol*, 273(1), 179–194.
- Lalli, G., Herreros, J., Osborne, S. L., Montecucco, C., Rossetto, O., & Schiavo, G. (1999). Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains. *J Cell Sci*, 112(Pt 1), 2715–2724.
- Lamotte d'Incamps, B., Destombes, J., Thiesson, D., Hellio, R., Lasserre, X., Kouchtir-Devanne, N., Jami, L., & Zytnicki, D. (1998). Indications for GABA-immunoreactive axo-axonic contacts on the intraspinal arborization of a Ib fiber in cat: a confocal microscope study. *J Neurosci*, 18(23), 10030–10036.
- Lamotte D'Incamps, B., Meunier, C., Monnet, M. L., Jami, L., & Zytnicki, D. (1998). Reduction of presynaptic action potentials by PAD: model and experimental study. *J Comput Neurosci*, 5(2), 141–156.
- Laporte, Y., & Lloyd, D. P. (1952). Nature and significance of the reflex connections established by large afferent fibers of muscular origin. *Am J Physiol*, 169(3), 609–621.
- Latash, M.L. (2002) *Bases neurophysiologiques du mouvement*. Bruxelles, De Boeck. Chap. 5 pp 51-58.
- Laurin, J., Dousset, E., & Decherchi, P. (2010). Modulation of the spinal excitability by muscle metabosensitive afferent fibers. *J Neurosci Res*, 88(12), 2755–2764.
- Laurin, J., Dousset, E., Mesure, S., & Decherchi, P. (2009). Neuromuscular recovery pattern after medial collateral ligament disruption in rats. *J Appl Physiol*, 107(1), 98–104.
- Lawrence, G. W., Foran, P., & Oliver Dolly, J. (2002). Insights into a basis for incomplete inhibition by botulinum toxin A of Ca<sup>2+</sup>-evoked exocytosis from permeabilised chromaffin cells. *Toxicology*, 181-182, 249–253.
- Le Bars, R. (1976). Le réflexe de Hoffmann chez un groupe de jeunes nageurs. *Mrd Sport* 50:221-223
- Le Bars, D., & Willer, J.-C. (2004). Physiologie de la douleur. *EMC - Anesthésie-Réanimation*, 1(4), 227–266.
- Lee, H. H. C., Deeb, T. Z., Walker, J. A., Davies, P. A., & Moss, S. J. (2011). NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor mediated currents. *Nature Neuroscience*, 29(6), 997–1003.

- Lee, J. K., Emch, G. S., Johnson, C. S., & Wrathall, J. R. (2005). Effect of spinal cord injury severity on alterations of the H-reflex. *Experimental Neurology*, *196*(2), 430–440.
- Lee, K. W., & Oh, S. J. (1994). Early appearance of aging phenomenon in the interdigital nerves of the foot. *Muscle Nerve*, *17*(1), 58–63.
- Legerlotz, K., Matthews, K., McMahon, C., & Smith, H. (2009). Botulinum toxin-induced paralysis leads to slower myosin heavy chain isoform composition and reduced titin content in juvenile rat gastrocnemius muscle. *Muscle & Nerve*, *39*(4), 472–479.
- Leis, S., Weber, M., Isselmann, A., Schmelz, M., & Bircklein, F. (2003). Substance-P-induced protein extravasation is bilaterally increased in complex regional pain syndrome. *Exp Neurol*, *183*(1), 197–204.
- Leis, S., Weber, M., Schmelz, M., & Bircklein, F. (2004). Facilitated neurogenic inflammation in unaffected limbs of patients with complex regional pain syndrome. *Neurosci Lett*, *359*(3), 163–166.
- Lexell, J. (1995). Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *50 Spec No*, 11–16.
- Lexell, J., Taylor, C. C., & Sjostrom, M. (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci*, *84*(2-3), 275–294.
- Li, J., Hand, G. A., Potts, J. T., Wilson, L. B., & Mitchell, J. H. (1997). c-Fos expression in the medulla induced by static muscle contraction in cats. *Am J Physiol*, *272*(1 Pt 2), H48–H56.
- Li, J., Maile, M. D., Sinoway, A. N., & Sinoway, L. I. (2004). Muscle pressor reflex: potential role of vanilloid type 1 receptor and acid-sensing ion channel. *J Appl Physiol* (1985), *97*(5), 1709–1714.
- Li, J., & Mitchell, J. H. (2000). c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray during static muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *279*(6), H2986–H2993.
- Li, J., & Mitchell, J. H. (2002). Role of NO in modulating neuronal activity in superficial dorsal horn of spinal cord during exercise pressor reflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(3), H1012–H1018.
- Li, Y., Gorassini, M. A., & Bennett, D. J. (2004). Role of persistent sodium and calcium currents in motoneuron firing and spasticity in chronic spinal rats. *J Neurophysiol*, *91*(2), 767–783.
- Light, A. R., Huguen, R. W., Zhang, J., Rainier, J., Liu, Z., & Lee, J. (2008). Response to: Dorsal Root Ganglion Neurons Innervating Skeletal Muscle Respond to Physiological Combinations of Protons, ATP, and Lactate Mediated by ASIC, P2X and TRPV1. *Journal of Neurophysiology*, *100*, 1184–1201.
- Light, A. R., & Perl, E. R. (1979). Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol*, *186*(2), 133–150.
- Lim, E. C., & Seet, R. C. (2010). Use of botulinum toxin in the neurology clinic. *Nat Rev Neurol*, *6*(11), 624–636.
- Lin, C. J., Chen, W., Chen, C., Lin, Y., Zimmer, A., & Chen, C. (2012). An antinociceptive role for substance P in acid-induced chronic muscle pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(2), E76–E83.
- Lin, Q., Wu, J., & Willis, W. D. (1999). Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurophysiol*, *82*(5), 2602–2611.

