



HAL
open science

Mécanismes spinaux et supraspinaux impliqués dans le couplage entre les réseaux locomoteurs et posturaux

Lauriane Beliez

► **To cite this version:**

Lauriane Beliez. Mécanismes spinaux et supraspinaux impliqués dans le couplage entre les réseaux locomoteurs et posturaux. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0367>. <tel-01135921>

HAL Id: tel-01135921

<https://theses.hal.science/tel-01135921v1>

Submitted on 26 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Lauriane BELIEZ

**Mécanismes spinaux et supraspinaux impliqués dans le
couplage entre les réseaux locomoteurs et posturaux**

Sous la direction de : Jean-René CAZALET

Soutenue le 5 Décembre 2014

Membres du jury :

| | | |
|--------------------------|---|------------|
| M. CABELGUEN, Jean-Marie | Professeur Université de Bordeaux | Président |
| M. MELLEN, Nicholas | Professeur Université de Louisville | Rapporteur |
| M. BERANECK, Mathieu | Chargé de recherche Université de Paris | Rapporteur |
| M. YVERT, Blaise | Directeur de recherche Université de Grenoble | Examineur |

Titre : Mécanismes spinaux et supraspinaux impliqués dans le couplage entre les réseaux locomoteurs et posturaux

Résumé : Les fonctions locomotrices et posturales sont contrôlées par un ensemble de réseaux neuronaux qui doivent interagir afin de produire un comportement locomoteur optimal, adaptable aux contraintes internes et externes de l'organisme. Le maintien d'un équilibre dynamique au cours de la locomotion repose sur des processus internes de coordination entre les réseaux nerveux spinaux et supraspinaux qui commandent les différents segments du corps (membres, tête et tronc). C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés aux interactions entre la fonction locomotrice et la fonction posturale, sur des préparations réduites de tronc cérébral-moelle épinière de rats nouveau-nés, au sein desquelles les CPGs locomoteurs spinaux et les noyaux vestibulaires sont intacts. Des approches combinées électrophysiologiques, pharmacologiques, neuroanatomique et lésionnelles nous ont permis de mettre en évidence une partie des mécanismes à l'origine du couplage entre les différents réseaux neuronaux étudiés. Dans cette étude nous avons montré que les réseaux locomoteurs lombaires contrôlent l'activité des réseaux thoraciques axiaux, de manière à produire une activation coordonnée des réseaux moteurs des membres et du tronc. Cette coordination est sous influence des entrées supraspinales. Les amines induisent une organisation temporelle spécifique de l'activité des réseaux thoraco-lombosacrés, et les informations en provenance des noyaux vestibulaires influencent le rythme locomoteur. Ces données apportent des éléments nouveaux concernant les processus neuronaux à l'origine de la coordination des réseaux moteurs et posturaux.

Mots clés : tronc cérébral- moelle épinière, réseaux de neurones, locomotion, posture

Title : Spinal and supraspinal mechanisms involved in the coupling between locomotor and postural networks

Abstract : Locomotor and postural functions are controlled by a set of neural networks that must interact to produce optimal locomotor behavior, adaptable to internal and external constraints of the body. Maintaining a dynamic balance during locomotion is based on internal coordination processes between spinal and supraspinal neuronal networks controlling different parts of the body (limbs, head and trunk). In this context, we have interested in the interactions between locomotor and postural functions, in spinal and supraspinal networks. The experiments were conducted on isolated brainstem-spinal cord preparations from neonatal rats, in which the spinal locomotor CPGs and the vestibular nuclei are intact. Electrophysiological, pharmacological, and neuroanatomical approaches allowed us to highlight some of the mechanisms involved in the coupling of the different neural networks. In this study we showed that the lumbar locomotor networks control the activity of axial thoracic networks, in order to produce a coordinated activation of motors

networks of limbs and trunk. This coordination is modulated by amines and information from the vestibular nuclei. These data provide new evidence for spinal mechanisms involved in the coordination of motor and postural networks.

Keywords : brainstem- spinal cord, neuronal networks, locomotion, posture

Unité de recherche

[CNRS Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR 5287,
146 rue Léo Saignat, Zone nord Bat 2 2ème étage, 33 076 Bordeaux Cedex]

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Abréviations | 8 |
| Problématique et présentation du mémoire | 9 |
| Introduction générale..... | 11 |
| I- La locomotion | 12 |
| A) Le cycle locomoteur | 12 |
| B) Le tronc et la locomotion | 14 |
| II- Contrôle neuronal de la locomotion. | 18 |
| A) Organisation centrale et périphérique de la locomotion : | 18 |
| a- L'étage supraspinal | 19 |
| b- L'étage spinal | 20 |
| c- Régulation de l'activité locomotrice | 20 |
| B) Organisation des réseaux locomoteurs de la moelle épinière | 23 |
| a- Localisation des CPGs de la marche..... | 24 |
| b- Fonctionnement du CPG..... | 25 |
| c- Dissection génétique du CPG..... | 26 |
| d- Motoneurones et propriétés membranaires impliquées dans la régulation du cycle locomoteur..... | 30 |
| III- Neuromodulation | 33 |
| A) Les acides aminés excitateurs..... | 34 |
| B) Les acides aminés inhibiteurs : GABA et Glycine..... | 36 |
| C) La sérotonine (5HT) | 37 |
| D) La noradrénaline (NA) | 40 |
| E) La dopamine (DA)..... | 41 |
| IV- Le contrôle postural | 43 |
| A) Structures impliquées dans le contrôle postural | 43 |
| a- Mécanismes supraspinaux | 43 |
| b- Mécanismes spinaux | 46 |
| B) Les ajustements posturaux..... | 47 |
| a- Contrôle postural chez la lamproie | 48 |
| b- Contrôle postural chez les quadrupèdes en station debout | 49 |
| c- Contrôle postural chez les quadrupèdes au cours de la locomotion..... | 51 |
| d- Contrôle postural chez l'homme..... | 52 |
| Objectifs de la thèse | 54 |
| Matériels et Méthodes..... | 56 |
| I- La préparation de moelle épinière isolée <i>in vitro</i> | 57 |
| A) Animaux..... | 58 |
| B) Préparations isolées <i>in vitro</i> | 58 |
| II- L'initiation de la locomotion..... | 59 |
| A) Par pharmacologie | 59 |
| B) Par stimulations électriques | 60 |
| C) Milieux modifiées..... | 60 |
| D) Barrières et sections | 60 |
| III- Électrophysiologie | 61 |
| A) Enregistrement extracellulaire | 61 |
| B) Enregistrement intracellulaire des motoneurones:..... | 61 |
| IV- Traitement des données | 62 |
| A) Acquisition et analyses | 62 |
| B) Statistiques | 64 |

| | |
|--|-----------|
| V- Les techniques neuroanatomiques | 65 |
| A) Marquages par un traceur rétrograde..... | 65 |
| B) Marquages cholinergiques | 65 |
| Résultats..... | 66 |
| Chapitre 1..... | 67 |
| <i>Origine de l'activité des réseaux thoraciques spinaux au cours de la locomotion.</i> | 67 |
| Introduction | 67 |
| Matériels et Méthodes..... | 68 |
| Résultats | 69 |
| A) Coordination du patron d'activité thoraco-lombaire lors de la locomotion fictive | 69 |
| B) Capacités rythmogènes conditionnelles des segments thoraciques spinaux isolés..... | 70 |
| C) Localisation des motoneurones thoraciques innervant les muscles du dos..... | 74 |
| D) Motoneurones corrélés à l'activité locomotrice lombaire et motoneurones non-corrélés. | 74 |
| E) Contrôle synaptique des motoneurones thoraciques..... | 77 |
| F) Commande monosynaptique des motoneurones thoraciques par le réseau locomoteur lombaire.... | 78 |
| Discussion | 79 |
| A) Organisation caudo-raustral des bouffées thoraciques axiales au cours de la locomotion. | 79 |
| B) Le réseau locomoteur lombaire contrôle l'activité locomotrice thoracique..... | 80 |
| C) Le contrôle locomoteur des motoneurones thoraciques. | 81 |
| Chapitre 2..... | 83 |
| <i>Modulation monoaminergique de l'activité des réseaux spinaux posturo-locomoteurs.</i> | 83 |
| Introduction | 83 |
| Matériels et Méthodes..... | 84 |
| Résultats | 85 |
| A) Modulation du rythme lombaire par les amines..... | 85 |
| B) Effets des amines sur les réseaux axiaux..... | 86 |
| C) Modulation de l'organisation temporelle de l'activité motrice..... | 88 |
| D) Effets de combinaisons multiples d'amines sur le rythme locomoteur. | 89 |
| Discussion | 90 |
| A) Effet des amines sur le rythme moteur et sa stabilité..... | 90 |
| B) Effets au niveau cellulaire des neuromodulateurs..... | 92 |
| C) La modulation aminergique des relations de phases lombaires. | 93 |
| D) La modulation aminergique des relations de phases axiales. | 94 |
| Chapitre 3..... | 96 |
| <i>Influence des noyaux vestibulaires sur les réseaux moteurs spinaux.....</i> | 96 |
| Introduction | 96 |
| Matériels et méthodes | 97 |
| Résultats | 98 |
| A) Réponses motrices à une stimulation vestibulaire, en condition contrôle..... | 98 |
| B) Plasticité des voies vestibulospinales. | 101 |
| C) Influence des noyaux vestibulaires au cours de la locomotion. | 102 |
| Discussion | 104 |
| A) Réponses motrices à une stimulation du nerf VIII | 104 |
| B) Réponses des motoneurones à une stimulation vestibulaire. | 105 |
| C) Importance des segments thoraciques dans la réponse vestibulaire..... | 107 |

| | |
|--|------------|
| A) Deux réseaux indépendants mais coordonnés..... | 110 |
| B) Mécanismes sous-tendant le couplage de diverses fonctions motrices..... | 112 |
| C) Conséquences physiopathologiques..... | 115 |
| E) Perspectives..... | 118 |
| <i>Bibliographie</i> | 120 |
| <i>Annexes</i> | 147 |

Sommaire des figures

Introduction générale

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Les différentes phases du cycle locomoteur chez le chat..... | 13 |
| Figure 2 : Le système locomoteur au cours de l'évolution..... | 14 |
| Figure 3 : Organisation des structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la locomotion..... | 18 |
| Figure 4 : Réseaux locomoteurs supraspinaux..... | 19 |
| Figure 5 : Localisation des réseaux lombaires spinaux..... | 24 |
| Figure 6 : Les facteurs de transcription déterminent l'identité des cellules spinales ventrales..... | 26 |
| Figure 7 : Les acides aminés..... | 34 |
| Figure 8 : La sérotonine..... | 38 |
| Figure 9 : La noradrénaline..... | 40 |
| Figure 10 : La dopamine..... | 41 |
| Figure 11 : Le système vestibulaire..... | 46 |
| Figure 12 : Contrôle de l'équilibre chez la lamproie..... | 48 |
| Figure 13 : Contrôle de l'équilibre chez le chat..... | 49 |
| Figure 14 : Organisation fonctionnelle du contrôle posturale chez les quadrupèdes..... | 51 |
| Figure 15 : Représentation schématique du dispositif expérimental..... | 61 |

Résultats

Chapitre 1

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Les bouffées d'activités motrices thoraco-lombaire sont coordonnées au cours de la locomotion fictive..... | 69 |
| Figure 2 : Capacités rythmogènes conditionnelles de la moelle épinière thoracique..... | 70 |
| Figure 3 : Modulation de l'activité locomotrice par les réseaux thoraciques spinaux..... | 71 |
| Figure 4 : Couplage entre l'activité locomotrice lombaire et les bouffées motrices enregistrées dans les segments thoraciques distaux..... | 72 |
| Figure 5 : Importance des connexions commissurales dans le couplage des activités motrices thoraco-lombaires..... | 73 |
| Figure 6 : Localisation intracellulaire et enregistrement de la population de motoneurons axiaux dans la moelle épinière thoracique. | 74 |
| Figure 7 : Deux populations de motoneurons thoraciques sont révélées lors d'épisodes de locomotion fictive. | 75 |
| Figure 8 : L'activation pharmacologique des réseaux locomoteurs lombaires déclenche des oscillations du potentiel de membrane dans certains motoneurons thoraciques..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Figure 9 : Activation électrique des réseaux locomoteurs lombaires déclenche des oscillations du potentiel de membrane dans certains motoneurons lombaires..... | 77 |
| Figure 10 : Commande synaptique locomotrice biphasique arrivant sur les motoneurons thoraciques entraînés par la locomotion. | 78 |
| Figure 11 : Transmission de la commande synaptique du réseau locomoteur lombaire aux motoneurons thoraciques..... | 79 |
| Figure 12 : Schéma résumant les relations entre le réseau locomoteur lombaire et les réseaux thoraciques. | 80 |

Chapitre 2

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Comparaison de l'activation du réseau locomoteur lombaire in vitro par les amines 5HT, ou DA ou NA. | 86 |
| Figure 2 : Comparaison de l'activation du réseau locomoteur axial in vitro par les amines 5HT, ou DA ou NA..... | 87 |
| Figure 3 : Contrôle des relations de phase par la 5HT, DA, ou NA..... | 89 |
| Figure 4 : Comparaison de l'activation du réseau locomoteur in vitro par diverses combinaisons de NMA et 5HT / DA / NA..... | 90 |
| Figure 5 : Contrôle des relations de phase par diverses combinaisons de NMA et 5HT / DA / NA..... | 91 |

Chapitre 3

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Activité spinale en réponse a une simulation du nerf vestibulaire..... | 99 |
| Figure 2 : Caractérisation des voies vestibulospinales..... | 100 |
| Figure 3 : Caractérisation de la réponse intracellulaire des motoneurons lombaires en réponse à une stimulation vestibulaire..... | 101 |
| Figure 4 : Plasticité dépendante de la fréquence de stimulation des afférences vestibulaires aux synapses des motoneurons lombaires ipsilatéraux. | 102 |
| Figure 5 : Réinitialisation de la locomotion. | 103 |
| Figure 6 : Effet d'une stimulation des noyaux vestibulaires sur la locomotion..... | 104 |
| Figure 7 : Schéma récapitulatif des connexions vestibulospinales..... | 105 |

Discussion

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Représentation schématique des voies de projections impliquées dans le couplage des réseaux thoraciques et lombaires, et des voies vestibulospinales..... | 111 |
| Figure 2 : Contrôle de l'activité des nerfs moteurs extraoculaires par la moelle épinière, chez le Xénope. | 115 |

Abréviations

5HT : sérotonine

AAE : acides aminés excitateurs

AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

AHP : after-hyperpolarisation

APV : 2-amino-5-phosphonopentanoic acid

Ca²⁺ : calcium

ChAT : Choline-Acetyl-Transferase

CPG : générateur central de patron

DA : dopamine

DNQX : 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione

DSCT : tractus spinocérébelleux dorsal

EMG : electromyogramme

GABA : acide gamma-aminobutyrique

K⁺ : potassium

KO : Knock out

L : lombaire

Mg²⁺ : magnésium

MLR : région locomotrice mésentérique

MN : motoneurone

NA : noradrénaline

NMDA : N-méthyl-D aspartate

NMA : N-méthyl-D,L aspartate

PIC : persitant inward current (courant persistant entrant)

PA : potentiel d'action

P : postnatal

PBS : tampon phosphate salin

PPSE/PPSI : potentiel postsynaptique excitateur/ inhibiteur

RS : cellule réticulospinale

SNr : substance noire réticulée

T : thoracique

TTX : tétrodotoxine

VSCT : tractus spinocérébelleux ventral

Problématique et présentation du mémoire

La locomotion est une fonction vitale pour un individu, qui lui permet de se déplacer dans son environnement. C'est un acte moteur complexe, impliquant la coordination des différents segments du corps : la tête, le tronc et les membres. Un mouvement locomoteur efficace nécessite des interactions entre les fonctions locomotrices et posturales. Le système locomoteur proprement dit produit les mouvements propulseurs, comme le mouvement des membres quadrupèdes ou bipèdes. Le système postural maintient une orientation du corps appropriée durant la locomotion. Le maintien d'un équilibre dynamique durant la propulsion vers l'avant repose sur des processus internes de coordination entre les réseaux nerveux spinaux et supraspinaux qui commandent les différents segments du corps. Mais si à ce jour la locomotion et la posture sont bien étudiées séparément, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes neuronaux sous-tendant leur couplage. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés aux interactions entre la fonction locomotrice et la fonction posturale au sein des réseaux spinaux et supraspinaux. Dans la mesure où les bipèdes et les quadrupèdes présentent une organisation relativement similaire de leurs appareils locomoteurs et posturaux, les expériences ont été menées chez un Vertébré supérieur, le rat nouveau-né. Ce modèle autorise des études sur des préparations réduites de système nerveux central, permettant des approches combinées électrophysiologiques, pharmacologiques, neuroanatomiques et lésionnelles.

Ce manuscrit sera subdivisé en six parties. La **première partie** de ce manuscrit est une introduction théorique articulée autour de quatre chapitres qui se proposent de situer l'ensemble de notre problématique parmi les données les plus récentes de la littérature. Le premier chapitre présente un bref rappel des principes fondamentaux définissant la locomotion ainsi que le rôle locomoteur du tronc au cours de l'évolution. L'organisation des différents réseaux neuronaux supraspinaux, spinaux et périphériques contrôlant la locomotion a été décrite dans le deuxième chapitre, où nous nous sommes focalisés sur les données récentes obtenues chez les mammifères. Dans un troisième temps, nous avons décrit la modulation des réseaux spinaux locomoteurs par les acides aminés excitateurs et inhibiteurs, ainsi que par les amines. Finalement, dans le dernier chapitre introductif, une

description des boucles de contrôle postural a été réalisée chez différentes espèces, de la lamproie à l'homme.

La **deuxième partie** de ce manuscrit présente les différentes méthodologies employées dans l'ensemble de mes travaux. Cette étude reposant uniquement sur des préparations réduites et isolées *in vitro*, une brève description des avantages et des inconvénients de cette préparation sera réalisée.

La **troisième partie** est consacrée à la présentation des résultats, scindée en trois chapitres indépendants. Les données expérimentales seront introduites et discutées individuellement dans chaque chapitre. Nous étudierons dans un premier temps les mécanismes cellulaires sous-tendant le contrôle des segments thoraciques spinaux au cours de la locomotion. Puis dans un second temps, la modulation des activités locomotrices axiales et des membres par les amines sera présentée. Enfin, l'étude de l'influence des noyaux vestibulaires sur les réseaux spinaux en condition de repos et au cours de la locomotion sera abordée.

Les deux dernières parties seront consacrées respectivement à la **discussion générale**, qui portera en particulier sur l'intégration de l'ensemble des informations locomotrices et posturales au sein des réseaux spinaux et supraspinaux, et aux **perspectives expérimentales** de ce travail doctoral.

En annexes, les papiers publiés de ce travail de thèse seront présentés.

Introduction générale

I- La locomotion

A) Le cycle locomoteur

La locomotion est l'acte moteur qui permet aux animaux de se déplacer à travers leur environnement. Elle est essentielle pour la survie des espèces en permettant aux individus de trouver de la nourriture, d'échapper au danger, de se reproduire.

La locomotion est une activité motrice rythmique qui implique des séquences d'activités des muscles des membres et du corps suivant un rythme et un patron précis, au contraire des réflexes qui sont des réponses stéréotypées à une stimulation sensorielle. Bien que la locomotion soit capable de maturation et d'adaptation tout au long de la vie d'un individu, c'est un comportement inné qui chez les vertébrés, incluant l'homme, est programmé au sein du système nerveux avant la naissance, mais qui n'est souvent exécuté qu'après une maturation des organes effecteurs et de l'activité posturale.

Au cours de l'évolution chez les vertébrés sont apparus de nouveaux modes de locomotion liés au développement du système appendiculaire. Ils se déclinent de la nage à la bipédie, changeant fondamentalement la fonction de certaines structures (le tronc ou les membres antérieurs). Lors du passage à la bipédie, qui a permis d'étendre le rôle des membres antérieurs à des activités de manipulation, la locomotion est devenue une tâche de plus en plus complexe, nécessitant un maintien de l'équilibre en posture érigée. Malgré cette grande diversité de comportements, l'étude de la locomotion chez de nombreux modèles animaux a montré que les principales caractéristiques du cycle locomoteur sont communes à l'ensemble des espèces (Rossignol, 1996; Duysens & Van de Crommert, 1998). La première description précise de la locomotion est venue avec l'apparition de la chronophotographie développée en 1880 par Etienne-Jules Marey et Eadweard Muybridge, qui permit la capture d'instantanés des différents moments du mouvement locomoteur chez l'animal et l'homme. Ces suites de séquences photographiques permirent de décomposer en détail le patron moteur.

La locomotion est caractérisée par une succession de cycles de flexion et d'extension des membres permettant une alternance entre les phases de transferts et les phases d'appuis, assurant ainsi la propulsion de l'animal (Philippon, 1905). La **phase de transfert**, qui correspond à la réalisation d'un pas, débute lorsque le membre quitte le sol et se

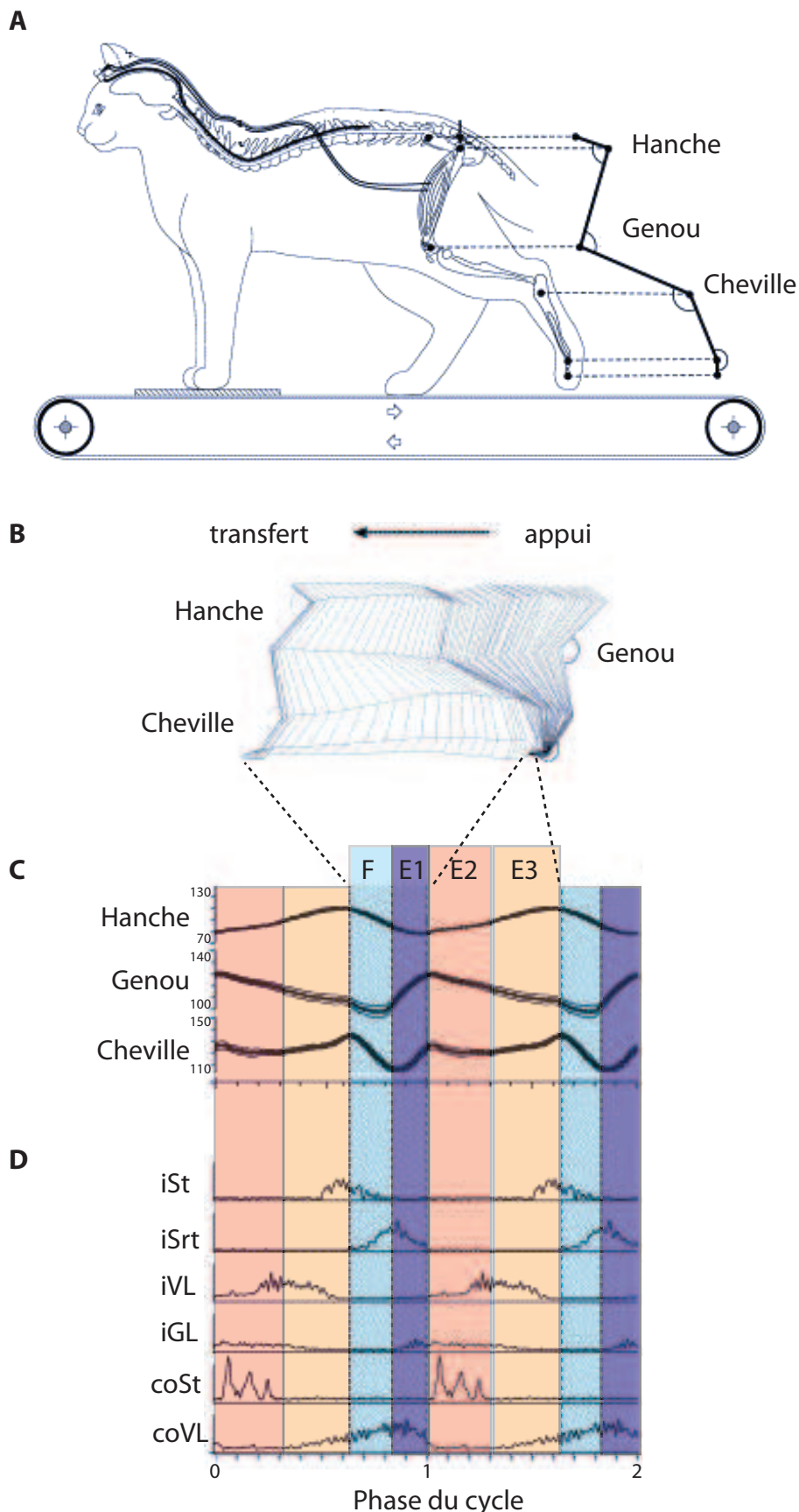


Figure 1 : Les différentes phases du cycle locomoteur chez le chat.

(A) Représentation schématique du modèle expérimental. (B) Variations des angles articulaires de la hanche, du genou et de la cheville au cours d'une phase de transfert et d'une phase d'appui. (C) Moyenne des variations angulaires observées sur les différentes articulations du membre postérieur lors de 10 cycles locomoteurs. La phase de transfert et la phase d'appui sont divisées en deux : F et E1; E2 et E3 respectivement. (D) Enregistrements EMGs des muscles de la cheville et de la hanche, rectifiés et moyennés de 9 cycles. Le cycle est normalisé et répété deux fois. (modifié d'après Rossignol, 2004)

termine au moment de son contact avec le sol (Fig. 1). Cette phase est divisée en deux parties (F et E1). F se caractérise par une flexion de toutes les articulations (cheville, genou et hanche), tandis que la phase E1 débute par une extension précoce du genou et de la cheville jusqu'au contact du membre avec le sol. Au cours de la **phase d'appui**, le membre repose sur le sol et l'ensemble du corps travaille à la propulsion vers l'avant. Les muscles les plus sollicités au cours de cette phase sont les muscles extenseurs, également appelés muscles antigravitaires. Cette phase est aussi divisée en deux périodes : E2 qui correspond à la durée pendant laquelle le membre supporte en partie le poids du corps, et E3 qui est définie comme la phase de propulsion au cours de laquelle toutes les articulations entrent en extension (Rossignol, 1996). La proportion de chaque phase dans le cycle est modifiée en fonction de la vitesse de marche. Ainsi, pour des vitesses de déplacement relativement lentes, la phase d'appui occupe la majeure partie du cycle. Lors d'une augmentation de la vitesse, la durée de la phase d'appui diminue et plus particulièrement la phase E3, tandis que la durée de la phase de transfert varie très peu.

Cette description du cycle locomoteur est basée sur les mouvements et le déplacement d'un membre donné. Cependant, une locomotion réelle et efficace requiert une coordination très étroite entre les membres et met en jeu de manière extrêmement complexe un nombre élevé de muscles synergistes et antagonistes. Les données de la cinématique, couplées aux enregistrements électromyographiques ont permis d'enrichir le patron locomoteur en caractérisant diverses allures locomotrices.

Une allure se définit par la séquence des différents temps d'appui sur le sol de chaque membre de l'animal (Abourachid, 2003). Il est important de noter que la vitesse de déplacement d'un animal peut varier dans une certaine gamme sans modifications de l'allure en augmentant simplement la fréquence ou la longueur des pas. Cependant, il existe certains « points de rupture ». Chez le chat, la marche laisse place au trot lorsque la vitesse de déplacement dépasse 0,7 mètre par seconde, puis au galop lorsque la vitesse atteint 2,7 mètres par seconde (Goslow *et al.*, 1973). D'une manière générale, les coordinations interappendiculaires sont totalement reconfigurées lors de ces changements d'allure, s'appuyant sur une modification drastique à la fois du patron de contraction des muscles fléchisseurs et extenseurs, et de la dynamique des articulations. Les relations de phases entre les membres sont décrites en prenant un membre de référence qui permet de normaliser le cycle locomoteur. Au cours d'épisodes de marche par exemple, les membres

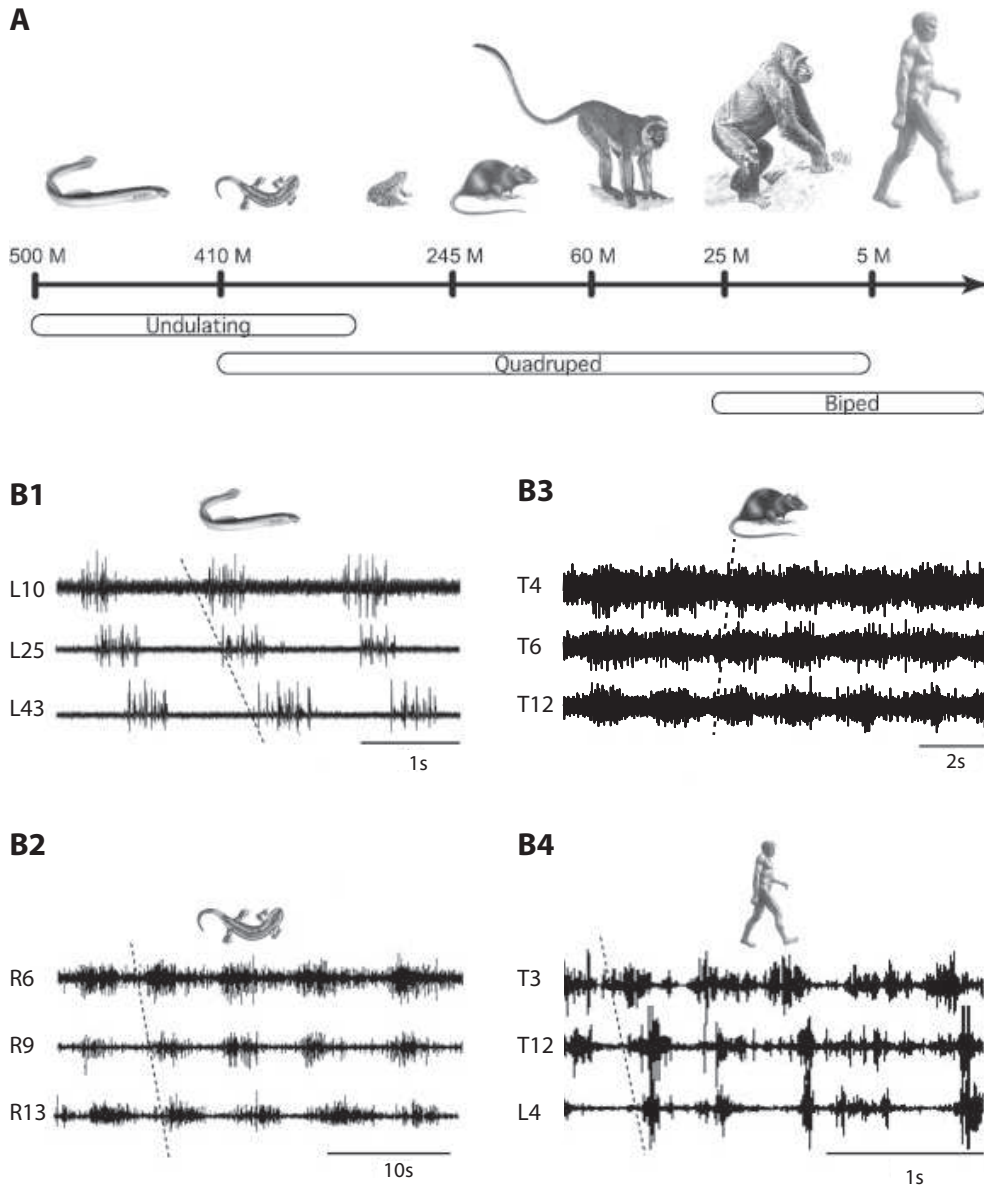


Figure 2 : Le système locomoteur au cours de l'évolution.

(A) Evolution du système locomoteur des vertébrés. Les changements majeurs sont l'apparition des membres, le passage d'un mouvement ondulant à une marche quadrupède, puis bipède. (B1) Enregistrement de la vague d'activité rostrocaudale au niveau des racines motrices ventrales rostrale (L1), intermédiaire (L25) et caudale (L43) sur une préparation de moelle épinière isolée de lamproie. (B2) L'enregistrement in vitro des racines ventrales motrices ipsilatérales sur une préparation de moelle épinière isolée de salamandre révèle une propagation rostrocaudale de l'activité motrice du tronc. (B3) L'enregistrement des racines ventrales thoraciques (T) 4, 6 et 12 sur une préparation de moelle épinière de rat nouveau-né montre une propagation caudo-rostrale de l'activité. (B4) Enregistrements EMG de la musculature axiale au niveau thoracique (T) 3, 12 et lombaire (L) 4 chez un humain au cours de la locomotion sur tapis roulant. (modifié d'après Falgairolle *et al.*, 2006).

d'une même ceinture (scapulaire ou pelvienne) se déplacent en alternance stricte. À l'inverse, lors du galop, ils se déplacent en phase.

B) Le tronc et la locomotion

Outre ces aspects purement dynamiques, la locomotion est intrinsèquement liée à la posture. En effet, le mouvement nécessite pour s'exécuter, une tension musculaire adéquate et une activité posturale adaptée. Deux types de postures peuvent être discriminés : la **posture statique** qui représente le positionnement des segments corporels sous la contrainte des forces de gravité, et la **posture dynamique** qui est une activité musculaire directement associée au mouvement. Déplacer son corps exige le maintien d'un équilibre dynamique durant la propulsion du corps. Il est nécessaire d'établir un équilibre entre ces deux objectifs contradictoires : se déplacer pour accomplir une tâche et réagir à la perturbation de l'équilibre posturale créée par ce mouvement. Ainsi se mouvoir résulte de l'intégration de toutes les positions des segments corporels incluant les membres mais aussi la tête et le tronc. L'ensemble des muscles doit présenter une action synergique, permettant de diriger correctement chaque segment corporel afin d'accomplir l'acte de locomotion.

Dans ce contexte, comprendre le fonctionnement de la dynamique axiale qui régule l'activité du tronc est une composante essentielle pour étudier la locomotion. Cependant peu d'études ont été menées sur ces mécanismes chez les mammifères. Chez d'autres espèces, en particulier celles utilisant une locomotion anguilliforme (lamproie, embryon de Xénope), les mécanismes permettant la genèse du mouvement du tronc ont été bien étudiés. Une des caractéristiques essentielles, commune à l'ensemble de ces systèmes est la présence d'une onde métachronale, définie par la propagation séquentielle d'une activité entre des éléments adjacents et selon une organisation temporelle précise (Fig. 2). De manière intéressante, ce patron d'activation est un des plus ubiquitaire, retrouvé depuis les organismes unicellulaires jusqu'aux réseaux spinaux des vertébrés, incluant les mammifères (Falgairolle *et al.*, 2013).

- Lamproie

Chez ce vertébré primitif, la nage résulte d'ondulations successives se propageant le long du corps. Plus la nage est rapide et plus la vague d'activité se déplace rapidement, permettant la propulsion du corps en avant (Grillner *et al.*, 1991). Le mouvement

ondulatoire de la lamproie est produit par une activation séquentielle rostro-caudale de la musculature axiale et une alternance bilatérale des bouffées d'activité. Cette activation séquentielle est due à un délai dans l'apparition des bouffées d'activité dans les segments adjacents (1% de la durée du cycle). Elle peut être inversée pour permettre un déplacement arrière (Matsushima & Grillner, 1992).

Chez ce modèle, de la locomotion dite « fictive » peut-être obtenue sur une préparation de moelle épinière isolée *in vitro*, soit par application d'acides aminés excitateurs, soit par stimulation des régions motrices du tronc cérébral (Cohen & Wallén, 1980). Le patron locomoteur ainsi induit couvre la même gamme de fréquence (0,25-10Hz) et présente une coordination intersegmentaire similaire à la nage *in vivo* (Wallén & Williams, 1984; Hsu *et al.*, 2014). Cependant la variabilité du patron est parfois plus importante que dans des conditions normales. Les caractéristiques de la nage arrière peuvent également être reproduites. En effet, si les segments caudaux de la moelle épinière sont activés par l'application d'acides aminés excitateurs à une concentration plus forte que les segments rostraux, ils deviennent actifs à une plus haute fréquence. Ce sont eux qui vont alors déclencher le rythme, et l'activité va se propager de façon caudorostrale (Matsushima & Grillner, 1992).

- Embryon de Xénope.

L'embryon de Xénope, un amphibien anoure aquatique, a un mode de locomotion similaire à celui de la lamproie, avec la propagation d'une onde métachronale le long du corps. Chez l'embryon de Xénope, deux modes locomoteurs peuvent être observés : la nage et « la fuite », chacun ayant son propre patron moteur : (1) une vague rostrocaudale avec une courte période (40-100ms) durant la nage ; et (2) une vague caudorostrale avec une période plus longue (>100ms) durant la fuite (Soffe, 1996). Ces deux comportements moteurs impliquent les mêmes populations de neurones, avec cependant plus de neurones recrutés au cours de la fuite. L'initiation de l'un ou de l'autre de ces comportements dépend de la stimulation de la moelle épinière : une stimulation de faible intensité va déclencher des épisodes de nage, et une stimulation de plus forte intensité va entraîner un comportement de fuite (Soffe, 1996).

Chez l'embryon de Xénope, le mouvement de nage part de la tête et progresse vers la queue. Une propagation métachronale est observée avec un délai de 1,5 à 5,5ms/mm

(Roberts *et al.*, 1998). Cette propagation rostrocaudale résulte d'un gradient dans l'excitabilité neuronale le long de la moelle épinière (Tunstall & Roberts, 1994). Des enregistrements intracellulaires des motoneurons à différents sites de la moelle épinière pendant la nage ont révélé une diminution rostrocaudale à la fois des entrées excitatrices glutamatergiques et des entrées inhibitrices glycinergiques (Tunstall & Roberts, 1994). Il a également été montré que les capacités rythmogènes du réseau ne sont pas réparties uniformément le long la moelle épinière. Les régions rostrales sont capables d'agir comme des oscillateurs indépendants, alors que les régions caudales ne peuvent générer un rythme que si elles sont connectées aux régions rostrales (Roberts *et al.*, 1998).

- Urodèles.

Bien que la propagation métachronale de l'activité axiale ait été le plus souvent étudiée chez des animaux se déplaçant de manière anguilliforme (lamproie, larve de Xénope), des modèles intermédiaires capables à la fois de générer une nage anguilliforme et une marche quadrupède ont aussi été utilisés. C'est le cas des urodèles, chez qui des études suggèrent que l'organisation spinale permettant le contrôle des mouvements du tronc est très proche de celle des apodes. Ainsi, au cours de la nage, ces animaux utilisent une stratégie de propulsion similaire à celle observée chez la lamproie, avec une propagation métachronale de l'activité motrice (Delvolvé *et al.*, 1999). Cependant, la vitesse de cette distribution rostrocaudale n'est pas uniforme, et trois régions différentes ont été déterminées. Cette différence dans la vitesse de propagation serait due à la présence des réseaux neuronaux des membres antérieurs et postérieurs (Delvolvé *et al.*, 1997).

Lors de la marche chez cet animal, les muscles du tronc présentent deux bouffées d'activité différentes, prenant leurs origines respectives au niveau des membres et se propageant en sens inverse pour se réunir au milieu du tronc. Ce dernier patron moteur, considéré comme hybride, suggère que l'incurvation du tronc implique une propagation métachronale, comme chez la lamproie, sur laquelle vient s'ajouter l'activité générée par les réseaux des membres.