- Lingueglia, E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem*, 282(24), 17325–17329.
- Liu, H. M., & Zhao, H. (2010). [A comparative study of botulinum toxin A and denervation-induced masseter muscle atrophy in rabbits]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 30(10), 2380–2383.
- Liu, N., Wang, L. H., Guo, L. L., Wang, G. Q., Zhou, X. P., Jiang, Y., Shang, J. Murao, K., Chen, J. W., Fu, W. Q., & Zhang, G. X. (2013). Chronic restraint stress inhibits hair growth via substance P mediated by reactive oxygen species in mice. *PLoS One*, 8(4), e61574.
- Ljubisavljevic, M., Jovanovic, K., & Anastasijevic, R. (1994). Fusimotor responses to fatiguing muscle contractions in non-denervated hindlimb of decerebrate cats. *Neuroscience*, 61(3), 683–689.
- Lledo, P. M., Zhang, X., Sudhof, T. C., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1998). Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science*, 279(5349), 399–403.
- Lloyd, D. P., & Chang, H. T. (1948). Afferent fibers in muscle nerves. *J Neurophysiol*, 11(3), 199–207.
- Lloyd, D. P., & Wilson, V. J. (1957). Reflex depression in rhythmically active monosynaptic reflex pathways. *J Gen Physiol*, 40(3), 409–426.
- Lolignier, S., Eijkelkamp, N., & Wood, J. N. (2015). Mechanical allodynia. *European Journal of Physiology*, 133–139.
- Lomo, T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432), 617–620.
- Lømo, T. (2003a). *Nerve-muscle interactions*. (E. Stålberg, Ed.) *Clinical Neurophysiology of Disorders of Muscle and the Neuromuscular Junction in Adults and Children. IFSCN Handbook of Clinical Neurophysiology*. Amsterdam: Elsevier.
- Lømo, T. (2003b). What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers? *J Neurocytol*, 32(5-8), 835–848.
- Lopez-Guajardo, A., Sutherland, H., Jarvis, J. C., & Salmons, S. (2001). Induction of a fatigue-resistant phenotype in rabbit fast muscle by small daily amounts of stimulation. *J Appl Physiol (1985)*, 90(5), 1909–1918.
- Lucioni, A., Bales, G. T., Lotan, T. L., McGehee, D. S., Cook, S. P., & Rapp, D. E. (2008). Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int*, 101(3), 366–370.
- Ludatscher, R. M., Silbermann, M., Gershon, D., & Reznick, A. (1985). Evidence of Schwann cell degeneration in the aging mouse motor end-plate region. *Exp Gerontol*, 20(2), 81–91.
- Lundbye-Jensen, J., & Nielsen, J. (2008). Immobilization induces changes in presynaptic control of group Ia afferents in healthy humans. *The Journal of Physiology*, 586(17), 4121–4135.
- Lynch, G. S., & Ryall, J. G. (2008). Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev*, 88(2), 729–767.
- Macefield, V. G., Gandevia, S. C., Bigland-Ritchie, B., Gorman, R. B., & Burke, D. (1993). The firing rates of human motoneurons voluntarily activated in the absence of muscle afferent feedback. *J Physiol*, 471, 429–443.
- Magladery, J. W., Mc Jr., D. D., & Stoll, J. (1950). Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. II. The effects of peripheral ischemia. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 86(5), 291–312.

- Marinelli, S., Luvisetto, S., Cobianchi, S., Makuch, W., Obara, I., Mezzaroma, E., Caruso, M., Straface, E., Przewlocka, B., & Pavone, F. (2010). Botulinum neurotoxin type A counteracts neuropathic pain and facilitates functional recovery after peripheral nerve injury in animal models. *Neuroscience*, *171*(1), 316–328.
- Marion, M., Sheehy, M., Sangla, S., & Soulayrol, S. (1995). Dose standardisation of botulinum toxin. *Journal of Neurology*, *59*(1), 102–103.
- Mark, A. L., Victor, R. G., Nerhed, C., & Wallin, B. G. (1985). Microneurographic studies of the mechanisms of sympathetic nerve responses to static exercise in humans. *Circ Res*, *57*(3), 461–469.
- Markel, T. A. (2003). Aging and the Exercise Pressor Reflex in Humans. *Circulation*, *107*(5), 675–678.
- Marqueste, T., Decherchi, P., Dousset, E., Berthelin, F., & Jammes, Y. (2002). Effect of muscle electrostimulation on afferent activities from tibialis anterior muscle after nerve repair by self-anastomosis. *Neuroscience*, *113*(2), 257–71.
- Marqueste, T., Decherchi, P., Messan, F., Kipson, N., Grelot, L., & Jammes, Y. (2004). Eccentric exercise alters muscle sensory motor control through the release of inflammatory mediators. *Brain Res*, *1023*(2), 222–230.
- Marsden, C. D., Meadows, J. C., & Hodgson, H. J. (1969). Observations on the reflex response to muscle vibration in man and its voluntary control. *Brain*, *92*(4), 829–846.
- Marshall, J. F. (1982). Sensorimotor disturbances in the aging rodent. *J Gerontol*, *37*(5), 548–554.
- Martin 3rd, W. H., Murphree, S. S., & Saffitz, J. E. (1989). Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. *Circ Res*, *64*(6), 1096–1105.
- Martin, P. G., Smith, J. L., Butler, J. E., Gandevia, S. C., & Taylor, J. L. (2006). Fatigue-sensitive afferents inhibit extensor but not flexor motoneurons in humans. *J Neurosci*, *26*(18), 4796–4802.
- Martin, T. P., Edgerton, V. R., & Grindeland, R. E. (1988). Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), *65*(5), 2318–2325.
- Martin, V., Dousset, E., Laurin, J., Gondin, J., Gautier, M., & Decherchi, P. (2009). Group III and IV muscle afferent discharge patterns after repeated lengthening and shortening actions. *Muscle Nerve*, *40*(5), 827–837.
- Matak, I., Bach-Rojecky, L., Filipovic, B., & Lackovic, Z. (2011). Behavioral and immunohistochemical evidence for central antinociceptive activity of botulinum toxin A. *Neuroscience*, *186*, 201–207.
- Matak, I., & Lackovic, Z. (2014). Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*, *119-120*, 39–59.
- Matthews, D. A., Cotman, C., & Lynch, G. (1976). An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res*, *115*(1), 1–21.
- Matthews, P. B. (1981). Evolving views on the internal operation and functional role of the muscle spindle. *J Physiol*, *320*, 1–30.
- Matthews, P. B. (1986). Observations on the automatic compensation of reflex gain on varying the pre-existing level of motor discharge in man. *J Physiol*, *374*, 73–90.

- Matthews, P. B. C. (1972). *Mammalian muscle receptors and their central actions. Monographs of the Physiological Society, no. 23.* London,: Edward Arnold.
- Mazzocchio, R., & Rossi, A. (1997). Involvement of spinal recurrent inhibition in spasticity. Further insight into the regulation of Renshaw cell activity. *Brain, 120(Pt 6)*, 991–1003.
- Mazzone, S. B., & Geraghty, D. P. (1999). Altered respiratory response to substance P and reduced NK1 receptor binding in the nucleus of the solitary tract of aged rats. *Brain Res, 826(1)*, 139–142.
- McCloskey, D. I. (1978). Kinesthetic sensibility. *Physiol Rev, 58(4)*, 763–820.
- McCloskey, D. I., & Streatfeild, K. A. (1975). Muscular reflex stimuli to the cardiovascular system during isometric contractions of muscle groups of different mass. *J Physiol, 250(2)*, 431–441.
- McCloskey, D., & Mitchell, J. (1972). Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *The Journal of Physiology, 224(1)*, 173–186.
- McComas, A. J. (1996). *Skeletal muscle. Form and Function.* Champaign, Human Kinetics.
- McMahon, S. E., & McWilliam, P. N. (1992). Changes in R-R interval at the start of muscle contraction in the decerebrate cat. *J Physiol, 447*, 549–562.
- Mendelowitz, D. (1999). Advances in Parasympathetic Control of Heart Rate and Cardiac Function. *News Physiol Sci, 14*, 155–161.
- Menetrey, D., Chaouch, A., & Besson, J. M. (1980). Location and properties of dorsal horn neurons at origin of spinoreticular tract in lumbar enlargement of the rat. *J Neurophysiol, 44(5)*, 862–877.
- Meng, J., Wang, J., Lawrence, G., & Dolly, J. O. (2007). Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J Cell Sci, 120(Pt 16)*, 2864–2874.
- Mense, S. (1981). Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2. *Brain Research, 225*, 95–105.
- Mense, S. (1993). Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain, 54(3)*, 241–289.
- Mense, S. (2009). Analgesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res, 196(1)*, 89–100.
- Mense, S., & Craig Jr., A. D. (1988). Spinal and supraspinal terminations of primary afferent fibers from the gastrocnemius-soleus muscle in the cat. *Neuroscience, 26(3)*, 1023–1035.
- Mense, S., & Meyer, H. (1985). Different types of slowly conducting afferent units in cat skeletal muscle and tendon. *The Journal of Physiology, 363*, 403–417.
- Mense, S., & Prabhakar, N. R. (1986). Spinal termination of nociceptive afferent fibres from deep tissues in the cat. *Neurosci Lett, 66(2)*, 169–174.
- Mense, S., & Stahnke, M. (1983). Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat. *The Journal of Physiology, 342*, 383–397.
- Merlie, J. P., Isenberg, K. E., Russell, S. D., & Sanes, J. R. (1984). Denervation supersensitivity in skeletal muscle: analysis with a cloned cDNA probe. *J Cell Biol, 99(1 Pt 1)*, 332–335.
- Mersmann, H. J. (1998). Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci, 76(1)*, 160–172.
- Meunier, S., & Pierrot-Deseilligny, E. (1998). Cortical control of presynaptic inhibition of Ia afferents in humans. *Exp Brain Res, 119(4)*, 415–426.

- Meyer-Lohmann, J., Riebold, W., & Robrecht, D. (1974). Mechanical influence of the extrafusal muscle on the static behaviour of deafferented primary muscle spindle endings in cat. *Pflugers Arch*, 352(3), 267–278.
- Mitchell, J. H., Reardon, W. C., & McCloskey, D. I. (1977). Reflex effects on circulation and respiration from contracting skeletal muscle. *Am J Physiol*, 233(3), H374–H378.
- Mitchell JH & Schmidt RF. (1983) Cardiovascular reflex control by afferent fibers from skeletal muscle receptors. In: Handbook of Physiology, section 2, The Cardiovascular System, vol.III Peripheral Circulation and Organ Blood Flow, edited by Shepherd JT, Abboud FM and Geiger SR. Bethesda, MD, USA: American Physiological Society, p. 623-658
- Miwa, T., Miwa, Y., & Kanda, K. (1995). Dynamic and static sensitivities of muscle spindle primary endings in aged rats to ramp stretch. *Neurosci Lett*, 201(2), 8–11.
- Mizumura, K., & Kumazawa, T. (1976). Reflex respiratory response induced by chemical stimulation of muscle afferents. *Brain Res*, 109(2), 402–406.
- Mizuno, Y., Tanaka, R., & Yanagisawa, N. (1971). Reciprocal group I inhibition on triceps surae motoneurons in man. *J Neurophysiol*, 34(6), 1010–1017.
- Montecucco, C., Schiavo, G., Tugnoli, V., & de Grandis, D. (1996). Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. *Mol Med Today*, 2(10), 418–424.
- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., & Ferrer-Montiel, A. (2004). Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*, 279(24), 25665–25672.
- Morita, H., Petersen, N., Christensen, L. O., Sinkjaer, T., & Nielsen, J. (1998). Sensitivity of H-reflexes and stretch reflexes to presynaptic inhibition in humans. *J Neurophysiol*, 80(2), 610–620.
- Morita, H., Shindo, M., Yanagawa, S., Yoshida, T., Momoi, H., & Yanagisawa, N. (1995). Progressive decrease in heteronymous monosynaptic Ia facilitation with human ageing. *Exp Brain Res*, 104(1), 167–170.
- Murphy, M., & Mizuno, M. (2011). Cardiovascular regulation by skeletal muscle reflexes in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(4) H1191-H1204.
- Mynark, R. G., & Koceja, D. M. (1997). Comparison of soleus H-reflex gain from prone to standing in dancers and controls. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 105(2), 135–140.
- Mynark, R. G., & Koceja, D. M. (2002). Down training of the elderly soleus H reflex with the use of a spinally induced balance perturbation. *J Appl Physiol* (1985), 93(1), 127–133.
- Mynark, R. G., Koceja, D. M., & Lewis, C. A. (1997). Heteronymous monosynaptic Ia facilitation from supine to standing and its relationship to the soleus H-reflex. *Int J Neurosci*, 92(3-4), 171–186.
- Nair, K. S. (2009). Muscle mitochondrial changes with aging and exercise 1–4. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 467–471.
- Nakamura, Y., & Katakura, N. (1995). Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci Res*, 23(1), 1–19.
- Nakayama, H., Noda, K., Hotta, H., Ohsawa, H., & Hosoya, Y. (1998). Effects of aging on numbers, sizes and conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of the pelvic nerve in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 69(2-3), 148–155.
- Namer, B. (2010). Age related changes in human C-fiber function. *Neurosci Lett*, 470(3), 185–187.