- Mammifères quadrupèdes

Chez le chat, il a été montré une activation cyclique des muscles du tronc coordonnée avec l'activité des membres (Carlson *et al.*, 1979; Zomlefer *et al.*, 1984a;

Koehler *et al.*, 1984). De manière intéressante, des études récentes réalisées sur des chats paralysés au cours d'épisodes de « scratching » fictifs, ont révélé la propagation rostro-caudale d'une vague électrique au niveau des interneurons spinaux lombosacrés. La durée de la phase de flexion, mais pas celle de la phase d'extension, est hautement corrélée avec la durée de la vague électrique, avec une vitesse moyenne de propagation de 0,3m/s (Perez *et al.*, 2009).

Chez le rat, le tronc participe activement à la locomotion en effectuant une grande oscillation de chaque côté, avec un déplacement allant alternativement vers le membre de réception. Une étude *in vivo* a montré que le tronc se courbait à chaque cycle moteur avec une propagation métachronale de la queue vers la tête (Falgairolle & Cazalets, 2007). Chez ces animaux, la propagation de l'activité motrice ne se voit que dans le sens caudo-rostral, c'est-à-dire dans le sens opposé à celui observé chez les vertébrés inférieurs lors de la nage en avant.

Bien qu'ils soient incapables de supporter leur poids durant les premières semaines de développement, les rats nouveau-nés sont capables de réaliser des séquences de locomotion (Fady *et al.*, 1998; Jamon & Clarac, 1998). Au fur à mesure de leur développement, le tonus musculaire du rat augmente et le patron moteur est modifié (Fady *et al.*, 1998; Brocard *et al.*, 1999). À P0, le rat présente une activité motrice de type « reptation », avec le ventre traînant au sol. Des mouvements oscillants sont observés au niveau du tronc traduisant une instabilité posturale (Jamon & Clarac, 1998). Ces oscillations disparaissent au cours du développement. Des enregistrements EMG du longissimus dorsali (un muscle du dos) chez le rat nouveau-né au cours du développement, ont montré qu'il n'existe pas de relation claire entre l'activité enregistrée au niveau des muscles du dos et les phases du pas avant P6 (Geisler *et al.*, 1996; Gramsbergen *et al.*, 1999). De P6 à P8, une activité faible est enregistrée au niveau des muscles du dos, et cette activité devient régulière à P11. Le rat présente un patron locomoteur « adulte » à P15. À cet âge le rat est capable de réaliser des activités motrices complexes (Westerga & Gramsbergen, 1990; Geisler *et al.*, 1993; Clarac *et al.*, 1998) et parallèlement l'activité des muscles du tronc devient en phase avec celle des membres (Geisler *et al.*, 1993; 1996). Toutefois, les muscles du dos n'acquièrent leurs caractéristiques adultes qu'à partir de P26.

Récemment, chez le rat nouveau-né, des bouffées d'activité motrice liées à l'activation du tronc lors d'expérimentation *in vivo* mais aussi *in vitro* ont été mises en

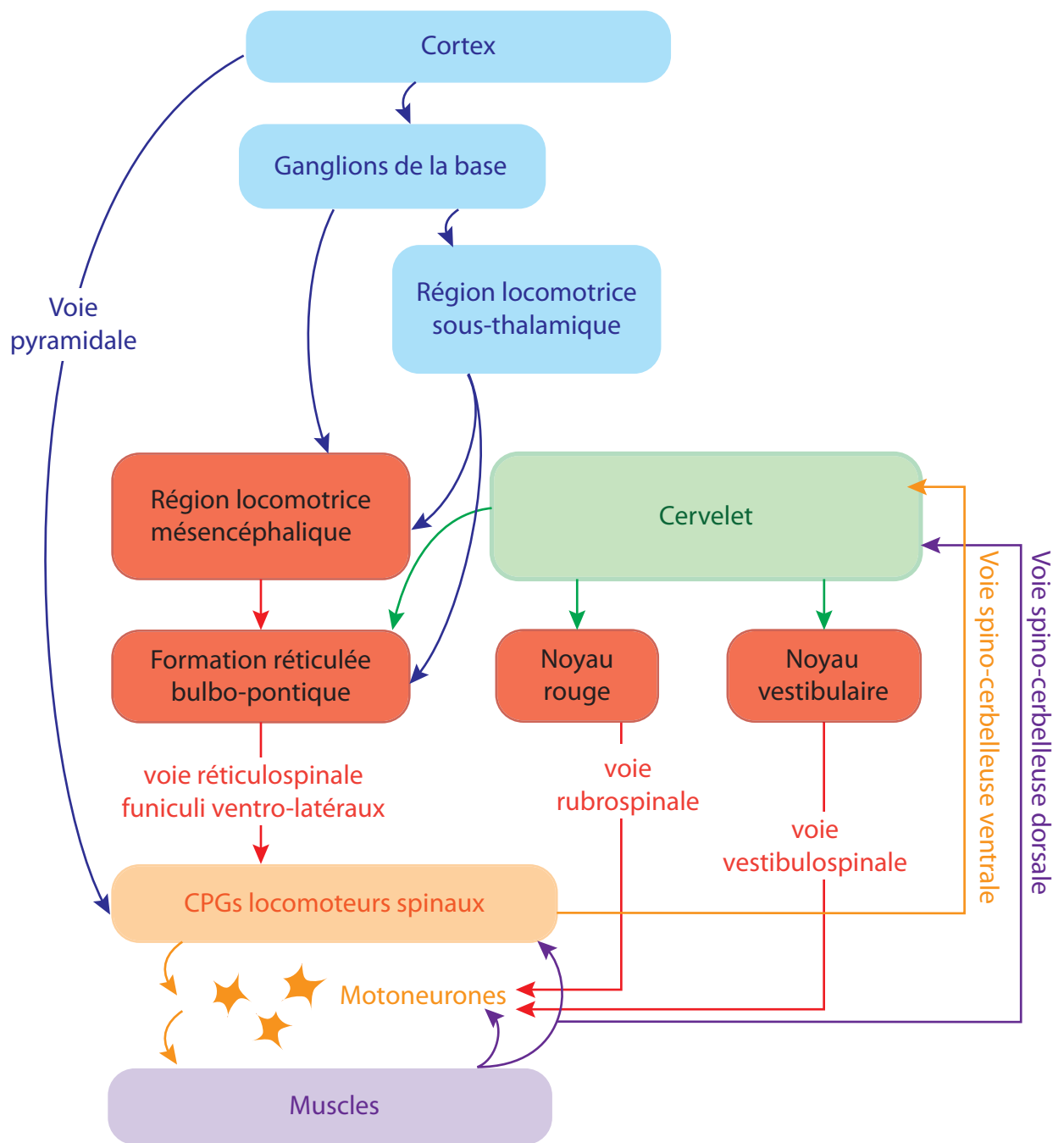


Figure 3 : Organisation des structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la locomotion.

évidence (Cazalets, 2005; Falgairolle & Cazalets, 2007). Une première étude *in vitro*, basée sur des enregistrements simultanés et multiples des racines ventrales thoraciques, lombaires et sacrées, a mis en évidence que la moelle épinière a une capacité intrinsèque à générer une activité motrice se propageant sur tout son axe (Cazalets, 2005). Ces travaux confirment l'induction centrale des bouffées d'activité des muscles dorsaux qui avait été antérieurement décrite (Koehler *et al.*, 1984).

- Humains

La propagation métachronale n'est pas seulement restreinte aux quadrupèdes. Des enregistrements électromyographiques réalisés chez l'Homme au niveau des muscles du dos pendant la marche ont montré une organisation temporelle comparable en termes d'amplitudes des bouffées d'activité et des relations de phases à celle d'autres espèces quadrupèdes (de Seze *et al.*, 2008). Deux bouffées d'activité sont enregistrées au niveau de la musculature axiale au cours de chaque cycle locomoteur, quand les bras et les jambes sont actifs. Le délai de propagation de la vague d'activité le long de la moelle épinière représente 17% du cycle locomoteur, soit environ 180ms. Ce délai de propagation varie en fonction de la tâche motrice réalisée (marche en avant, marche en arrière, amble) (de Seze *et al.*, 2008). Durant la marche, les oscillations du tronc diminuent lors de l'accroissement de la vitesse de 1 à 2m/s. Cela signifie que lorsque la vitesse de marche augmente, le tronc se raidit et présente de moins en moins de latéroflexion au cours du cycle de marche (Thorstensson *et al.*, 1984).

II- Contrôle neuronal de la locomotion.

A) Organisation centrale et périphérique de la locomotion :

L'organisation des structures qui sous-tendent la genèse de la locomotion est particulièrement bien conservée au sein du règne animal. On peut ainsi décrire trois étages principaux : l'étage supraspinal qui initie et contrôle la locomotion, l'étage spinale qui génère le rythme, et enfin l'étage périphérique qui permet d'adapter rapidement le mouvement aux contraintes environnementales (Fig. 3).

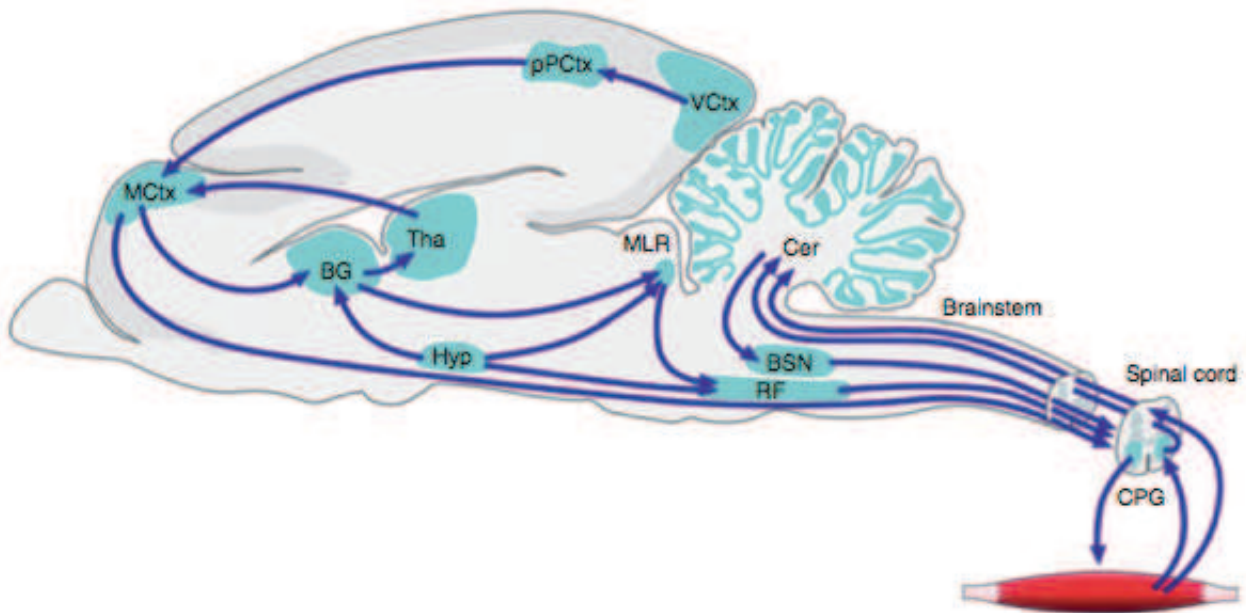
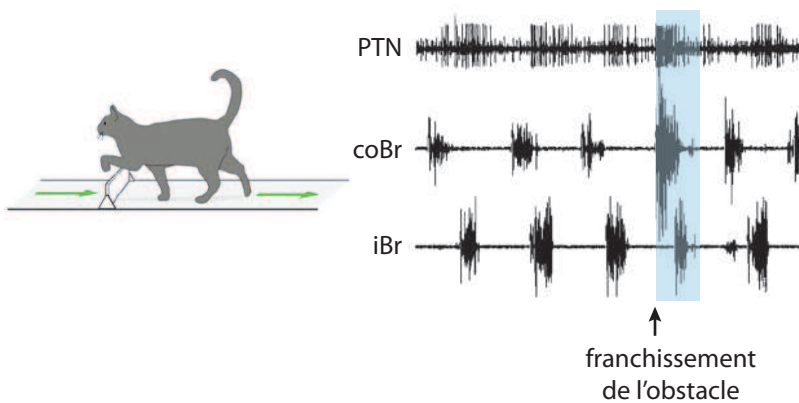
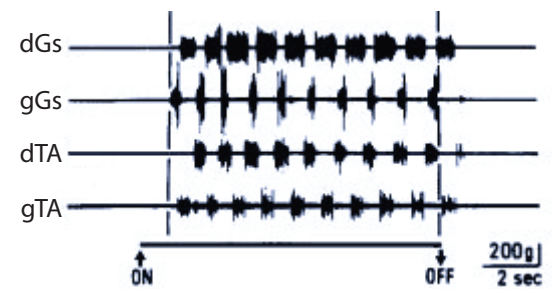
A**B****C**

Figure 4 : Réseaux locomoteurs supraspinaux.

(A) Structures nerveuses impliquées dans la locomotion. (B) Augmentation de l'activité enregistrée dans un neurone du faisceau pyramidal (PTN) lors du franchissement d'un obstacle. Le panneau de gauche est une représentation schématique des conditions expérimentales. L'activité des membres est enregistrée en EMG au niveau du muscle fléchisseur du coude, le brachialis ipsilatéral (iBr) et controlatéral (CoBr). (modifié d'après Drew *et al.*, 2008) (C) Stimulation de la MLR chez le chat placé sur un tapis roulant. L'activité est enregistrée en EMG au niveau des muscles tibialis antérieur (TA) et gastrocnémien (GS) droit (d) et gauche (g). La stimulation de la MLR déclenche une activité locomotrice qui cesse à la fin de la stimulation (barre noire). (modifié d'après Mori *et al.*, 1983)

Pendant longtemps, le chat a été le modèle principal pour l'étude de la locomotion chez les Vertébrés. Mais au cours des 20 dernières années, de nouveaux modèles vertébrés ont été développés comme la lamproie, le Xénope, le poisson zèbre et les rongeurs néonataux. Ces modèles ont amené un nouvel éclairage sur la compréhension de la fonction locomotrice chez les vertébrés. L'avancée dans le domaine de la génétique a ouvert de nombreuses possibilités sur l'étude des réseaux locomoteurs d'une manière qui était impossible auparavant.

a- L'étage supraspinal

Différentes aires corticales telles que le cortex moteur primaire, le cortex prémoteur et l'aire motrice supplémentaire participent à l'initiation et à la programmation de la locomotion. Des expériences de lésions ont montré que le cortex moteur n'est pas essentiel pour obtenir une locomotion correcte chez le chat et le chien. En effet, ces animaux peuvent marcher et courir sur un sol plat lorsque le cortex moteur ou le faisceau pyramidal sont détruits (Miller *et al.*, 1975; Bjursten *et al.*, 1976; Grillner, 1985; Kriellaars *et al.*, 1994). Cependant quand la situation devient plus complexe et demande un plus grand contrôle, par exemple lorsque le chat doit franchir un obstacle, le cortex moteur est nécessaire pour la réalisation du mouvement, en modifiant le patron moteur basal (Marple-Horvat *et al.*, 1993; Drew, 1993; Drew *et al.*, 2008b). De plus, l'intégration au niveau du cortex visuel est essentielle pour la locomotion « fine» (Fig. 4B) (Drew *et al.*, 2008a).

Les informations issues du cortex empruntent deux voies de projection, la voie pyramidale et la voie extrapyramidale. La voie pyramidale se projette directement sur les neurones spinaux après avoir décussé au niveau bulbaire, et contrôle les mouvements volontaires distaux et fins. Une partie de ses axones forment des collatérales qui se projettent au niveau des noyaux moteurs diencephaliques et du tronc cérébral (Fig. 4A). La voie extrapyramidale ou voie indirecte forme un relais au niveau de l'hypothalamus et des ganglions de la base qui ont pour rôle de sélectionner le comportement moteur approprié à une situation donnée. Les ganglions de la base sont fortement impliqués dans le système locomoteur puisqu'un dysfonctionnement de ces noyaux (par exemple lors de la maladie de Parkinson) induit un sévère déficit dans l'initiation et le contrôle de la locomotion. Sur le plan de la connectivité, les ganglions de la base exercent un tonus inhibiteur GABAergique

(originaires de la substance noire réticulée, SNr) sur les structures de projections telles que les régions locomotrices mésencéphaliques (Garcia-Rill, 1986; Hikosaka, 1991). Le déclenchement de la locomotion passerait alors par une levée de cette inhibition sur les structures motrices du tronc cérébral.

En 1960, un groupe russe découvrit qu'une stimulation électrique d'une petite zone du mésencéphale situé juste en avant du colliculus inférieur initiait de la locomotion chez des chats décérébrés (Fig. 4C). Cette région, appelée région locomotrice mésencéphalique (MLR), est présente chez tous les Vertébrés. Cette région est un pivot de l'intégration des commandes locomotrices venant des structures cérébrales supérieures. La MLR sert d'unité de contrôle : augmenter l'activité de cette région va augmenter progressivement la vitesse de locomotion. Ainsi, lorsque l'on stimule la MLR chez un animal au repos, ce dernier va se lever et se mettre à marcher. En augmentant l'intensité de la stimulation, l'animal va accélérer sa vitesse de marche et éventuellement commencer à galoper (Shik *et al.*, 1966; Mori *et al.*, 1983).

Les neurones de la MLR sont excitateurs et contiennent du glutamate et de l'acétylcholine comme neurotransmetteurs (Garcia-Rill & Skinner, 1987; Skinner *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1999). Ces neurones projettent sur les neurones de la formation réticulée bulbo-pontique, qui génère la commande finale initiant la locomotion (Armstrong, 1986; Noga *et al.*, 1991).

b- L'étage spinal

Au niveau spinal, des réseaux de neurones possèdent la capacité de transformer une commande tonique descendante en une activité rythmique (et ce en l'absence d'influence de la périphérie) et produisent un patron locomoteur transmis aux motoneurones. Ces réseaux neuronaux spinaux sont appelés générateurs centraux de patron (de l'anglais « *Central Pattern Generators* », CPGs), et seront abordés plus en détail ultérieurement.

c- Régulation de l'activité locomotrice

- Les afférences sensorielles

Bien que le CPG puisse produire un rythme et un patron en l'absence de retours sensoriels, l'activité locomotrice est en condition normale modulée par les entrées

sensorielles pour pouvoir s'adapter à l'environnement (Rossignol *et al.*, 2006; Frigon & Rossignol, 2006). Il existe deux types d'entrées sensorielles modulant le CPG : les afférences cutanées en provenance des mécanorécepteurs et les retours sensoriels en provenance des muscles et des articulations. Ces derniers sont générés respectivement par deux types de récepteurs proprioceptifs : les fuseaux neuromusculaires (fibre Ia et II) sensibles à l'étirement du muscle et les organes tendineux de Golgi (fibre Ib) sensibles à la force de contraction du muscle. Ces récepteurs sont impliqués dans le contrôle de la vitesse de la marche, de la durée des phases d'appui et de transfert, ainsi que de la force générée par les muscles. Ils sont importants pour faciliter la transition de la phase d'appui vers la phase de transfert au cours de la marche. En effet cette transition requiert un contrôle précis du muscle extenseur de la cheville et du muscle de flexion de la hanche. Au cours de ce transfert, les afférences Ib en provenance du muscle extenseur de la cheville vont inhiber les muscles fléchisseurs de cette dernière, tandis que les afférences Ia en provenance des muscles fléchisseurs de la hanche vont faciliter sa flexion. Cela démontre que les afférences proprioceptives de la cheville et de la hanche travaillent en synergie pour faciliter la transition de la phase d'appui vers la phase de transfert (Pearson, 2008). De la même manière, lorsque le membre est en extension complète, les signaux inhibiteurs en provenance des organes de Golgi des muscles extenseurs diminuent, pour faciliter la transition de la phase d'appui vers la phase de transfert (Conway *et al.*, 1987; Gossard *et al.*, 1994). C'est en régulant la durée de la phase d'appui et de transfert que les informations proprioceptives participent au contrôle de la vitesse de la marche.

Les afférences cutanées provenant des mécanorécepteurs codent les informations relatives au toucher discriminatif (fibres des groupes II/III). Les récepteurs sensoriels cutanés sont également importants dans la régulation de la locomotion (Panek *et al.*, 2014). Ils sont activés quand le membre en mouvement rencontre un obstacle dans son environnement. Leur activation va déclencher des réflexes, comme le réflexe « de correction » (Zehr *et al.*, 1997; Van Wezel *et al.*, 1997). Les entrées sensorielles sont filtrées selon la phase du cycle locomoteur. Par exemple, si un animal rencontre un obstacle quand le membre est dans sa phase de transfert, le réflexe va augmenter l'amplitude du mouvement pour permettre au pied de passer au-dessus de l'obstacle. Par contre si le même stimulus est appliqué sur le

dos du pied au cours de la phase d'appui, aucune correction ne sera apportée (Forssberg *et al.*, 1975; 1977; Forssberg, 1979; Drew & Rossignol, 1987).

Ces afférences semblent également être impliquées dans le placement des membres au cours de la locomotion, comme le montrent des expériences réalisées sur des chats spinaux dénervés (section des nerfs cutanés) incapables de réaliser correctement une marche sur les barreaux d'une échelle (Bouyer & Rossignol, 2003).

- Le cervelet

En plus de sélectionner et d'initier la locomotion, les circuits moteurs des centres supérieurs participent à la régulation de l'activité locomotrice et au maintien d'un équilibre correct indispensable pour réaliser une locomotion adéquate. Le cervelet joue un rôle central pour coordonner ces interactions. Des dommages au niveau du cervelet entraînent une locomotion désorganisée avec des longueurs de pas variables et un placement du pied incorrect, accompagné de problèmes d'équilibre tel qu'une augmentation des oscillations posturales, et des réponses anormales en cas de perturbations de la locomotion.

Le cervelet médian (vermis) et la zone intermédiaire des hémisphères cérébelleux, communément appelée le spinocervelet, reçoivent des entrées de deux groupes de neurones spinaux excitateurs, rythmiquement actifs durant la marche : les neurones de la voie spinocerebelleuse dorsale (DSCT) et les neurones de la voie spinocerebelleuse ventrale (VSCT) (Fedirchuk *et al.*, 2013).

Les neurones DSCT sont localisés dans la colonne de Clarke (Mann, 1973) située dans la corne dorsale de la moelle épinière, et projettent sur le cervelet via le funiculus dorsolatéral (Matsushita & Ikeda, 1970; Grant *et al.*, 1982; Xu & Grant, 1994). Ces neurones reçoivent des entrées en provenance des afférences proprioceptives, principalement des fuseaux neuromusculaires, et ainsi permettent au cervelet d'être renseigné sur le mouvement actuel des membres (Arshavsky *et al.*, 1972; Bosco & Poppele, 2003).

Les neurones VSCT sont localisés dans la moelle épinière ventrale et projettent sur le cervelet via le funiculus ventral (Matsushita & Ikeda, 1970; Lundberg & Weight, 1971; Grant *et al.*, 1982; Xu & Grant, 1994). Leur activité rythmique n'est pas dépendante des informations sensorielles provenant des membres, mais ils sont rythmiquement modulés par le CPG locomoteur (Arshavskii *et al.*, 1972; Gustafsson & Lindström, 1973). Ainsi, les

neurones du VSCT envoient au cervelet une copie d'efférence du rythme généré par le CPG locomoteur (Lundberg, 1971) .

Pris ensemble, ces circuits composent une boucle spinocérébelleuse qui permet de moduler l'activité du CPG en fonction de l'environnement. En comparant le mouvement attendu (provenant du VSCT) et le mouvement réel (provenant du DCST), le cervelet peut ajuster la commande motrice en contrôlant indirectement l'activité des CPGs spinaux et des motoneurones via les voies descendantes vestibulospinales, rubrospinales et réticulospinales.

- Les noyaux vestibulaires

Outre l'initiation et le contrôle de la locomotion, l'étage supraspinal détermine également le niveau de tonus postural afin de maintenir l'équilibre de l'animal au cours de la locomotion en ajustant en permanence la balance entre la contractilité des muscles extenseurs et fléchisseurs. Ainsi, les noyaux vestibulaires latéraux, activés phasiquement au cours de la locomotion, se projettent au sein de la moelle épinière sur les interneurones et les motoneurones extenseurs, induisant une augmentation de l'activité des muscles antigravitaires au cours de la phase d'appui (Orlovsky, 1972). À l'inverse, le noyau rouge et la formation réticulée pontique se projettent sur les neurones innervant les muscles fléchisseurs, intervenant préférentiellement dans la régulation de la phase de transfert (Lai & Siegel, 1990; Rossignol *et al.*, 2006). Cette balance fonctionnelle entre ces structures prend toute sa dimension dans les expériences de lésion chez le chat où une transection intercolliculaire induit une rigidité dite de décérébration (hyperextension) suite à la suppression de l'influence du noyau rouge (Sherrington, 1906).

B) Organisation des réseaux locomoteurs de la moelle épinière

Une avancée dans la compréhension des substrats neuronaux permettant la genèse de la locomotion chez les mammifères fut menée par le neurophysiologiste Thomas Graham Brown au début de 20^{ème} siècle. Il montra que le mouvement de flexion et d'extension des membres postérieurs pouvait être évoqué chez le chat dont la moelle épinière avait été transectée au niveau thoracique, et dont les entrées sensorielles avaient été supprimées. Graham Brown conclut que les réseaux neuronaux de la moelle épinière peuvent, quand ils sont correctement activés, organiser des mouvements rythmiques avec une alternance de

flexion et d'extension, en absences de retours sensoriels. Ces recherches montrèrent clairement que la moelle épinière elle-même contient des réseaux neuronaux capables de générer des mouvements rythmiques sans informations sensorielles. Ces réseaux neuronaux sont appelés générateurs centraux de patron ou CPGs. Les neurones du CPG reçoivent des informations en provenance des structures supraspinales, à partir desquelles ils sont capables de produire un rythme et un patron d'activité qui sera envoyé jusqu'aux motoneurones puis aux muscles.

a- Localisation des CPGs de la marche.

Très tôt, des études ont montré que la région lombaire contenait suffisamment d'éléments neuronaux pour produire un patron d'activation des muscles des membres postérieurs extrêmement précis au cours de la locomotion.

Grillner et Zangger (Grillner & Zangger, 1979) furent les premiers à étudier la localisation du réseau moteur contrôlant les membres postérieurs chez le chat, en utilisant une approche lésionnelle. Ils montrèrent qu'une alternance rythmique peut être évoquée entre les muscles fléchisseurs et extenseurs de la cheville quand les segments L6-S1 sont isolés du reste de la moelle. De plus, lors de la stimulation de la MLR chez le chat, les interneurones du segment L4 sont rythmiquement actifs au cours de la locomotion (Shefchyk *et al.*, 1990), suggérant que les capacités rythmogènes du CPG contrôlant les membres postérieurs sont localisées dans l'élargissement lombaire. Par la suite, de nombreuses recherches furent menées sur la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de rongeurs, et à l'aide d'approches lésionnelles, électrophysiologique, pharmacologiques et de marquages neuroanatomiques définirent les segments T13-L2 comme localisation du CPG sur ce modèle (Fig. 5) (Kudo & Yamada, 1987a; Cazalets *et al.*, 1995; Bracci *et al.*, 1996; Kiehn & Kjaerulff, 1996; Cowley & Schmidt, 1997a; Kremer & Lev-Tov, 1997; Bonnot *et al.*, 1998; Gabbay *et al.*, 2002; Bertrand & Cazalets, 2002; Antri *et al.*, 2011). De la même manière, la localisation transversale des CPGs fut mise en évidence au sein de la moelle épinière ventrale au niveau des couches VII, VIII et X de Rexed (Viala *et al.*, 1988; Kjaerulff *et al.*, 1994; Cina & Hochman, 2000; Antri *et al.*, 2011).

Les membres antérieurs sont contrôlés par les réseaux locomoteurs localisés dans la moelle épinière cervicale (Ballion *et al.*, 2001). Ces deux CPGs sont interconnectés pour

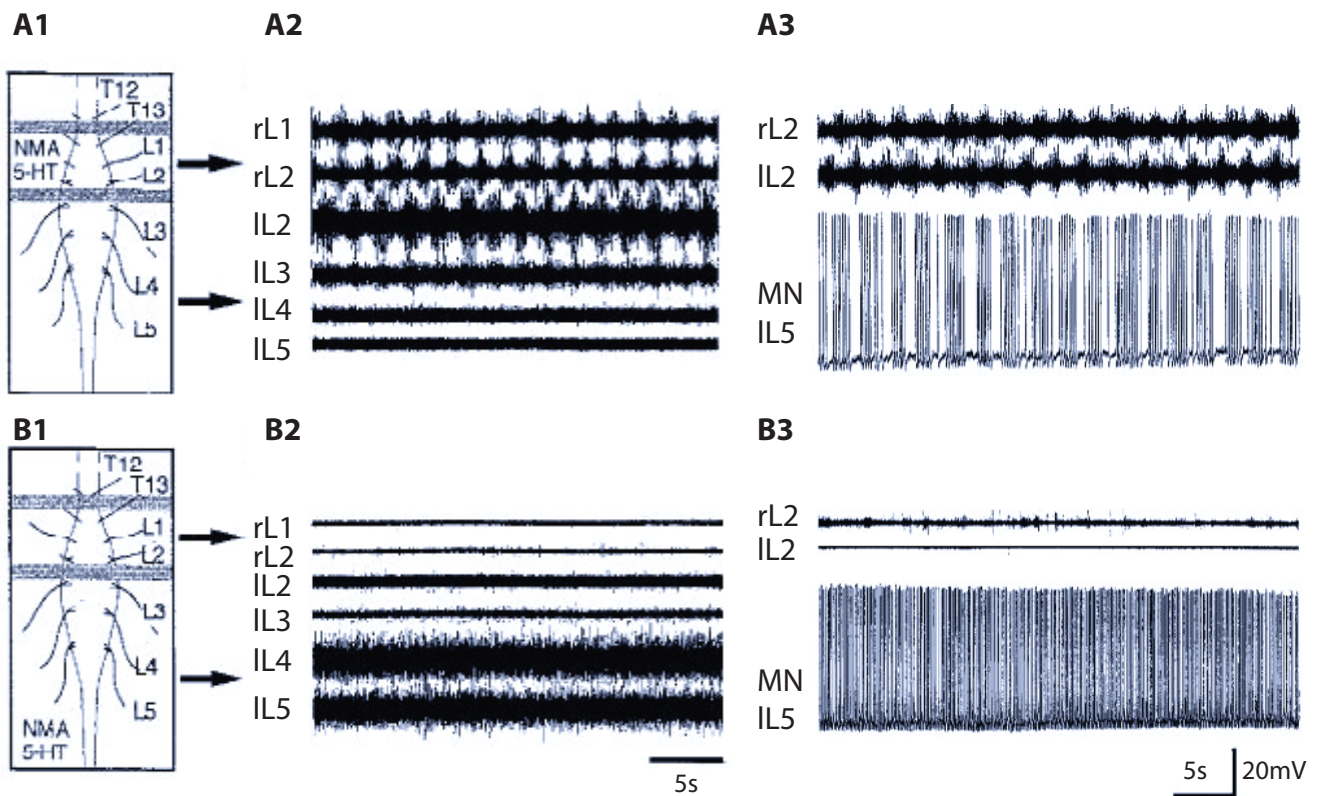


Figure 5 : Localisation des réseaux locomoteurs lombaires.

(A1) et (B1) Représentation schématique des conditions expérimentales. (A2) L'application de NMA/5HT sur les segments lombaires L1 à L2 déclenche une activité locomotrice dans les racines ventrales lombaires L1 à L3. (A3) Dans cette condition, une activité locomotrice rythmique est enregistrée dans les motoneurones lombaires L5. (B2) Lors de la perfusion des segments lombaires bas, seule une activité tonique est enregistrée au niveau des racines lombaires L4 et L5. (B3) L'activité enregistrée dans un motoneurone lombaire L5 révèle une activité tonique. (modifié d'après Cazalets *et al.*, 1995)

permettre la coordination adéquate des membres antérieurs et postérieurs (Juvén *et al.*, 2005).

b- Fonctionnement du CPG

Le **patron moteur** chez les mammifères quadrupèdes est plus complexe que celui de la lamproie (Grillner, 2003; 2006) ou du Xénope (Roberts *et al.*, 1998) car l'activité des muscles des membres doit être coordonnée à la fois en respectant une alternance bilatérale mais également une alternance flexion-extension. Deux types d'approche ont été utilisés pour étudier l'organisation des réseaux moteurs chez les mammifères. De manière traditionnelle, des techniques de lésions, d'électrophysiologies, de marquages neuroanatomiques conventionnels ainsi que des approches pharmacologiques menées chez le chat et le rongeur, ont permis d'identifier plusieurs populations d'interneurons sur la base de leurs propriétés membranaires (rebond post inhibiteur, plateaux), de la connectivité (afférences sensorielles, efférences) ainsi que de leur patron locomoteur (extenseur, fléchisseur ou tonique). Plus récemment une approche génétique a été mise au point pour étudier les neurones moteurs spinaux (cette approche sera développée ultérieurement).

Des expériences de lésions réalisées sur des préparations de moelles épinières isolées *in vitro* de rats nouveau-nés ont montré qu'une hémimoelle est capable de générer **l'alternance flexion-extension** des membres (Kudo & Yamada, 1987a; Cowley & Schmidt, 1997a; Bonnot *et al.*, 2002; Falgairolle & Cazalets, 2007; Hägglund *et al.*, 2013). Les connexions inhibitrices glycinergiques sont importantes dans la genèse de cette alternance, et la perfusion de strychnine (un inhibiteur glycinergique) sur la préparation déclenche une activité synchrone entre les racines innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs (Cowley & Schmidt, 1995; Cazalets, 2005).

Il existe des évidences montrant que les interneurons inhibiteurs la sont essentiels pour coordonner l'alternance flexion-extension (Pratt & Jordan, 1987). Les interneurons la sont activés par des afférences proprioceptives de type Ia originaires des fuseaux neuromusculaires. Des expériences menées chez le chat ont montré que les interneurons la sont organisés en groupes fléchisseurs et extenseurs, connectés réciproquement autour d'une articulation. Les interneurons la « fléchisseurs » inhibent les motoneurons extenseurs, tandis que les interneurons la « extenseurs » inhibent les motoneurons

fléchisseurs. D'autres neurones inhibiteurs sont aussi impliqués dans cette alternance. Les motoneurones reçoivent des inhibitions rythmiques des cellules de Renshaw qui sont activées par les collatérales des motoneurones (McCrea *et al.*, 1980).

Des expériences menées chez le rat ont révélé l'existence de deux voies impliquées dans **l'alternance gauche-droite** : une voie directe impliquant des neurones commissuraux inhibiteurs projetant sur les motoneurones et une voie indirecte qui projette sur des neurones prémoteurs inhibiteurs (Kjaerulff & Kiehn, 1996; 1997; Quinlan & Kiehn, 2007). La perfusion d'antagonistes glycinergiques et GABAergiques sur la moelle épinière isolée de rat nouveau-né induit une activité rythmique caractérisée par une activité bilatérale synchrone (Bracci *et al.*, 1996). Ce double système inhibiteur est lui-même sous le contrôle des neurones générant le rythme moteur.

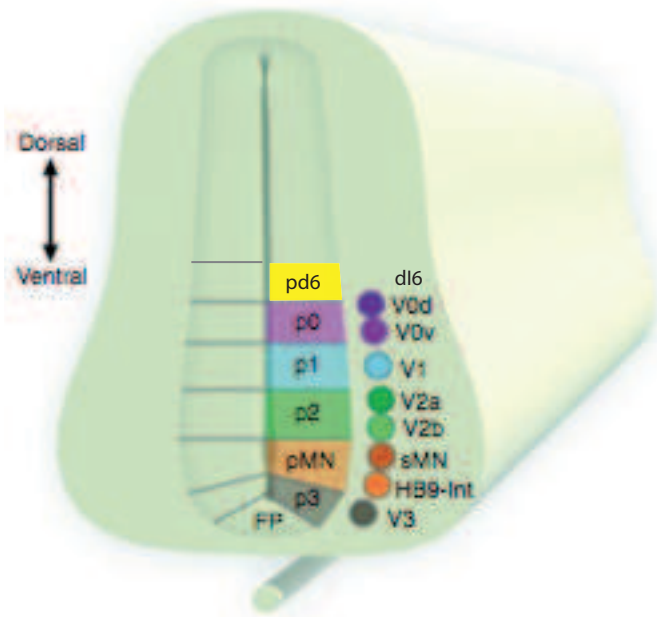
c- Dissection génétique du CPG

Au cours de la dernière décennie, de nouvelles approches basées sur des techniques de génétique moléculaire combinées à l'électrophysiologie et à de l'imagerie fonctionnelle ont permis d'identifier différentes populations d'interneurones participant à l'activité locomotrice. Très tôt au cours du développement des morphogènes sont sécrétés pour permettre la différenciation de cinq progéniteurs ventraux et six progéniteurs dorsaux caractérisés par leur expression différentielle de facteurs de transcription (Fig. 6). Au fur et à mesure du développement, les cellules progénitrices mûrissent et migrent vers leur position finale dans la moelle épinière. Au sein de la moelle épinière ventrale où se situe le CPG, les neurones peuvent être divisés en six groupes : les neurones V0 à V3, les interneurones Hb9, et les motoneurones (Goulding, 2009).

- Les neurones V0

Les neurones V0 sont spécifiés par le facteur de transcription Dbx1 et sont localisés dans la partie ventro-médiane de tous les segments de la moelle épinière (Pierani *et al.*, 1999). Cette population est constituée d'environ deux tiers de neurones inhibiteurs et d'un tiers de neurones excitateurs (Lanuza *et al.*, 2004). Les neurones V0 sont pour la plupart des neurones commissuraux (Pierani *et al.*, 2001) réparties en deux groupes : les neurones V0 localisés dans la partie dorsale (V0_D) et les neurones V0 de la partie ventrale (V0_V). Toutefois, une étude récente a mis en évidence un troisième groupe de neurones, les V0_{C/G}, qui ont la

A



B

| Type | Facteurs de transcription | Projections et neurotransmetteurs |
|----------|---------------------------|---|
| ● dl6 | WT1/dmrt3 | Ipsilatérales et commissurales Inhibiteurs - GABA/glycine |
| ● V0d | Dbx1/Evx1- | Commissurales Inhibiteurs - GABA/glycine |
| ● V0v | Dbx1/Evx1+ | Commissurales Excitateurs - glutamate |
| ● V1 | En1 | Ipsilatérales Inhibiteurs - GABA/glycine |
| ● V2a | Chx10 | Ipsilatérales Excitateurs - glutamate |
| ● V2b | Gata2/3 | Ipsilatérales Inhibiteurs - GABA/glycine |
| ● MN | HB9 | Périphériques - Acetylcholine |
| ● Hb9 In | HB9 | Ipsilatérales Excitateurs - glutamate |
| ● V3 | Sim1 | Commissurales (85%) Ipsilatérales (15%) Excitateurs - glutamate |

Figure 6 : Les facteurs de transcription déterminent l'identité des cellules spinales ventrales.