- Ng, A. V., Callister, R., Johnson, D. G., & Seals, D. R. (1993). Age and gender influence muscle sympathetic nerve activity at rest in healthy humans. *Hypertension*, *21*(4), 498–503.
- Ng, A. V., Callister, R., Johnson, D. G., & Seals, D. R. (1994). Sympathetic neural reactivity to stress does not increase with age in healthy humans. *Am J Physiol*, *267*(1 Pt 2), H344–H353.
- Nielsen, H. M., Skalicky, M., & Viidik, A. (1998). Influence of physical exercise on aging rats. III. Life-long exercise modifies the aging changes of the mechanical properties of limb muscle tendons. *Mech Ageing Dev*, *100*(3), 243–260.
- Nielsen, J., Crone, C., & Hultborn, H. (1993). H-reflexes are smaller in dancers from The Royal Danish Ballet than in well-trained athletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, *66*(2), 116–121.
- Nielsen, J., Petersen, N., Ballegaard, M., Biering-Sorensen, F., & Kiehn, O. (1993). H-reflexes are less depressed following muscle stretch in spastic spinal cord injured patients than in healthy subjects. *Exp Brain Res*, *97*(1), 173–176.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., & Shanahan, F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, *201*(2), 167–180.
- Oda, K. (1984). Age changes of motor innervation and acetylcholine receptor distribution on human skeletal muscle fibres. *J Neurol Sci*, *66*(2-3), 327–338.
- Orozco, O. E., Walus, L., Sah, D. W., Pepinsky, R. B., & Sanicola, M. (2001). GFRalpha3 is expressed predominantly in nociceptive sensory neurons. *Eur J Neurosci*, *13*(11), 2177–2182.
- Padinjat, R., & Andrews, S. (2004). TRP channels at a glance. *Journal of Cell Science*, *117*(24), 5707–5709.
- Palmieri, R. M., Weltman, A., Edwards, J. E., Tom, J. A., Saliba, E. N., Mistry, D. J., & Ingersoll, C. D. (2005). Pre-synaptic modulation of quadriceps arthrogenic muscle inhibition. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, *13*(5), 370–376.
- Palmieri-Smith, R. M., Hopkins, J. T., & Brown, T. N. (2009). Peroneal activation deficits in persons with functional ankle instability. *Am J Sports Med*, *37*(5), 982–988.
- Pan, H. L., Stebbins, C. L., & Longhurst, J. C. (1993). Bradykinin contributes to the exercise pressor reflex: mechanism of action. *J Appl Physiol (1985)*, *75*(5), 2061–2068.
- Panneton, W. M., Gan, Q., & Juric, R. (2005). The central termination of sensory fibers from nerves to the gastrocnemius muscle of the rat. *Neuroscience*, *134*(1), 175–187.
- Pasini, E., Le Douairon Lahaye, S., Flati, V., Assanelli, D., Corsetti, G., Specca, S., Bernabei, R., Calvani, R., & Marzetti, E. (2012). Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Experimental Gerontology*, *47*(1), 23–28.
- Paterson, K., Lolignier, S., Wood, J. N., McMahon, S. B., & Bennett, D. L. H. (2014). Botulinum toxin-A treatment reduces human mechanical pain sensitivity and mechanotransduction. *Annals of Neurology*, *75*(4), 591–596.
- Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci*, *26*(4), 199–206.
- Perez-Gonzalez, J. E. (1981). Factors determining the blood pressure responses to isometric exercise. *Circ Res*, *48*(6 Pt 2), I76–86.
- Perot, C., Goubel, F., & Mora, I. (1991). Quantification of T- and H-responses before and after a period of endurance training. *European Journal of Applied Physiology*, *63*(5), 368–375.

- Person, R. J. (1989). Somatic and vagal afferent convergence on solitary tract neurons in cat: electrophysiological characteristics. *Neuroscience*, *30*(2), 283–295.
- Pertici, V., Amendola, J., Laurin, J., Gignes, D., Madaschi, L., Carelli, S., Marqueste, T., Gorio, A., & Decherchi, P. (2013). The use of poly(N-[2-hydroxypropyl]-methacrylamide) hydrogel to repair a T10 spinal cord hemisection in rat: a behavioural, electrophysiological and anatomical examination. *ASN Neuro*, *5*(2), 149–166.
- Pescatello, L. S., Franklin, B. A., Fagard, R., Farquhar, W. B., Kelley, G. A., & Ray, C. A. (2004). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*, *36*(3), 533–553.
- Petersen, N., Christensen, L. O., & Nielsen, J. (1998). The effect of transcranial magnetic stimulation on the soleus H reflex during human walking. *J Physiol*, *513* (Pt 2), 599–610.
- Petrofsky, J. S., & Lind, A. R. (1980). The blood pressure response during isometric exercise in fast and slow twitch skeletal muscle in the cat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, *44*(3), 223–230.
- Petrofsky, J. S., Phillips, C. A., Sawka, M. N., Hanpeter, D., Lind, A. R., & Stafford, D. (1981). Muscle fiber recruitment and blood pressure response to isometric exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, *50*(1), 32–37.
- Pette, D., & Vrbova, G. (1999). What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve*, *22*(6), 666–677.
- Pettorossi, V. E., Torre, G. Della, Bortolami, R., & Brunetti, O. (1999). The role of capsaicin-sensitive muscle afferents in fatigue-induced modulation of the monosynaptic reflex in the rat. *The Journal of Physiology*, *515*(2), 599–607.
- Pezet, S., Krzyzanowska, A., Wong, L. F., Grist, J., Mazarakis, N. D., Georgievska, B., & McMahon, S. B. (2006). Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF. *Mol Ther*, *13*(6), 1101–1109.
- Phadke, C. P., On, A. Y., Kirazli, Y., Ismail, F., & Boulias, C. (2013). Intrafusal effects of botulinum toxin injections for spasticity: Revisiting a previous paper. *Neuroscience Letters*, *541*, 20–23.
- Pickett, A. M., & Hambleton, P. (1994). Dose standardisation of botulinum toxin. *Lancet*, *344*(8920), 474–475.
- Piepoli, M., Clark, A. L., & Coats, A. J. (1995). Muscle metaboreceptors in hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in men. *Am J Physiol*, *269*(4 Pt 2), H1428–H1436.
- Pierrot-Deseilligny, E., & Burke, D. (2005). *The circuit of the Human Spinal Cord : Its Role in Motor Control and Movement Disorders*. New York: Cambridge University Press.
- Pierrot-Deseilligny, E., & Mazevet, D. (2000). The monosynaptic reflex: a tool to investigate motor control in humans. Interest and limits. *Neurophysiol Clin*, *30*(2), 67–80.
- Pomeranz, B., Wall, P. D., & Weber, W. V. (1968). Cord cells responding to fine myelinated afferents from viscera, muscle and skin. *J Physiol*, *199*(3), 511–532.
- Potts, J. T., Lee, S. M., & Anguelov, P. I. (2002). Tracing of projection neurons from the cervical dorsal horn to the medulla with the anterograde tracer biotinylated dextran amine. *Auton Neurosci*, *98*(1-2), 64–69.
- Price, M. P., Lewin, G. R., Mellwrath, S. L., Cheng, C., Xie, J., Heppenstall, P. A., Stucky, C. L., Mannsfeldt, A. G., Brennan, T. J., Drummond, H. A., Qiao, J., Benson, C. J., Tarr, D. E., Hrstka, R. F., Yang, B., Williamson, R. A., & Welsh, M. J. (2000). The mammalian



- sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature*, 407(6807), 1007–1011.
- Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., & Prescott, S. A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev*, 60(1), 149–170.
- Prior, B. M., Ploutz-Snyder, L. L., Cooper, T. G., & Meyer, R. A. (2001). Fiber type and metabolic dependence of T2 increases in stimulated rat muscles. *J Appl Physiol*, 90(2), 615–623.
- Priori, A., Berardelli, A., Mercuri, B., & Manfredi, M. (1995). Physiological effects produced by botulinum toxin treatment of upper limb dystonia. Changes in reciprocal inhibition between forearm muscles. *Brain*, 118(Pt 3), 801–807.
- Purkiss, J. R., Welch, M. J., Doward, S., & Foster, K. A. (1997). Capsaicin stimulates release of substance P from dorsal root ganglion neurons via two distinct mechanisms. *Biochem Soc Trans*, 25(3), 542S.
- Purkiss, J. R., Welch, M. J., Doward, S., Foster, K. A., & Quinn, C. P. (1998). A method for the measurement of [3H]-glutamate release from cultured dorsal root ganglion neurons. *Biochem Soc Trans*, 26(2), S108.
- Purkiss, J., Welch, M., Doward, S., & Foster, K. (2000). Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 59(11), 1403–6.
- Qi, J., Peters, K. W., Liu, C., Wang, J. M., Edinger, R. S., Johnson, J. P., Watkins, S. C., & Frizzell, R. A. (1999). Regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by syntaxin 1A. *J Biol Chem*, 274(43), 30345–30348.
- Ramon y Cajal, S., & May, R. M. (1928). *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford London: Oxford University Press ; Humphrey Milford.
- Ranoux, D., Gury, C., Fondarai, J., Mas, J. L., & Zuber, M. (2002). Respective potencies of Botox and Dysport: a double blind, randomised, crossover study in cervical dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72(4), 459–462.
- Rasmussen, M., Zierath, J. R., & Barres, R. (2014). Dynamic epigenetic responses to muscle contraction. *Drug Discov Today*, 19(7), 1010–1014.
- Rattigan, S., Appleby, G. J., Edwards, S. J., McKinstry, W. J., Colquhoun, E. Q., Clark, M. G., & Richter, E. A. (1986). Alpha-adrenergic receptors in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 136(3), 1071–1077.
- Reese, N. B., Skinner, R. D., Mitchell, D., Yates, C., Barnes, C. N., Kiser, T. S., & Garcia-Rill, E. (2006). Restoration of frequency-dependent depression of the H-reflex by passive exercise in spinal rats. *Spinal Cord*, 44(1), 28–34.
- Reid, M. B. (1996). Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol Sci*, 11, 114–119.
- Reinert, A., Kaske, A., & Mense, S. (1998). Inflammation-induced increase in the density of neuropeptide-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle. *Exp Brain Res*, 121(2), 174–180.
- Remy-Neris, O., Barbeau, H., Daniel, O., Boiteau, F., & Bussel, B. (1999). Effects of intrathecal clonidine injection on spinal reflexes and human locomotion in incomplete paraplegic subjects. *Exp Brain Res*, 129(3), 433–440.
- Ren, L. Q., Wienecke, J., Chen, M., Moller, M., Hultborn, H., & Zhang, M. (2013). The time course of serotonin 2C receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 236, 31–46.

- Renshaw B. (1940) Activity in the simplest spinal reflex pathways. *J Neurophysiol*, 3, 373-87.
- Rizo, J., & Sudhof, T. C. (1998). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Biol*, 5(10), 839–842.
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*, 3(8), 641–653.
- Rochcongar, P., Dassonville, J., & Le Bars, R. (1979). [Modification of the Hoffmann reflex in function of athletic training (author's transl)]. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 40(3), 165–170.
- Rogozhin, A. A., Pang, K. K., Bukharaeva, E., Young, C., & Slater, C. R. (2008). Recovery of mouse neuromuscular junctions from single and repeated injections of botulinum neurotoxin A. *J Physiol*, 586(13), 3163–3182.
- Roland, P. E., & Ladegaard-Pedersen, H. (1977). A quantitative analysis of sensations of tension and of kinaesthesia in man. Evidence for a peripherally originating muscular sense and for a sense of effort. *Brain*, 100(4), 671–692.
- Roll, J., Vedel, J., & Ribot, E. (1989). Alteration of proprioceptive messages induced by tendon vibration in man: a microneurographic study. *Experimental Brain Research*, 76(1), 213–222.
- Roos, M. R., Rice, C. L., & Vandervoort, A. A. (1997). Age-related changes in motor unit function. *Muscle Nerve*, 20(6), 679–690.
- Rosales, R. L., Arimura, K., Takenaga, S., & Osame, M. (1996). Extrafusal and intrafusal muscle effects in experimental botulinum toxin-A injection. *Muscle Nerve*, 19(4), 488–496.
- Rosales, R. L., & Dressler, D. (2010). On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur J Neurol*, 17(Suppl 1), 71–80.
- Rosant, C., Nagel, M. D., & Perot, C. (2007). Aging affects passive stiffness and spindle function of the rat soleus muscle. *Exp Gerontol*, 42(4), 301–308.
- Rosenheimer, J. L. (1985). Effects of chronic stress and exercise on age-related changes in end-plate architecture. *J Neurophysiol*, 53(6), 1582–1589.
- Rossetto, O., Morbiato, L., Caccin, P., Rigoni, M., & Montecucco, C. (2006). Presynaptic enzymatic neurotoxins. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1534–1545.
- Rossignol, S., Chau, C., Brustein, E., Giroux, N., Bouyer, L., Barbeau, H., & Reader, T. A. (1998). Pharmacological activation and modulation of the central pattern generator for locomotion in the cat. *Ann N Y Acad Sci*, 860, 346–359.
- Rotto, D. M., & Kaufman, M. P. (1988). Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol*, 64, 2306–2313.
- Rowell, L. B. (1993). *Human cardiovascular control*. New York ; Oxford: Oxford University Press.
- Rowell, S., Loring, B., & Shepherd, J. (1996). Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems. In O. U. Press (Ed.), *Handbook of Physiology* (Vol. Section 12, p. 1224p). Press Rev Ed.
- Rudomin, P. (1994). Segmental and descending control of the synaptic effectiveness of muscle afferents. *Prog Brain Res*, 100, 97–104.
- Ryall, J. G., Gregorevic, P., Plant, D. R., Sillence, M. N., & Lynch, G. S. (2002). Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283(6), R1386–94.