(A) Les morphogènes sont sécrétés selon un gradient de concentration rostrocaudale et vont spécifier les cellules progénitrices pd6, p0-p3 et pMN, caractérisées par l'expression de leurs facteurs de transcription. Lorsque les cellules progénitrices mûrissent, elles migrent latéralement et sont appelées dl6, V0-V3, HB9, et motoneurones. (B) Tableau montrant les principaux facteurs de transcription pour les six classes de neurones situés ventralement (dl6, V0-V3, HB9 et MN), leurs projections, et le phénotype des neurotransmetteurs de ces neurones. (modifié d'après Kiehn & Dougherty, 2013)

particularité d'être soit glutamatergique ($V0_G$) soit cholinergique ($V0_C$), et qui projettent ipsilatéralement sur les motoneurones. D'après les auteurs, les neurones $V0_{C/G}$ ont un rôle important dans la neuromodulation de l'activité motoneuronale (Zagoraiou *et al.*, 2009). Il a été montré que les interneurones V0 sont rythmiquement actifs au cours de la locomotion (Dyck & Gosgnach, 2009). Chez les souris, la délétion des neurones V0 entraîne une diminution de la coordination droite-gauche, alors que l'alternance homolatérale flexion-extension est conservée (Lanuza *et al.*, 2004; Talpalar *et al.*, 2013). Des délétions sélectives des $V0_D$ et $V0_V$ ont révélé que ces populations sont responsables de l'alternance bilatérale dans une gamme de vitesse locomotrice donnée (Talpalar *et al.*, 2013). Ces données suggèrent que les neurones V0 sont impliqués dans le contrôle de l'alternance bilatérale lors de la locomotion, mais ils ne semblent pas être nécessaires à l'initiation de l'activité locomotrice.

- Les neurones V1

Les interneurones V1 sont des interneurones inhibiteurs qui projettent ipsilatéralement sur les motoneurones des segments voisins (Alvarez *et al.*, 2005). Il est admis que les cellules de Renshaw ainsi que les interneurones de types Ia dérivent de cette population neuronale (Sapir *et al.*, 2004). Les souris qui n'expriment plus cette population neuronale ne parviennent plus à produire des patrons locomoteurs rapides (Gosgnach *et al.*, 2006). Chez ces souris, le patron d'activité flexion-extension est conservé (Gosgnach *et al.*, 2006), ce qui indique que les neurones V1 ne sont pas suffisants pour générer l'alternance flexion-extension. Néanmoins, il a été montré que ces neurones participent à la genèse de ce patron en interaction avec d'autres populations neuronales (Zhang *et al.*, 2014).

- Les neurones V2

Les interneurones V2 sont localisés dans la lamina VII de la moelle épinière (Dougherty & Kiehn, 2010a). Ils peuvent être divisés en deux sous-populations sur la base des facteurs de transcription exprimés: les neurones V2a et V2b. 95% des neurones V2a sont des neurones excitateurs, dont les projections sont ipsilatérales glutamatergiques (Lundfald *et al.*, 2007), alors que les neurones V2b sont des neurones commissuraux inhibiteurs (Al-Mosawie *et al.*, 2007; Lundfald *et al.*, 2007). Sachant que les interneurones excitateurs sont essentiels pour l'initiation et le maintien de l'activité locomotrice chez les mammifères (Kiehn *et al.*, 2008), les neurones V2a ont été les premiers étudiés. Ainsi, les études

électrophysiologiques ont montré que les neurones V2a possèdent des propriétés membranaires leur permettant de produire des oscillations endogènes (Dougherty & Kiehn, 2010b; Zhong *et al.*, 2010) et que les souris n'exprimant pas les neurones V2a présentent *in vitro* une altération de l'alternance gauche-droite (Crone *et al.*, 2008). Des études ultérieures menées sur des souris adultes n'exprimant pas les V2a, ont montré que l'alternance bilatérale est uniquement affectée lors des phases de locomotion à haute vitesse, ce qui suggère que l'activation des V2a est mise en jeu uniquement lors d'épisodes de marche rapide (Crone *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2010; Dougherty & Kiehn, 2010a). Le fait que la locomotion soit maintenue en l'absence des neurones V2a suggère que cette population neuronale ne constitue pas le générateur de rythme locomoteur. Toutefois, en plus de leurs caractéristiques anatomiques et électrophysiologiques, les neurones V2a reçoivent une commande directe provenant du générateur de rythme locomoteur (Zhong *et al.*, 2010; Dougherty & Kiehn, 2010a) et pourraient donc constituer un élément important du circuit neuronal impliqué dans l'élaboration du patron locomoteur. Une étude récente a montré que les neurones V2b participent à la genèse de l'alternance flexion-extension, en interaction avec les neurones V1 (Zhang *et al.*, 2014).

- Les neurones V3

Les interneurones V3 sont des interneurones excitateurs glutamatergiques (Zhang *et al.*, 2008) localisés dans la région dorso-médiane et ventro-médiane de la moelle épinière, et projetant directement sur les motoneurones controlatéraux. Deux sous-populations de neurones V3 ont été mises en évidence sur la base de leurs localisations et de leurs propriétés électrophysiologiques : les neurones V3 ventraux et dorsaux (Borowska *et al.*, 2013). Chez des souris mutées où les neurones V3 ont été mis sous silence, la locomotion fictive est caractérisée par une activité irrégulière et asymétrique entre les nerfs gauche-droite d'un segment spinal (Zhang *et al.*, 2008). Ce patron d'activité irrégulier est également observé *in vivo* lors d'épisodes de locomotion chez ces souris mutées. Ces résultats montrent que les interneurones V3 participent à la coordination des activités locomotrices bilatérales (Zhang *et al.*, 2008).

- Les neurones dl6 :

Les interneurones dl6 sont localisés dans la lamina VII/VIII de la moelle épinière (Gross *et al.*, 2002) et sont de type inhibiteur. Cette population neuronale est relativement

hétérogène, car elle est composée de neurones ipsilatéraux et commissuraux. Une étude récente basée sur des enregistrements électrophysiologiques a permis de démontrer que la plupart des neurones dl6 sont actifs rythmiquement au cours d'un épisode de locomotion fictive (Dyck *et al.*, 2012). Sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques ainsi que de leurs patrons de décharge, ces neurones peuvent être divisés en deux populations. La première présente des bouffées de potentiels d'action faiblement coordonnées à l'activité enregistrée au niveau des racines ventrales. Toutefois, ces neurones possèdent des propriétés membranaires intrinsèques similaires à celles des neurones oscillants, ce qui pourrait leur faire jouer un rôle dans la genèse du rythme locomoteur. La seconde population de neurones présente un patron de décharge rythmique en phase avec l'activité enregistrée au niveau des sorties motrice, mais ne possède aucune des propriétés membranaires caractéristiques des neurones oscillants. De plus, chez des souris KO pour une sous population de neurones dl6 (les neurones dl6 exprimant le facteur de transcription *dmrt3*), les souris néonatales présentent des problèmes de coordinations gauche-droite lors d'épisodes de air-stepping. Chez l'adulte, on observe un patron moteur altéré lors de locomotion à grande vitesse (Vallstedt & Kullander, 2013).

- Les neurones Hb9

Les interneurones exprimant le facteur de transcription Hb9 (basic helix-loop- helix domain containing, class B, 9) sont localisés dans la partie ventro-médiane de la moelle épinière et s'étendent de la région cervicale à la région lombaire (Wilson *et al.*, 2005; Hinckley *et al.*, 2005; Ziskind-Conhaim *et al.*, 2010). Ce sont des neurones glutamatergiques, interconnectés, et dont les projections axonales sont uniquement ipsilatérales (Hinckley *et al.*, 2005). Il a été montré que ces neurones sont rythmiquement actifs durant la locomotion fictive (Wilson *et al.*, 2005; Hinckley *et al.*, 2005) et qu'ils possèdent des propriétés membranaires spécifiques des neurones oscillants, telles que les courants sodiques persistants (Ziskind-Conhaim *et al.*, 2008). Isolés par application de TTX, ces neurones conservent la faculté de produire des oscillations rythmiques de leur potentiel de membrane lors de l'application du cocktail NMA/5HT utilisé pour induire la locomotion fictive (Wilson *et al.*, 2005). Cependant, des études récentes ont remis en cause le rôle central de ces neurones dans la genèse du rythme locomoteur. Tout d'abord, le nombre de neurone Hb9 par segment spinal (environ 40 chez la souris) semble être insuffisant pour générer une

activité rythmique telle que la locomotion (Kwan *et al.*, 2009). De plus, il a été mis en évidence que l'activité des neurones Hb9 débute le plus souvent après l'apparition des bouffées locomotrices enregistrées au niveau des racines ventrales (Kwan *et al.*, 2009) et dans ces conditions les neurones Hb9 ne peuvent être considérés comme initiateurs du rythme locomoteur. À ce jour il est difficile de déterminer le rôle précis de cette population d'interneurones dans le comportement locomoteur, puisque les motoneurones expriment également le facteur de transcription Hb9, ce qui empêche la création d'un modèle de souris délété pour les neurones Hb9.

De plus, dans le cas d'ablation génétique de certaines populations neuronales, des mécanismes de compensations peuvent intervenir et ainsi fausser l'interprétation des résultats. C'est pourquoi, des modèles de souris exprimant des canaux photosensibles sont actuellement développés afin d'activer spécifiquement certaines populations neuronales. Des études récentes ont ainsi permis de déterminer que l'activation lumineuse des neurones spinaux exprimant le transporteur Vglut2 est suffisante pour initier un épisode de locomotion fictive (Hägglund *et al.*, 2010).

d- Motoneurones et propriétés membranaires impliquées dans la régulation du cycle locomoteur

- Motoneurones

Les neurones moteurs sont présents à tous les niveaux de la moelle épinière et projettent hors du système nerveux central sur les muscles squelettiques. Il existe trois types des motoneurones : les motoneurones α , qui innervent les fibres musculaires extrafusales, les motoneurones γ qui innervent les fibres intrafusales, et les motoneurones β qui innervent les deux types de fibres (Banks, 1994).

Les motoneurones α et β peuvent être divisés en deux catégories : les motoneurones « fast » et « slow ». Cette catégorisation s'effectue sur la base de propriétés métaboliques et contractiles des muscles innervés (Hoffmann, 1966; Kernell, 1986; Banks, 1994). Plusieurs études ont montré que les caractéristiques anatomiques et les propriétés électriques des motoneurones sont corrélées aux types des motoneurones. Ainsi plusieurs paramètres sont utilisés pour distinguer les motoneurones « fast » et « slow » comme la taille du soma, l'excitabilité des cellules, l'AHP (afterhyperpolarization) et la vitesse de conductance

axonale. Par exemple, les motoneurones « fast » innervant des muscles fatigables, tendent à avoir un soma assez grand et une résistance faible et donc nécessitent beaucoup de courant dépolarisant pour évoquer un PA. Ils ont également une AHP plus courte que celle des motoneurones « slow » (Zengel *et al.*, 1985; Manuel & Zytnicki, 2011).

- Propriétés cellulaires et rythme locomoteur

La connexion synaptique n'est pas le seul élément à déterminer le fonctionnement du CPG. Les neurones possèdent de nombreuses conductances ioniques potassiques, sodiques et calciques, qui déterminent leur réponse aux entrées synaptiques. Certaines de ces conductances ioniques peuvent participer à la genèse du rythme et modifier le patron de décharge des neurones. Ainsi il a été montré chez de nombreuses espèces que les propriétés de membranes jouent un rôle important dans le fonctionnement du CPG, comme par exemple les propriétés de plateaux qui amplifient la bouffée (Bennett *et al.*, 1998; Brownstone, 2006), ainsi que les conductances ioniques impliquées dans les transitions de phases et dans la régulation de la fréquence de décharge (Bertrand & Cazalets, 1998*b*; Kiehn *et al.*, 2000).

Des propriétés de « **burst conditionnels** » ont été décrites dans des neurones spinaux moteurs. L'application de NMDA sur une préparation de moelle épinière isolée de rongeurs déclenche des oscillations du potentiel de membranes des motoneurones (Kiehn *et al.*, 1996; MacLean *et al.*, 1997). Ces oscillations NMDA-dépendantes sont retrouvées lorsque les neurones sont isolés par ajout de tétrodothine (TTX) dans le bain de perfusion (Hochman *et al.*, 1994; MacLean *et al.*, 1997). Ces oscillations sont susceptibles de jouer un rôle essentiel dans la genèse du rythme locomoteur chez les mammifères (Kiehn, 1991; Schmidt *et al.*, 1998). Ces propriétés sont également retrouvées dans des neurones spinaux de différentes espèces. Chez la lamproie ces oscillations NMDAR dépendantes sont impliquées dans le contrôle de la nage lente (Cangiano, 2003; Wallén & Grillner, 2003).

Les **propriétés de plateaux** sont un mécanisme d'amplification post-synaptique. Ces propriétés permettent au neurone de se dépolariser et de décharger pendant une période prolongée en réponse à une brève entrée excitatrice (Bennett *et al.*, 1998; Brownstone, 2006). Cette dépolarisation peut cesser de manière spontanée par une modification des conductances ioniques ou bien suite à une entrée inhibitrice (Hultborn *et al.*, 1975; Hounsgaard *et al.*, 1984; Crone *et al.*, 1988). Les propriétés de plateaux sont sous-tendues

par les courants entrants persistants (PICS) composés d'un courant sodique persistant (I_{NAP}) (Li & Bennett, 2003; Harvey, 2006a) et d'un courant calcique persistant (canal calcique de type L) (Lee & Heckman, 1998; Carlin *et al.*, 2000). Les courants I_{can} (Calcium-activated non selective current) sont également impliqués dans le maintien de ces phénomènes de plateau (Bouhadfane *et al.*, 2013). Ce mécanisme d'amplification est important dans la régulation de la fonction motrice mais également de la fonction posturale (Eken *et al.*, 1989; Eken & Kiehn, 1989). Chez les motoneurones des vertébrés, leur expression est contrôlée par la neuromodulation induite par les monoamines, comme la sérotonine et la noradrénaline (ce sujet sera développé ultérieurement).

En plus des inhibitions réciproques, les conductances ioniques sont impliquées dans les transitions de phase, et peuvent affecter le rythme et le patron locomoteur.

Ainsi, le **courant I_h** participe au mécanisme d'échappement à l'inhibition, qui permet au motoneurone de sortir d'un état hyperpolarisé. Le courant I_h (courant activé par une hyperpolarisation) est un courant entrant impliquant des ions Na^+ et K^+ . Quand le potentiel de membrane est hyperpolarisé, le courant I_h s'active, entraînant la formation d'un « sag » qui correspond à la dépolarisation du neurone malgré le maintien de l'hyperpolarisation. Quand l'hyperpolarisation est levée, le courant I_h contribue à l'apparition d'un rebond post-inhibiteur. Ce comportement a deux conséquences importantes sur les propriétés intégratives de la cellule. Premièrement, le « sag » limite les effets d'une inhibition soutenue en permettant à la cellule d'échapper à cette inhibition. Deuxièmement, le rebond post-inhibiteur peut déclencher une bouffée de potentiels d'actions (Bertrand & Cazalets, 1998b; Kiehn *et al.*, 2000). Ce courant est présent dans les motoneurones spinaux (Takahashi, 1990a; 1990b) et participe aux transitions de phases au cours de la locomotion (Bertrand & Cazalets, 1998b).

D'autres conductances participent à la formation du rebond post-inhibiteur, comme le **courant calcique à bas seuil de type T**. C'est un courant à faible seuil d'activation, qui se désactive au cours d'une hyperpolarisation. Lorsque l'hyperpolarisation est levée, le courant I_T participe à la formation du rebond post-inhibiteur. Ce courant est retrouvé dans motoneurones (Berger & Takahashi, 1990; Bertrand & Cazalets, 1998b) et les cellules HB9-positives (Bertrand & Cazalets, 1998b; Anderson *et al.*, 2012).

Ces courants sont donc essentiels pour permettre les transitions de phase au cours de la locomotion (Bertrand & Cazalets, 1998b).

III- Neuromodulation

Dans le but de produire un déplacement précis et efficace de l'animal au travers de son environnement, il est nécessaire que l'activité des réseaux spinaux soit flexible et modulable. La neuromodulation représente une source importante de cette flexibilité.

La décharge rythmique des motoneurones qui commandent les mouvements locomoteurs résulte de l'activité et des connexions entre les différents interneurons prémoteurs spinaux. La neuromodulation modifie l'activité locomotrice via plusieurs mécanismes : soit en modulant les propriétés des motoneurones et des interneurons du CPG, soit en modulant les connexions synaptiques entre les interneurons et les motoneurones. Ces deux mécanismes n'affectent pas le rythme de la même manière. Ainsi la modulation des propriétés membranaires des motoneurones va essentiellement modifier l'amplitude ou la durée des bouffées motrices (Berger & Takahashi, 1990; Kjaerulff & Kiehn, 2001). Si les propriétés des bouffées ne sont pas modifiées mais que la fréquence motrice est altérée, alors les neuromodulateurs affectent essentiellement les réseaux prémoteurs (Cazalets *et al.*, 1992; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000a; Zhong, 2006; Han *et al.*, 2007). Dans la plupart des cas, à la fois l'amplitude et la fréquence sont modifiées, suggérant que les CPGs et les motoneurones sont affectés simultanément.

Les principaux neuromodulateurs étudiés dans le contrôle de la locomotion chez les vertébrés sont répartis en trois principales catégories : les amines (5HT, noradrénaline, dopamine), les acides aminés excitateurs et inhibiteurs (glutamate et ses analogues, GABA, glycine), et les peptides (substance P). D'autres molécules n'appartenant pas à ces catégories ont été montrées comme altérant l'activité locomotrice, comme les purines (ATP et adénosine), la D-serine, les endocannabinoïdes, et l'azote (NO). Pour la plupart, ces neuromodulateurs agissent sur des récepteurs couplés à des protéines G, et modulent la concentration en seconds messagers intracellulaires. Ces neuromodulateurs proviennent de deux sources possibles : une source extrinsèque telle que les entrées modulatrices en

provenance des structures supérieures et une source intrinsèque de neuromodulateurs libérés par les cellules spinales (pour revue voir (Harris-Warrick, 2011; Miles & Sillar, 2011))

Il semblerait que les acides aminés excitateurs (AAEs) établissent les caractéristiques temporelles basales du rythme moteur avec une période motrice dépendante de la concentration en AAEs endogènes libérés (Kudo & Yamada, 1987*b*; Cazalets *et al.*, 1992; Beato *et al.*, 1997; Talpalar & Kiehn, 2010). Le rôle principal des amines serait de moduler ce patron basal généré par les AAEs, dans le but de produire un comportement moteur efficace.

Dans cette partie, nous ne considérerons que la neuromodulation du système moteur chez les mammifères, la partie sensorielle ne sera pas abordée.

A) Les acides aminés excitateurs.

Historiquement le NMDA, un acide aminé excitateur agoniste des récepteurs NMDA, a été reporté comme la première molécule capable de déclencher des épisodes de locomotion fictive sur des préparations de moelles épinières isolées de rat nouveau-né (Fig. 7A) (Kudo & Yamada, 1987*b*; Smith & Feldman, 1987).

Le glutamate est connu comme étant le neurotransmetteur excitateur principal dans le système nerveux central. Il est à la fois libéré de manière endogène par les neurones spinaux, et par les voies descendantes (Jordan *et al.*, 2008; Hägglund *et al.*, 2010). Le glutamate a un effet excitateur rapide via l'activation de récepteurs ionotropiques au glutamate (AMPA, NMDA et kaïnate) mais peut aussi agir en se liant à trois groupes de récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (mGluRs I-III) (Beato *et al.*, 1997). L'effet des récepteurs métabotropiques au glutamate dans le système moteur des Vertébrés a été principalement étudié chez la lamproie (Krieger *et al.*, 1998; Manira *et al.*, 2002). Il existe deux sous-types de récepteurs mGluRs de types 1 : les mGluR1 et mGluR5, tous deux localisés en postsynaptique (Krieger *et al.*, 1996), mais modulant la locomotion de manière différente. L'activation des récepteurs mGluR1 augmente la fréquence locomotrice (Krieger *et al.*, 1998), à l'inverse activer les récepteurs mGluR5 ralentit la fréquence locomotrice (Kettunen *et al.*, 2002). Chez la lamproie, les récepteurs mGluRs de type 2 et 3 sont localisés au niveau présynaptique et inhibent la transmission synaptique en bloquant le relargage du glutamate (Cochilla & Alford, 1998). Ainsi, ces récepteurs permettraient un contrôle négatif

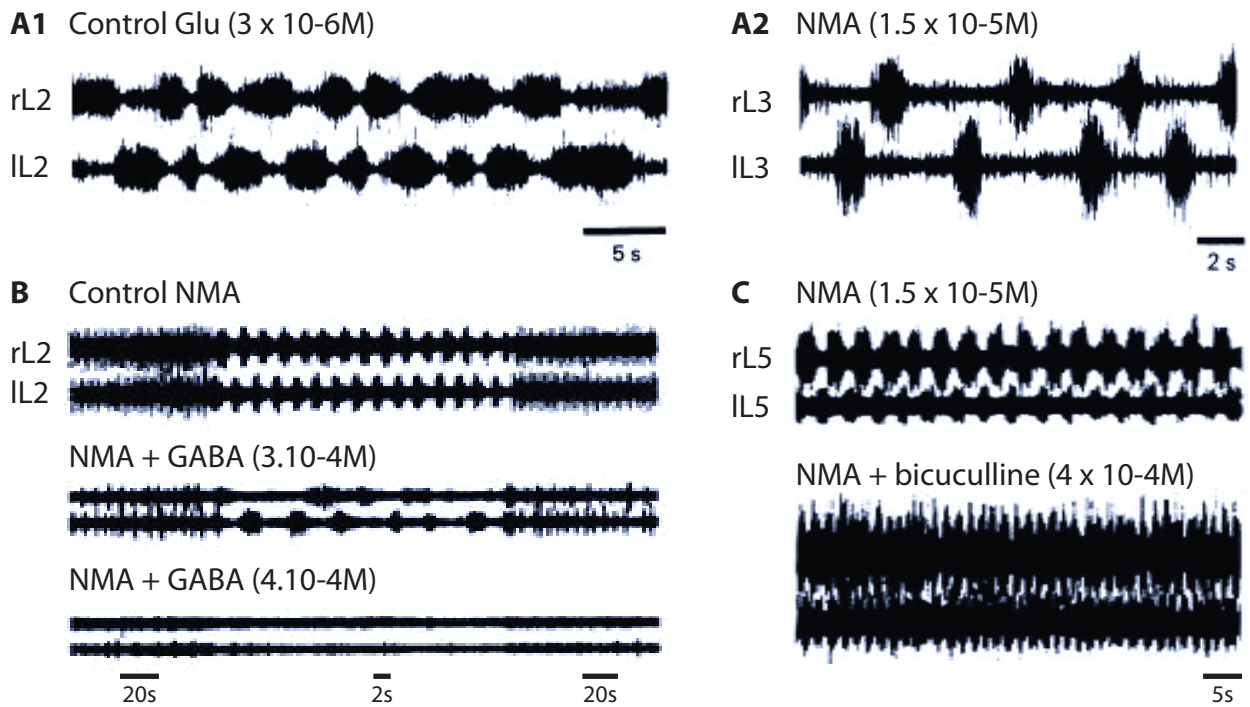


Figure 7 : Les acides aminés.

(A1) Activité locomotrice induite par la perfusion de glutamate, enregistrée au niveau des racines lombaires L2 droite (rL2) et gauche (IL2). (A2) Activité locomotrice induite par la perfusion de NMA (un agoniste glutamatergique) enregistrée au niveau des racines lombaires L3 droite (rL3) et gauche (IL3) (modifié d'après Cazalets *et al.*, 1992). (B) Locomotion fictive induite par perfusion de NMA sur la préparation est progressivement ralentie lors de la perfusion de GABA avant d'être complètement inhibée. Différentes échelles de temps sont utilisées pour montrer clairement la régularité de l'activité motrice. (C) Activité motrice enregistrée lors de la perfusion de doses élevées de NMA associées à une faible dose de bicuculline. Dans cette condition, la période locomotrice accélère. L'activité est enregistrée au niveau des racines ventrales lombaires droite et gauche, respectivement rL2 et IL2 (modifié d'après Cazalets *et al.*, 1994).

de la transmission excitatrice et leur activation ralentit la locomotion fictive (Krieger *et al.*, 1996).

Chez les rongeurs l'activation des mGluR1 module, mais n'induit pas l'activité locomotrice sur les préparations de moelle épinière isolée. L'application d'agonistes aux récepteurs mGluR de groupe 1 sur une moelle épinière isolée de rat, peut soit ralentir le rythme soit interrompre complètement l'activité locomotrice (Taccola *et al.*, 2004b). À l'inverse, des travaux réalisés sur des moelles épinières isolées de souris montrent une augmentation de l'activité locomotrice lors de l'activation des mGluR1 (Iwagaki & Miles, 2011), en accord avec les résultats obtenus chez la lamproie. Il a également été montré qu'en plus de moduler la fréquence locomotrice, les mGluR1 affectent aussi l'amplitude des bouffées motrices chez la souris, ce qui indique que la modulation induite par les mGluR1 agit à la fois sur les interneurons du CPG et les motoneurons. Ainsi, au niveau des motoneurons, il a été montré que l'application d'agonistes aux récepteurs mGluR1 dépolarise le potentiel de membrane à la fois chez le rat et la souris (Marchetti *et al.*, 2003; Iwagaki & Miles, 2011). Chez la souris, l'activation des mGluR1 augmente le seuil de déclenchement des potentiels d'actions, ce qui entraîne une diminution de la décharge des motoneurons (Iwagaki & Miles, 2011). Il a également été montré que les mGluR1 modulent la transmission synaptique. Ainsi chez le rat, les mGluR1 dépriment la transmission impliquée dans la voie sensorimotrice ainsi que les transmissions inhibitrices récurrentes en provenance des cellules de Renshaw (Marchetti *et al.*, 2003; 2005). Chez la souris, ils dépriment les entrées excitatrices locomotrices arrivant sur les motoneurons (Iwagaki & Miles, 2011).

Bien que la plupart des travaux se soient concentrés sur les mGluR1, l'activation des récepteurs de types 2 et 3 module également l'activité locomotrice chez les rongeurs. L'application d'un agoniste aux récepteurs mGluR3 ralentit le rythme locomoteur induit par application de NMA et 5HT. L'activation de ces deux récepteurs entraîne également une dépression de la transmission sensorimotrice chez le rat (Taccola *et al.*, 2004a).

B) Les acides aminés inhibiteurs : GABA et Glycine.

Il existe un nombre très important d'interneurones inhibiteurs au sein de la moelle épinière, comme par exemple les interneurones inhibiteurs Ia (Hultborn *et al.*, 1971; Feldman & Orlovsky, 1975), les cellules de Renshaw (Renshaw, 1946) et les interneurones inhibiteurs commissuraux (Butt & Kiehn, 2003; Lanuza *et al.*, 2004). Ces interneurones inhibiteurs contrôlent des aspects clés du patron locomoteur tel que l'alternance bilatérale et l'alternance fléchisseurs-extenseurs, mais ils peuvent aussi moduler le rythme de l'activité locomotrice.

La glycine est depuis longtemps considérée comme le neurotransmetteur inhibiteur impliqué dans les connexions inhibitrices réciproques à la base de l'alternance droite-gauche et fléchisseurs-extenseurs. Ainsi l'application de strychnine, un antagoniste glycinergique, sur une préparation de moelle épinière isolée de rat désorganise totalement l'activité locomotrice (Cazalets *et al.*, 1996). Il est difficile d'étudier le rôle modulateur d'un neurotransmetteur qui contrôle l'organisation du patron moteur. Toutefois des travaux ont montré que l'application de glycine sur une moelle épinière isolée *in vitro* inhibe la locomotion fictive induite par l'application de NMA, d'acétylcholine et de sérotonine, ce qui suggère un effet neuromodulateur de la glycine sur le rythme locomoteur (Cowley & Schmidt, 1995).

Ajoutée à cette modulation glycinergique, on retrouve une expression étendue des récepteurs métabotropiques GABA_B le long de la moelle épinière (Towers *et al.*, 2000; Charles *et al.*, 2003) suggérant un potentiel rôle modulateur de l'activité locomotrice via des transmissions inhibitrices GABAergiques. Lorsque l'activité locomotrice est établie par perfusion de NMA sur la préparation de moelle épinière isolée de rat nouveau-né, l'ajout de GABA provoque selon sa concentration soit un ralentissement du rythme et une diminution de l'amplitude des bouffées motrices, soit un arrêt de l'activité (Fig. 7B). Cet effet passe à la fois par les récepteurs GABA_A et GABA_B. En effet l'application d'agonistes GABA_A (muscimol) et GABA_B (baclophen) bloque l'activité locomotrice. À l'inverse, l'application d'antagonistes des deux sous types de récepteurs, bicuculline (GABA_A) et phaclophen (GABA_B) entraîne une accélération du rythme locomoteur induit par le NMA (Fig. 7C) (Cazalets *et al.*, 1994).

Les récepteurs GABAergiques sont aussi impliqués dans la modulation de la transmission sensorimotrice. Ainsi, l'application d'un agoniste aux récepteurs GABA_B va déprimer la transmission synaptique. De nombreuses études réalisées chez le rongeur (Wang & Dun, 1990; Bertrand & Cazalets, 1999) ont montré que la principale action neuromodulatrice des récepteurs GABA_B est d'inhiber la libération des neurotransmetteurs au niveau présynaptique, et n'a pas ou peu d'effets sur les propriétés postsynaptiques des motoneurones. À l'inverse, les récepteurs GABA_A agiraient sur les mécanismes postsynaptiques (Bertrand & Cazalets, 1998a; 1999).

C) La sérotonine (5HT)

La 5HT est une molécule qui joue un rôle clé dans le développement et la modulation de la locomotion. Chez les mammifères, la 5HT arrivant sur la moelle épinière provient du noyau raphé situé dans le tronc cérébral. Des neurones sérotoninergiques ont également été trouvés un niveau du segment sacré de la moelle épinière (Ballion *et al.*, 2002). Les cibles neuronales de la 5HT au sein de la moelle épinière incluent les motoneurones (Alvarez *et al.*, 1998), les cellules de Renshaw (Carr *et al.*, 1999), les interneurones commissuraux des laminae VII et VIII (Hammar *et al.*, 2004; Zhong, 2006), ainsi que les interneurones V0c (Zagoraïou *et al.*, 2009), V2 (Al-Mosawie *et al.*, 2007) et Hb9 (Wilson *et al.*, 2005).

En 1969, Viala et Buser ont montré que l'administration intraveineuse de 5-HTP, un précurseur de la 5HT, sur des lapins anesthésiés et paralysés présentant un système nerveux intact, déclenche une décharge de locomotion fictive au niveau des nerfs fléchisseurs des membres postérieurs. Ces résultats ont été retrouvés chez des lapins spinalisés, où l'injection intraveineuse de 5-HTP entraîne une activité de locomotion fictive au niveau des nerfs fléchisseurs (Viala & Buser, 1971). Barbeau et Rossignol ont examiné l'effet de l'injection intraveineuse d'agonistes des récepteurs 5HT sur l'initiation et la modulation de la locomotion chez le chat spinalisé en T13. Ils ont montré que, bien que la 5HT seule ne suffise pas à déclencher de la locomotion, les substances sérotoninergiques sont capables de moduler de la locomotion entraînée par un tapis roulant. Ainsi, les précurseurs et les agonistes des récepteurs 5HT augmentent la longueur du pas, ainsi que la durée et l'amplitude de l'activité EMG des membres postérieurs fléchisseurs et extenseurs (Barbeau & Rossignol, 1991). De plus, chez des chats spinalisés après une transection partielle de la

moelle épinière, l'injection de précurseurs de la 5HT ou d'agonistes augmente la régularité de la marche au cours de la phase de récupération (Barbeau & Rossignol, 1990). La 5HT est également capable d'induire et de faciliter la récupération de l'activité locomotrice chez des rats adultes spinalisés (Antri *et al.*, 2005).

Chez le rat, il a été montré que l'application de 5HT sur une préparation de moelle épinière isolée déclenche une activité de locomotion fictive enregistrée au niveau des racines lombaires (Fig. 8A) (Cazalets *et al.*, 1990; 1992; Sqalli-Houssaini *et al.*, 1993; Cowley & Schmidt, 1994; Nishimaru *et al.*, 1999; Madriaga *et al.*, 2004). Si la 5HT peut activer les réseaux locomoteurs de moelle épinière isolée de rat, elle a également un rôle de modulateur sur cette préparation (Fig. 8B). La 5HT agit sur de nombreux sous types de récepteurs présents au sein de la moelle épinière ventrale: 5HT_{1A} et 5HT_{1B}, 5HT₂, et 5HT₇, et ses effets modulateurs vont varier en fonction du sous-type de récepteurs activé.

L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques à ces récepteurs a permis de mettre en évidence que la 5HT peut avoir à la fois un rôle excitateur et inhibiteur. L'activation des récepteurs 5HT₂ et 5HT₇ permet une facilitation de l'activité locomotrice, en augmentant la fréquence et l'amplitude de l'activité motrice enregistrée sur des préparations *in vitro* (Madriaga *et al.*, 2004; Landry *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009) (Cazalets *et al.*, 1992; Beato & Nistri, 1998; Schmidt & Jordan, 2000; Pearlstein *et al.*, 2005). L'application d'antagonistes aux récepteurs 5HT_{2A} et 5HT₇ ralentie l'activité de locomotion fictive déclenchée par une stimulation électrique du tronc cérébral (Liu, 2005). De faible dose d'antagonistes aux récepteurs 5HT₇ augmente la durée du cycle de marche et désorganise le patron moteur (Jordan *et al.*, 2008) ; suggérant une action sur les neurones du CPG impliqués dans la génération du rythme locomoteur. L'application d'antagoniste aux récepteurs 5HT_{2A} réduit l'amplitude des bouffées d'activité motrices sans affecter la durée du cycle, suggérant un effet directement sur les motoneurones (Liu, 2005; Jordan *et al.*, 2008). De plus, l'activation des récepteurs 5HT₂ et 5HT₇ renforce et stabilise l'alternance bilatérale et fléchisseurs/extenseurs au cours de la locomotion fictive (Pearlstein *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). À l'inverse, l'activation des récepteurs 5HT_{1A} et 5HT_{1B} a un effet inhibiteur en ralentissant la fréquence du rythme locomoteur (Beato & Nistri, 1998; Dunbar *et al.*, 2010). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que la 5HT module l'activité des motoneurones ou des interneurones de dernier ordre pour influencer sur l'amplitude de la

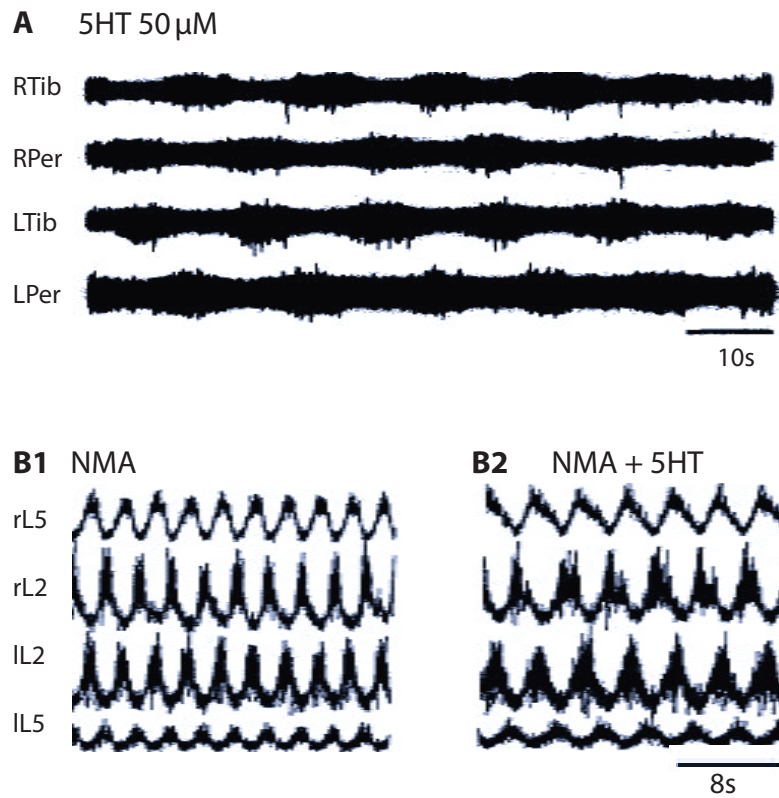


Figure 8 : La sérotonine

(A) La perfusion de 5HT sur une préparation de moelle épinière isolée déclenche une activité de locomotion fictive présentant une alternance droite-gauche (r et l respectivement) et fléchisseur-extenseur, enregistrée bilatéralement au niveau des nerfs fléchisseurs (Tib) et extenseurs (per). (modifié d'après Cowley & Schmidt, 1994). (B1) : La locomotion fictive induite par le NMA est (B2) ralentie par l'ajout de 5HT dans le bain de perfusion. (modifié d'après Beato & Nistri, 1998)

sortie motrice finale, mais module aussi les interneurones impliqués dans la genèse du rythme et ainsi modifie la fréquence et la coordination de l'activité motrice.

La modulation de l'activité des motoneurones par la 5HT passe par plusieurs mécanismes cellulaires, comme les courants entrants persistants (PICs). Les PICs et les potentiels de plateaux associés, sont entraînés par l'activation des récepteurs 5HT chez le chat (Hounsgaard *et al.*, 1988; Crone *et al.*, 1988) et le rat (Bennett *et al.*, 2001; Harvey, 2006b; Li *et al.*, 2007). Cet entraînement va permettre la facilitation des courants entrants persistants sodique et calcique et réduire les courants potassiques (Hounsgaard & Kiehn, 1989; Berger & Takahashi, 1990; Perrier, 2002; Harvey, 2006b; Li *et al.*, 2007). C'est cette modulation des PICs au sein des motoneurones qui contribue aux effets modulateurs de la 5HT sur l'amplitude des sorties motrices des réseaux spinaux. Mais la 5HT influence également d'autres propriétés motoneuronales : elle diminue la sensibilité des récepteurs NMDA, ce qui facilite les oscillations dépendantes des NMDARs (Maclean *et al.*, 1998; Maclean & Schmidt, 2001) et module les canaux potassiques rectifiants entrants et les courants I_h (Kjaerulff & Kiehn, 2001).

En plus de la modulation des motoneurones, la 5HT module les propriétés intrinsèques des interneurones spinaux via plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation de la fréquence locomotrice. L'effet le plus commun de la 5HT est de dépolariser le potentiel membranaire de repos des interneurones et de diminuer le seuil de déclenchement des potentiels d'actions (Carlin, 2005; Zhong, 2006; Dai *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2010). La 5HT réduit également l'amplitude de l'AHP dans les interneurones locomoteurs et module les courants I_h et les PICs (Dai *et al.*, 2009; Dai & Jordan, 2010).

Enfin, en plus d'affecter la locomotion via la modulation des propriétés intrinsèques des neurones spinaux, la 5HT peut également exercer ses effets en modulant la transmission synaptique. La modulation de la transmission synaptique dans la moelle épinière ventrale comprend la modulation des entrées sensorielles et descendantes sur les interneurones spinaux chez le chat (Jankowska *et al.*, 2000; Hammar *et al.*, 2004; 2007) et l'entrée sensorielle sur les motoneurones chez le rat (Barrière *et al.*, 2008).