- Ryall, J. G., Plant, D. R., Gregorevic, P., Sillence, M. N., & Lynch, G. S. (2004). Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *J Physiol*, 555(Pt 1), 175–188.
- Rybicki, K. J., Waldrop, T. G., & Kaufman, M. P. (1985). Increasing gracilis muscle interstitial potassium concentrations stimulate group III and IV afferents. *J Appl Physiol* (1985), 58(3), 936–941.
- Saito, M., Mano, T., & Iwase, S. (1989). Sympathetic nerve activity related to local fatigue sensation during static contraction. *J Appl Physiol* (1985), 67(3), 980–984.
- Santilli, V., Frascarelli, M. A., Paoloni, M., Frascarelli, F., Camerota, F., De Natale, L., & De Santis, F. (2005). Peroneus longus muscle activation pattern during gait cycle in athletes affected by functional ankle instability: a surface electromyographic study. *Am J Sports Med*, 33(8), 1183–1187.
- Sato, A., Sato, Y., & Schmidt, R. F. (1981). Heart rate changes reflecting modifications of efferent cardiac sympathetic outflow by cutaneous and muscle afferent volleys. *J Auton Nerv Syst*, 4(3), 231–247.
- Sato, A., Sato, Y., Shimura, M., & Uchida, S. (2000). Calcitonin gene-related peptide produces skeletal muscle vasodilation following antidromic stimulation of unmyelinated afferents in the dorsal root in rats. *Neurosci Lett*, 283(2), 137–140.
- Sato, A., Sato, Y., & Suzuki, H. (1985). Aging effects on conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of peripheral nerves. *Neurosci Lett*, 53(1), 15–20.
- Sato, S., Shirato, K., Tachiyashiki, K., & Imaizumi, K. (2011). Muscle plasticity and beta(2)-adrenergic receptors: adaptive responses of beta(2)-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 729598.
- Scaglioni, G., Ferri, a, Minetti, a E., Martin, a, Van Hoecke, J., Capodaglio, P., Sartorio, A., & Narici, M. V. (2002). Plantar flexor activation capacity and H reflex in older adults: adaptations to strength training. *Journal of Applied Physiology* (1985), 92(6), 2292–302.
- Schiaffino, S., Sandri, M., & Murgia, M. (2007). Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*, 22, 269–278.
- Schieppati, M. (1987). The Hoffmann reflex: a means of assessing spinal reflex excitability and its descending control in man. *Prog Neurobiol*, 28(4), 345–376.
- Scott, A. B. (1980). Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 17(1), 21–25.
- Scott, A. B., Rosenbaum, A., & Collins, C. C. (1973). Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol*, 12(12), 924–927.
- Seals, D. R. (1989). Sympathetic neural discharge and vascular resistance during exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985), 66(5), 2472–2478.
- Seals, D. R., & Enoka, R. M. (1989). Sympathetic activation is associated with increases in EMG during fatiguing exercise. *J Appl Physiol* (1985), 66(1), 88–95.
- Sehl, M. E., & Yates, F. E. (2001). Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56(5), B198–208.
- Sharpless, S. K. (1975). *Disuse supersensitivity*. New York : Academic Press.
- Sherrington, C. S. (1906). *The integrative action of the nervous system*. New York : C. Scribner's sons.
- Shields, R. K., Dudley-Javoroski, S., & Oza, P. D. (2011). Low-frequency H-reflex depression in trained human soleus after spinal cord injury. *Neurosci Lett*, 499(2), 88–92.

- Simon, A., Shenton, F., Hunter, I., Banks, R. W., & Bewick, G. S. (2010). Amiloride-sensitive channels are a major contributor to mechanotransduction in mammalian muscle spindles. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 1), 171–185.
- Sinoway, L., Prophet, S., Gorman, I., Mosher, T., Shenberger, J., Dolecki, M., Briggs, R., & Zelis, R. (1989). Muscle acidosis during static exercise is associated with calf vasoconstriction. *J Appl Physiol* (1985), 66(1), 429–436.
- Skinner, R. D., Houle, J. D., Reese, N. B., Berry, C. L., & Garcia-Rill, E. (1996). Effects of exercise and fetal spinal cord implants on the H-reflex in chronically spinalized adult rats. *Brain Res*, 729(1), 127–131.
- Smith, E. S., Omerbasic, D., Lechner, S. G., Anirudhan, G., Lapatsina, L., & Lewin, G. R. (2011). The molecular basis of acid insensitivity in the African naked mole-rat. *Science*, 334(6062), 1557–1560.
- Smith, S. A., Downey, R. M., Williamson, J. W., & Mizuno, M. (2014). Autonomic dysfunction in muscular dystrophy: a theoretical framework for muscle reflex involvement. *Frontiers in Physiology*, 5(February), 47.
- Smith, S. A., Mitchell, J. H., & Garry, M. G. (2006). The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. *Experimental Physiology*, 91(1), 89–102.
- Smith, S. A., Mitchell, J. H., Naseem, R. H., & Garry, M. G. (2005). Mechanoreflex mediates the exaggerated exercise pressor reflex in heart failure. *Circulation*, 112(15), 2293–300.
- Smith, S. A., Leal, A. K., Williams, M. A., Murphy, M. N., Mitchell, J. H., & Garry, M. G. (2010). The TRPV1 receptor is a mediator of the exercise pressor reflex in rats. *J Physiol*, 588(Pt 7), 1179–1189.
- Spears, R., Dees, L. A., Sapozhnikov, M., Bellinger, L. L., & Hutchins, B. (2005). Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain*, 19(1), 34–40.
- Stacey, M. J. (1969). Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. *J Anat*, 105(Pt 2), 231–254.
- Stebbins, C. L., Brown, B., Levin, D., & Longhurst, J. C. (1988). Reflex effect of skeletal muscle mechanoreceptor stimulation on the cardiovascular system. *J Appl Physiol* (1985), 65(4), 1539–1547.
- Stebbins, C. L., & Longhurst, J. C. (1989). Potentiation of the exercise pressor reflex by muscle ischemia. *J Appl Physiol* (1985), 66(3), 1046–1053.
- Stebbins, C. L., Schultz, E., Smith, R. T., & Smith, E. L. (1985). Effects of chronic exercise during aging on muscle and end-plate morphology in rats. *Journal of Applied Physiology*, 58(1), 45–51.
- Sugiura, Y., Terui, N., & Hosoya, Y. (1989). Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers. *J Neurophysiol*, 62(4), 834–840.
- Svensson, P., Wang, K., Arendt-Nielsen, L., Cairns, B. E., & Sessle, B. J. (2005). Pain effects of glutamate injections into human jaw or neck muscles. *J Orofac Pain*, 19(2), 109–118.
- Swash, M., & Fox, K. P. (1972). The effect of age on human skeletal muscle. Studies of the morphology and innervation of muscle spindles. *J Neurol Sci*, 16(4), 417–432.
- Taguchi, T., & Mizumura, K. (2011). Augmented mechanical response of muscular thin-fiber receptors in aged rats recorded in vitro. *European Journal of Pain (London, England)*, 15(4), 351–358.

- Taguchi, T., Ota, H., Matsuda, T., Murase, S., & Mizumura, K. (2010). Cutaneous C-fiber nociceptor responses and nociceptive behaviors in aged Sprague-Dawley rats. *Pain*, *151*(3), 771–782.
- Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y., & Kass, D. A. (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*, *11*(2), 214–222.
- Taylor, J. L., Butler, J. E., & Gandevia, S. C. (2000). Changes in muscle afferents, motoneurons and motor drive during muscle fatigue. *Eur J Appl Physiol*, *83*(2-3), 106–115.
- Thimm, F., & Baum, K. (1987). Response of chemosensitive nerve fibers of group III and IV to metabolic changes in rat muscles. *Pflugers Arch*, *410*(1-2), 143–152.
- Thompson, F. J., Reier, P. J., Lucas, C. C., & Parmer, R. (1992). Altered patterns of reflex excitability subsequent to contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurophysiol*, *68*(5), 1473–1486.
- Tibes, U. (1977). Reflex inputs to the cardiovascular and respiratory centers from dynamically working canine muscles. Some evidence for involvement of group III or IV nerve fibers. *Circ Res*, *41*(3), 332–341.
- Tipton, C. M. (1991). Exercise, training and hypertension: an update. *Exerc Sport Sci Rev*, *19*, 447–505.
- Tischler, M. E., Henriksen, E. J., Munoz, K. A., Stump, C. S., Woodman, C. R., & Kirby, C. R. (1993). Spaceflight on STS-48 and earth-based unweighting produce similar effects on skeletal muscle of young rats. *J Appl Physiol* (1985), *74*(5), 2161–2165.
- Trompetto, C., Currà, A., Buccolieri, A., Suppa, A., Abbruzzese, G., & Berardelli, A. (2006). Botulinum toxin changes intrafusal feedback in dystonia: a study with the tonic vibration reflex. *Movement Disorders*, *21*(6), 777–782.
- Trompetto, C., Marinelli, L., Mori, L., Canneva, S., Colombano, F., Traverso, E., Curra, A., & Abbruzzese, G. (2014). The effect of age on post-activation depression of the upper limb H-reflex. *Eur J Appl Physiol*, *114*(2), 359–364.
- Vandervoort, A. A., & McComas, A. J. (1986). Contractile changes in opposing muscles of the human ankle joint with aging. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *61*(1), 361–7.
- Vandervoort, A. (2002). Aging of the human neuromuscular system. *Muscle & Nerve*, *25*(1), 17–25.
- Van Ermengem, E.P. (1897). Über einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehung zum Botulismus. *ZHyg Infektionskrankh*, *26*, 1-56 (English version: Van Ermengem, E.P. (1979). A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. *Rev Infect Dis*, *1*, 701-19).
- Varejao, A. S., Cabrita, A. M., Patricio, J. A., Bulas-Cruz, J., Gabriel, R. C., Melo-Pinto, P., Couto, P. A., & Meek, M. F. (2001). Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: gait kinematics. *Microsurgery*, *21*(8), 383–388.
- Vera-Portocarrero, L. P., & Westlund, K. N. (2004). Attenuation of nociception in a model of acute pancreatitis by an NK-1 antagonist. *Pharmacol Biochem Behav*, *77*(3), 631–640.
- Verderio, C., Grumelli, C., Raiteri, L., Coco, S., Paluzzi, S., Caccin, P., Rossetto, O., Bonanno, G., Montecucco, C., Matteoli, M. (2007). Traffic of botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic*, *8*(2), 142–153.
- Victor, R. G., Bertocci, L. a, Pryor, S. L., & Nunnally, R. L. (1988). Sympathetic nerve discharge is coupled to muscle cell pH during exercise in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *82*(4), 1301–1305.

- Victor, R. G., Rotto, D. M., Pryor, S. L., & Kaufman, M. P. (1989). Stimulation of renal sympathetic activity by static contraction: evidence for mechanoreceptor-induced reflexes from skeletal muscle. *Circ Res*, *64*(3), 592–599.
- Vilceanu, D., & Stucky, C. L. (2010). TRPA1 Mediates Mechanical currents in the plasma membrane of Mouse Sensory Neurons. *PLoS ONE*, *5*(8), 1–10.
- Vinogradova, O. L., Popov, D. V., Tarasova, O. S., Bravyi, Y. R., Missina, S. S., Bersenev, E. Y., & Borovik, A. S. (2012). Ergoreflex: The Essence and Mechanisms. *Human Physiology*, *38*, 665–674.
- Von-Düring, M., and K. H. Andres. (1990) Topography and ultrastructure of group III and IV nerve terminals of cats gastrocnemius- soleus muscle. In: *The Primary Afferent Neuron: A Survey of Recent Morpho-Functional Aspects*, edited by W. Zenker and W. L. Neuhuber. New York: Plenum, p. 35–41.
- Von Düring, M., Bauersachs, M., Bohmer, B., Veh, R. W., & Andres, K. H. (1990). Neuropeptide Y- and substance P-like immunoreactive nerve fibers in the rat dura mater encephali. *Anat Embryol (Berl)*, *182*(4), 363–373.
- Wall, P. D., & Woolf, C. J. (1984). Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. *J Physiol*, *356*, 443–458.
- Wang, H. J., Li, Y. L., Gao, L., Zucker, I. H., & Wang, W. (2010). Alteration in skeletal muscle afferents in rats with chronic heart failure. *J Physiol*, *588*(Pt 24), 5033–5047.
- Wang, H. J., Wang, W., Patel, K. P., Rozanski, G. J., & Zucker, I. H. (2013). Spinal cord GABA receptors modulate the exercise pressor reflex in decerebrate rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *305*(1), R42–49.
- Wang, R., Guo, W., Ossipov, M. H., Vanderah, T. W., Porreca, F., & Lai, J. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor normalizes neurochemical changes in injured dorsal root ganglion neurons and prevents the expression of experimental neuropathic pain. *Neuroscience*, *121*(3), 815–824.
- Wang, R., King, T., Ossipov, M. H., Rossomando, A. J., Vanderah, T. W., Harvey, P., Cariani, P., Frank, E., Sah, D. W., & Porreca, F. (2008). Persistent restoration of sensory function by immediate or delayed systemic artemin after dorsal root injury. *Nat Neurosci*, *11*(4), 488–496.
- Wang, S., & Albers, K. M. (2009). Behavioral and cellular level changes in the aging somatosensory system. *Ann N Y Acad Sci*, *1170*, 745–749.
- Wang, S., Davis, B. M., Zwick, M., Waxman, S. G., & Albers, K. (2006). Reduced thermal sensitivity and Nav1.8 and TRPV1 channel expression in sensory neurons of aged mice. *Neurobiology of Aging*, *27*(6), 895–903.
- Wang, T., Martin, S., Papadopoulos, A., Harper, C. B., Mavlyutov, T. A., Niranjana, D., Glass, N. R., Cooper-White, J. J., Sibarita, J. B., Choquet, D., Davletov, B., & Meunier, F. A. (2015). Control of autophagosome axonal retrograde flux by presynaptic activity unveiled using botulinum neurotoxin type a. *J Neurosci*, *35*(15), 6179–6194.
- Watt, D. G., Stauffer, E. K., Taylor, A., Reinking, R. M., & Stuart, D. G. (1976). Analysis of muscle receptor connections by spike-triggered averaging. 1. Spindle primary and tendon organ afferents. *J Neurophysiol*, *39*(6), 1375–1392.
- Waxman, S. G., & Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 153–63.