D) La noradrénaline (NA)

Les neurones noradrénergiques projetant sur la moelle épinière proviennent de deux structures situées au niveau du bulbe et du pont : le locus coeruleus et les noyaux subcoeruleus Kolliker-Fuse et parabrachialis (Westlund *et al.*, 1983; Ono & Fukuda, 1995; Giroux *et al.*, 1999). Ces entrées noradrénergiques projettent sur les motoneurones (Rajaofetra *et al.*, 1992; Gladden *et al.*, 2000), les interneurones commissuraux (Hammar *et al.*, 2004), et les interneurones prémoteurs de la lamina VII (Maxwell *et al.*, 2000). On retrouve une expression généralisée de récepteurs adrénergiques (α_1 , α_2 , β) dans la moelle épinière de mammifères (Roudet *et al.*, 1994; Giroux *et al.*, 1999; Noga *et al.*, 2011).

Tout comme la 5HT, la noradrénaline peut à la fois initier et moduler la locomotion fictive. Chez des chats spinalisés, l'activation des récepteurs noradrénergiques, et en particulier des récepteurs α_2 , stimule l'activité locomotrice (Forssberg & Grillner, 1972; Barbeau & Rossignol, 1991; Kiehn *et al.*, 1992; Chau *et al.*, 1998). À l'inverse, la noradrénaline appliquée sur une moelle épinière isolée de rat déclenche une activité rythmique non-locomotrice très lente (Fig. 9A) (Kiehn *et al.*, 1999; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000a; Gabbay, 2004). Toutefois, sur ces deux modèles, l'application de noradrénaline au cours d'une activité de locomotion fictive ralentit le rythme et augmente l'amplitude des EMGs ou de l'activité enregistrée au niveau des racines ventrales (Chau *et al.*, 1998; Kiehn *et al.*, 1999; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000a). L'utilisation d'agonistes spécifiques a permis de déterminer que l'effet modulateur de la noradrénaline sur la locomotion dépend du sous-type de récepteur activé. Sur une moelle épinière de rat nouveau-né, l'activation spécifique des récepteurs α_2 provoque une diminution de la fréquence de l'activité locomotrice mais n'a pas d'effet sur l'amplitude des bouffées (Fig. 9C) (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b). À l'inverse, l'activation des récepteurs α_1 augmente l'activité locomotrice et diminue l'amplitude des bouffées motrices (Fig. 9B) (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b). Il semblerait donc que l'effet dominant de la noradrénaline sur les neurones spinaux soit une augmentation de l'excitabilité, via l'activation des récepteurs α_1 , tandis que l'activation des récepteurs α_2 et β inhibe l'activité locomotrice (Fig. 9D) (Elliott *et al.*, 1991; Ono & Fukuda, 1995; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000a; Tartas *et al.*, 2010).

Tout comme la 5HT, la noradrénaline module de nombreuses propriétés intracellulaires. Elle facilite les courants entrants persistants et les potentiels de plateaux

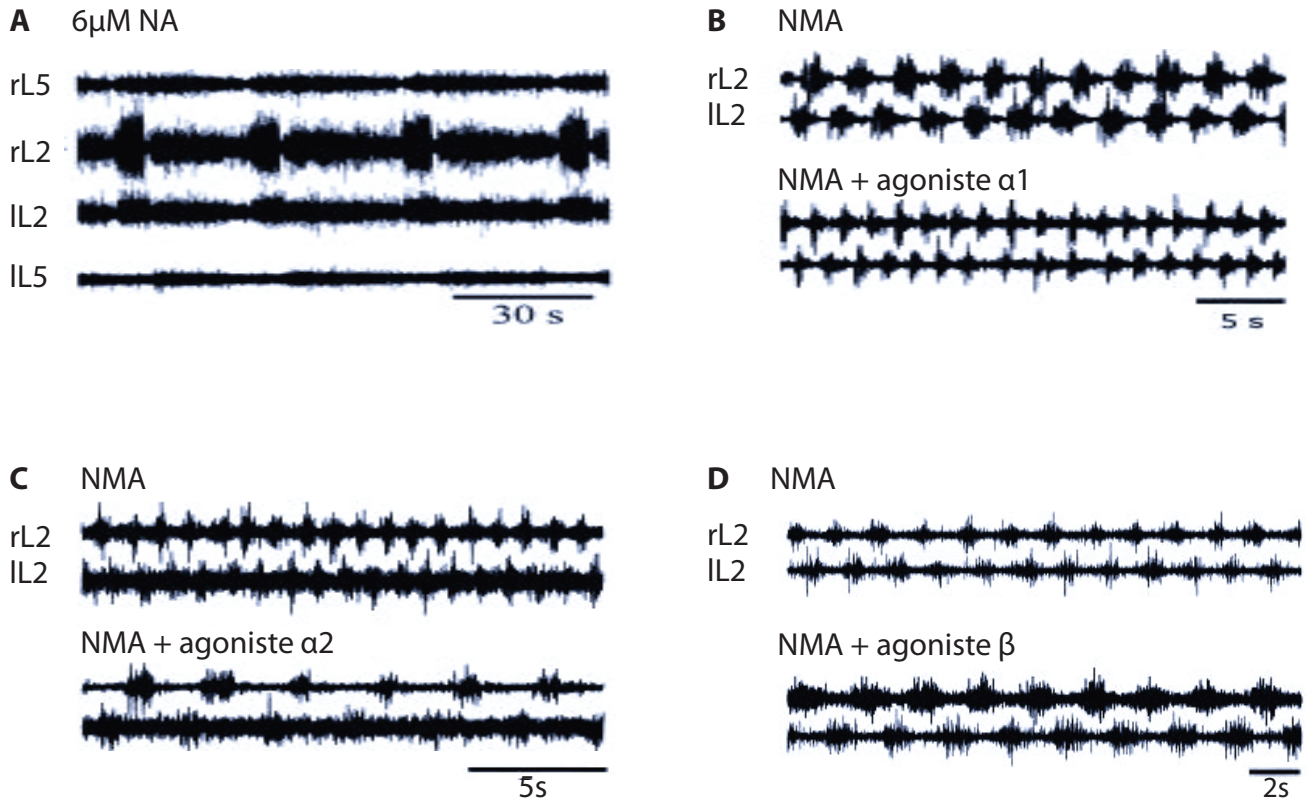


Figure 9 : La noradrénaline

(A) L'application de noradrénaline sur une moelle épinière isolée déclenche des bouffées d'activité alternées enregistrées bilatéralement au niveau des racines lombaires L2 (rL2et IL2) et L5 (rL5et IL5). (modifié d'après Kiehn *et al.*, 1999). (B) La perfusion d'un agoniste α 1 (methoxamine) accélère l'activité locomotrice induite par le NMA. (C) La perfusion d'un agoniste α 2 (xylazine) ralentie l'activité locomotrice induite par le NMA. (D) La perfusion d'un agoniste β augmente l'amplitude des bouffées et ralentie le rythme locomoteur entraîné par le NMA. (modifié d'après Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000)

(Conway *et al.*, 1988; Lee & Heckman, 1999; Theiss & Heckman, 2005), diminue les courants potassiques rectifiants entrants (Tartas *et al.*, 2010) et hyperpolarise le seuil de déclenchement des potentiels d'actions (Fedirchuk & Dai, 2004). Toutefois, à l'inverse de la 5HT, la noradrénaline semble avoir peu d'effet modulateur sur l'AHP (Tartas *et al.*, 2010).

L'activation des récepteurs noradrénergiques, peut aussi altérer l'activité locomotrice en modulant les connexions synaptiques au sein de la moelle épinière. Des expériences menées sur des moelles épinières isolées de rat ont montré que l'application de noradrénaline révèle des voies excitatrices récurrentes qui participent à la modulation de l'activité locomotrice en augmentant la fréquence de l'activité rythmique (Machacek & Hochman, 2006). La noradrénaline augmente également la commande synaptique arrivant sur les motoneurones dans la moelle épinière isolée de rat (Tartas *et al.*, 2010), ce qui contribue à l'augmentation de l'amplitude des bouffées motrices. Enfin, comme la 5HT, la noradrénaline peut moduler les entrées en provenance des voies descendantes projetant sur les interneurones médullaires chez le chat (Hammar *et al.*, 2004; 2007) ainsi que les entrées sensorielles projetant que les motoneurones chez le rat (Barrière *et al.*, 2008).

E) La dopamine (DA)

Chez les mammifères, les voies dopaminergiques en provenance principalement de la région hypothalamique A11, sont distribuées tout le long de la corne ventrale de la moelle épinière (Weil-Fugazza & Godefroy, 1993; Holstege *et al.*, 1996). De plus, tous les sous-types de récepteurs dopaminergiques (D1-D5) sont exprimés dans la moelle ventrale (Zhu *et al.*, 2007; 2008).

La dopamine n'est pas aussi efficace que la 5HT ou la noradrénaline pour initier l'activité locomotrice. Chez des chats spinalisés, l'application d'agonistes dopaminergiques ne parvient pas à induire de la locomotion (Barbeau & Rossignol, 1991). L'injection de L-DOPA chez des rats nouveau-nés provoque des épisodes de pédalage dans l'air (Van Hartesveldt *et al.*, 1991; Stehouwer *et al.*, 1994; Jamon *et al.*, 2002). Chez les rongeurs, l'efficacité de la dopamine pour induire de la locomotion varie selon les espèces. Dans les préparations de moelles épinières isolées de rat nouveau-né, la dopamine peut déclencher des épisodes de locomotion fictive, bien que l'activité soit beaucoup plus lente que celle induite par la 5HT et plus irrégulière (Fig. 10A) (Kiehn & Kjaerulff, 1996; Barrière *et al.*, 2004).

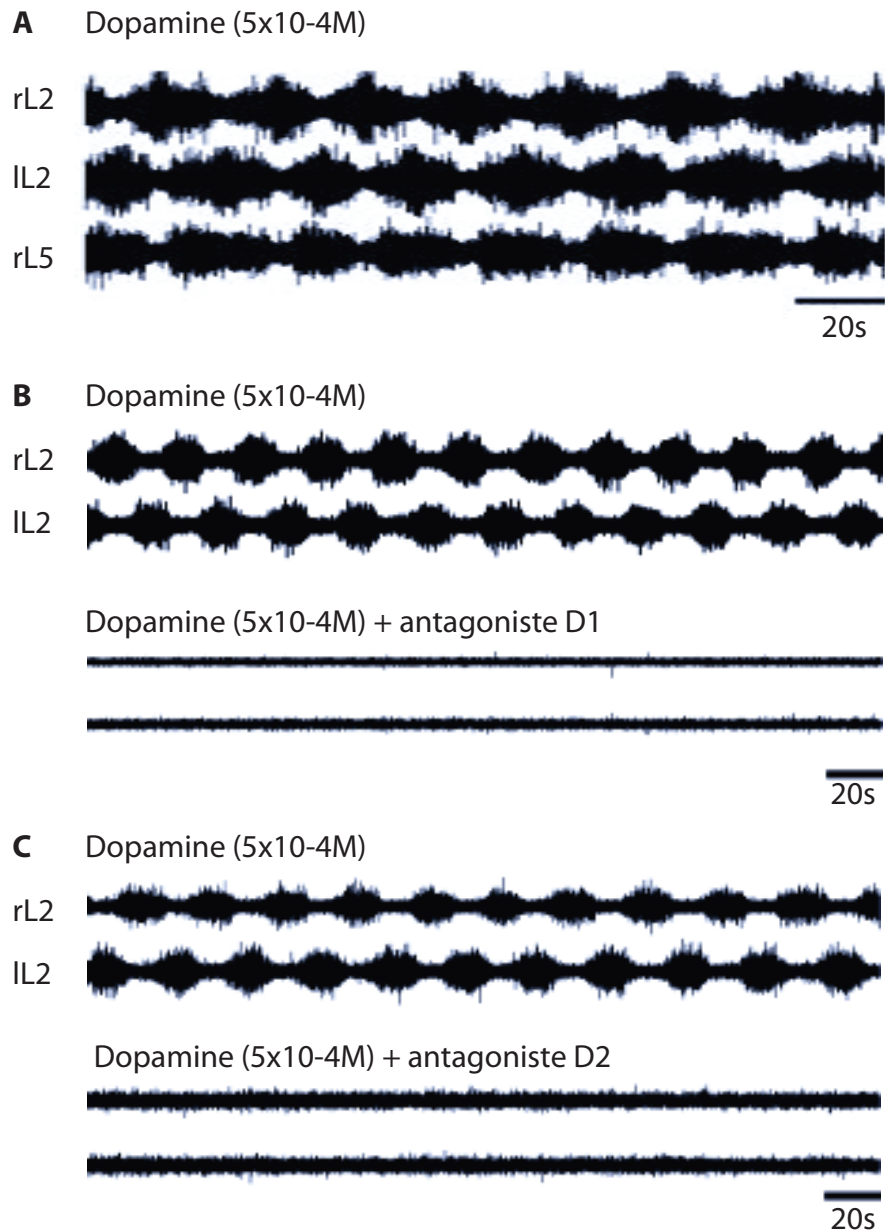


Figure 10 : La dopamine

(A) La perfusion de dopamine sur la moelle épinière déclenche des bouffées d'activités lentes avec une alternance droite-gauche (rL2-IL2) et fléchisseur-extenseur (rL2-rL5). (B) L'activité rythmique induite par la dopamine est complètement abolie lors de la perfusion d'un antagoniste D1 (SCH-23390) et (C) D2 (raclopride) indiquant que les récepteurs D1 et D2 sont impliqués dans la réponse dopaminergique (modifié d'après Barrière *et al.*, 2004).

Cette activité locomotrice est induite par l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 (Fig. 10B et C) (Barrière *et al.*, 2004). L'injection d'antagonistes aux récepteurs dopaminergiques D1 et D2 inhibe la genèse d'épisode de pédalage dans l'air induit par la L-DOPA, chez le rat nouveau-né (McCrea *et al.*, 1997). En revanche, dans des préparations de moelles épinières isolées de souris néonatales, l'activation des seuls récepteurs à la dopamine n'est pas suffisante pour induire une activité locomotrice. Toutefois il a été montré que la 5HT n'est plus capable d'entraîner de la locomotion fictive lorsque des antagonistes dopaminergiques D1 et D2 sont appliqués dans le bain de perfusion (Madriaga *et al.*, 2004). Cela suggère que l'activation des récepteurs dopaminergiques (principalement D1 et D2) par la dopamine endogène est nécessaire pour déclencher une activité locomotrice fictive induite par la 5HT.

Que ce soit chez le chat ou chez le rongeur, la dopamine peut moduler l'activité locomotrice. Chez le chat, l'activation des récepteurs dopaminergiques augmente l'amplitude de l'activité du muscle fléchisseur lors de la locomotion (Barbeau & Rossignol, 1991), ce qui suggère que l'effet principal de la dopamine a lieu au niveau des motoneurones. En comparaison, dans des préparations de moelles épinières isolées de rongeurs, l'activation des récepteurs dopaminergiques ralentit le rythme locomoteur initié par l'application d'acides aminés excitateurs ou de NMA/5HT, tout en augmentant l'amplitude des bouffées motrices (Whelan *et al.*, 2000; Barrière *et al.*, 2004; Gordon & Whelan, 2006). Ainsi, chez les rongeurs, la dopamine semble susceptible de moduler à la fois l'activité des interneurones impliqués dans la génération du rythme et les motoneurones.

L'analyse des mécanismes par lesquels l'activation des récepteurs dopaminergiques module les neurones spinaux chez les mammifères est actuellement limitée aux motoneurones et aux interneurones Hb9. Ainsi sur des préparations de moelle épinière isolée de souris, il a été montré que l'application de dopamine augmente l'excitabilité des motoneurones en modulant notamment les courants potassiques Ca^{2+} -dépendants (SK_{CA}), ainsi que les courants I_A (Han *et al.*, 2007). De plus, l'activation des récepteurs dopaminergique D1 augmente l'amplitude du courant AMPA (Han & Whelan, 2009). Dans le cas des interneurones Hb9, l'application de la dopamine est nécessaire, mais pas suffisante pour induire un comportement oscillatoire, qui pourrait participer à la genèse du rythme locomoteur (Wilson *et al.*, 2005; Han & Whelan, 2009). En plus de moduler les propriétés intrinsèques des motoneurones et des interneurones Hb9, la dopamine peut également

moduler les entrées synaptiques arrivant sur les motoneurones et va notamment déprimer la transmission sensori-motrice (Carp & Anderson, 1982; Clemens & Hochman, 2004; Barrière *et al.*, 2008).

IV- Le contrôle postural

Les animaux et les humains stabilisent activement l'orientation de leur corps dans l'espace grâce au système de contrôle postural. Chez l'homme, ce système est indispensable pour permettre la station debout, durant la marche, mais sert également de support pour permettre la réalisation de mouvements volontaires. Il existe deux types d'ajustements posturaux : les ajustements posturaux anticipés (feed forward) qui modifient la posture avant l'initiation du mouvement et facilite sa réalisation, et les ajustements posturaux correcteurs (feedback) qui apparaissent suite à un déséquilibre postural. Dans ce chapitre, seuls les ajustements posturaux correcteurs seront traités.

Contrairement à l'appareil locomoteur qui a été analysé en détail chez un certain nombre d'espèces, l'étude des mécanismes et des réseaux posturaux est beaucoup moins avancée, en raison notamment de la difficulté à étudier la boucle de contrôle postural. Des études menées chez le chat décérébré ont montré que cette boucle de contrôle implique de nombreuses structures à la fois supraspinales et spinales.

A) Structures impliquées dans le contrôle postural

a- Mécanismes supraspinaux

Il a été montré qu'un chat décérébré peut toujours, s'asseoir, se lever et marcher (Bard & Macht, 1958). Lorsqu'il est positionné sur le côté, l'animal présente un ensemble de réflexes lui permettant de se redresser et de retrouver une posture normale, face dorsale vers le haut (Bard & Macht, 1958). Ces résultats suggèrent qu'une part essentielle des mécanismes responsables du contrôle postural chez les mammifères est située sous le niveau de décérébration (tronc cérébral, cervelet, moelle épinière).

Toutefois, la participation du cortex moteur dans le contrôle de la posture a été mise en évidence. Des enregistrements de neurones du cortex moteur chez le lapin ont montré

que la plupart des neurones de la couche 5 (qui donnent lieu au faisceau corticospinal) sont modulés au cours d'ajustements posturaux induits par des inclinaisons latérales de la plateforme sur laquelle repose l'animal (Beloozerova *et al.*, 2005). Bien que le cortex moteur ne soit pas nécessaire pour la stabilisation basale de la posture (Bard & Macht, 1958), on peut remarquer que la contribution corticale est importante pour l'acquisition de nouvelles synergies posturales (Ioffe *et al.*, 2003). Des patients présentant des lésions au niveau corticospinal ont des difficultés à déplacer leur centre de pression de manière volontaire et à apprendre une nouvelle tâche nécessitant une coordination posturale fine (Ioffe *et al.*, 2003).

L'implication du tronc cérébral et du cervelet dans le contrôle postural a été confirmée par deux expériences. Il a été montré que des stimulations électriques de sites spécifiques de tronc cérébral (aire tegmentale ventrale et dorsale) et du cervelet (noyau dentelé) affectent de manière très importante le tonus des muscles extenseurs (Mori *et al.*, 1989; Asanome *et al.*, 1998). De plus, des enregistrements intracellulaires de neurones réticulospinaux sur un animal intact debout, ont montré que ces neurones se mettent à décharger de manière très importante lorsque l'équilibre du chat est perturbé (Stapley & Drew, 2009). De même, au cours de la marche sur un plan incliné, ces cellules vont présenter un patron de décharge modifié lors d'un changement d'inclinaison de la plateforme (Matsuyama & Drew, 2000).

Au niveau supraspinal, le système responsable de la détection de la position de la tête et du corps dans l'espace est le système vestibulaire, situé au niveau bulbaire. Le système vestibulaire est composé de deux types de structures différentes : les organes otolithiques, qui détectent la force de gravité et les inclinaisons de la tête, et les canaux semi-circulaires sensibles aux rotations de la tête.

Les organes otolithiques comprennent deux structures : l'utricule et le saccule, sensibles aux accélérations linéaires. Chaque organe à otolithes contient un épithélium sensoriel dénommé macula, orienté verticalement dans le saccule et horizontalement dans l'utricule. Cette disposition particulière permet au saccule d'être sensibles aux accélérations verticales et à l'utricule de détecter les accélérations latérales et sagittales (Igarashi, 1967; Naganuma *et al.*, 2003). Les organes otolithiques sont caractérisés par la présence d'une fine couche de carbonates de calcium qui sont responsables de la sensibilité de la macula à l'inclinaison de la tête. En effet, lors de la réalisation d'un mouvement, leur poids va les

entraîner dans le sens du mouvement et ainsi activer les cellules ciliées présentes dans la macula. Les canaux semi-circulaires sont sensibles aux accélérations angulaires. Ils sont composés d'un ensemble de trois structures en arceaux disposées de manière orthogonale, et contiennent également des cellules ciliées dont le déplacement va permettre de détecter le mouvement.

Les afférences vestibulaires primaires de la VIIIème paire de nerfs crâniens se projettent directement et ipsilatéralement sur les noyaux vestibulaires du tronc cérébral (Barmack, 2003). Chez la grenouille, deux types de neurones vestibulaires secondaires ont été identifiés sur la base de leurs caractéristiques électrophysiologiques : les neurones toniques qui déchargent de manière continue et les neurones phasiques qui répondent de manière transitoire à une dépolarisation de longue durée (Straka *et al.*, 2004). Ces neurones sont sensibles à des fréquences de stimulations différentes, les neurones toniques déchargent pour des fréquences basses de stimulation (<10Hz), puis cessent de décharger pour des fréquences supérieures, alors que les neurones phasiques répondent pour des fréquences voisines de 20Hz (Beraneck *et al.*, 2007; Straka *et al.*, 2009). Chez les rongeurs, deux types de neurones vestibulaires secondaires ont été identifiés : les neurones de types A et B, caractérisés sur la base de leurs propriétés membranaires intrinsèques, notamment sur la régularité de leur décharge et sur la forme et l'amplitude de leur AHP (Serafin *et al.*, 1991; Johnston *et al.*, 1994; Lac & Lisberger, 1995). Ainsi, en réponse à une dépolarisation prolongée, les neurones de type A déchargent de manière tonique et constante sur les gammes de courants testés, alors que les neurones de types B présentent des réponses plus complexes avec une adaptation à la décharge (Eugène *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que lors du traitement des informations vestibulaires, les neurones de types A correspondraient à la composante tonique linéaire alors que les neurones de type B seraient responsables de la composante phasique non linéaire.

La plasticité du système vestibulaire a été étudiée à l'aide d'une labyrinthectomie, qui représente une déafférentation fonctionnelle des noyaux vestibulaires. Dans cette condition, l'activité spontanée des afférences vestibulaires sensorielles est supprimée, ce qui prive les neurones vestibulaires secondaires de leurs entrées excitatrices mais préserve les corps cellulaires des neurones. Cette lésion entraîne un déséquilibre entre la décharge des noyaux vestibulaires situés des deux côtés du tronc cérébral, ce qui provoque notamment un nystagmus oculaire et une forte instabilité posturale (Curthoys & Halmagyi, 1995; Dieringer,

1995). Suite à la lésion un ensemble de processus cellulaires et comportementaux appelé compensation vestibulaire apparaissent et permet une restauration fonctionnelle partielle. On observe une réorganisation des connexions synaptiques et une modification progressive des propriétés membranaires neuronales. Un mois après la lésion, la proportion de neurones de types A est augmentée du côté lésé et diminué du côté opposé à la lésion suite à des modifications des propriétés membranaires (Beraneck *et al.*, 2003; 2004).

Lors d'une rotation de la tête, l'activation des afférences vestibulaires d'un côté va entraîner l'inhibition des afférences vestibulaires du côté opposé grâce à des connexions commissurales inhibitrices (Shimazu & Precht, 1966). Les noyaux vestibulaires reçoivent également des informations visuelles (Cazin *et al.*, 1980) et proprioceptives (Welgampola & Colebatch, 2001; Marsden *et al.*, 2002; Grasso *et al.*, 2011), mais aussi des projections corticales, cérébelleuses et réticulées, ce qui permet au système vestibulaire d'intégrer et de coordonner les informations des mouvements de la tête et du corps (Fig. 11A). Les noyaux vestibulaires projettent au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière, via deux voies vestibulospinales : le funiculus vestibulospinal latéral (LVST) et le funiculus vestibulospinal médian (MVST). Ce dernier peut projeter sur la moelle épinière de manière ipsilatérale (iMVST) ou contralatérale (cMVST) (Glover & Petursdottir, 1988; Glover, 2000; Pasqualetti *et al.*, 2007; Uchino & Kushiro, 2011). Ces faisceaux innervent les motoneurones spinaux dans des segments distincts (Fig. 11B). Ainsi, le MVST innerve les segments spinaux cervicaux, et contrôle les réflexes posturaux de la nuque, tandis que le LVST innerve les motoneurones cervicaux, thoraciques et lombaires et participe au contrôle des membres et du tronc, contribuant au maintien de la posture érigée (Wilson & Peterson, 1978; Wilson *et al.*, 1995; Anon, 2006; Kasumacic *et al.*, 2010).

b- Mécanismes spinaux

La moelle épinière joue un double rôle dans le contrôle de la posture : elle intègre les commandes motrices supraspinales, et elle reçoit des entrées sensorielles « locales » également impliquées dans les réflexes de contrôle posturaux. Des expériences de lésions ont permis d'étudier l'importance de ces deux fonctions dans le maintien de la stabilité. Un animal présentant une transection complète de la moelle épinière au niveau thoracique bas, n'est plus capable de maintenir une orientation face dorsale vers le haut au niveau de

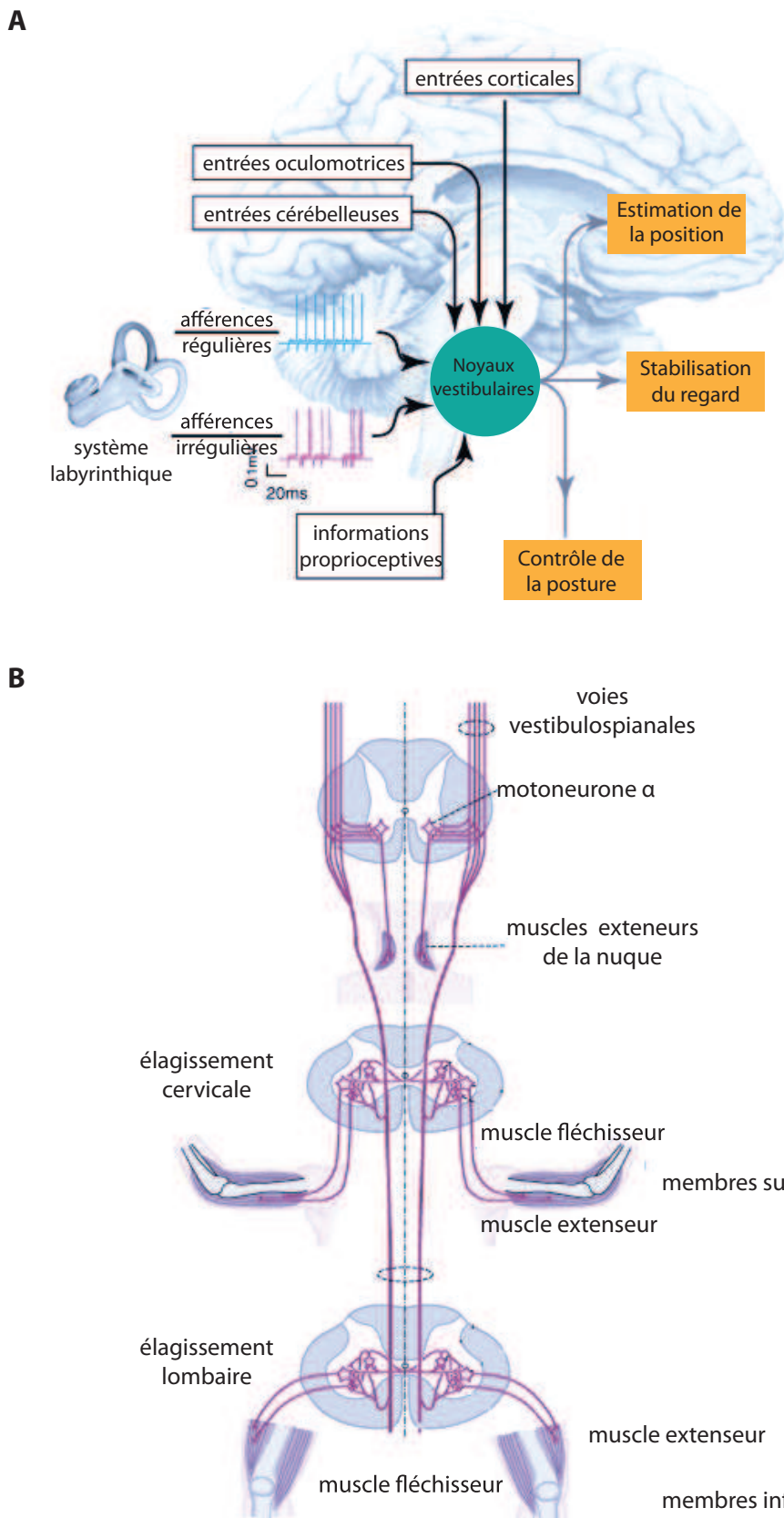


Figure 11 : Le système vestibulaire.

(A) Les noyaux vestibulaires (VN) reçoivent des entrées directes de plusieurs zones du cerveau, notamment: (i) des afférences vestibulaires du nerf VIII, (ii) des noyaux oculomoteurs du tronc cérébral, (iii) du cervelet, et iv) plusieurs régions du cortex (par exemple des zones prémotrices et somatosensorielles, et du cortex temporal supérieur). Les noyaux renvoient ensuite des commandes impliquées dans la stabilisation du regard et de la posture. (modifié d'après Cullen, 2012). (B) Les voies descendantes vestibulospinales projettent à différents niveaux spinaux et permettent de contrôler les réponses motrices de la nuque et des membres. (modifié d'après Uchino & Kushiro, 2011).

l'arrière-train (Macpherson *et al.*, 1997; Macpherson & Fung, 1999), bien qu'une partie du contrôle postural puisse être retrouvé après entraînement (Barbeau & Rossignol, 1987; de Leon *et al.*, 1998; Edgerton *et al.*, 2001). Cette perte du contrôle postural pourrait être expliquée par le fait qu'une transection complète prive la moelle épinière des commandes supraspinales nécessaires au maintien de l'équilibre. Des animaux soumis à une hémisection latérale de la moelle épinière sont, après une courte période de récupération, en mesure de maintenir leur équilibre debout et au cours de la locomotion (Helgren & Goldberger, 1993; Kutzt-Buschbeck *et al.*, 1996; Lyalka *et al.*, 2005; Barriere *et al.*, 2010). Un animal présentant deux hémisections bilatérales, et donc privé des informations descendantes, est capable de récupérer une stabilité latérale au niveau de l'arrière-train (Kato *et al.*, 1985). Après une hémisection ventrale de la moelle épinière, les corrections posturales sont supprimées, ce qui suggère que le faisceau ventral est essentiel pour permettre le contrôle postural. À l'inverse, après une hémisection dorsale de la moelle épinière, les animaux sont capables de rapidement récupérer leur contrôle postural, et de plus les caractéristiques de leur patron EMG sont similaires à ceux observés chez des animaux intacts (Lyalka *et al.*, 2005), ce qui suggère que le faisceau dorsal ne participe pas au contrôle postural.

Les réflexes spinaux sont mis en jeu par deux types d'informations sensorielles : les informations proprioceptives et cutanées. Les fuseaux musculaires et les organes tendineux de Golgi jouent un rôle important en fournissant aux réseaux posturaux des informations sur l'activité des membres (Duysens *et al.*, 2000; Deliagina *et al.*, 2000a). La perte des informations cutanées, notamment au niveau de la plante des pieds, entraîne une instabilité au cours de la station debout et de la locomotion (Meyer *et al.*, 2004; Bolton & Misiaszek, 2009).

B) Les ajustements posturaux

Différentes espèces maintiennent une orientation particulière de leurs corps dans l'espace (verticale chez l'homme, dorsale chez les quadrupèdes et les poissons) grâce à l'activité d'un système de contrôle postural fonctionnant en boucle (Massion, 1992; Deliagina & Orlovsky, 2002). Ce système est sensible à toute modification de l'orientation du corps et provoque des ajustements posturaux. Au cours de la locomotion, le système postural interagit étroitement avec le système locomoteur. La lamproie est un modèle

particulièrement intéressant pour l'étude de la posture, car c'est un animal qui évolue dans un milieu tridimensionnel. Dans ces conditions les informations vestibulaires jouent un rôle primordial pour permettre à la lamproie d'appréhender la position de son corps dans l'espace.

a- Contrôle postural chez la lamproie

Au cours de la nage chez la lamproie, l'orientation du corps dans le plan transversal, horizontal et sagittal est stabilisée par des mécanismes reposant en grande partie sur les entrées vestibulaires (Deliagina *et al.*, 1992; 2000a; Pavlova *et al.*, 2004). Toute déviation de l'orientation du corps est reflétée au niveau des entrées vestibulaires (Deliagina *et al.*, 1992), ce qui provoque un ajustement postural. Dans le plan sagittal et horizontal, les corrections sont apportées grâce à un fléchissement du corps dans la direction opposée à la perturbation (Fig. 12A) (Ullen *et al.*, 1995; McClellan & Hagevik, 1997). Lors d'une perturbation dans le plan transversal, la lamproie va modifier son patron de nage de manière à pouvoir effectuer une rotation qui orientera la face dorsale vers le haut (Zelenin *et al.*, 2003). Chez la lamproie, les commandes permettant les changements de l'orientation du corps sont transmises du tronc cérébral à la moelle épinière via les neurones réticulospinaux (RS) (Brodin *et al.*, 1988; Pavlova & Deliagina, 2002; Deliagina *et al.*, 2002). Grâce aux entrées vestibulaires arrivant sur les neurones réticulospinaux, ces derniers sont sensibles aux rotations dans différents plans, chez l'animal intact mais aussi dans des préparations isolées *in vitro* (Deliagina *et al.*, 1992; 2000b; Pavlova & Deliagina, 2002; Karayannidou *et al.*, 2007; Zelenin *et al.*, 2007). Pour chaque plan, on trouve deux groupes antagonistes de neurones réticulospinaux répondant à des rotations dans des directions opposées (Deliagina *et al.*, 1992; 2000b; Pavlova & Deliagina, 2002). Ces cellules produisent une commande qui permettra à l'animal de corriger son mouvement dans le sens inverse à la perturbation en activant les muscles ventraux ipsilatéraux et dorsaux controlatéraux et en inhibant les muscles ventraux controlatéraux et dorsaux ipsilatéraux (Fig. 12C) (Wannier *et al.*, 1998). Ce système possède un point d'équilibre : il stabilise l'orientation, jusqu'à ce que les réflexes vestibulaires antagonistes se compensent. Cet équilibre a lieu lorsque l'orientation de la lamproie est face dorsale vers le haut. Des facteurs environnementaux peuvent perturber ce point d'équilibre. Ainsi, l'illumination d'un œil affecte les deux groupes antagonistes de neurones réticulospinaux de manière différente, ce qui provoque une

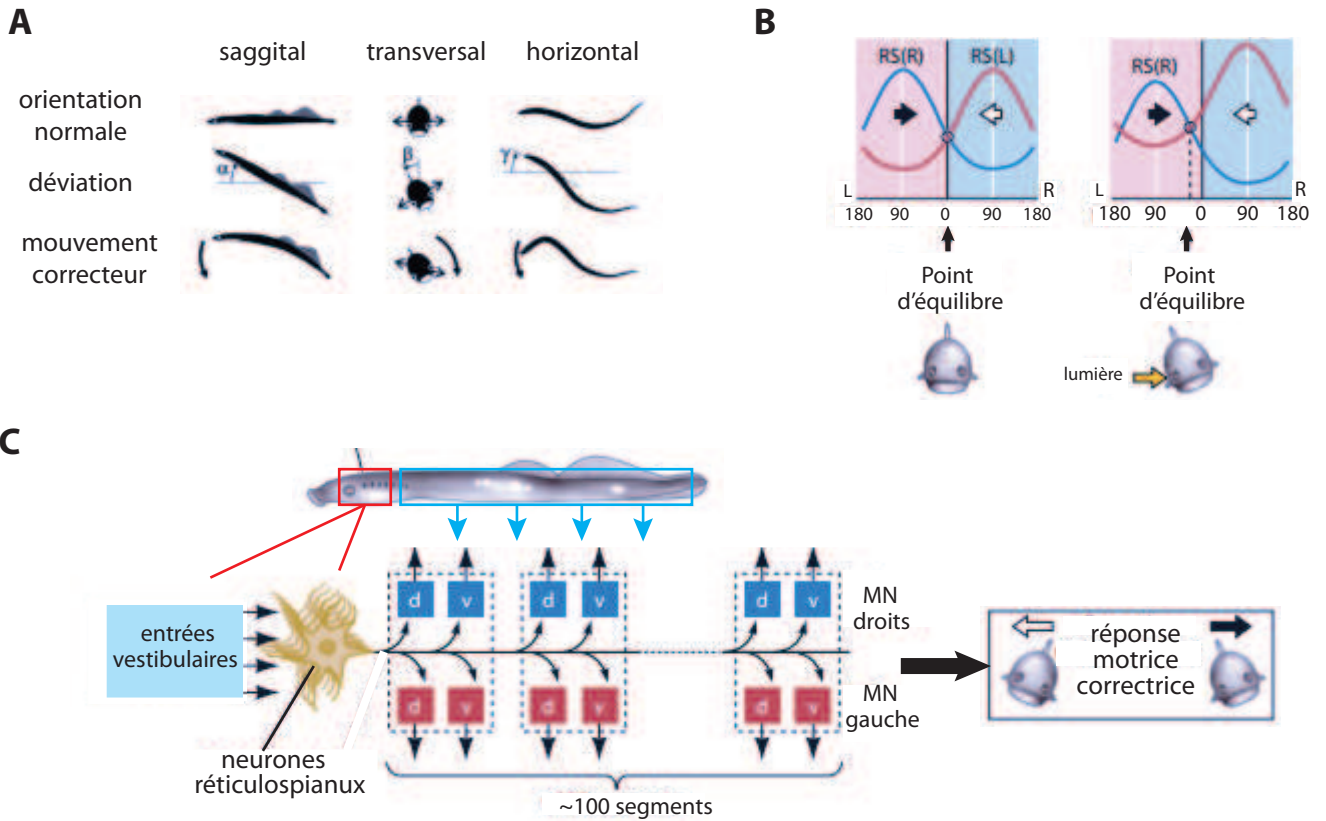


Figure 12 : Contrôle de l'équilibre chez la lamproie

(A) Au cours de la nage régulière, la lamproie stabilise son orientation dans le plan sagittal, transversal et horizontal. Des déviations dans ces trois plans (angle α , β et γ respectivement), entraînent une réponse correctrice (flèches) permettant la restauration de l'orientation initiale. (B) L'équilibre est contrôlé par les entrées vestibulaires. Les courbes représentent l'activité des neurones RS droit (RSR) et gauche (RSL) en fonction de l'angle de rotation (L : rotation à gauche, R : rotation à droite). Les entrées vestibulaires activent les neurones réticulospinaux en fonction de la rotation contralatérale. La direction de la rotation entraînée par les RS droits et gauches est indiquée par les flèches noires et blanches respectivement. Le système est à son point d'équilibre à 0° (orientation face dorsale vers le haut). Des entrées visuelles causent une perturbation du point d'équilibre. (C) Commande réticulospinale chez la lamproie. Chaque neurone réticulospinale projette sur la moelle épinière, jusqu'aux segments les plus caudaux. Les sorties motrices segmentaires sont réalisées par quatre groupes de motoneurons contrôlant les muscles ventraux et dorsaux, des deux côtés de la lamproie (d et v respectivement). Ces neurones peuvent exercer leur action directement sur les motoneurons ou via les interneurons. Les neurones réticulospinaux reçoivent des entrées vestibulaires (modifié d'après Deliagina *et al.*, 2006).

modification de l'orientation du corps de la lamproie (Fig. 12B) (Deliagina *et al.*, 1993; 2000b).