- Weber, M., Birklein, F., Neundorfer, B., & Schmelz, M. (2001). Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome. *Pain*, *91*(3), 251–257.
- Welch, M. J., Purkiss, J. R., & Foster, K. a. (2000). Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *38*(2), 245–58.
- Wesselmann, U. (2001). Neurogenic inflammation and chronic pelvic pain. *World J Urol*, *19*(3), 180–185.
- Wiegand, H., Erdmann, G., & Wellhoner, H. H. (1976). 125I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *292*(2), 161–165.
- Wiegand, H., & Wellhoner, H. H. (1977). The action of botulinum A neurotoxin on the inhibition by antidromic stimulation of the lumbar monosynaptic reflex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *298*(3), 235–238.
- Wienecke, J., Enriquez Denton, M., Stecina, K., Kirkwood, P. A., & Hultborn, H. (2015). Modulation of spontaneous locomotor and respiratory drives to hindlimb motoneurons temporally related to sympathetic drives as revealed by Mayer waves. *Frontiers in Neural Circuits*, *9*(February), 1–18.
- Williams, M. A., Smith, S. A., O'Brien, D. E., Mitchell, J. H., & Garry, M. G. (2008). The group IV afferent neuron expresses multiple receptor alterations in cardiomyopathic rats: evidence at the cannabinoid CB1 receptor. *J Physiol*, *586*(3), 835–845.
- Williams, R. S., Caron, M. G., & Daniel, K. (1984). Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *Am J Physiol*, *246*(2 Pt 1), E160–7.
- Williamson, J. W., Mitchell, J. H., Olesen, H. L., Raven, P. B., & Secher, N. H. (1994). Reflex increase in blood pressure induced by leg compression in man. *J Physiol*, *475*(2), 351–357.
- Williamson, L. C., & Neale, E. (1998). Syntaxin and 25-kDa synaptosomal-associated protein: differential effects of botulinum neurotoxins C1 and A on neuronal survival. *Journal of Neuroscience Research*, *52*(5), 569–583.
- Willis Jr., W. D. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*, *124*(4), 395–421.
- Wilson, L. B. (2000). Spinal modulation of the muscle pressor reflex by nitric oxide and acetylcholine. *Brain Research Bulletin*, *53*(1), 51–58.
- Wilson, L. B., Dyke, C. K., Parsons, D., Wall, P. T., Pawelczyk, J. A., Williams, R. S., & Mitchell, J. H. (1995). Effect of skeletal muscle fiber type on the pressor response evoked by static contraction in rabbits. *J Appl Physiol (1985)*, *79*(5), 1744–1752.
- Wilson, L. B., Fuchs, I. E., & Mitchell, J. H. (1993). Effects of graded muscle contractions on spinal cord substance P release, arterial blood pressure, and heart rate. *Circulation Research*, *73*(6), 1024–1031.
- Windhorst, U. (1996). On the role of recurrent inhibitory feedback in motor control. *Progress in Neurobiology*, *49*(6), 517–587.
- Wood, S. A., Gregory, J. E., & Proske, U. (1996). The influence of muscle spindle discharge on the human H reflex and the monosynaptic reflex in the cat. *J Physiol*, *497* (Pt 1), 279–290.
- Woolf, C. J., & Wall, P. D. (1986). Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci*, *6*(5), 1433–1442.

- Wu, Y., Zhao, G., Li, H., Zheng, Z., Zhong, S., Yang, Z., Feng, Z., Yang, Q., & Zhu, X. (2010). Botulinum toxin type A for the treatment of glabellar lines in Chinese: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Dermatol Surg*, 36(1), 102–108.
- Xing, J., Sinoway, L., & Li, J. (2008). Differential responses of sensory neurones innervating glycolytic and oxidative muscle to protons and capsaicin. *J Physiol*, 586(13), 3245–3252.
- Yamauchi, K., Stone, A. J., & Kaufman, M. P. (2014). Hindlimb venous distention evokes a pressor reflex in decerebrated rats. *Physiol Rep*, 2(6).
- Yu, B. P., Masoro, E. J., & McMahan, C. A. (1985). Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontol*, 40(6), 657–670.
- Yu, B. P., Masoro, E. J., Murata, I., Bertrand, H. A., & Lynd, F. T. (1982). Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J Gerontol*, 37(2), 130–141.
- Yu, X. M., & Mense, S. (1990). Somatotopical arrangement of rat spinal dorsal horn cells processing input from deep tissues. *Neurosci Lett*, 108(1-2), 43–47.
- Zehr, E. P. (2002). Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *European Journal of Applied Physiology*, 86(6), 455–468.
- Zhao, L. C., Yang, B., Wang, R., Lipton, S. A., & Zhang, D. (2010). Type C botulinum toxin causes degeneration of motoneurons in vivo. *Neuroreport*, 21(1), 14–18.