Ainsi, chez la lamproie, les réseaux supraspinaux jouent un rôle crucial dans la stabilisation de l'orientation du corps en générant une commande motrice correctrice sur la base des informations vestibulaires. La fonction des réseaux spinaux est de transformer la commande supraspinale en activité motrice permettant une correction posturale.

b- Contrôle postural chez les quadrupèdes en station debout

Les quadrupèdes terrestres maintiennent une orientation horizontale face dorsale vers le haut en stabilisant l'orientation de la tête et du tronc. L'orientation de ces deux éléments est contrôlée par deux mécanismes différents : l'orientation de la tête est stabilisée principalement sur la base d'informations visuelles et vestibulaires, tandis que la stabilisation du tronc dépend essentiellement des entrées somatosensorielles en provenance des mécanorécepteurs des membres (Barberini & Macpherson, 1998; Deliagina *et al.*, 2000a; Boyle, 2001; Beloozerova *et al.*, 2003b; 2003a).

Lors de la station debout chez les quadrupèdes, les quatre membres participent pour supporter le poids du corps. Quand la posture de l'animal est perturbée, chaque membre contribue à générer une réponse motrice correctrice (Fig. 13C) (Macpherson, 1988a; 1988b; Lacquaniti & Maioli, 1994; Jacobs & Macpherson, 1996; Beloozerova *et al.*, 2003b; 2003a). Une coordination entre ces quatre membres est donc indispensable. Une hypothèse proposée pour expliquer cette coordination est que les informations sensorielles en provenance de chaque membre sont traitées et intégrées pour obtenir une idée générale de la posture du corps. Si une perturbation est observée, une commande spécifique sera envoyée à chaque membre pour coordonner leurs mouvements. Cependant, il a été montré que les lapins et les chats sont capables de garder leur équilibre dans des situations complexes, où la partie antérieure et postérieure du corps est supportée par deux plateformes inclinables dans des sens contraires (Beloozerova *et al.*, 2003a). Pour expliquer ces résultats il a été proposé que chez les quadrupèdes, le système permettant la stabilisation du tronc dans le plan frontal consiste en deux sous-systèmes relativement indépendants, permettant la stabilisation des membres antérieurs et postérieurs séparément (Beloozerova *et al.*, 2003b). Chaque sous-système reçoit des informations somatosensorielles des membres correspondants.

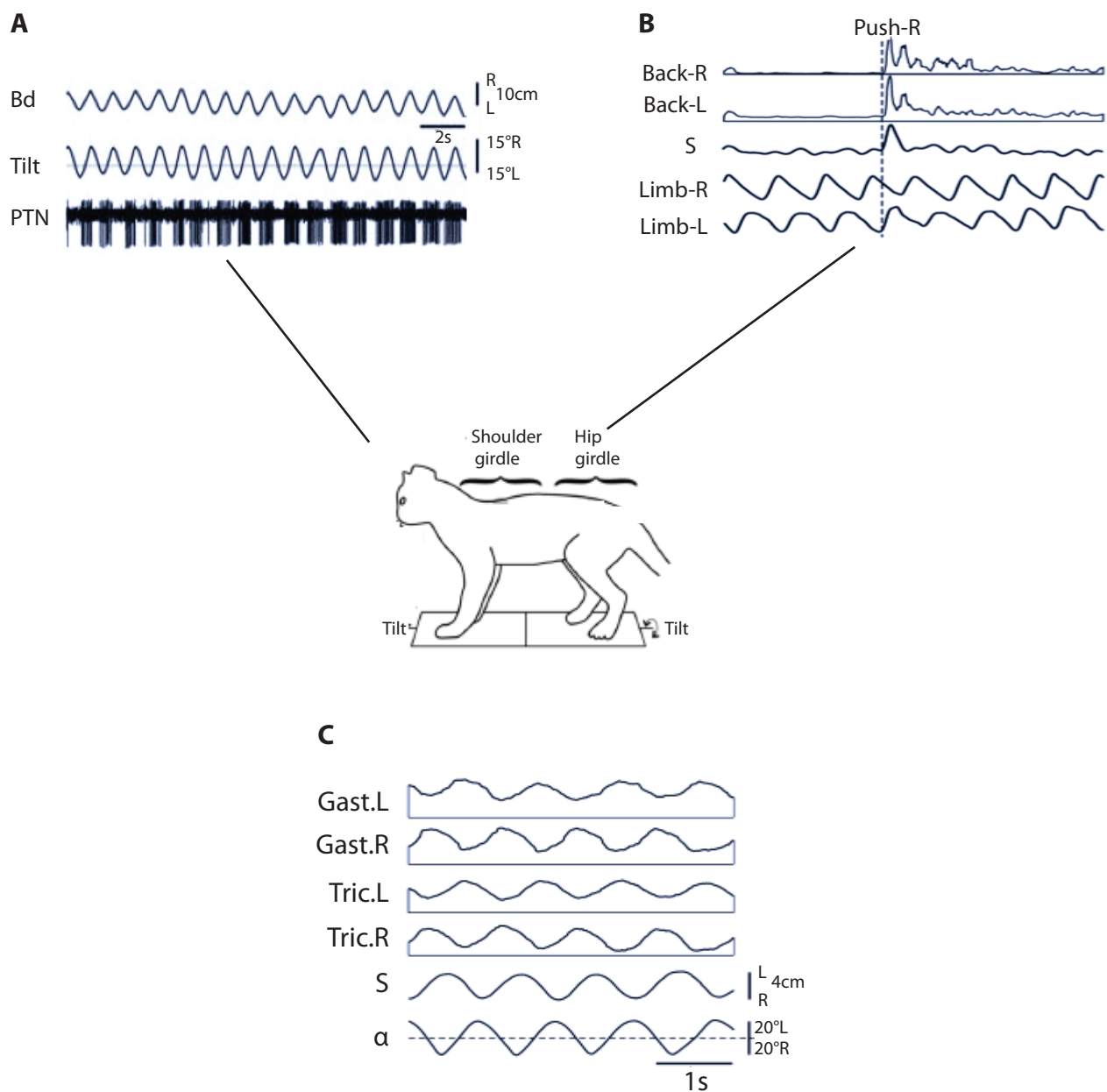


Figure 13 : Contrôle de l'équilibre chez le chat.

(A) L'activité enregistrée dans les neurones de la voie pyramidale (PTN) sont modulés en relation avec les inclinaisons de la plateforme (tilt) et les corrections posturales (Bd) (modifié d'après Karayannidou *et al.*, 2009). (B) Réponses des muscles erector spinae droit et gauche à une poussée latérale au cours d'une activité de locomotion déclenchée par une stimulation de la MLR. Une coactivation des muscles est observée en réponse à la perturbation (modifié d'après Musienko *et al.*, 2014). (C) Réponses électromyographiques enregistrées penant une inclinaison de plateforme. Enregistrements des déplacements latéraux du corps et de l'activité EMG des triceps et des gastrocnemius droit et gauche pendant les inclinaisons de la plateforme (modifié d'après Beloozerova *et al.*, 2003).

Pour caractériser l'organisation fonctionnelle de ces sous-systèmes des expériences ont été réalisées dans lesquelles un ou plusieurs membres sont maintenus relevés, et ainsi exclus du système de maintien de l'équilibre. Les réponses posturales sont ensuite enregistrées lors de l'inclinaison des plateformes (Deliagina *et al.*, 2006). Ces expériences ont montré que : (1) chaque sous-système est capable de compenser l'inclinaison de la plateforme quand les membres de l'autre ceinture ne participent pas à la stabilisation du tronc ; (2) la coordination entre les deux sous-systèmes est basée majoritairement sur l'influence du sous-système des membres antérieurs sur celui des membres postérieurs. Cependant, ces influences ne déterminent pas nécessairement la réponse des membres à l'inclinaison. Dans le cas d'une inadéquation entre les informations somatosensorielles en provenance des membres antérieurs et postérieurs, le mouvement correcteur sera généré sur la base des informations en provenance des membres postérieurs (Deliagina *et al.*, 2006) ; (3) chaque membre peut être contrôlé de manière indépendante du reste du corps en réponse aux informations somatosensorielles en provenance de ce même membre. Ces sous-systèmes semi-autonomes permettraient une meilleure adaptabilité aux conditions environnementales complexes.

Les informations somatosensorielles jouent un rôle important pour permettre le maintien de l'équilibre du corps sur des plateformes inclinées ; cependant le système postural contrôlant la stabilisation du tronc reçoit aussi des informations en provenance des noyaux vestibulaires. Il a été montré que des entrées vestibulaires spécifiques ne sont pas essentielles pour induire une correction posturale dans la majorité des conditions (Inglis & Macpherson, 1995; Beloozerova *et al.*, 2003a; Deliagina *et al.*, 2006). Les informations vestibulaires non-spécifiques toniques sont importantes pour le fonctionnement normal des mécanismes posturaux (Deliagina *et al.*, 1997). Activées par ces informations toniques, les voies descendantes (vestibulospinale, réticulospinale...) envoient une commande tonique bilatérale sur les réseaux neuronaux spinaux impliqués dans les corrections posturales (Musienko *et al.*, 2010). Cette entrée vestibulaire tonique permet d'augmenter l'excitabilité des motoneurones extenseurs et ainsi augmente le tonus musculaire des muscles extenseurs des jambes qui sont principalement impliqués dans le support du poids du corps lors de la station debout (Duysens *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'activation du système vestibulaire par des stimulations galvaniques (stimulations transcraniales qui excitent les afférences vestibulaires du côté de l'électrode négative et les inhibent du côté de l'électrode

positive), perturbe les réflexes posturaux des membres. Le réflexe postural du membre est augmenté du côté de l'électrode positive et diminué du côté de l'électrode négative (Hsu *et al.*, 2012).

Le cortex joue également un rôle dans le contrôle postural sur des plateformes inclinées. Des enregistrements de neurones du faisceau pyramidal (appartenant à la voie corticospinale) chez un chat en équilibre sur des plateformes inclinées ont révélé une activité très forte au niveau de ces neurones (Fig. 13A) (Beloozerova *et al.*, 2005). Deux populations de neurones pyramidaux participant au contrôle de la station debout ont été mises en évidence : des neurones dont l'activité est corrélée avec une inclinaison ipsilatérale de la plateforme et ceux dont l'activité est corrélée avec une inclinaison contralatérale (Karayannidou *et al.*, 2009a). Ces résultats indiquent que les neurones pyramidaux reçoivent des informations sensorielles en provenances des membres ipsilatéraux et contralatéraux (Karayannidou *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces travaux montre que le maintien de la station debout implique deux boucles de contrôle (Fig. 14). Une boucle spinale, entraînée par des informations proprioceptives et cutanées des membres et qui contrôle séparément les membres antérieurs et postérieurs. La seconde boucle implique les centres supraspinaux, qui reçoivent des entrées sensorielles des mécanorécepteurs des membres, ainsi que des informations sur le positionnement de la tête grâce aux entrées visuelles et vestibulaires. L'intégration de ces informations va permettre d'envoyer une commande correctrice phasique à la moelle épinière via différentes voies : réticulospinale, vestibulospinale, rubrospinale et corticospinale. C'est donc la coordination entre les informations supraspinales et les réflexes spinaux qui permet de contrôler la posture.

c- Contrôle postural chez les quadrupèdes au cours de la locomotion

- Réactions à une poussée latérale

Au cours d'un mouvement locomoteur, l'application d'une poussée latérale sur le chat au niveau de l'épaule ou de la hanche entraîne une oscillation latérale du tronc, suivie d'un retour à la position initiale (Karayannidou *et al.*, 2009b). La correction du mouvement est réalisée au niveau du membre perturbé, par une modification du patron moteur. Le membre effectue un déplacement latéral au cours la phase de transfert, vers l'intérieur ou l'extérieur selon la direction de la poussée et la phase du cycle locomoteur dans laquelle elle

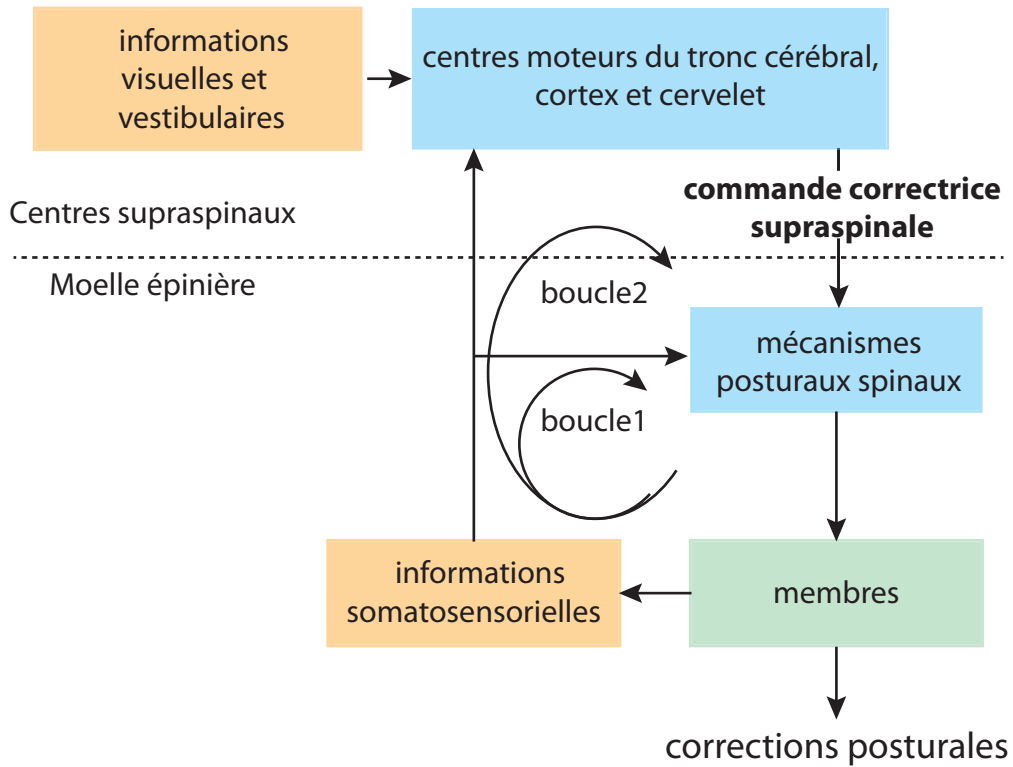


Figure 14 : Organisation fonctionnelle du contrôle postural chez les quadrupèdes.

Deux boucles de contrôle stabilisent l'orientation du corps, impliquant des mécanismes spinaux (boucle 1) et supraspinaux (boucle 2). (modifié d'après Deliagina *et al.*, 2008)

a lieu. Ainsi, un pas vers l'extérieur est réalisé quand la poussée est appliquée au cours de la phase de transfert du membre controlatéral, tandis qu'un pas vers l'intérieur est réalisé quand la poussée est donnée durant la phase de transfert du membre ipsilatéral (Karayannidou *et al.*, 2009b; Musienko *et al.*, 2014). Cela permet une restauration de la stabilité latérale. Ce mouvement correcteur est incorporé dans le patron locomoteur, et affecte très peu la durée du cycle du pas (Misiaszek, 2006). Ce système de correction est essentiellement généré par des mécanismes spinaux, et la direction du pas est déterminée par les entrées somatosensorielles provenant du membre opposé à la perturbation. Les afférences cutanées sont importantes pour réguler l'amplitude de la réponse mais n'affectent ni la latence, ni la direction du pas (Bolton & Misiaszek, 2009). Ces mécanismes sont similaires chez un animal intact (Karayannidou *et al.*, 2009b) et décérébré (Musienko *et al.*, 2014) suggérant que si le cortex n'est pas nécessaire, il jouerait toutefois un rôle en ajustant ces réactions posturales.

Au cours d'une poussée latérale, le tronc est également perturbé. L'enregistrement électromyographique des muscles du dos a révélé une coactivation des muscles droit et gauche au cours de la poussée, généré par les entrées sensorielles en provenance du tronc (Fig. 13B) (Musienko *et al.*, 2014) fig11). Cette coactivation des muscles du dos entraînerait une augmentation de la rigidité du tronc, ce qui permettrait de stabiliser la posture du tronc.

d- Contrôle postural chez l'homme

Des études réalisées sur des cas cliniques ont montré l'importance des informations proprioceptives dans le contrôle postural chez l'homme. Une diminution des entrées proprioceptives en provenance des jambes, par exemple chez des patients présentant une neuropathie périphérique, entraîne des risques de chutes importants (Sorock & Labiner, 1992; Richardson *et al.*, 1992), les informations proprioceptives en provenances des jambes étant suffisantes pour le maintien de l'équilibre debout (Fitzpatrick *et al.*, 1994b). Une instabilité posturale est détectée de manière très rapide par le système sensoriel proprioceptif, sensible à l'étirement des muscles de la cheville, du genou et du tronc (Allum *et al.*, 1989). Un ajustement postural est alors généré, dont l'amplitude et le patron d'activation des muscles sont contrôlés par les informations proprioceptives, vestibulaires et visuelles (Allum & Pfaltz, 1985; Horak *et al.*, 1994; Inglis *et al.*, 1994; Allum *et al.*, 1995).

Chez l'homme, l'importance des entrées vestibulaires dans le maintien de la posture a été montrée grâce à des expériences de stimulations galvaniques, réalisées dans différentes conditions (debout, assis, microgravité). Lors d'une stimulation galvanique (stimulation électrique du processus mastoïde), le corps bascule du côté de l'anode en réponse à une illusion de déséquilibre du côté de la cathode, ce qui déclenche des réponses importantes au niveau du tronc et des membres (Britton *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1997). Toutefois ces réponses sont tâches dépendantes : une activité musculaire enregistrée au niveau des membres chez un sujet debout disparaît si celui-ci s'assoie (Britton *et al.*, 1993; Fitzpatrick *et al.*, 1994a). Au cours de la marche, une stimulation galvanique entraîne une déviation du côté de l'anode (Fitzpatrick *et al.*, 1999; Bent *et al.*, 2000). Le placement du pied va être dépendant de la phase dans laquelle la stimulation galvanique est réalisée. Lorsque la stimulation galvanique a lieu au cours de la phase d'appui, l'amplitude de déplacement du pied est plus importante que lorsque la simulation à lieu pendant la phase de transfert (Bent *et al.*, 2004).

La réponse musculaire déclenchée par une stimulation galvanique est dépendante du nombre d'entrées sensorielles dont dispose le sujet. Si ce dernier est privé d'informations visuelles alors la réponse sera plus grande (Welgampola & Colebatch, 2001; Bent *et al.*, 2002). De même la perte des entrées somatosensorielle (par anesthésie du pied par exemple) va augmenter l'amplitude de la réponse (Magnusson *et al.*, 1990). À l'inverse, si le sujet peut toucher une référence stable avec ses doigts, alors la réponse diminue (Britton *et al.*, 1993). Ces résultats montrent que l'équilibre postural est contrôlé par l'intégration de l'ensemble des informations sensorielles.

En conclusion, le contrôle postural dynamique repose sur l'intégration de différentes informations sensorielles, pour réaliser des compensations posturales lors d'un trouble de l'équilibre. Chez la lamproie, les afférences vestibulaires constituent le mécanisme central du maintien de l'équilibre. Chez les animaux quadrupèdes et chez l'homme, l'équilibre est assuré par deux boucles de contrôle : spinale et supraspinale, impliquant des informations vestibulaires, somatosensorielles et visuelles.

Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail doctoral visent à établir les mécanismes permettant le couplage de différents réseaux neuronaux locomoteurs et posturaux nécessaires à la production d'une activité locomotrice efficace et au maintien de l'équilibre dynamique. Pour cela deux axes d'études ont été abordés : la coordination des réseaux moteurs des membres et des réseaux axiaux lors de la locomotion et l'influence des noyaux vestibulaires sur les réseaux spinaux. Sur des préparations de tissus nerveux isolés *in vitro* de rats nouveau-nés, des expériences électrophysiologiques, pharmacologiques et neuroanatomiques ont été menées dans le but de répondre aux questions suivantes :

A- La locomotion implique une synergie entre l'activité des muscles des membres responsables du mouvement de propulsion, et entre la musculature axiale. Cette dernière est impliquée à la fois dans le maintien de l'équilibre en condition statique mais également au cours de la locomotion. En effet, l'enregistrement en EMG des muscles du dos révèle que ces derniers sont rythmiquement actifs au cours des cycles de marche. Le premier objectif de notre étude a été de déterminer les mécanismes sous-tendant cette coordination, qui sont à ce jour inconnus. 1- Dans ce contexte, quelles sont les capacités rythmiques intrinsèques des segments thoraciques ? 2- Comment s'influence respectivement l'activité rythmique thoracique et l'activité motrice lombaire, et quelles sont les voies impliquées dans le couplage entre les réseaux thoraciques et lombaires ? 3- Par ailleurs les segments thoraciques contiennent des motoneurones impliqués dans l'activité des muscles du tronc. Nous nous intéresserons à la nature de la commande synaptique que ces motoneurones doivent recevoir des réseaux locomoteurs lombaires.

B- Si les activités neuronales des segments thoraciques et lombaires sont coordonnées au cours de la locomotion, ces activités sont susceptibles d'être modulées pour permettre une flexibilité de la locomotion. Nous avons étudié dans un second temps la modulation des activités locomotrices des membres et de la musculature axiale en déterminant 1- si les réseaux neuronaux thoraciques peuvent être activés par des neuromodulateurs classiquement impliqués dans la genèse du rythme moteur chez les Vertébrés. 2- Comment s'organise l'activité motrice des réseaux spinaux lombaires qui contrôlent les membres

postérieurs et l'activité des réseaux axiaux thoraciques et sacrés ? 3- Enfin, comment cette organisation est modulée par les amines : la sérotonine, la dopamine, et la noradrénaline ?

C- Enfin, le contrôle de la posture implique des interactions entre les réseaux neuronaux de la moelle épinière et du tronc cérébral. Les noyaux vestibulaires, qui permettent de détecter les mouvements de la tête et les variations d'équilibre corporels, projettent sur l'ensemble de la moelle. Nous étudierons leur influence sur les différents segments spinaux. 1- Dans des conditions de repos, quelles sont les réponses spinales enregistrées lors d'une stimulation vestibulaire et comment sont organisées les voies vestibulospinales ? 2- Quelles sont les entrées synaptiques arrivant sur les neurones lombaires lors de la stimulation des noyaux vestibulaires ? 3- Enfin, comment les informations vestibulaires modulent-elles la locomotion ?

Matériels et Méthodes

I- La préparation de moelle épinière isolée *in vitro*.

Comme présenté dans l'introduction, la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* est un modèle majeur pour l'étude de la locomotion. En effet, la petite taille du tissu, sa faible myélinisation et l'absence de barrière hémato-encéphalique permettent la diffusion aisée des métabolites (glucose, oxygène...) et des substances neuroactives ajoutées dans le milieu de perfusion. Ainsi, cette préparation présente l'avantage de pouvoir être activée pharmacologiquement (Kudo & Yamada, 1987*b*; Cazalets *et al.*, 1990; 1992; Cowley & Schmidt, 1994; Kjaerulff & Kiehn, 1996; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000*b*; Barrière *et al.*, 2004), ou par une stimulation électrique des régions locomotrices du tronc cérébral (Zaporozhets *et al.*, 2004) ou des racines dorsales (Lev-Tov *et al.*, 2000; Etlin *et al.*, 2013), et ainsi de générer une activité motrice dont le patron est similaire à celui enregistré en EMG *in vivo* (Juvin & Morin, 2005). Depuis une vingtaine d'années de nombreux groupes de recherches ont disséqué l'organisation des réseaux locomoteurs spinaux, nous permettant d'avoir aujourd'hui une bonne connaissance des mécanismes permettant la genèse du rythme moteur au niveau lombaire.

Toutefois, malgré tous les avantages que présente ce modèle pour l'étude des réseaux générateurs de rythmes moteurs, il est important d'en connaître les limites, imposées par l'utilisation de cette préparation réduite et isolée *in vitro*. Du fait de la myélinisation progressive de la moelle au cours du développement, qui empêche la diffusion de l'oxygène dans les tissus, nous sommes limités à une étude sur des préparations de rats nouveau-nés âgés de 0 à 5 jours (P0 à P5). Or à cet âge, le système nerveux est un système immature en cours de développement, ce qui signifie que les phénomènes observés chez des rats nouveau-nés peuvent ne pas être présents chez des rats adultes. De plus il ne faut pas oublier que les retours sensoriels ainsi que les centres supérieurs sont supprimés dans cette préparation, or ils jouent un rôle important dans la modulation des phénomènes locomoteurs étudiés. Toutefois, la comparaison des résultats obtenus sur notre préparation et chez des animaux *in vivo*, notamment l'organisation du patron locomoteur, nous indique que malgré ses limites, ce modèle reste cohérent pour étudier les fonctions locomotrices et posturales.

A) Animaux

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des rats nouveau-nés Sprague-Dawley, âgés entre 0 et 5 jours postnataux (P0- P5). Toutes les procédures ont été effectuées en accord avec le comité éthique local de l'Université de Bordeaux.

B) Préparations isolées *in vitro*

Les animaux ont été anesthésiés par isofluorane jusqu'à la perte complète des réflexes, puis décapités. La peau du dos a été enlevée et la préparation a été placée face dorsale vers le haut dans une chambre de dissection. Sous contrôle binoculaire, une section des os du crâne, suivie d'une laminectomie a été réalisée pour exposer et prélever le tronc cérébral et la moelle épinière. Par la suite, les méninges entourant le tissu nerveux sont retirées. Toutes les dissections et les enregistrements ont été réalisés sous une perfusion continue de liquide cébrospinal artificiel (aCSF), équilibré à 95%O₂-5%CO₂ (pH7,4) à température ambiante (24-26°C) et contenant (mM): NaCl 130, KCl 3, CaCl₂ 2.5, MgSo₄ 1.3, NaH₂PO₄ 0.58, NaHCO₃ 25 et glucose 10.

Selon les besoins expérimentaux, deux types de préparation ont ainsi été utilisés. Une préparation thoraco-lombo-sacrée où la moelle épinière est sectionnée au niveau T2 afin de supprimer l'influence du CPG antérieur sur la préparation (Juvén & Morin, 2005) a été utilisée pour réaliser les expériences de pharmacologie et les enregistrements intracellulaires de motoneurones thoraciques.

Des préparations tronc cérébral-moelle épinière où la VIIIème paire de nerfs crâniens est finement disséquée pour pouvoir être stimulée ont été utilisées dans la dernière partie de cette thèse. Dans ces expériences, le tronc cérébral est perfusé par un liquide cébrospinal enrichi en potassium (4mM KCl), et la moelle épinière est perfusée par le liquide physiologique décrit précédemment.

L'identification des racines motrices cervicales (C1 à C8), thoraciques (T1 à T13), lombaires (L1 à L6) et sacrées (S1 à S4) est effectuée rostro-caudalement par un comptage à partir de la première racine cervicale.

Afin de limiter les effets indésirables de la dissection, les préparations sont laissées au repos dans le liquide physiologique pendant 1 heure, avant que le premier enregistrement ne soit effectué.

II- L'initiation de la locomotion

A) Par pharmacologie

Des épisodes d'activité locomotrice fictive ont été induits par l'application exogène d'un mélange de N-méthyl-D,L-aspartate (15 μ M, NMA, Sigma) et de sérotonine (5HT, Sigma) et/ou de dopamine (DA, Sigma), et/ou de noradrénaline (NA, Sigma). La dopamine et la noradrénaline sont fraîchement préparées et protégées de l'exposition à la lumière au cours de leur perfusion dans le bain, dans le but d'éviter la photo-dégradation. Du sodium-metabisulfite (0.1% ; Sigma) est ajouté à la dopamine pour empêcher son oxydation (Barrière *et al.*, 2004). Les drogues sont perfusées grâce à une pompe péristaltique (le flux de perfusion est maintenu à 4ml/min, dans une chambre de perfusion de 4ml). Les effets des drogues apparaissent 5-10 min après le début de l'application, le temps nécessaire pour que la solution saline soit totalement remplacée dans la chambre d'enregistrement et que les drogues diffusent dans le tissu.

Dans les expériences de pharmacologie, différentes combinaisons de drogues sont testées sur la même préparation, dans un ordre aléatoire, excepté pour la dopamine. Des travaux précédents ont montré qu'une haute concentration de dopamine (500 μ M) peut exercer des effets à long terme sur une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* (Barrière *et al.*, 2004), de ce fait cette amine est toujours testé après les autres, et à une concentration 10 fois plus faible que celle utilisée pour produire des effets à long terme (50 μ M au lieu de 500 μ M). Quand différentes concentrations sont testées sur la même préparation, nous commençons toujours par l'application de la concentration la plus faible. La durée totale d'application est de 20min. Chaque perfusion de drogues est suivie d'une période de rinçage avec du liquide physiologique, d'au moins 30 minutes. Au cours d'un épisode de locomotion fictive, la période des cycles initiaux est longue, avant de se raccourcir jusqu'à atteindre un plateau d'activité présentant un rythme stable d'une période d'environ 3 à 5s (Sqalli-Houssaini *et al.*, 1993; Cazalets *et al.*, 1999). Toutes les analyses sont réalisées sur 30 cycles consécutifs pris au cours de ce plateau.

Dans certaines expériences, l'ajout de gabazine (1 μ M) et de strychnine (2 μ M) a permis de bloquer respectivement les synapses inhibitrices GABAergiques et glycinergiques.

B) Par stimulations électriques

Stimulation des racines dorsales : La stimulation (stimulateur Master 8) des racines sacrées dorsales d'une moelle épinière quiescente permet de déclencher une activité locomotrice fictive par la mise en jeu des afférences sensorielles. L'intensité minimale de stimulation (seuil) permettant de déclencher une réponse enregistrée au niveau des racines ventrales L2, est déterminée pour un train de stimulation de 1Hz ou 2Hz. Les racines sont ensuite stimulées à 2 fois le seuil (durée des pulses 0,5msec).

Stimulation du nerf VIII : Les neurones vestibulospinaux sont activés en stimulant la VIIIème paire de nerfs crâniens grâce à une électrode de succion en verre polie (Harvard Apparatus, UK). Le nerf est stimulé par un Master 8, en chocs uniques ou avec des trains de stimulation de 2Hz ou 5Hz. Entre chaque stimulation, un temps de repos d'au moins 1 minute est laissé à la préparation pour éviter la fatigue synaptique. La force de la stimulation est exprimée en multiple du courant « seuil » (T), qui est le plus petit courant injecté permettant d'obtenir une réponse. Le nerf est simulé à 2 fois le seuil (durée des pulses 0,5msec).

C) Milieux modifiés

Pour certaines expériences, un milieu bas calcium-haut magnésium a été perfusé sur le compartiment thoracique dans le but de bloquer de manière réversible la transmission synaptique chimique de ce segment de moelle épinière. Ce liquide cérebrospinal modifié contient des concentrations diminuées de calcium et augmentées en magnésium (0,1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂).

Une solution isotonique de sucrose (339mM sucrose, 5mM HEPES) ajustée à pH7,4 a été utilisée pour bloquer toute activité nerveuse au niveau lombosacré. En l'absence de toute espèce ionique, la genèse et la propagation des potentiels d'actions est bloquée au niveau de la région spinale perfusée.

D) Barrières et sections

Dans plusieurs expériences, la chambre d'enregistrement a été partitionnée en deux ou trois compartiments grâce à des barrières de Vaseline construites à l'aide de seringues, pour permettre l'application sélective de drogues sur des régions précises de moelle épinière. Durant l'expérience, une différence de niveau entre les compartiments est réalisée

afin de déceler la présence d'éventuelles fuites au niveau des barrières. De plus à la fin de l'expérience, l'étanchéité a été testée par addition de bleu de méthylène d'un côté du mur de Vaseline.

III- Électrophysiologie

A) Enregistrement extracellulaire

Par des électrodes en passant: Cette technique a été utilisée pour les racines ventrales lombaires qui peuvent être disséquées sur une longueur importante et fixées au fond de la cuve de perfusion par des minuties. Une première électrode en acier est placée au contact direct de la racine d'intérêt et isolée du milieu de perfusion par de la Vaseline. La seconde électrode est placée dans le bain pour être utilisé comme référence. La différence de potentiel entre ces deux électrodes permet d'enregistrer l'activité électrique transitant par ces fibres nerveuses.

Par des électrodes de succion: L'activité motrice a été enregistrée au niveau des racines ventrales motrices les plus courtes (thoraciques) grâce à des électrodes de succion en verre (Harvard Apparatus). Les racines sont aspirées dans les électrodes remplies de liquide physiologique. Le maintien en position de ces électrodes est permis grâce à des micromanipulateurs. Une électrode de référence est placée dans le milieu de perfusion, sans contact avec la moelle. Comme pour les électrodes en passant, l'activité électrique récupérée lors des enregistrements est la différence de potentiel entre ces deux électrodes. Dans toutes les figures la position des électrodes est indiquée par des points noirs.

B) Enregistrement intracellulaire des motoneurones:

Enregistrement des motoneurones thoraciques : Préalablement à l'enregistrement intracellulaire, une transection sagittale supplémentaire est réalisée au niveau du segment thoracique d'intérêt à l'aide de ciseaux fins MN-26B. Un bloc de Sylgard triangulaire a été collé sur le fond de la cuve d'enregistrement, comme support pour la partie sectionnée de la moelle épinière. Cette partie est placée de manière légèrement fléchie, de façon à ce qu'après avoir été placée sur le bloc de Sylgard, la surface coupée repose de manière horizontale sous l'objectif. Cette configuration de "moelle retroussée" nous permet de

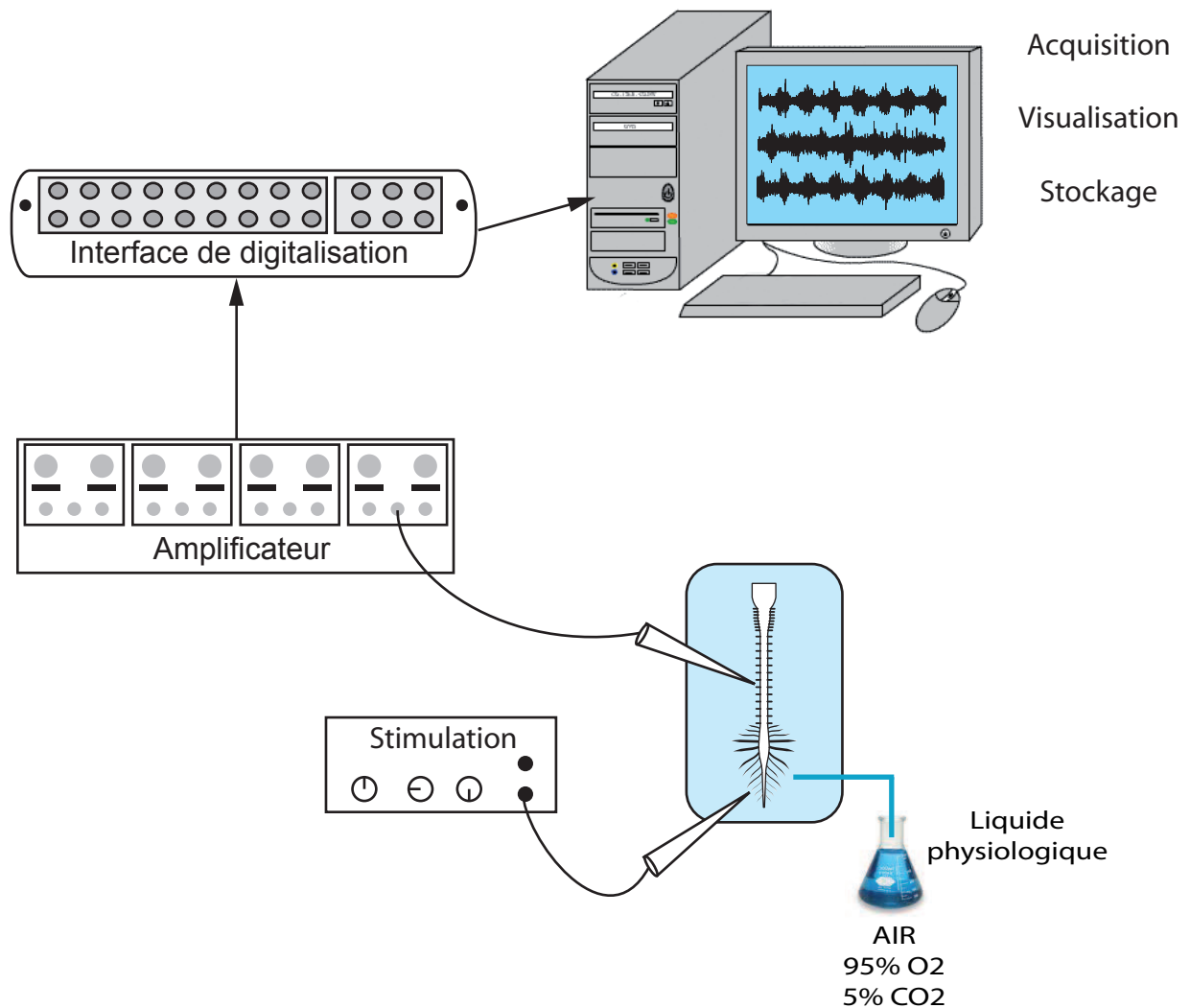


Figure 15 : Représentation schématique du dispositif expérimental.

La préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolée est maintenue en survie pendant plusieurs heures dans du liquide physiologique oxygéné. Les activités motrices sont enregistrées par des électrodes de succion ou des électrodes en passant placées au niveau des racines ventrales. Le signal est ensuite amplifié, digitalisé et visualisé sur un ordinateur. Un stimulateur électrique permet d'activer les afférences sensorielles.

positionner la pipette d'enregistrement de manière spécifique sur la partie ventro-médiane de la moelle épinière thoracique.

Enregistrements des motoneurones lombaires: Pour étudier l'influence du système vestibulaire sur la moelle épinière, des enregistrements de motoneurones lombaires sur moelle entière ont été réalisés. Dans ces expériences la moelle est positionnée face ventrale vers le haut et la pie-mère est délicatement retirée au niveau de la zone d'intérêt à l'aide de ciseau fin MC26-B (Moria, Paris) de manière à mettre à jour le tissu nerveux.

Dans ces deux configurations, les motoneurones sont enregistrés en utilisant une technique de patch clamp « en aveugle » grâce à un Multiclamp 700B. Ils sont identifiés sur la base de leur réponse antidromique à une stimulation de la racine ventrale de la zone d'intérêt. Seuls les motoneurones avec un potentiel de membrane d'au moins -50mV et une amplitude des potentiels d'actions de 50mV sont conservés pour réaliser les expériences. Les électrodes d'enregistrements en verre (4-7mΩ, borosilicate avec filament, WPI, USA) sont remplies avec : 120mM K-gluconate, 20mM KCl, 0.1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 10mM HEPES, 0.1mM CaCl₂, 0.1mM GTP, 0.2mM AMPc, 0.1mM Leupeptin, 77mM d-Mannitol, and 3mM Na₂-ATP, à pH 7.3. Pour certains motoneurones, nous avons réalisé les enregistrements intracellulaires grâce à des électrodes en verre de 70mΩ (Harvard Apparatus), contenant 2M de K acétate.

Dans certaines expériences, une solution de haut Ca²⁺/haut Mg²⁺ (7.5mM CaCl₂ et 8mM MgSO₄) est utilisée pour diminuer la transmission synaptique dans certains segments (Berry & Pentreath, 1976; Cazalets *et al.*, 1995; Jahr & Yoshioka, 2005). De la strychnine (1μM) a été utilisée pour bloquer l'activation des récepteurs glycinergiques, et du 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 0.5μM) et du (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (APV, 0.5μM) ont été utilisés pour bloquer les récepteurs glutamatergiques.

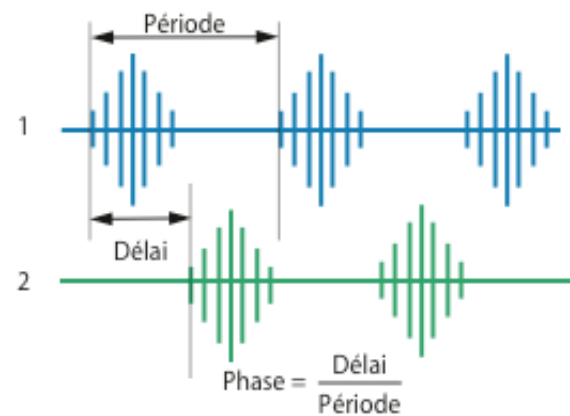
IV- Traitement des données

A) Acquisition et analyses

Le signal a été amplifié 5000 fois grâce à un amplificateur, puis acquis à 2kHz en utilisant une interface (Digidata 1322A, molecular device, CA, USA) pilotée par le logiciel Axograph (Axon Instrument, CA, USA). Les données brutes sont filtrées (filtre passe-haut,

50Hz), rectifiées et intégrées avant d'être analysées grâce à un programme Matlab (Mathworks) développé au laboratoire. L'amplitude des bouffées et la période des cycles locomoteurs sont calculées en se basant sur la détection du début de la bouffée. Les enregistrements de la racine L2 sont utilisés comme trace de référence car L2 présente systématiquement le meilleur rapport signal/bruit. La détection des bouffées s'effectue sur la trace de référence, puis l'ensemble des enregistrements associés est découpé en fonction de ces bouffées et rééchantillonné. Les cycles individuels sont superposés et moyennés dans le but d'augmenter le rapport signal/bruit, et ainsi réaliser une détection plus précise des pics des bouffées d'activité enregistrées. Les tracés sont ensuite dupliqués afin de souligner la rythmicité de l'activité obtenue.

Certaines séries d'expériences ont nécessité un calcul de relation de phases entre deux activités enregistrées sur deux racines ventrales distinctes. En effet, les activités nerveuses locomotrices sont caractérisées par des phases d'alternance (droite-gauche, flexion-extension). Les relations de phases entre les deux activités de deux racines motrices ont été calculées de la façon suivante : le délai d'apparition de l'activité enregistrée (D) dans la racine motrice 2 par rapport à la racine ventrale de référence 1 est divisé par la période de l'activité rythmique P.



Le calcul des relations de phases est réalisé à partir d'une trentaine de cycles locomoteurs sélectionnés de façon aléatoire dans des épisodes de locomotion fictive stable. Ainsi, une valeur de phase moyenne proche de 0 ou de 1 indique une synchronisation entre l'activité des deux racines, tandis qu'une valeur proche de 0,5 indique une alternance. Les valeurs linéaires sont ensuite transformées en valeurs angulaires et une représentation circulaire réalisée grâce au logiciel Igor Pro (IgorPRO Software, Wavemetrics, ORn USA) permet de calculer une phase moyenne ainsi que la force du vecteur (qui exprime la variabilité de la distribution des phases individuelles autour de cette valeur moyenne).

Certaines racines thoraciques présentent une activité difficilement détectable, sur laquelle il est impossible de déterminer manuellement le début et la fin des bouffées. Dans

cette condition, les relations de phases entre les bouffées d'activités enregistrées simultanément dans plusieurs racines ventrales sont calculées à l'aide d'une analyse basée sur la transformée en ondelettes (pour une description plus importante de la méthode voir (Torrence & Campo, 1998; Grinsted & Moore, 2004; Mor & Lev-Tov, 2007)). Un logiciel développé au laboratoire sur la base du logiciel de cohérence de Wavelet de Matlab a été utilisé. Cette méthode permet d'extraire la fréquence locomotrice, les valeurs de cohérences et les relations de phase entre deux enregistrements acquis simultanément. Pour cela, l'activité obtenue au niveau d'une racine est décomposée en fréquence, puis pour chaque paire d'enregistrement, une carte de corrélations croisées représentant la puissance des fréquences (XWT) et une carte de cohérence mettant en évidence les régions où la corrélation entre les signaux est significative (CWT) sont réalisées. Les résultats obtenus avec ces deux algorithmes sont combinés dans une carte (CXWT), permettant de mettre en avant les régions significatives en termes de corrélation et de cohérence. De cette carte les relations de phases sont extraites dans les zones de cohérence. Comme précédemment, les valeurs obtenues sont présentées dans des diagrammes circulaires.

B) Statistiques

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (Graphpad software, CA, USA). Les résultats sont représentés sous la forme valeur à la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre n représente la quantité de préparations utilisées et les astérisques indiquent une différence significative. Les valeurs moyennes sont considérées statistiquement significatives lorsque les valeurs de p sont inférieures à 0,05. Les différences entre les moyennes sont évaluées en utilisant un t-test (comparaisons de 2 groupes) ou d'ANOVA une voie (comparaison de plus de 2 groupes) suivie d'une analyse *post-hoc* avec le test de Tukey. Les données sont testées pour leur normalité, et si elles ne suivent pas à la loi normale, un test analogue non-paramétrique est utilisé. Lors des expériences de pharmacologie, l'égalité des groupes de variances est testée par un test de Brown-Forsythe ou un F-test.

Les analyses statistiques des données circulaires sont réalisées sur les données brutes grâce à des statistiques de distribution circulaire en utilisant le logiciel IGoPro (Wavemetrics, OR, USA) et Oriana (KCS, UK). Le test de Rayleigh est utilisé pour déterminer

la force du couplage. Le test non-paramétrique Watson U2 ou le test de Mardia ont été utilisés pour comparer deux échantillons de données circulaires (Oriana KCS, UK et IgorPRO Software, WaveMetrics, ORn USA). Le test de Watson-Williams (un analogue circulaire de l'ANOVA à une voie, (Berens, 2009) a été utilisé pour comparer plus de deux échantillons.

V- Les techniques neuroanatomiques

A) Marquages par un traceur rétrograde

Les rats âgés de P0 à P3, sont anesthésiés par hypothermie et placés sur un pain de glace afin de les maintenir endormis durant l'injection. Une légère incision est réalisée dans la peau du dos, et un cristal de traceur rétrograde, la sous unité B de la toxine du choléra couplé à de l'alexa Fluor 488 (Molecular probes, OR) est placé dans le muscle d'intérêt (longissimus ou multifidus dorsali). La peau du dos est recollée à l'aide d'une colle vétérinaire (Vetbond) et les rats sont replacés dans la cage avec leur mère respective pendant 2 jours. Une fois ce délai écoulé, l'animal est disséqué afin de récupérer la moelle épinière et de réaliser un marquage cholinergique des motoneurones (voir ci-après).

B) Marquages cholinergiques

Les moelles épinières sont fixées par immersion dans une solution de paraformaldehyde à 4% durant 12h à 4°C. Les préparations sont ensuite rincées dans du PBS sucrose 20% à 4°C pendant 12h, puis congelées à -80°C dans de l'isopentane. Les moelles épinières sont ensuite coupées au cryostat et les tranches de 20µM sont disposées sur des lames. Ces dernières sont ensuite rincées avec du PBS (3x10min) et saturées pendant 1h30 à température ambiante dans une solution constituée de PBS, de triton 0,3% et de BSA 1%. L'incubation de l'anticorps primaire ChAT-chèvre dilué au 1:100 est réalisée dans une solution PBS-triton-BSA, durant une nuit à température ambiante. Les lames sont par la suite rincées avec du PBS (5x10min), puis l'incubation de l'anticorps secondaire de singe anti-chèvre couplé à l'alexa fluor 488 dilué au 1:500 est effectuée pendant une heure. Après rinçage dans du PBS (5x10min), les lames sont montées dans un milieu Vectashield Hard Set et observées en utilisant un microscope Nikon AZ100M.

Résultats

Chapitre I

Origine de l'activité des réseaux thoraciques spinaux au cours de la locomotion.

Introduction

Le comportement locomoteur nécessite non seulement la production de forces nécessaires pour propulser le corps, mais aussi le maintien de l'équilibre dynamique impliqué dans la réalisation de chaque cycle locomoteur. Des analyses cinématiques et électromyographiques du comportement locomoteur chez les vertébrés ont montré que ce comportement est réalisé grâce à l'activation organisée des muscles des membres postérieurs, des membres antérieurs et des segments axiaux. Cela implique des opérations synergiques entre les réseaux prémoteurs supraspinaux et spinaux impliqués dans la locomotion et la posture (Grillner *et al.*, 1995; Rossignol *et al.*, 2006; Falgairolle *et al.*, 2006; Deliagina *et al.*, 2008).

La coordination des muscles du tronc et des membres lors de la locomotion a été décrite chez l'homme (Thorstensson *et al.*, 1982; de Seze *et al.*, 2008; Ceccato *et al.*, 2009), le rat (Gramsbergen *et al.*, 1999) et le chat (Carlson *et al.*, 1979; Zomlefer *et al.*, 1984b). La preuve d'un mécanisme central de coordination a été obtenue à partir d'expériences menées chez les chats (Koehler *et al.*, 1984) et chez des rats néonataux (Falgairolle & Cazalets, 2007). Cependant jusqu'à présent, la plupart de nos connaissances sur l'organisation du contrôle moteur du tronc lors de la locomotion proviennent d'espèces au mode de locomotion ondulatoire, dans laquelle le tronc occupe une place centrale dans l'appareil locomoteur (Cohen, 1987; Roberts, 1990; Matsushima & Grillner, 1992; Roberts *et al.*, 1998; McClellan & Hagevik, 1999; Grillner & Wallén, 2002; Falgairolle *et al.*, 2013). Étonnamment, peu de choses sont connues sur les mécanismes impliqués dans le contrôle des mouvements du tronc lors de la locomotion chez les vertébrés quadrupèdes ou bipèdes.

Récemment, en utilisant une préparation de moelle épinière isolée de rat nouveau-né, nous avons montré que les segments thoraciques, dans laquelle les motoneurones des muscles du dos sont distribués, réalisent des bouffées motrices avec un rapport de 1: 1 en phase avec les bouffées motrices lombaires au cours d'une activité locomotrice fictive (Falgairolle & Cazalets, 2007). De manière intéressante, nous avons montré que

l'organisation temporelle de ces activités *in vitro*, se propageant caudorostralement le long des segments thoraciques, pourrait expliquer la vague de flexion observée le long de l'axe du corps du rat nouveau-né au cours de mouvements locomoteurs *in vivo*. Ces mécanismes de couplage intraspinaux pourraient donc contribuer à la coordination des différents segments du corps observés lors de la locomotion *in vivo*. Dans notre étude, nous avons utilisé la même préparation pour aller plus loin dans l'identification de certains des mécanismes impliqués dans le couplage des activités locomotrices lombaires et thoraciques. Nous avons mis en évidence que l'expression d'un patron locomoteur au niveau thoracique dépend de l'activation du réseau locomoteur lombaire lui-même. Au niveau cellulaire, nous avons identifié deux sous-populations de neurones moteurs thoraciques: (1) des motoneurones locomoteurs réalisant des oscillations du potentiel de membrane dont la décharge est corrélée avec le cycle locomoteur; (2) des motoneurones non-entraînés par l'activité locomotrice et dont les oscillations du potentiel de membrane et la décharge de potentiels d'action ne sont pas corrélées avec l'activité locomotrice. Dans le premier groupe, nous avons montré qu'une partie de la commande synaptique locomotrice provient directement des réseaux moteurs lombaires, qui peuvent contrôler les segments thoraciques distants par des voies propriospinales directes ou indirectes.

Matériels et Méthodes

Ces expériences ont été réalisées sur des préparations de moelles épinières isolées *in vitro*, sectionnées en T2 dès le début de l'expérience, afin de supprimer toute influence en provenance des réseaux moteurs cervicaux qui contrôlent les membres antérieurs (Ballion *et al.*, 2001). L'activité de locomotion fictive est déclenchée par la perfusion d'un mélange de NMA à 15 μ M et de 5HT à 15 μ M. L'activité extracellulaire est enregistrée au niveau des racines thoraciques (de T3 à T11), et lombaires (L2 et L5). Pour les enregistrements intracellulaires, une section transversale est réalisée au niveau thoracique d'intérêt pour accéder aux corps cellulaires, et la moelle est placée dans la configuration de moelle retroussée présentée dans la figure 6 (pour plus de détails voir le chapitre Matériels et Méthodes de cette thèse).

Dans certaines expériences, une solution isotonique de sucrose a été utilisée au niveau des réseaux locomoteurs lombaires pour supprimer toute activité au niveau de ces

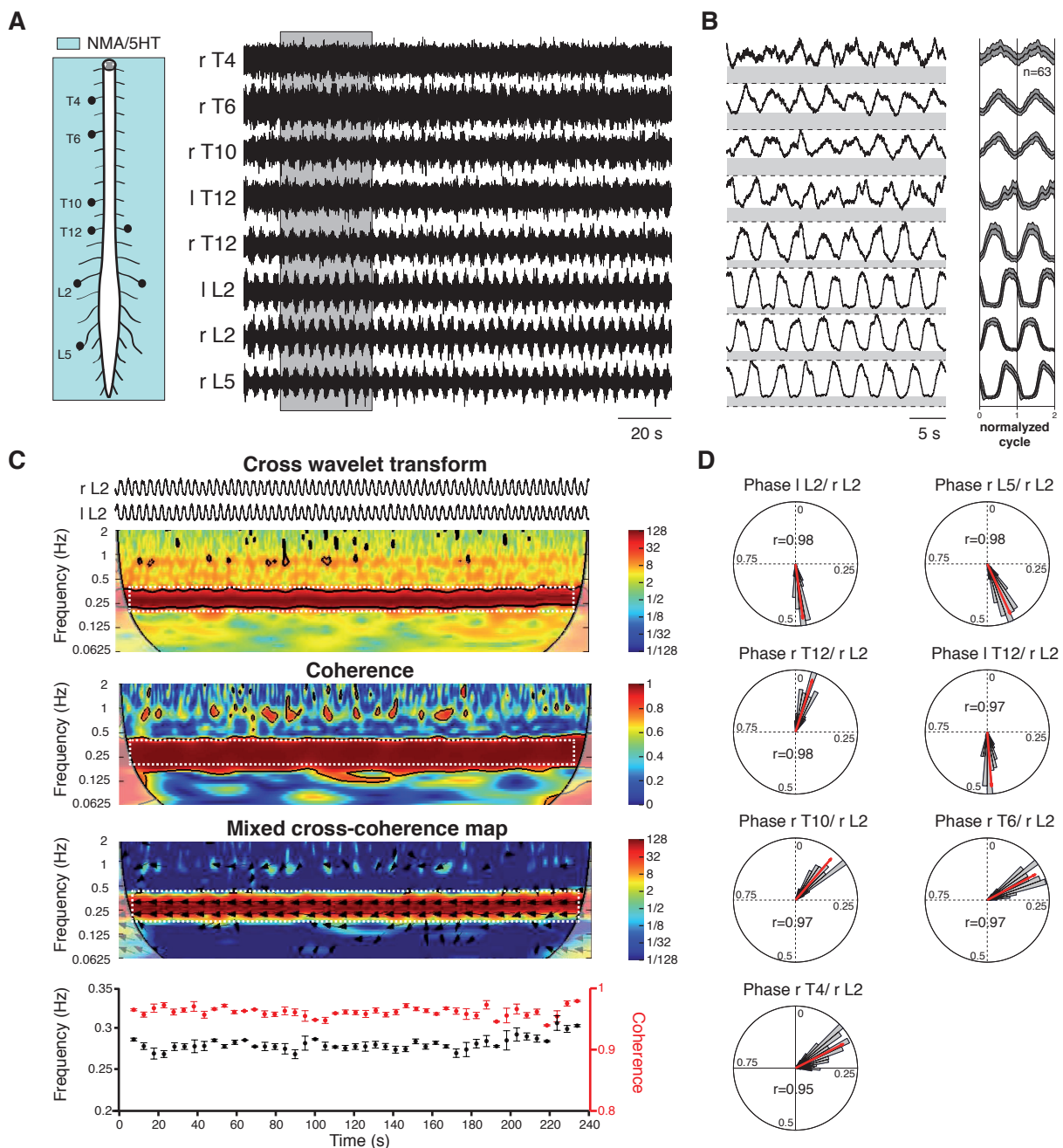


Figure 1 : Les bouffées d'activités motrices thoraco-lombaire sont coordonnées au cours de la locomotion fictive.

(A) Enregistrements simultanés de plusieurs racines ventrales lombaire et thoraciques pendant un épisode de locomotion fictive induit par du NMA (15 μ M) et de la 5HT (15 μ M). (B) Traces lissées et rectifiées (panneau de gauche) de la séquence présentée en A (zone grisée) montrant la coordination des bouffées motrices lombaires et thoraciques. Noter l'augmentation du ratio entre l'amplitude des bouffées d'activité (ligne en pointillé) et la dépolarisation tonique (en gris). Le panneau de droite illustre le cycle normalisé moyen répété 2 fois (n = 63 cycles, à droite L2 prise). (C) Exemple de l'analyse en ondelettes effectuée entre des paires d'enregistrements. La carte de corrélation croisées (panneau supérieur) et la carte de cohérence entre les activités des racines L2 bilatérales révèlent des bandes fréquentielles de "hautes puissances" et la corrélation entre les signaux au cours du temps, respectivement. La puissance des fréquences et la cohérence entre les signaux sont codées par des couleurs chaudes et froides indiquant des valeurs hautes et basses, respectivement. Les contours noirs délimitent les domaines où le niveau de significativité est supérieur à 5%. Les régions d'intérêt (ROI, rectangle blanc pointillé) ont été définies à partir de la carte obtenue en mélangeant les cartes de corrélations croisées et de cohérence (carte du bas). Les flèches indiquent la relation de phase entre chaque composante de fréquences importantes (la direction de gauche indiquant une relation en antiphase). Les graphiques du bas illustrent l'évolution de la fréquence (marqueurs noirs) et de la cohérence (marqueurs rouges) au cours du temps, dans la ROI. (D) Digrammes circulaires représentant les relations de phase entre les activités motrices enregistrées à partir de différents racines par rapport à la racine de référence L2 droite. La direction et la longueur des flèches rouges indiquent la valeur moyenne de phase (normalisée de 0 à 1) et la valeur de r, respectivement. r, droite; l, gauche; T, thoracique, L, lombaire.

réseaux. Des antagonistes des récepteurs glutamatergiques (CNQX, 5 μ M et APV, 5 μ M), ainsi que des récepteurs glycinergiques (strychnine, 2 μ M) ont été utilisés pour caractériser la commande synaptique. Enfin, une solution contenant des concentrations élevées en calcium (7.5mM) et magnésium (8mM) a été utilisée pour bloquer les voies polysynaptiques au niveau des segments thoraciques.

Résultats

A) Coordination du patron d'activité thoraco-lombaire lors de la locomotion fictive

Dans cette série d'expériences, l'activité de locomotion fictive est déclenchée sur des préparations de moelles épinières isolées en utilisant des applications exogènes de NMA (15 μ M) et de sérotonine (5HT, 15 μ M). Dans l'ensemble des préparations (n= 79), quand l'application est réalisée sur l'ensemble de la moelle épinière thoraco-lombo-sacrée, des épisodes soutenus de locomotion fictive stable sont enregistrés au niveau des racines lombaires (période moyenne de $3,32 \pm 0,09$ s), avec une alternance bilatérale segmentaire des bouffées motrices et une alternance homolatérale des bouffées d'activités de flexion et d'extension, enregistrés au niveau des racines ventrales L2 et L5 respectivement. L'enregistrement simultané des racines ventrales thoraciques et lombaires révèle que 79% des préparations (n= 63/79) expriment des bouffées d'activités rythmiques dans les segments thoraciques spinaux lors d'une activation par le mélange NMA/5HT (Fig. 1A). La figure 1B présente des enregistrements intégrés rectifiés. La zone grise sous chaque enregistrement représente le niveau de dépolarisation tonique (Fig. 1B). Le rapport entre l'amplitude des bouffées et le niveau d'activité tonique est plus faible au niveau thoracique que dans les segments lombaires (Figure 1B, panneau de gauche). En moyenne, le rapport signal rythmique /activité tonique au niveau des racines ventrales L2 est significativement plus élevé ($1,75 \pm 0,08$; n= 63 préparations) que le rapport moyen obtenu à partir d'enregistrements au niveau thoraciques ($1,09 \pm 0,01$; n = 46 préparations; $p < 0,0001$, test de Mann-Whitney). Une activation sérotoninergique tonique des neurones sympathiques situés dans la colonne intermédiolatérale au niveau thoracique pourrait contribuer à réduire le rapport signal/activité à ce niveau (Pierce *et al.*, 2010). Dans les 16/79 préparations restantes, l'activité locomotrice enregistrée au niveau lombaire ne se propage pas au niveau des segments thoraciques où une activité tonique a été observée.

L'analyse quantitative des épisodes locomoteurs présentés dans la figure 1A a été réalisée en utilisant une méthode de décomposition temps/fréquence des signaux électrophysiologiques basée sur la transformée en ondelette (wavelet transform analysis, Mor & Lev-Tov, 2007). Cette méthode permet de suivre l'évolution du contenu fréquentiel du signal au cours du temps, et à l'avantage de pouvoir être appliquée sur des signaux présentant de faibles rapports signal/bruit empêchant la détection semi-automatique ou manuelle des bouffées d'activités. La carte temps/fréquence présentée dans la partie supérieure de la figure 1C représente la corrélation croisée obtenue à partir de l'analyse en ondelettes des activités enregistrées au niveau des deux racines L2. Sur cette carte présentée entre 0,0625 et 2 Hz, les zones de couleurs chaudes indiquent les bandes fréquentielles de "haute puissance" dans le domaine temporel, c'est à dire les régions dans lesquelles les fréquences étaient significativement présentes sur les deux signaux. Ainsi une bande de fréquences allant de 0,25 à 0,4 Hz étaient significativement présentes sur les deux signaux. De façon complémentaire, une analyse de cohérence (wavelet coherence analysis, Fig. 1C, panneau du milieu) permet de mettre en évidence les régions où la corrélation entre les signaux (à une fréquence donnée et un temps donné) est significative. Par commodité, les cartes de corrélation croisée (cross wavelet) et de cohérence (wavelet coherence) ont été combinées de manière à mettre en avant les régions significatives en terme de corrélation et de cohérence (Mor & Lev-Tov, 2007, Figure 1C, carte du bas). A partir de la région d'intérêt (rectangle blanc pointillé) sélectionnée sur cette dernière carte, ont pu être définies la fréquence locomotrice ($0,28 \pm 0,01$ Hz) et les valeurs de cohérence ($0,96 \pm 0,01$) au cours du temps (Fig. 1C, tracé du bas). Enfin, nous avons également pu extraire l'évolution des relations de phase entre les activités enregistrées bilatéralement au niveau du segment L2 (relation de phase moyenne de $0,47 \pm 0,02$) dans la gamme de fréquences d'intérêts à partir de l'analyse de corrélation en ondelette. Les diagrammes circulaires de la Figure 1D présentent les relations de phase entre les racines ventrales enregistrées et la racine L2 droite prise comme référence. Ils indiquent que les bouffées d'activité enregistrées au niveau thoracique sont coordonnées à l'activité locomotrice générée au niveau lombaire. Comme observé précédemment (Falgairolle & Cazalets, 2007), on observe une propagation caudo-rostrale progressive du délai d'apparition des bouffées.

B) Capacités rythmogènes conditionnelles des segments thoraciques spinaux isolés

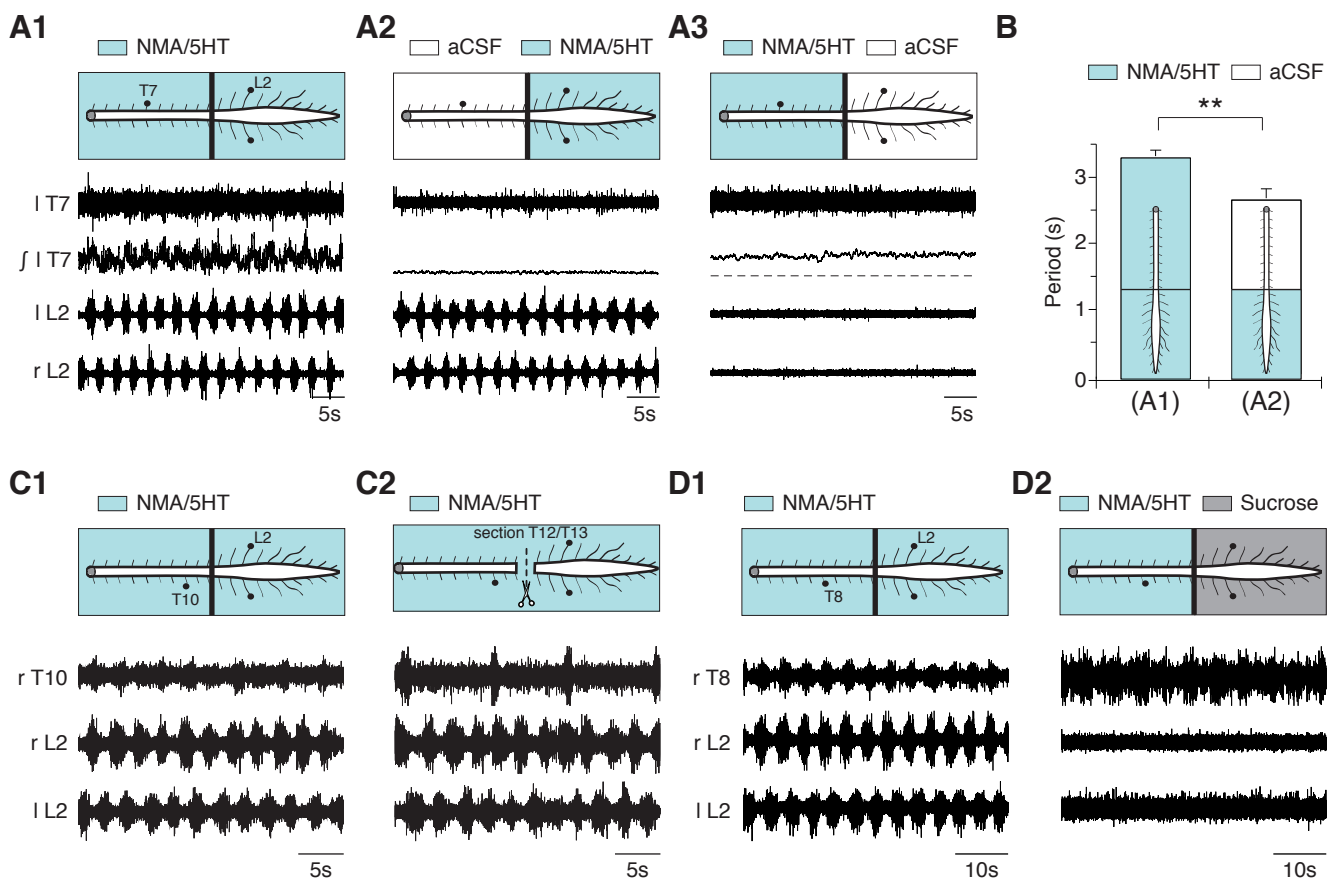


Figure 2 : Capacités rythmogènes conditionnelles de la moelle épinière thoracique.

(A) Des bouffées d'activité motrices rythmiques coordonnées sont enregistrées au niveau thoracique au cours d'un épisode de locomotion fictive (A1). Ces bouffées ne sont pas présentes lorsque seuls les segments lombo-sacrés sont activés, dans la même préparation (A2). (A3) Une activité tonique est enregistrée au niveau thoracique lorsque seuls les segments thoraciques sont pharmacologiquement activés. (B) La période locomotrice moyenne enregistrée lorsque les réseaux lombo-sacrés sont activés pharmacologiquement est nettement plus rapide que celle obtenue lorsque l'ensemble de la préparation est activée (n = 28 préparations). (C) Les bouffées thoraciques enregistrées au cours d'une activité locomotrice (C1-D1) sont remplacées par une activité rythmique lente après une section complète de la moelle, réalisée au niveau T12 / T13 (C2) ou suite à un blocage de la conduction axonale au niveau de la région lombo-sacrée par une solution sucrée (D2). r, droite; l, gauche; T, thoracique, L, lombaire.

Pour étudier les capacités rythmogènes des segments thoraciques, la moelle épinière a été artificiellement divisée en deux parties grâce à un mur de Vaseline placé au niveau des segments thoraciques T12 / T13 (n = 28) de manière perfuser séparément la moelle épinière thoracique et la moelle épinière lombo-sacrée. En condition contrôle, c'est-à-dire lorsque le mélange NMA/5HT est appliqué dans les deux compartiments, l'activité rythmique enregistrée dans les deux régions est synchronisée (Fig. 2A1). Dans les mêmes préparations, l'application de NMA/5HT uniquement sur les segments lombo-sacrée déclenche une activité locomotrice au niveau lombaire, mais les segments thoraciques restent silencieux (Fig. 2A2). Dans cette condition, la période lombaire locomotrice (n= 28 préparations, $2,68 \pm 0,14$ s) est significativement diminuée par rapport au contrôle (n= 28 préparations, $3,16 \pm 0,14$ s, $p < 0,05$, t-test apparié), ce qui indique que l'activation des segments thoraciques contribue à réguler la durée du cycle généré par le réseau locomoteur lombaire (Fig. 2B). Dans tous les cas, l'application de NMA/5HT sur les segments thoraciques seuls ne déclenche qu'une dépolarisation tonique au niveau thoracique, mais ne réussit pas à initier une activité rythmique (Fig. 2A3).

Toutefois, dans une étude précédente, il a été montré que la moelle épinière est capable de générer des bouffées d'activité rythmiques lorsqu'elle est isolée des segments lombaires par une section de la moelle épinière au niveau T12 / T13 (Falgairolle & Cazalets, 2007). Dans notre étude, en réalisant la même section, l'application de NMA/5-HT dans le bain de perfusion déclenche une activité rythmique dans 6/18 préparations (Fig. 2C1-C2). En condition contrôle, c'est-à-dire avant section, l'application de NMA/5HT sur l'ensemble de la moelle épinière déclenche des bouffées d'activité locomotrice coordonnées entre les segments thoraciques et lombaires (Fig. 2C1). Après section, une nouvelle application de NMA/5HT déclenche une activité rythmique lente au niveau thoracique, qui n'est plus corrélée avec l'activité locomotrice lombaire (Fig. 2C2). La période des cycles thoraciques est significativement augmentée ($7,87 \pm 0,87$ s, n = 62 cycles) et la période des cycles lombaires est significativement diminuée de ($2,6 \pm 0,01$ s, n = 202 cycles), par rapport à la période contrôle mesurée avant section ($3,00 \pm 0,09$ s, n = 51 cycles, test Mann-Whitney, $p < 0,05$). Dans cette expérience, 12/18 préparations ont exprimé une activité tonique après section. Pour augmenter l'excitabilité des réseaux thoraciques de ces préparations isolées, un antagoniste GABAergique, la gabazine à $1 \mu\text{M}$ a été ajoutée dans le bain de perfusion

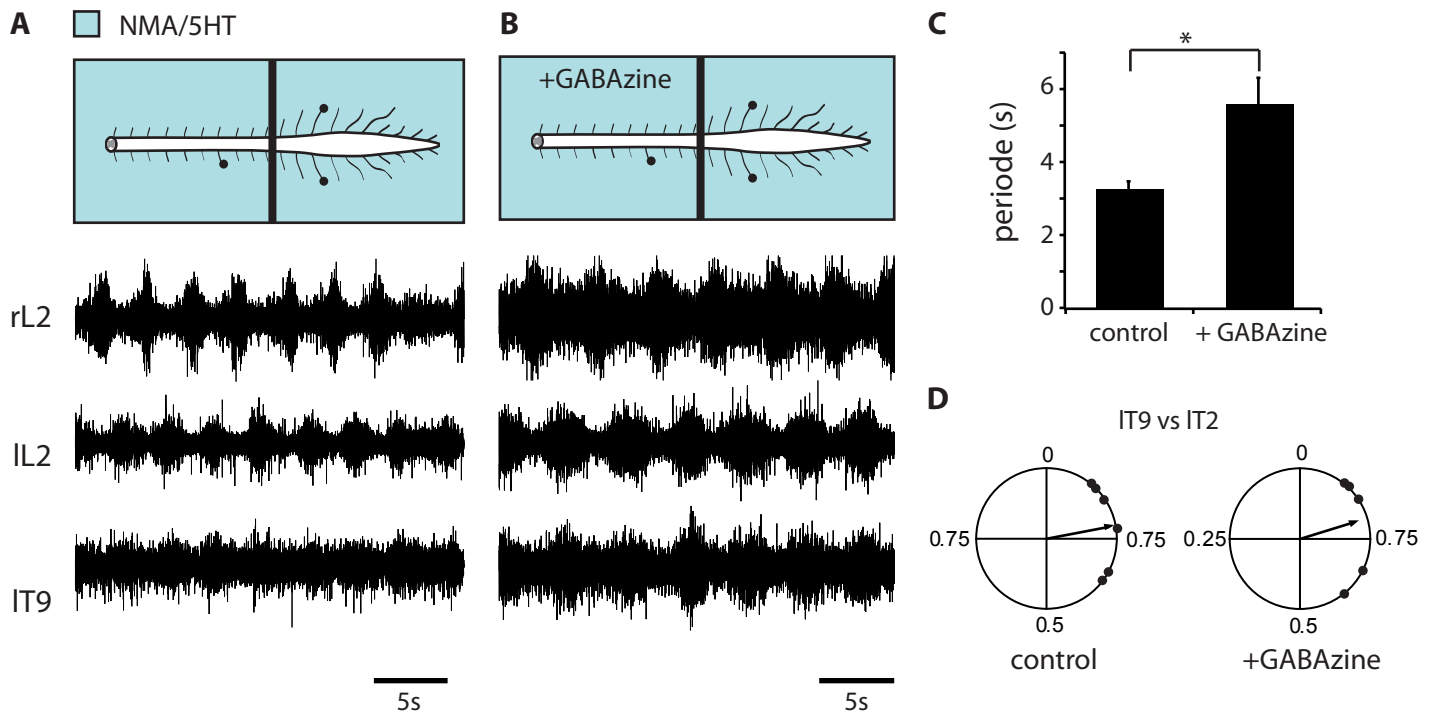


Figure 3 : Modulation de l'activité locomotrice par les réseaux thoraciques spinaux.

(A) L'activité motrice rythmique enregistrée au niveau thoracique et lombaire au cours d'un épisode de locomotion fictive (B) est ralentie par l'application de gabazine (2 μ M) au niveau des réseaux thoraciques. (C) Histogramme représentant la période locomotrice en condition contrôle et après application de gabazine. (D) Diagrammes circulaires représentant les relations de phase entre les bouffées motrices enregistrées au niveau de la racine thoracique (T9) et de la racine lombaire L2 ipsilatérale de référence, en condition contrôle (panneau de gauche) et après ajout de gabazine (panneau de droite). Chaque point indique la valeur moyenne obtenue pour une expérience. r, droite; l, gauche; T, thoracique, L, lombaire.

contenant le mélange NMA/5HT (Cazalets *et al.*, 1994; Bertrand & Cazalets, 1998a). Cela a permis de déclencher une activité rythmique lente au niveau des segments thoraciques dans toutes les préparations testées (n = 9 préparations, $7,82 \pm 0,76$ s) (données non montrées).

L'utilisation d'une approche lésionnelle sur cette préparation pouvant entraîner une perturbation des capacités rythmiques endogènes des segments thoracique isolés, en modifiant l'intégrité fonctionnelle de ces réseaux (Juvin & Morin, 2005), nous avons également utilisé une approche pharmacologique en perfusant avec du NMA/5HT les segments spinaux thoraciques, tout en bloquant l'activité neuronale au niveau lombaire grâce à la perfusion d'une solution isotonique de sucrose au niveau de la moelle lombosacrée (Fig. 2D1-D2). Dans cette condition, nous avons observé un patron d'activité comparable à celui observé après section, avec une augmentation significative de la période des bouffées au niveau thoracique (Fig. 2D2, n= 7 préparations, $8,23 \pm 1,06$ s) par rapport à la période locomotrice obtenue en condition contrôle (Fig. 2D1, $3,57 \pm 0,37$ s, t-test non paramétrique pairé Wilcoxon test, $p < 0,05$). Ainsi, une séparation physique ou pharmacologique des réseaux thoraciques et lombaires permet de révéler une activité rythmique intrinsèque aux réseaux thoraciques.

L'ensemble de ces résultats suggère que les réseaux lombaires inhibent l'activité rythmique thoracique en condition contrôle. Toutefois, nous avons également montré que l'activation des segments thoraciques contribue à réguler la durée du cycle généré par le réseau locomoteur lombaire (Fig. 2B). Pour étudier plus précisément l'influence des réseaux thoraciques sur le rythme locomoteur lombaire, nous avons perfusé l'ensemble de la moelle avec un mélange de NMA/5HT, de manière à déclencher des épisodes de locomotion fictive à la fois au niveau des racines ventrales thoraciques et lombaires (Fig. 3A, n= 6). Puis de la gabazine à $2\mu\text{M}$ a été rajoutée au mélange de NMA/5HT, uniquement sur les segments thoraciques, de manière à augmenter l'excitabilité de ces derniers. Dans cette condition nous avons observé un ralentissement significatif du rythme locomoteur ($3,26 \pm 0,21$ s en condition control et $5,98 \pm 0,72$ en condition gabazine ; t-test pairé ; $p < 0,02$; Fig. 3C) et une augmentation significative de l'amplitude des bouffées d'activités à la fois au niveau thoracique et au niveau lombaire (Fig. 3B ; t-test pairé ; $p < 0,05$). L'organisation temporelle des relations thoraco-lombaires n'est pas modifiée entre la condition contrôle (valeur moyenne de phase $0,22 \pm 0,05$; $r = 0,95$) et la condition gabazine (valeur moyenne de phase

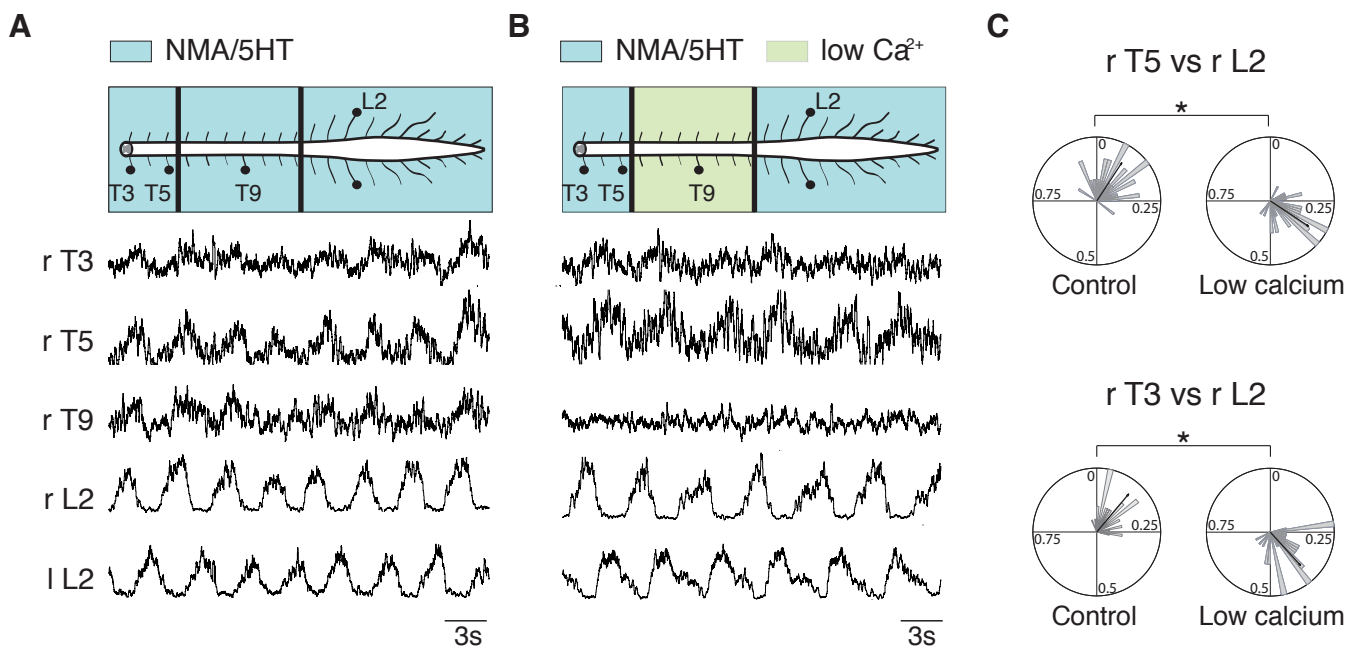


Figure 4 : Couplage entre l'activité locomotrice lombaire et les bouffées motrices enregistrées dans les segments thoraciques distaux.

(A) Des activités locomotrices coordonnées le long de la moelle épinière thoraco-lombaire sont déclenchées par une perfusion de NMA / 5HT (condition contrôle). (B) Des bouffées d'activité motrices coordonnées à l'activité locomotrice lombaire sont enregistrées dans les segments thoraciques supérieurs lorsque la transmission synaptique est bloquée (solution de bas calcium) au niveau des segments thoraciques intermédiaires T6-T12. Noter l'absence d'activité en T9 dans cette dernière condition. (C) Diagrammes circulaires représentant les relations de phase entre les bouffées motrices enregistrées au niveau T3 (panneaux inférieurs) et T5 (panneaux supérieurs) des segments thoraciques par rapport à la racine L2 ipsilatérale prise comme référence, avant (contrôle, panneaux de gauche) et après le blocage de la transmission synaptique dans segments thoraciques (milieu bas calcium, panneaux de droite). Noter le décalage de la phase moyenne observée entre les conditions de bas calcium par rapport à la condition de contrôle. r, droite; l, gauche; T, thoracique, L, lombaire. * $p < 0,05$

0,20 ± 0,11; $r = 0,79$; Watson U2 test; $p > 0,05$; Fig. 3D). Ces expériences confirment l'influence inhibitrice des réseaux thoraciques sur le rythme locomoteur lombaire. Il semble donc qu'il existe des connexions réciproques entre les segments thoraco-lombaires, qui pourraient être impliquées dans la régulation du rythme locomoteur.

Les mécanismes de coordination entre les activités thoraciques et les réseaux locomoteurs lombaires peuvent impliquer de longues voies ascendantes propriospinales et / ou des voies ascendantes relayées au niveau thoracique. Pour tester cette hypothèse, la moelle épinière a été artificiellement divisée en trois compartiments (T3-T5, T6-T11, T12-queue de cheval) à l'aide de murs de Vaseline ($n = 6$ préparations). Dans toutes les préparations, l'application simultanée de NMA/5HT dans les trois compartiments déclenche une activité locomotrice coordonnée le long de la moelle épinière (Fig. 4A). Un blocage de l'activité synaptique par application locale d'une solution de bas calcium/haut magnésium sur les segments intermédiaires (T6-T12), n'a pas d'effet sur l'expression des bouffées d'activité dans les segments thoraciques supérieurs, qui restent coordonnées à l'activité locomotrice lombaire (Fig. 4B). Le blocage synaptique des relais thoraciques intermédiaires, entraîne cependant un décalage significatif des relations de phase des bouffées motrices thoracique en T5 (valeur moyenne de phase: contrôle, $0,15 \pm 0,08$; bas calcium/haut magnésium $0,34 \pm 0,11$; test de Watson U2, $p < 0,05$) et en T3 (valeur moyenne de phase: contrôle, $0,22 \pm 0,12$; bas calcium/haut magnésium $0,39 \pm 0,11$; test de Watson U2, $p < 0,05$; Fig. 4C) par rapport à la racine de référence L2. Cela indique qu'en condition contrôle, il existe à la fois des voies ascendantes propriospinales longues, et des relais segmentaires qui pourraient contribuer à la coordination de l'activité locomotrice thoracique et lombaire.

Pour déterminer si ces voies propriospinales projettent sur les segments thoraciques ipsilatéraux ou réalisent des connexions croisées, nous avons utilisé une approche de lésion en réalisant une hémisection sagittale au niveau thoracique T11. La perfusion de NMA/5HT sur une moelle épinière intacte déclenche une activité motrice à la fois au niveau lombaire et au niveau thoracique (Fig. 5A). Suite à une hémisection sagittale réalisée au niveau thoracique T11, l'activité locomotrice enregistrée au niveau des racines ventrales thoraciques T6 et T8 persiste, à la fois au niveau des segments thoraciques situés du côté non-lésé, mais également au niveau des racines thoraciques situées au-dessus du site de

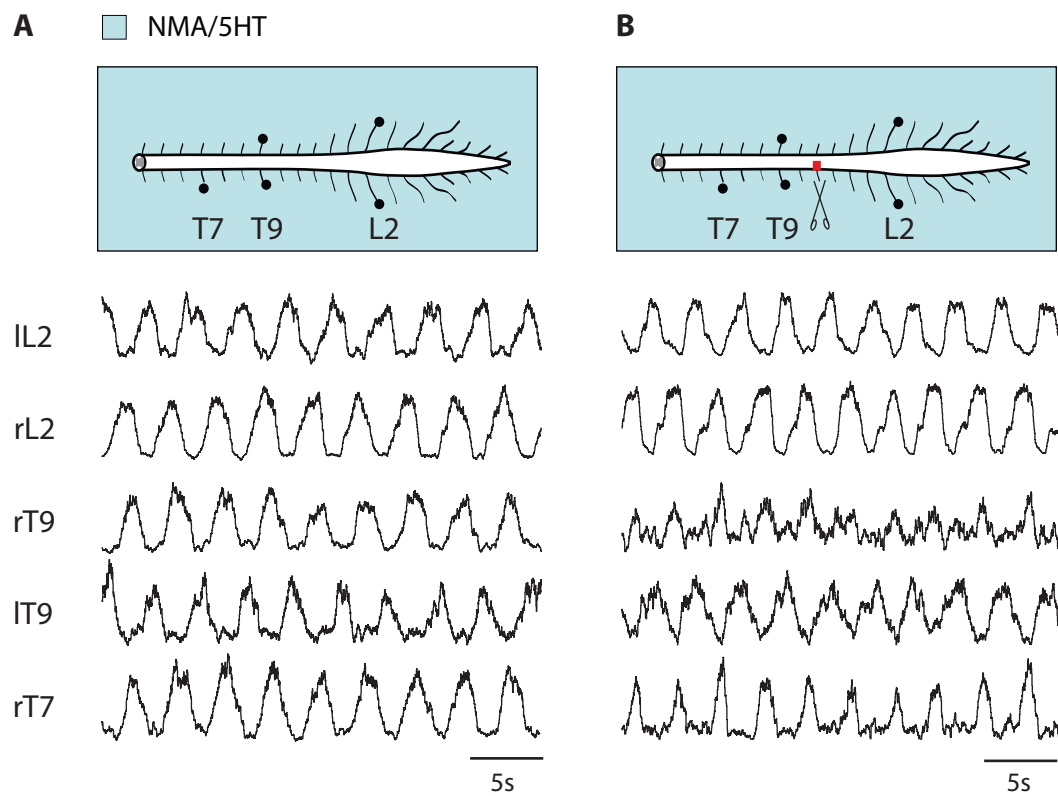


Figure 5 : Importance des connexions commissurales dans le couplage des activités motrices thoraco-lombaires.

(A) Activité locomotrice coordonnée enregistrée le long de la moelle épinière thoraco-lombaire, entraînée par la perfusion de NMA/5HT. (B) Une hémisection sagittale en T11 gauche (barre rouge) ne bloque pas l'activité motrice enregistrée au niveau des racines thoraciques situées au-dessus de la section (rT9 et rT7), suggérant l'importance des connexions commissurales. r, droite; l, gauche; T, thoracique; L, lombaire.

section, bien que l'activité devienne moins claire (Fig. 5B). Sur 8 préparations, aucune différence significative de l'amplitude n'a été observée au niveau des bouffées d'activités thoraciques avant et après lésion (t-test païré ; $p > 0,05$). De même, l'organisation temporelle des relations de phase entre la racine lombaire de référence L2 et la racine thoracique T8 située au-dessus de la lésion est identique à celle observée avant la lésion (valeur moyenne de phase ; contrôle : $0,14 \pm 0,06$; $r=0,92$ et après lésion : $0,18 \pm 0,09$; $r=0,83$; Watson U2 test ; $p > 0,05$). Aucune différence significative de la période motrice n'est observée au niveau lombaire avant et après lésion ($4,26 \pm 0,61$ en condition contrôle et $4,07 \pm 0,63$ après lésion ; $n=8$; t-test païré ; $p > 0,05$). Cette expérience suggère qu'il existe des connexions croisées au niveau thoracique au-dessus du site de lésion, et que ces connexions jouent une part importante dans l'organisation des relations thoraco-lombaires.

C) Localisation des motoneurones thoraciques innervant les muscles du dos.

Dans une étude précédente, nous avons montré que les motoneurones innervant les muscles du dos (les muscles longissimus et multifidus dorsali) sont organisés en colonne le long de la moelle épinière thoraco-lombaire (Falgairolle & Cazalets, 2007), mais leur emplacement dans le plan transversal n'a pas été défini. Afin de réaliser l'enregistrement intracellulaire des motoneurones thoraciques axiaux, il était indispensable de déterminer avec précision leur localisation au sein de la moelle épinière. Au niveau thoracique, un marquage à la choline acétyl-transférase a révélé deux populations de motoneurones dans la lamina IX (Fig. 6A, panneau de gauche). Afin de localiser les motoneurones innervant les muscles du dos, des cristaux de sous-unité de cholera toxin β conjugué à de l'Alexa Fluor 488 (CT β -AF 488) ont été insérés dans les muscles longissimus et multifidus dorsali d'un seul côté du dos ($n = 3$ préparations). En accord avec la littérature (Smith & Hollyday, 1983), les corps cellulaires des motoneurones marqués rétrogradement (Fig. 6A, panneau du milieu) ont été exclusivement retrouvés dans la population de motoneurones ventromédiane (Fig. 6A, panneau de droite).

D) Motoneurones corrélés à l'activité locomotrice lombaire et motoneurones non-corrélés.

Des enregistrements intracellulaires en patch-clamp de motoneurones ont été effectués le long de la moelle épinière thoracique (de T3 à T11) pour étudier l'activité des

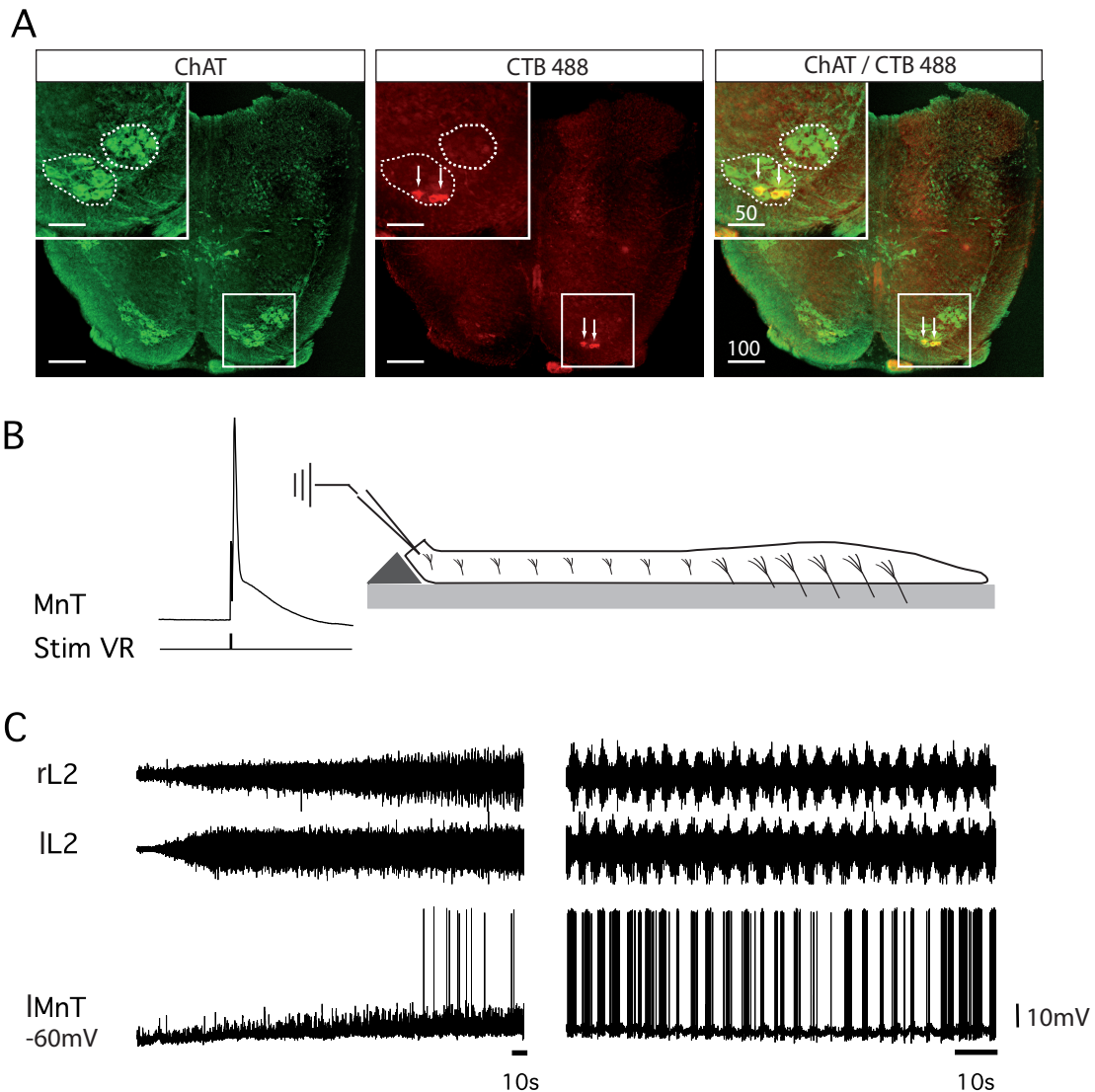


Figure 6 : Localisation intracellulaire et enregistrement de la population de motoneurones axiaux dans la moelle épinière thoracique.

(A) Localisation du groupe de motoneurones innervant les muscles du dos au niveau du segment thoracique T12. Un marquage à la Choline acétyl-transférase des cellules cholinergiques (panneau de gauche) montrent deux principales populations de motoneurones dans la zone ventromédiane et dans une partie latérale de la moelle ventrale (agrandissement de la zone encadrée en haut à gauche). La localisation ventromédiane des motoneurones innervant les muscles du dos est révélée par marquage rétrograde réalisé par injection intramusculaire du traceur rétrograde cholera-toxine B. Les flèches indiquent les motoneurones marqués. La superposition des marquages présentée dans le panneau de droit confirme que cellules marquées sont bien des motoneurones cholinergiques. (B) Diagramme illustrant le dispositif expérimental utilisée pour l'enregistrement des motoneurones thoraciques. La moelle épinière a été sectionnée transversalement au niveau d'un segment thoracique d'intérêt et la surface sectionnée a été surélevée par un triangle de Sylgard de manière à faciliter l'accès aux motoneurones lors des enregistrements intracellulaires. Les motoneurones ont été identifiés par la présence d'un potentiel d'action antidromique enregistré en réponse à des stimulations de la racine ventrale thoraciques correspondante (panneau de gauche). (C) Enregistrements des modifications de l'activité extracellulaire lombaire et intracellulaire enregistrée dans un motoneurone thoracique lors de la perfusion de NMA/5HT sur la préparation. (C1) L'activité locomotrice apparaît progressivement au niveau lombaire et le motoneurone se dépolarise en parallèle, (C2) avant de se mettre à décharger en phase avec l'activité locomotrice.

motoneurones axiaux thoraciques au cours d'épisodes de locomotion fictive. Pour cela, nous avons utilisé une préparation de moelle épinière coupée transversalement aux différents niveaux d'enregistrement, afin de pouvoir cibler les motoneurones situés dans la partie ventromédiane de la moelle (méthodes, Fig. 6B). Nos résultats sont basés sur les enregistrements réalisés à partir de 59 motoneurones thoraciques, identifiés par une stimulation antidromique (Fig. 6B, panneau de gauche).

La figure 6C montre un exemple représentatif des changements qui se produisent dans un motoneurone thoracique lors de l'activation des réseaux locomoteurs. Pendant les premières minutes de perfusion de NMA/5HT, une activité tonique apparaît au niveau lombaire, puis une activité locomotrice stable s'installe. Le potentiel de membrane des motoneurones thoraciques se dépolarise progressivement, et en parallèle les entrées synaptiques arrivant sur les motoneurones augmentent. Par la suite, les motoneurones se mettent à décharger des bouffées de potentiels d'actions lors de la phase de dépolarisation des oscillations du potentiel de membrane (Fig. 6C, le panneau du milieu).

Pendant l'application de NMA/5HT sur les préparations de moelles épinières thoraco-lombo-sacrée, nous avons constaté que 25/33 motoneurones émettent des bouffées de potentiels d'action coordonnés à l'activité locomotrice enregistrée au niveau lombaire. L'analyse de la distribution des potentiels d'actions au cours des différentes phases du cycle moteur (arbitrairement divisé en 10; Fig. 7A, panneau de droite) montre clairement une modulation de la décharge en fonction du cycle moteur. En revanche, dans 8/33 motoneurones thoraciques enregistrés dans cette condition, les potentiels d'actions sont répartis uniformément, et l'on peut voir que les motoneurones ne déchargent pas pendant une phase particulière du cycle moteur (Fig. 7B, panneau de droite).

Afin de déterminer si l'activité des motoneurones thoraciques au cours du cycle locomoteur est contrôlée par les segments lombaires, nous avons réalisé des enregistrements de ces motoneurones lors de la perfusion de NMA/5HT au niveau des segments lombo-sacrés uniquement (Fig. 8). Sur les 25 motoneurones enregistrés dans cette condition, 13 d'entre eux ont exprimé des oscillations de leurs potentiels de membrane rythmiques et synchronisés avec l'activité locomotrice lombaire. Dans l'exemple présenté dans la figure 8A, les oscillations du potentiel de membrane sont synchronisées avec l'activité enregistrée dans la racine ventrale L2, comme le révèle la moyenne des cycles

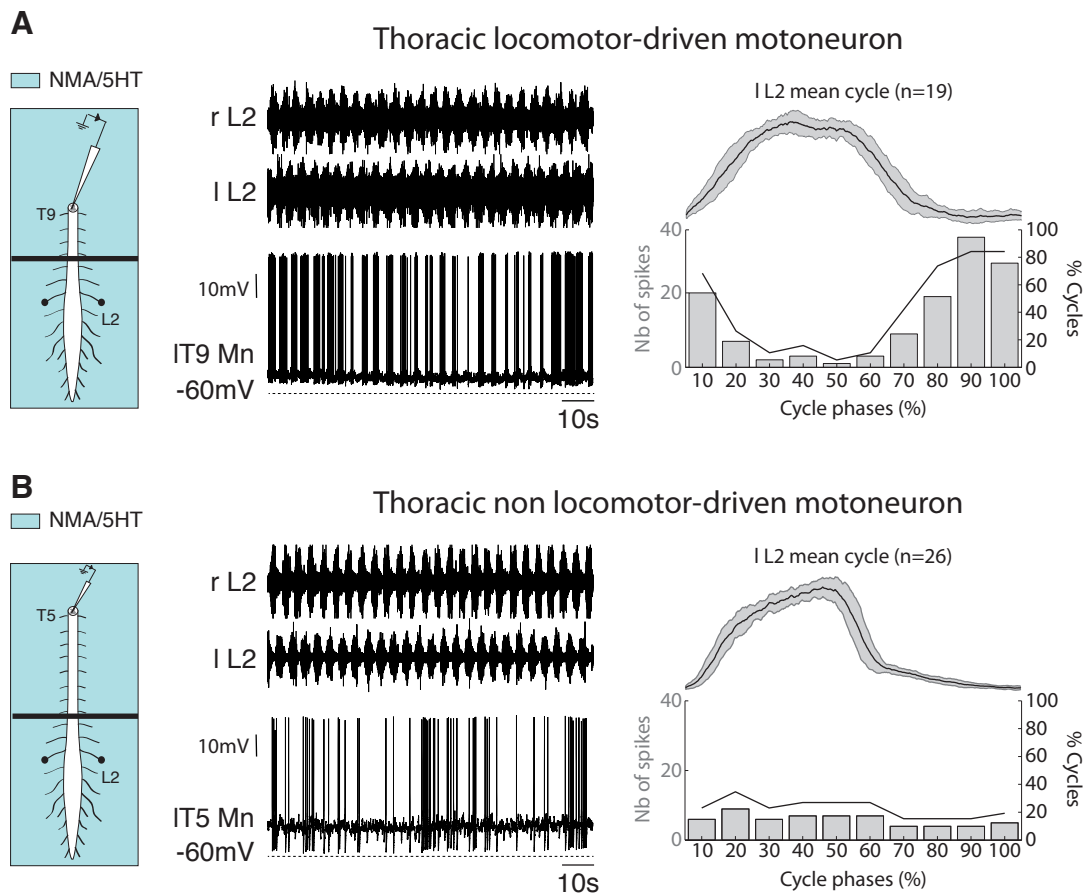


Figure 7 : Deux populations de motoneurones thoraciques sont révélées lors d'épisodes de locomotion fictive.

(A) Enregistrement intracellulaire d'un motoneurone thoracique T9 qui exprime une activité coordonnée avec l'activité locomotrice induite par la perfusion de NMA/5HT. L'histogramme à droite représente le nombre de potentiels d'action émis au cours du cycle locomoteur (normalisé et moyenné à partir des bouffées d'activité de la racine L2 gauche et arbitrairement divisé en 10, tracés du haut). La ligne noire épaisse indique le pourcentage de cycles au cours de laquelle au moins un potentiel d'action a été émis dans les différentes sous-phases du cycle locomoteur. Ce motoneurone émet des potentiels d'action en majorité entre les bouffées du cycle locomoteur de la racine lombaire gauche L2. (B) Enregistrement intracellulaire d'un motoneurone thoracique T5 non entraîné par la locomotion (panneau du milieu) dont l'activité est sans rapport avec l'activité locomotrice lombaire, comme indiqué par la distribution uniforme des potentiels d'action observée au cours du cycle locomoteur (panneau de droite). r, à droite; l, à gauche; T, thoracique, L, lombaire.

extracellulaires et intracellulaires (Fig. 8A, panneau du bas). Dans cette condition expérimentale 12/25 motoneurones n'ont pas montré d'oscillations de leurs potentiels de membrane dans cette condition (Fig. 8B). Ces deux patrons de décharge ne sont pas dépendants des conditions expérimentales, en effet, aucuns des 20 motoneurones enregistrés dans les deux conditions expérimentales n'ont montré de changements dans leur patron d'activité, ce qui suggère que nous avons enregistré deux populations de motoneurones thoraciques fonctionnellement différentes. Au total, sur les 59 motoneurones enregistrés dans une ou les deux conditions expérimentales, 38 (64%) étaient des motoneurones thoraciques entraînés par la locomotion, qui ont exprimé des oscillations du potentiel de membrane phasiques coordonnées au patron locomoteur, tandis que les 21 motoneurones restants n'ont pas exprimé d'activité coordonnée à l'activité locomotrice lombaire (Fig. 8D).

Lors de l'activation des CPGs locomoteurs lombaires par une stimulation électrique des racines dorsales sacrées, deux populations de motoneurones thoraciques ($n= 8$ motoneurones) ont également été observées (Fig. 9). 5 motoneurones ont montré une activité caractérisée par une composante tonique lente d'une valeur moyenne d'amplitude de $2,5 \pm 0,92$ mV, et d'une composante en phase avec l'activité de locomotion fictive enregistrée au niveau des racines ventrales lombaires, avec une amplitude moyenne des oscillations du potentiel de membrane de $3,68 \pm 0,83$ mV (Fig. 9A). Les 3 autres motoneurones ont présenté une dépolarisation lente moyenne de $2,04 \pm 1,18$ mV, mais n'ont réalisé aucune oscillation de leur potentiel de membrane au cours de la locomotion induite par les stimulations électriques (Fig. 9B). Ainsi, il semblerait qu'il existe deux populations de motoneurones thoraciques fonctionnellement différentes. Ces deux populations ne sont pas dépendantes de la condition expérimentale.

De manière intéressante, la proportion des motoneurones entraînés par la locomotion n'est pas uniforme le long de la moelle thoracique car nous avons observé que leur proportion diminue significativement dans le sens caudo-rostral (T8-T10: 81%, T6-T7: 64%, T3-T5: 50%, test de Chi2, $p < 0,0001$; Fig. 8D).

Pour déterminer si ces deux patrons de réponses sont dus à des différences dans les propriétés membranaires de ces deux populations de motoneurones, nous avons testé la résistance d'entrée membranaire, le patron de décharge, ainsi que l'AHP. Aucune différence

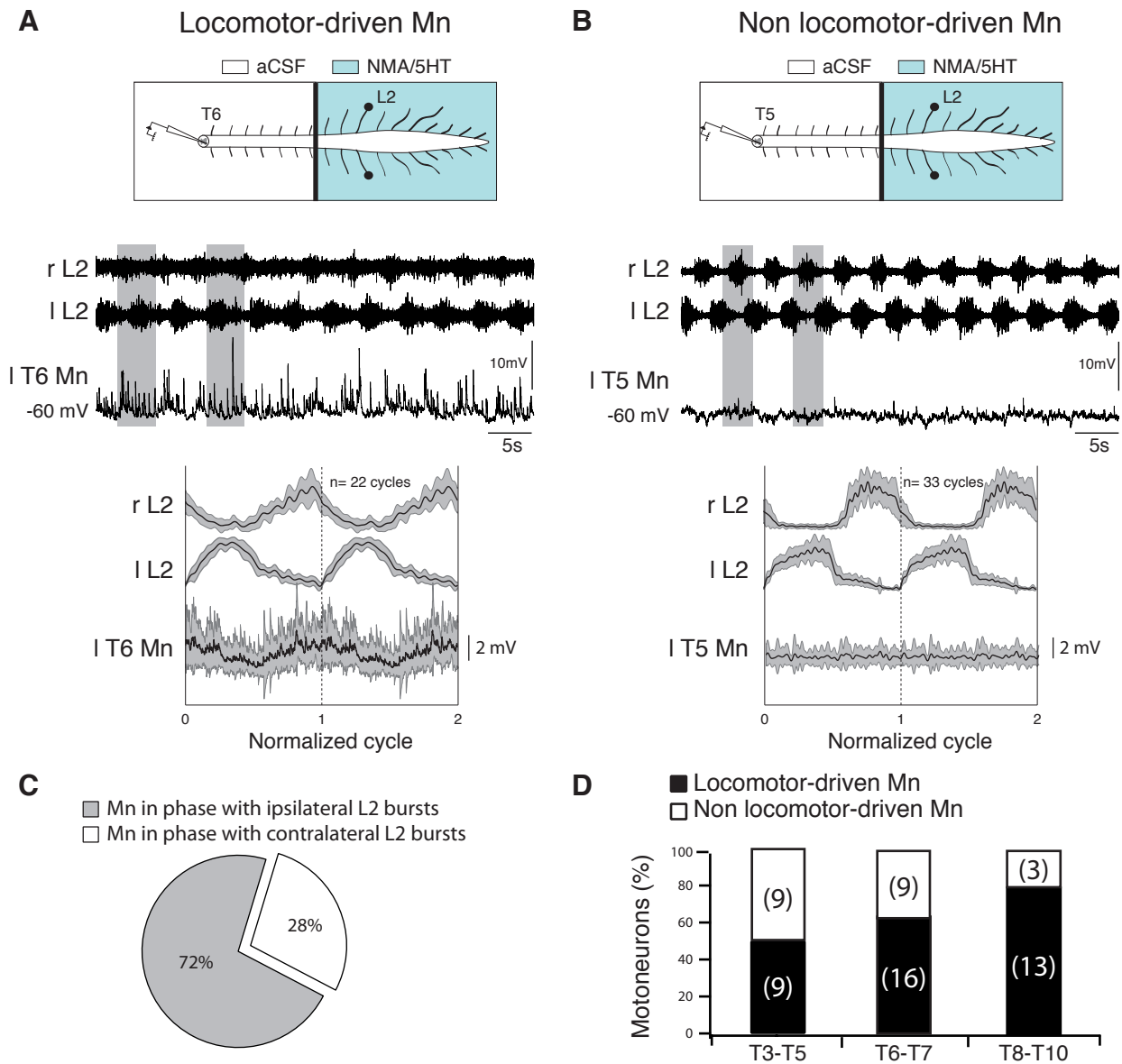


Figure 8 : L'activation pharmacologique des réseaux locomoteurs lombaires déclenche des oscillations du potentiel de membrane dans certains motoneurons thoraciques.

(A) Les oscillations du potentiel de membrane enregistrées dans un motoneurone T6 entraîné par la locomotion, sont coordonnées à l'activité locomotrice lombaire lors de l'application de NMA/5-HT uniquement au niveau des réseaux lombo-sacrée. La représentation du cycle locomoteur moyen (panneau du bas) met en évidence la relation 1: 1 entre les oscillations du potentiel de membrane enregistrées au niveau du motoneurone et de l'activité locomotrice lombaire. (B) La même démarche expérimentale appliquée sur un motoneurone non entraîné par la locomotion, enregistré au niveau du segment thoracique T5 ne montrent aucune oscillation du potentiel pendant la locomotion. (C) Pourcentage des motoneurons entraînés par la locomotion exprimant des oscillations du potentiels de membrane et des potentiels d'actions en phase avec les bouffées d'activité locomotrice lombaire de la racine L2 ipsi- (gris) et controlatéral (blanc). (D) Les pourcentages cumulatifs de motoneurons entraînés par la locomotion (noir) et de motoneurons non entraînés par la locomotion en fonction des segments thoraciques supérieur (T3-T5), intermédiaire (T6-T7) et inférieure (T8-T10). Les chiffres situés dans les barres indiquent le nombre de motoneurons. r, à droite; l, à gauche; T, thoracique, L, lombaire.

significative n'a été observée dans la résistance membranaire d'entrée de ces deux populations ($46 \pm 5,6 \text{ M}\Omega$ pour les motoneurones avec entraînement locomoteur ; et $66 \pm 7,9 \text{ M}\Omega$ pour motoneurones sans entraînement locomoteur, t-test ; $p= 0,054$). Dans un second temps, afin de déterminer la relation fréquence instantanée-courant (f-I), nous avons injecté une série de créneaux de courant dépolarisant dans des cellules maintenues à leur potentiel de repos par l'injection d'un courant hyperpolarisant. Cette relation fréquence instantané-courant n'est pas significativement différente comme la révèle la pente de la courbe f-i ($0,19 \pm 0,03$ pour les motoneurones avec entraînement locomoteur vs $0,24 \pm 0,05$ pour motoneurones sans entraînement locomoteur, t-test ; $p= 0,409$). Enfin, nous savons que l'AHP (afterhyperpolarisation) joue un rôle fondamental dans le contrôle de la fréquence de décharge et dans le contrôle du patron de l'activité des motoneurones. Nous avons mesuré l'amplitude de l'AHP dans ces deux populations et aucune différence significative n'a été observée ($- 3.85\text{mV} \pm 0.77\text{mV}$ pour les motoneurones avec entraînement locomoteur et $-4.8\text{mV} \pm 1,39\text{mV}$ pour motoneurones sans entraînement locomoteur, $p= 0,495$). Ces résultats suggèrent que la différence de patron d'activité de ces deux populations de motoneurones au cours de la locomotion, ne dépend pas des propriétés membranaires des motoneurones, mais des entrées synaptiques arrivant sur ces derniers.

E) Contrôle synaptique des motoneurones thoraciques

Nous avons réalisé des expériences pour déterminer la nature de la connexion synaptique qui entraîne les oscillations phasiques du potentiel de membrane dans les motoneurones thoraciques entraînés par la locomotion ($n=6$ de 6 préparations différentes). Pour cela, nous avons utilisé des préparations qui ont été partitionnées avec un mur de Vaseline situé au niveau T12 / T13, permettant l'application au niveau thoracique d'antagonistes à différents récepteurs pendant des épisodes de locomotion induits par l'application de NMA/5HT sur les segments lombo-sacrés (Fig. 10). La figure 10.A1 présente un enregistrement d'un motoneurone T7 au cours d'un épisode locomoteur entier. À cette échelle de temps lente on observe une dépolarisation lente du potentiel de membrane d'une amplitude de 6 mV. Un agrandissement de la séquence (Fig. 10B1) révèle des oscillations du potentiel de membrane corrélées à la locomotion ($5,9 \pm 0,23\text{mV}$, $n = 30$ cycles) sur la dépolarisation lente. Suite à l'application de DNQX ($5 \mu\text{M}$), un antagoniste aux récepteurs AMPA et kaïnate, dans le compartiment thoracique, à la fois la dépolarisation

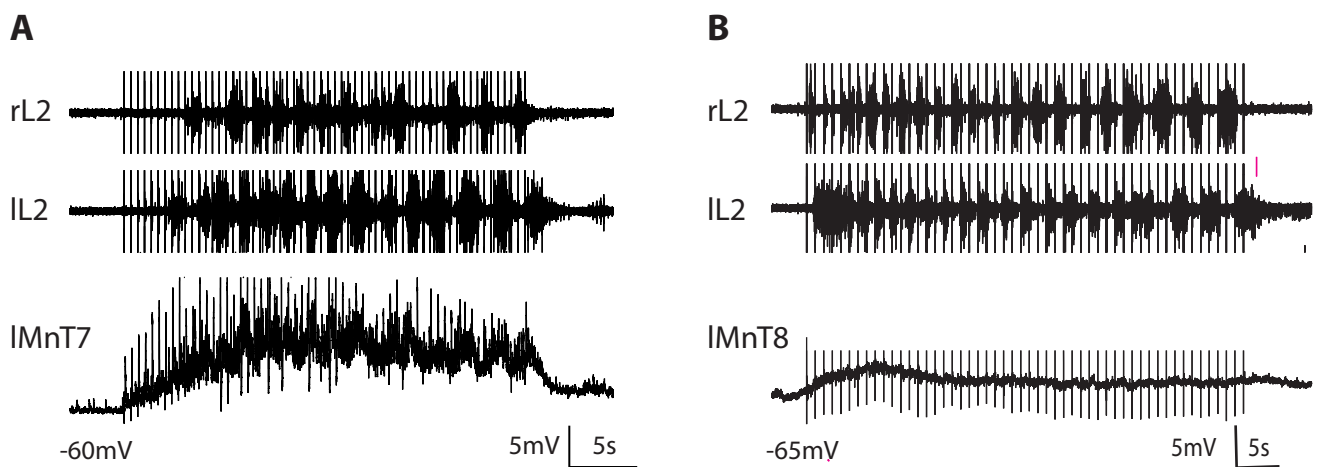


Figure 9 : L'activation électrique des réseaux locomoteurs lombaires déclenche des oscillations du potentiel de membrane dans certains motoneurones lombaires.

(A) Des oscillations du potentiels de membranes sont enregistrées au niveau d'un motoneurone thoracique T7 lors d'un épisode de locomotion fictive déclenché par un stimulation d'une racine dorsale sacrée. (B) Aucune variation du potentiel de membrane coordonnée à l'activité locomotrice est observée dans ce motoneurone thoracique T8 lors d'un épisode de locomotion fictive entraîné par stimulation d'une racine dorsale sacrée.

lente et l'amplitude des oscillations ont diminué de 13% (5,2 mV) et 59,4% ($2,4 \pm 0,08$ mV, n = 29 cycles), respectivement (Fig. 10A2-B2). L'ajout de l'antagoniste du récepteur NMDA, (AP5 ; 5 μ M) à la solution saline contenant le DNQX, diminue encore l'amplitude de la dépolarisation lente (1,9 mV, ~ 68% de diminution par rapport à la dépolarisation de contrôle) et des oscillations phasiques ($1,8 \pm 0,07$ mV, 69,5 % de baisse par rapport à l'amplitude contrôle, n = 30 cycles, Fig. 10A3-B3).

Nous avons également constaté que l'inhibition glycinergique participe à la commande synaptique arrivant sur les motoneurones thoraciques. Dans l'exemple présenté dans la Figure 10.C1, toutes les oscillations phasiques du potentiel de membrane ont été complètement abolies lorsque de la strychnine (2 μ M) a été ajouté au DNQX (5 μ M) et à l'AP5 (5 μ M) sur les segments thoraciques (Fig. 10C2). L'ensemble de ces expériences indique que la commande synaptique qui contrôle l'activité phasique des motoneurones corrélés à la locomotion au niveau thoracique, est médiée par l'activation des récepteurs des acides aminés excitateurs et des récepteurs glycinergiques.

F) Commande monosynaptique des motoneurones thoraciques par le réseau locomoteur lombaire.

Enfin, nous avons testé si la commande synaptique arrivant sur les motoneurones thoraciques entraînés par la locomotion provient directement du réseau locomoteur lombaire. Nous avons utilisé une préparation de moelle épinière partitionnée avec des murs de Vaseline placés au niveau T12 / T13 pour déclencher une activité de locomotion fictive dans les réseaux lombaires, et nous avons enregistré en intracellulaire des motoneurones thoracique (n= 5 de 5 préparations différentes). Les oscillations du potentiel de membrane de l'un de ces motoneurones, enregistré au niveau du segment T5, sont présentées dans la figure 11A. Dans cette condition contrôle, l'amplitude moyenne de la commande synaptique est de $4,95 \pm 0,15$ mV. Dans une deuxième étape, nous avons remplacé localement la solution ACSF normale par une solution de haut calcium /haut magnésium pour réduire la transmission polysynaptique dans les segments thoraciques (Berry & Pentreath, 1976; Cazalets *et al.*, 1995; Jahr & Yoshioka, 2005). Comme le montre la figure 11B, l'absence de relais thoraciques polysynaptiques ne bloque pas les oscillations du potentiel de membrane sur ce motoneurone thoracique, bien que l'amplitude de la commande synaptique soit

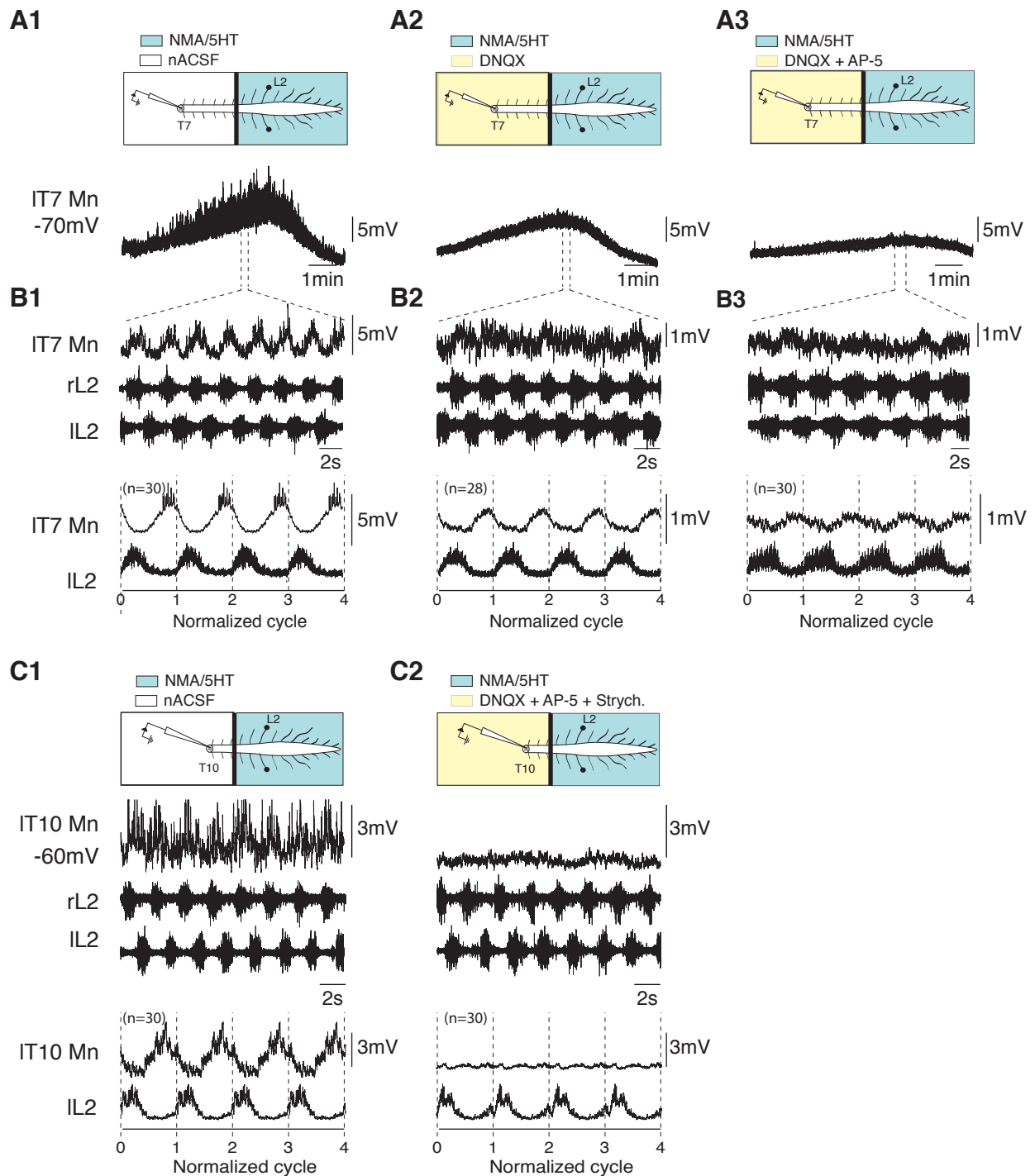


Figure 10 : Commande synaptique locomotrice biphasique arrivant sur les motoneurones thoraciques entraînés par la locomotion.

(A) Dépolarisation globale du potentiel de membrane d'un motoneurone T7 au cours d'un épisode de locomotion fictive entier, provoquée par l'application de NMA (15 μ M) et de 5HT (15 μ M) au niveau des segments lombo-sacrée, en condition contrôle (A1), et au cours de l'application de DNQX seul (5 μ M), (A2) ou combiné avec de l'AP5 (5 μ M, A3) appliquée au niveau des segments thoracique. Noter la diminution de l'amplitude de la dépolarisation lente en présence de DNQX et DNQX/AP5. (B) Des épisodes de locomotion extrait des séquences présentées en A montrent les oscillations du potentiel de membrane en phase avec le patron locomoteur enregistré au niveau des racines ventrales L2 (enregistrements du haut). Les panneaux du bas illustrent le cycle moyen (répété 4 fois) obtenu en utilisant les bouffées d'activité de la racine L2 gauche comme référence, et montrent la diminution de l'amplitude de la commande synaptique locomotrice en présence de DNQX et de DNQX/AP5 au niveau thoracique. (C) Enregistrements bruts (panneaux supérieurs) et représentation du cycle moyen (répété 4 fois, panneaux du bas) obtenu à partir d'un motoneurone T10 lors de l'activation pharmacologique des réseaux locomoteurs lombaires avant (C1) et après l'application de strychnine (2 μ M), DNQX (5 μ M) et AP5 (5 μ M) sur les segments thoraciques. Après le blocage des récepteurs glutamatergiques et glycinergiques, plus aucune oscillations du potentiel de membrane n'ont été observées. r, à droite; l, à gauche; T, thoracique, L, lomboire.

réduite de $2,49 \pm 0,04$ mV (Fig. 11C). En moyenne, l'amplitude de la commande synaptique locomotrice est diminuée de $43,2 \pm 21,5\%$ ($n = 5$ motoneurones) lors de la perfusion de la solution de haut calcium /haut magnésium sur les segments thoraciques, par rapport à la condition contrôle. Cette observation indique qu'une partie de la commande synaptique reçue par les motoneurones locomoteurs thoraciques provient directement du réseau locomoteur lombaire.

Discussion

L'un des principaux résultats de notre étude, résumée dans le schéma de la figure 12, est que le réseau locomoteur lombaire participe à l'émergence d'activités locomotrices au niveau thoracique. En utilisant des enregistrements intracellulaires de motoneurones thoraciques, combinés à une manipulation pharmacologique de ces segments, nous avons montré qu'une partie des motoneurones thoraciques présentent des oscillations de leur potentiel de membrane coordonnées à l'activité locomotrice. Ces oscillations sont biphasiques, avec une composante excitatrice glutamatergique et une phase d'inhibition d'origine glycinergique. Nous avons montré pour la première fois que le réseau locomoteur lombaire influe directement sur les motoneurones thoraciques et contribue à l'entraînement de leurs oscillations du potentiel de membrane.

A) Organisation caudo-raustral des bouffées thoraciques axiales au cours de la locomotion.

Sur des préparations de moelles épinières isolées de rat nouveau-né, bien que les réseaux spinaux cervicaux, lombaires et sacrés contrôlant respectivement les mouvements des membres antérieurs, des membres postérieurs et de la queue, puissent être activés indépendamment (Cazalets *et al.*, 1995; Lev-Tov *et al.*, 2000; Ballion *et al.*, 2001; Gabbay *et al.*, 2002), ils produisent une activité coordonnée lorsqu'ils sont stimulés simultanément (Kremer & Lev-Tov, 1997; Cazalets *et al.*, 2000; Cazalets & Bertrand, 2000; Gabbay *et al.*, 2002; Juvin & Morin, 2005; Juvin *et al.*, 2012). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux réseaux thoraciques impliqués dans le contrôle de la musculature axiale. En réalisant des enregistrements simultanés en extracellulaire des racines ventrales à différents niveaux de la moelle épinière, nous avons confirmé que les segments thoraciques peuvent être activés pharmacologiquement et expriment une activité avec une relation de phase de 1: 1 avec l'activité lombaire de locomotion fictive (Falgairolle & Cazalets, 2007). En utilisant

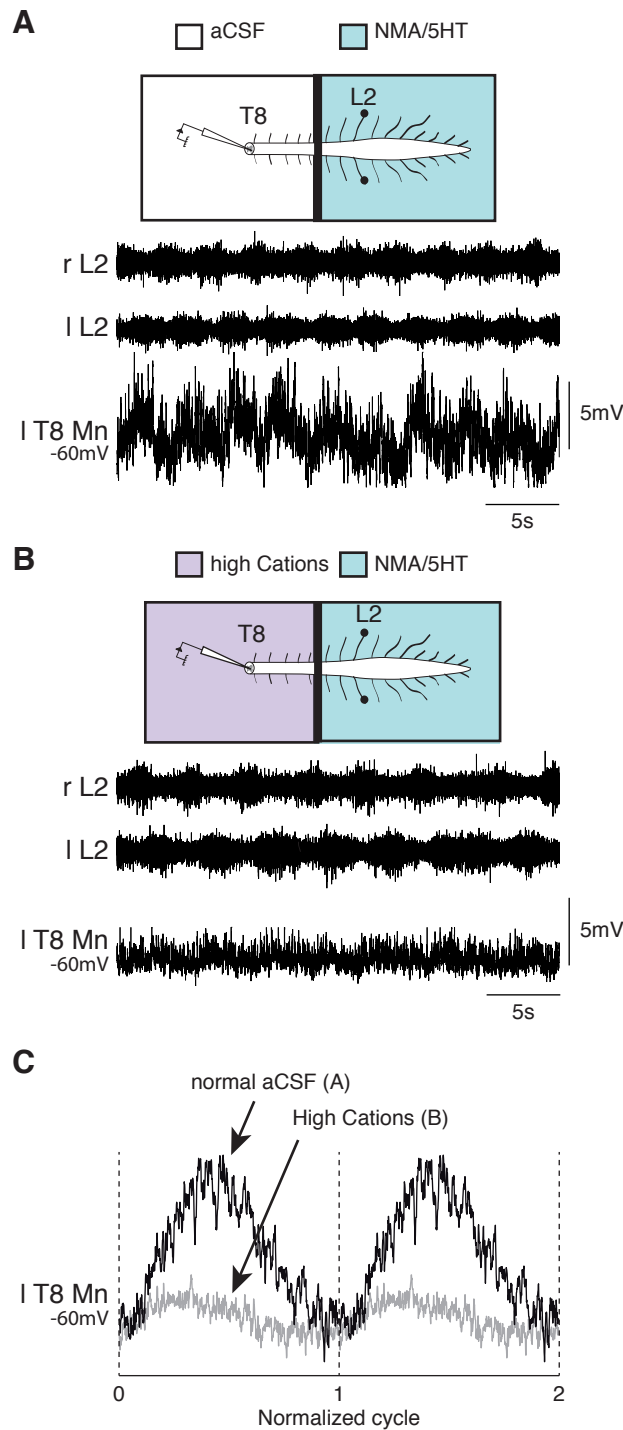


Figure 11 : Transmission de la commande synaptique du réseau locomoteur lombaire aux motoneurones thoraciques.

(A) Oscillations du potentiel de membrane enregistrées à partir d'un motoneurone T8 pendant une activité de locomotion fictive induite par perfusion de NMA/5HT sur la moelle épinière lombaire. (B) Dans ce même motoneurone, ces oscillations persistent lorsque la transmission polysynaptique est bloquée par perfusion d'une solution de haut calcium-haut magnésium (high cations) sur les segments thoraciques. (C) Représentation des commandes synaptiques moyennes enregistrées en condition contrôle (tracé noir) et en présence d'une solution de haut calcium-haut magnésium (tracé gris) dans le compartiment thoracique, montrant la diminution de l'amplitude de la commande synaptique dans la dernière condition. r, à droite; l, à gauche; T, thoracique, L, lombaire.

une analyse de transformées en ondelettes, un ensemble d'outils d'analyse mathématique validé dans notre domaine (Fig. 1, (Torrence & Campo, 1998; Grinsted & Moore, 2004; Mor & Lev-Tov, 2007; Hägglund *et al.*, 2013; Talpalar *et al.*, 2013), nous avons également confirmé que les bouffées d'activité locomotrice thoraciques sont organisées en vagues ascendantes d'activité le long de la moelle épinière thoracique au cours de la locomotion fictive. Cette organisation ascendante des bouffées axiales thoraciques qui correspondent à la flexion de l'axe du corps au cours des cycles de locomotion *in vivo* chez les rats nouveau-nés contraste avec la direction rostro-caudale de déplacement de l'onde lors de la locomotion en avant lors de la nage chez les Vertébrés inférieurs (Wallén & Williams, 1984; Tunstall & Roberts, 1991; Matsushima & Grillner, 1992; Masino & Fetcho, 2005; Gabriel *et al.*, 2008). Il apparaît que la propagation de l'onde locomotrice le long du système axial est un mécanisme de base chez les vertébrés qui a été adapté au cours de l'évolution afin de soutenir le développement des modes de propulsion quadrupède et bipède (Delvolvé *et al.*, 1997).

B) Le réseau locomoteur lombaire contrôle l'activité locomotrice thoracique

Les capacités rythmiques endogènes des réseaux thoraciques sont très dépendantes d'une contribution de la moelle épinière lombaire. En effet, le cocktail de NMA/5HT ne déclenche pas de bouffées d'activités thoraciques lorsqu'il est appliqué sur les réseaux thoraciques uniquement. À l'inverse, une activité apparaît lorsque ces segments ont été physiquement ou pharmacologiquement isolés de la moelle lombaire (Fig. 2, (Cowley & Schmidt, 1997b; Kremer & Lev-Tov, 1997). Cela suggère que la région lombo-sacrée exerce une influence inhibitrice tonique sur les réseaux rythmiques thoraciques.

L'expression de l'activité locomotrice thoracique, dans nos conditions pharmacologiques, dépend donc de l'activation des réseaux lombaire locomoteurs, et implique des voies propriospinales ascendantes (Reed *et al.*, 2006; 2009; Reed & Magnuson, 2013; Brockett *et al.*, 2013). En accord avec les observations antérieures faites chez la lamproie (Hagevik & McClellan, 1999; Miller & Sigvardt, 2000), de longues voies ascendantes sont suffisantes pour maintenir une coordination 1:1 entre l'activité locomotrice des segments de la moelle thoracique rostrale et lombaire, quand la transmission synaptique a été bloquée dans les segments intermédiaires (Fig. 4). De plus, des informations relayées au

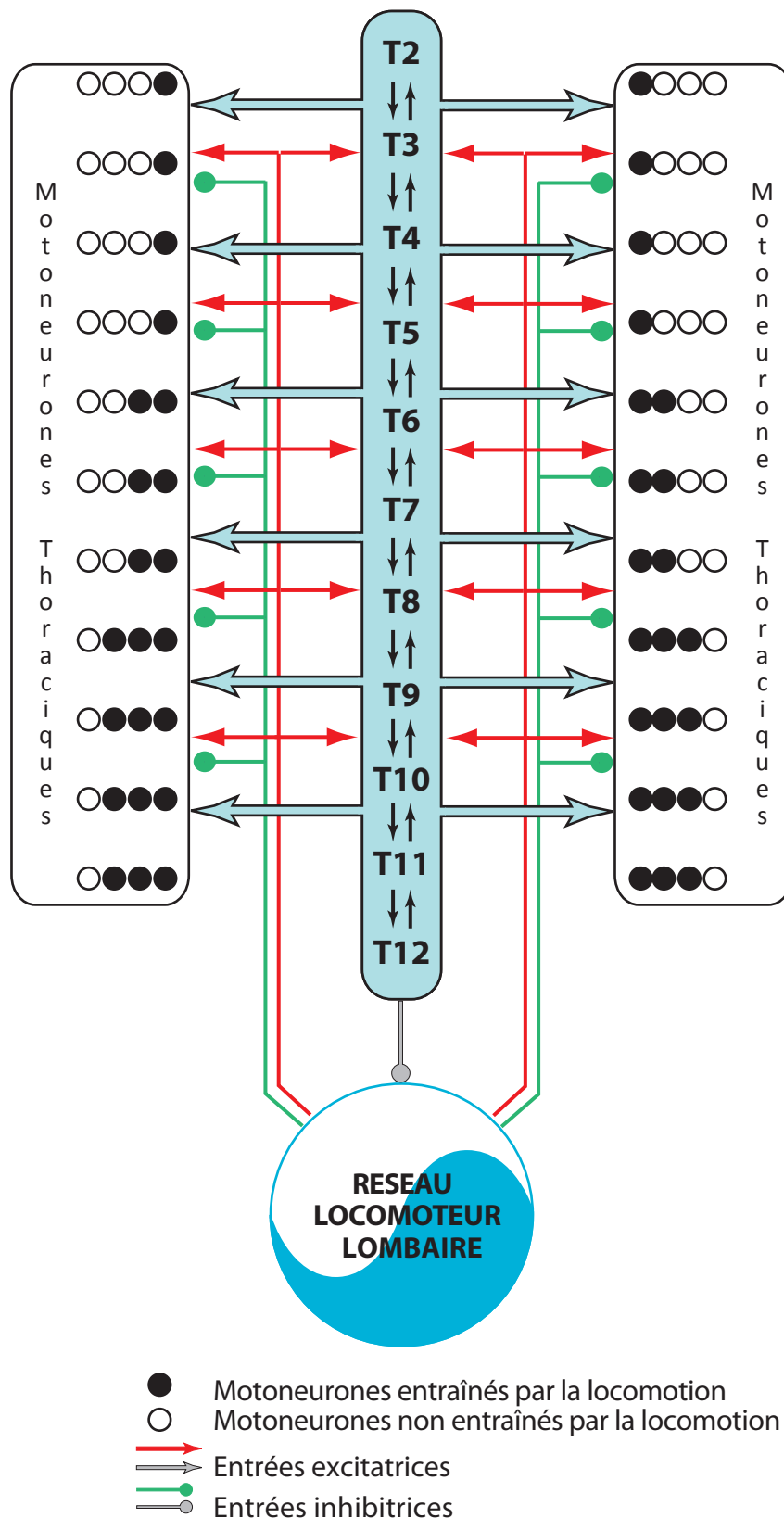


Figure 12 : Schéma résumant les relations entre le réseau locomoteur lombaire et les réseaux thoraciques.

Résumé des résultats obtenus dans cette étude montrant une partie des mécanismes impliqués dans le contrôle des réseaux thoraciques par le réseau locomoteur lombaire. Le réseau locomoteur lombaire entraîne l'activité thoracique tout en agissant à la fois au niveau premotoneuronal (bleu clair) et au niveau des motoneurones par des voies propriospinales courtes et longues. La flèche descendante indique que les réseaux thoraciques peuvent moduler la période de l'activité motrice générée par le réseau lombaire.

niveau segmentaires contribuent à définir l'organisation temporelle des sorties motrices thoraciques, tout comme cela a été observé chez la lamproie (Hagevik & McClellan, 1999; Miller & Sigvardt, 2000; Cazalets, 2005; Falgairolle & Cazalets, 2007). Cette observation n'est pas surprenante, étant donné l'importance de ces deux composantes dans la coordination des réseaux locomoteurs cervicaux et lombaires (Juvin & Morin, 2005; Juvin *et al.*, 2012) et pour la transmission descendante des informations supraspinales locomotrices (Courtine *et al.*, 2008; Cowley *et al.*, 2008; Zaporozhets *et al.*, 2011).

Nous avons également remarqué que la période locomotrice est diminuée lorsque seule la région lombo-sacrée est activée, par rapport à celle obtenue au cours de la co-activation des réseaux thoraciques et lombo-sacré (Fig. 2). Ainsi l'activité des réseaux thoracique déclenchée par l'application de NMA/5HT peut également moduler le réseau locomoteur lombaire. L'ensemble de nos données rappellent le caractère asymétrique de la relation entre le réseau locomoteur lombaire et les réseaux cervicaux, thoraciques et sacrés : il a été montré que le plus rapide impose son propre rythme et / ou contribue à définir l'organisation temporelle du patron d'activité des autres régions (Kremer & Lev-Tov, 1997; Cazalets *et al.*, 2000; Cazalets & Bertrand, 2000; Gabbay *et al.*, 2002; Juvin & Morin, 2005).

C) Le contrôle locomoteur des motoneurones thoraciques.

L'enregistrement intracellulaire des motoneurones thoraciques révèle deux populations différentes (Fig. 7, 8 et 9). La première regroupe une population de motoneurones phasiques entraînés par la locomotion, et qui expriment des oscillations de leur potentiel de membrane lors de la locomotion fictive. Il est probable que ces motoneurones soient des motoneurones innervant les muscles du dos qui sont rythmiquement actifs lors de la locomotion (Carlson *et al.*, 1979; Thorstensson *et al.*, 1982; Smith & Hollyday, 1983; Zomlefer *et al.*, 1984b; Carlson & Thorstensson, 1988; Delvolvé *et al.*, 1997; Gramsbergen *et al.*, 1999; de Seze *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012). En revanche, les motoneurones non-entraînés par la locomotion (deuxième population) n'expriment pas d'oscillations de leur potentiel de membrane liées à la locomotion. Il ne faut pas oublier que nos enregistrements ont été réalisés sur des préparations de moelles épinières où les segments cervicaux ont été enlevés. Or nous avons vu dans cette étude que la proportion de neurone entraîné par la locomotion diminue caudorostralement le long de la moelle

épineière (Fig. 8), ce qui soulève la possibilité qu'une partie d'entre eux, en particulier dans les segments rostraux, pourrait être recrutée lorsque le réseau locomoteur cervical est actif (Ballion *et al.*, 2001). De plus, le recrutement des motoneurones thoraciques par les réseaux lombaires peut ne pas être uniforme le long de la moelle épinière. Par exemple, le recrutement des motoneurones axiaux au cours de la nage chez la larve de poisson zèbre ou de Xénope résulte d'une combinaison de leurs propriétés rythmiques endogènes et de la force la commande synaptique qu'ils reçoivent (Tunstall & Roberts, 1994; Menelaou & McLean, 2012).

La commande locomotrice enregistrée dans les motoneurones thoraciques est biphasique, avec une composante excitatrice et une composante inhibitrice (Fig. 10) comme cela est également observé dans les motoneurones lombaires (Cazalets *et al.*, 1996). Nous avons montré que le réseau locomoteur lombaire prend part directement à l'entraînement oscillatoire des motoneurones thoraciques (Fig. 8 et 11). La réduction de l'amplitude des oscillations du potentiel membranaire observée lorsque la transmission polysynaptique est bloquée dans la moelle épinière thoracique, indique que les réseaux thoraciques contribuent à renforcer la force de la commande synaptique. Cette étude est la première ayant permis de mettre en évidence que le réseau locomoteur lombaire contribue à organiser le patron d'activité des sorties motrices générées dans les segments distants, via un accès à la fois au niveau pré-motoneuronale et au niveau des motoneurones

Bien que le tronc joue un rôle central dans la posture et la locomotion (Carlson & Thorstensson, 1988; de Seze *et al.*, 2008; Schmidt & Fischer, 2010), les réseaux thoraciques contrôlant les muscles du dos sont restés jusqu'à présent très peu étudiés chez les mammifères. Dans ce contexte, nous avons franchi une étape supplémentaire dans la compréhension du couplage fonctionnel entre le réseau locomoteur lombaire et les réseaux axiaux thoraciques. Nous avons montré que le réseau locomoteur lombaire joue un rôle central dans la génération des sorties motrices thoraciques, agissant à la fois au niveau pré-motoneuronale et au niveau des motoneurones. Ce travail fait partie d'une approche globale du fonctionnement des réseaux de la moelle épinière (Juvén & Morin, 2005; Falgairolle *et al.*, 2006; Falgairolle & Cazalets, 2007; Juvén *et al.*, 2012), qui sera probablement utile pour concevoir des stratégies thérapeutiques innovantes suites à des lésions de la moelle épinière (Bjerkefors *et al.*, 2009).

Chapitre 2

Modulation monoaminergique de l'activité des réseaux spinaux posturo-locomoteurs.

Introduction

La réalisation d'un mouvement locomoteur efficace nécessite une action synergique de plusieurs groupes musculaires, en vue d'assurer le positionnement approprié de l'ensemble des régions du corps au cours du mouvement (Cazalets & Bertrand, 2000; Falgairolle *et al.*, 2006). Cependant, la plupart des études consacrées à la compréhension du contrôle locomoteur chez l'homme et les quadrupèdes (Rossignol, 1996; Duysens & Van de Crommert, 1998) ont seulement abordé le fonctionnement des circuits neuronaux lombaires contrôlant les mouvements des membres postérieurs. Relativement peu d'études ont abordé le fonctionnement des réseaux neuronaux thoraciques et sacrés qui contrôlent la musculature axiale, en coordination avec les mouvements des membres (Thorstensson *et al.*, 1982; Zomlefer *et al.*, 1984b; Koehler *et al.*, 1984; Gramsbergen *et al.*, 1999; de Seze *et al.*, 2008; Rauscent *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2012). Or tous ces réseaux locomoteurs ne fonctionnent pas de manière isolée, mais interagissent les uns avec les autres. Ce n'est que récemment qu'une attention croissante a été accordée à l'interaction entre les divers segments de la moelle épinière chez les mammifères quadrupèdes et les humains au cours de la locomotion (Cazalets & Bertrand, 2000; Wannier *et al.*, 2001; Dietz & Michel, 2002; Falgairolle *et al.*, 2006; MacLellan *et al.*, 2011; Falgairolle *et al.*, 2013; Nakajima *et al.*, 2013).

Plusieurs revues (Harris-Warrick, 2011; Miles & Sillar, 2011) ont récemment abordé le rôle des neuromodulateurs dans le contrôle de l'activité des circuits neuronaux de la moelle épinière. En utilisant une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né, l'effet neuromodulateur des trois amines biogènes : la sérotonine, la dopamine et de la noradrénaline sur l'activité locomotrice lombaire a été largement étudiée (Cazalets *et al.*, 1992; Kiehn & Kjaerulff, 1996; Kiehn *et al.*, 1999; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b; Barrière *et al.*, 2004; Madriaga *et al.*, 2004; Pearlstein *et al.*, 2005; Gordon & Whelan, 2006; Liu *et al.*, 2009). Il a été montré que ces amines peuvent moduler le patron locomoteur de manières différentes en fonction du sous-type de récepteurs activés. La plupart des effets induits par

ces amines sur des préparations de moelle épinière isolée *in vitro* ont également été retrouvés chez les rongeurs adultes spinalisés (Landry *et al.*, 2006; Lapointe *et al.*, 2008; Lapointe & Guertin, 2008; Lapointe *et al.*, 2009). De manière surprenante, malgré le nombre d'études qui ont examiné l'action de chaque amine seule ou appliquée en combinaison avec des acides aminés excitateurs sur des préparations de moelles isolées *in vitro*, très peu d'études ont directement comparé l'action de ces trois amines sur le patron locomoteur lombaire et axiale.

Le but de notre étude est (1) d'identifier le mélange neuromodulateur permettant l'activation optimale des réseaux spinaux impliqués dans le contrôle des membres postérieurs et de la musculature axiale; (2) d'étudier comment ces amines biogènes : la sérotonine (5HT), la dopamine (DA) et de la noradrénaline (NA) modulent les interactions entre les réseaux lombaires, thoraciques et sacrés au cours d'une activité de locomotion fictive initiée par l'activation des récepteurs glutamatergiques.

Matériels et Méthodes.

Ces expériences ont été réalisées sur des préparations de moelles épinières isolées *in vitro*, sectionnées en T2 dès le début de l'expérience, afin de supprimer toute influence en provenance des réseaux moteurs cervicaux qui contrôlent les membres antérieurs (Ballion *et al.*, 2001). L'activité de locomotion fictive est déclenchée par la perfusion d'un mélange de NMA à 15 μ M et de une ou plusieurs amines. L'activité de locomotion fictive est enregistrée au niveau des segments thoraciques (T6 et T11), lombaires (L2 et L5), et sacrés (S1 et S3).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à plusieurs paramètres moteurs à savoir la période du cycle locomoteur (c'est-à-dire le temps séparant le début de deux bouffées d'activité successives), l'amplitude des bouffées, et le coefficient de variation qui est un indicateur de la stabilité du rythme de la période, et qui est obtenue en divisant la valeur de la déviation standard de la période par la moyenne de la période d'une même expérience. Cette valeur est exprimée en pourcentage. Ces paramètres sont analysés grâce à un logiciel de Wavelets et un logiciel développé sous Matlab (pour plus de précisions, voir le chapitre Matériels et Méthodes).

Les relations de phases ont été calculées et représentées sur des diagrammes circulaires où chaque point correspond à la valeur moyenne de phase obtenue dans une expérience. La direction du vecteur indique la moyenne des relations de phases de l'ensemble des expériences et sa longueur montre la variabilité interindividuelle.

Résultats

A) Modulation du rythme lombaire par les amines

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la façon dont les trois monoamines : la sérotonine, la noradrénaline et la dopamine modulent la locomotion fictive induite par application d'acides aminés excitateurs (AAE) sur la préparation. Pour cela, nous avons enregistré l'activité motrice au niveau des racines ventrales lombaires L2 et L5 ipsilatérales et contralatérales qui innervent respectivement les muscles fléchisseurs et extenseurs. Une activité locomotrice fictive a été induite par l'application conjointe dans le bain de perfusion de NMA à 15 μ M (un agoniste glutamatergique) et d'une amine testée à plusieurs concentrations. Une activité motrice rythmique générée par la moelle épinière est considérée comme de la "locomotion fictive" quand une alternance entre les bouffées motrices fléchisseurs et extenseurs est enregistrée en extracellulaire au niveau des racines ventrales L2 et L5 (Cazalets *et al.*, 1992; Kjaerulff & Kiehn, 1996), et lorsque la durée de cycle moteur se situe dans une gamme similaire à celle observée chez l'animal intact au même âge (1s; (Cazalets *et al.*, 1990; Jamon & Clarac, 1998). Dans nos expériences nous avons observé que le patron moteur enregistré au niveau lombaire présente une alternance bilatérale ainsi qu'une alternance flexion-extension, comparable au patron locomoteur observé *in vivo* (Fig. 1A1-A3), quelle que soit l'amine, à toutes les concentrations testées.

Plusieurs paramètres caractéristiques de l'activité locomotrice ont été ensuite calculés, à savoir la période du cycle locomoteur (c'est-à-dire le temps séparant le début de deux bouffées d'activité successives, Fig. 1B), le coefficient de variation de la période qui est un indice de la régularité temporelle du patron moteur (Fig. 1C) et l'amplitude des bouffées (Fig. 1D). Une diminution significative dose-dépendante de la période du cycle locomoteur est observée lors de l'application de la dopamine à concentration croissante, comme obtenu dans des études précédentes (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b; Barrière *et al.*, 2004) (ANOVA, $p = 0,0016$). Aucune variation significative de la période n'est observée lors de

l'application de la noradrénaline (ANOVA, $p = 0,5$) et de la sérotonine (test t de Student, $p = 0,14$), dans les gammes de concentrations testées.

Afin de mettre en évidence des différences possibles entre d'autres paramètres tels que le coefficient de variation, la relation de phase ou l'amplitude des bouffées d'activité, nous avons voulu déclencher une locomotion fictive ayant une période de cycle locomoteur comparables entre les trois amines. Pour cela, nous avons choisi une concentration intermédiaire dans la gamme de concentration testée : 50 μM de dopamine et de noradrénaline et 15 μM de 5HT. Ces concentrations seront par la suite utilisées tout au long de l'étude. Pour comparer la stabilité du rythme en présence des trois amines nous avons calculé le coefficient de variations qui représente la déviation standard de la période divisée par la moyenne de la période pour une expérience (Fig. 1C). Cette variabilité est comparable lors de l'application de NMA/5HT et de NMA/DA ($9,3 \pm 1,3\%$ et $11 \pm 2\%$, respectivement), tandis qu'elle est significativement plus élevée lors de l'application de NMA/NA ($20,7 \pm 2,8\%$, ANOVA, $p = 0,0002$). Cela montre que le rythme locomoteur induit par la noradrénaline est moins stable que le rythme locomoteur entraîné par la 5HT ou la dopamine. Pour chaque amine, il n'y a aucun effet dose-dépendant dans la variabilité de la période.

La figure 1D montre les changements relatifs d'amplitude des bouffées motrices lombaires L2 et L5, induits par ces trois amines. Pour chaque essai, l'amplitude moyenne de l'activité dans chaque racine ventrale lombaire lors de l'application de NMA/5HT est considérée comme la condition contrôle, et les mesures dans les autres conditions pharmacologiques ont été normalisées par rapport à cette valeur. L'amplitude des bouffées motrices lombaires de flexion (L2) et d'extension (L5) est augmentée lors de la perfusion de dopamine et de noradrénaline.

Ces résultats indiquent que chaque amine est capable d'exercer une action spécifique sur l'activité du réseau moteur lombaire, en influençant différents paramètres moteurs (période, stabilité du rythme et amplitude des bouffées).

B) Effets des amines sur les réseaux axiaux.

Dans un second temps, nous avons voulu étudier la modulation par ces trois amines des réseaux moteurs axiaux thoraciques et sacrés au cours la locomotion. La figure 2A présente des enregistrements simultanés des racines ventrales ipsilatérales thoraciques (T6

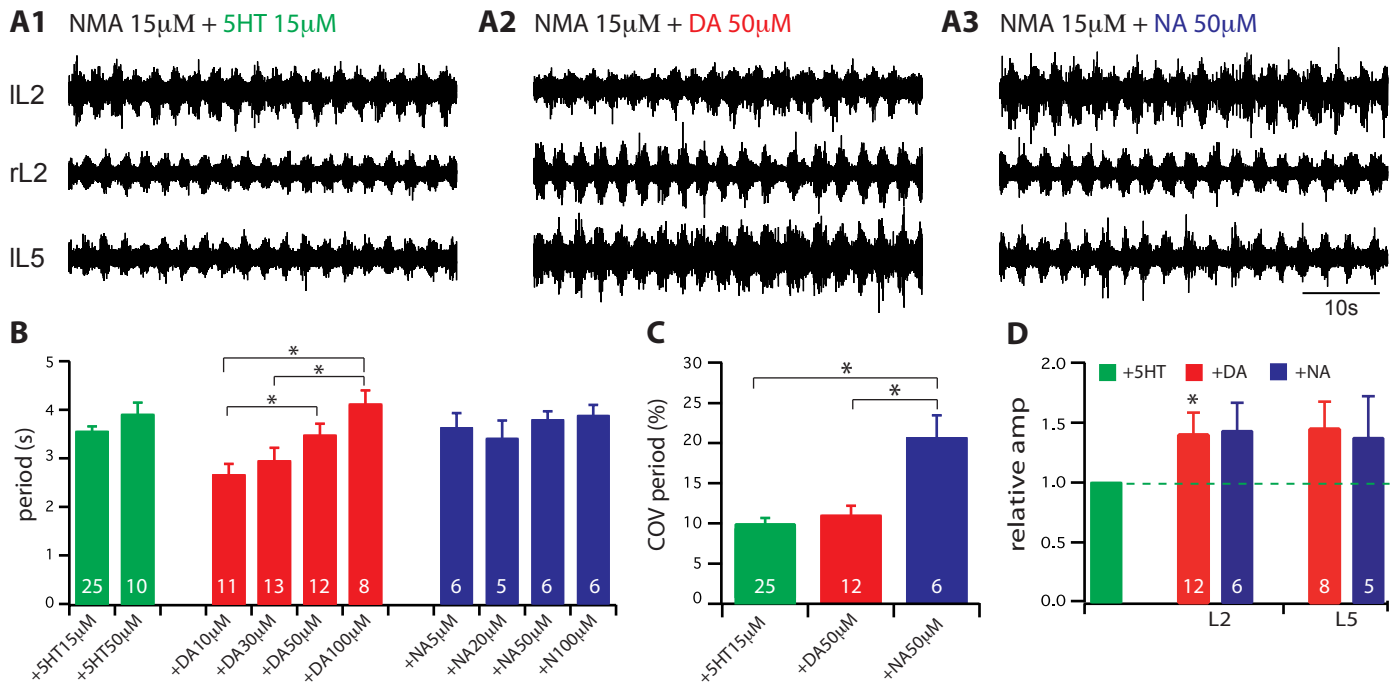


Figure 1 : Comparaison de l'activation du réseau locomoteur lombaire in vitro par les amines 5HT, ou DA ou NA.

(A) Chaque amine a été ajoutée à la solution saline contenant le NMA (15 µM), un acide aminé excitateur agoniste du récepteur NMDA. L'activité est enregistrée en extracellulaire au niveau des racines ventrales lombaires L2 bilatérales (IL2, rL2) et de la racine L5 gauche (IL5) sur une préparation de moelle épinière isolée. (B) Valeurs moyennes de la période locomotrice obtenues pour différentes concentrations d'amines. Un effet dose-dépendant est observable uniquement pour la dopamine. (C) Coefficients de variations (COV) de la période des cycles locomoteurs pour chaque amine (NMA 15 µM, 5HT 15 µM, 50 µM DA, NA 50 µM), montre que la noradrénaline NA déclenche une activité motrice plus instable. (D) Amplitudes relatives moyennes normalisées par rapport à l'amplitude observée en condition NMA-5HT (barre verte). La dopamine et la noradrénaline augmentent l'amplitude des bouffées d'activité motrice au niveau des racines lombaires ventrales. Dans cette figure et dans les figures suivantes, le nombre indiqué sur chaque barre de l'histogramme indique le nombre d'expériences. * p < 0,05.

et T11), lombaire (L2) et sacrées (S1, S3), obtenus à partir de la même expérience lors de la perfusion de NMA associé successivement à la 5HT (Fig. 2A1), à la dopamine (Fig. 2A2) et à la noradrénaline (Fig. 2A3) aux mêmes concentrations que dans la figure 1. Chaque amine induit des bouffées d'activité motrices coordonnées au niveau de tous les segments de la moelle épinière, mais avec des différences qualitatives. Une première observation nous permet de constater que l'amplitude de la bouffée motrice sacrée en présence de dopamine et surtout de noradrénaline est fortement augmentée. Dans la région thoracique, les bouffées motrices sont plus faciles à distinguer, en présence de 5HT qu'en présence de dopamine ou de noradrénaline. La figure 2B indique la proportion d'expériences dans lesquelles des bouffées d'activité motrices ont été enregistrées dans les segments thoraciques et sacrés, quand une activité motrice soutenue est induite au niveau lombaire (similaire à celle observée dans la figure1). À cet égard, la 5HT et la noradrénaline ont été sensiblement plus efficaces que la dopamine pour déclencher un rythme stable au niveau thoracique et sacré. Le calcul relatif d'amplitude en prenant pour chaque racine la condition NMA/5HT comme référence, indique que l'amplitude des bouffées d'activité motrice dans les segments thoraciques est significativement diminuée lors de l'application de dopamine (Fig. 2C; t-test de Student pairé, $p = 0,0002$), tandis que l'amplitude la bouffée d'activité motrice au niveau sacré est significativement augmentée par la dopamine (figure 2C; t-test de Student pairé, $p = 0,03$) et la noradrénaline (Fig. 2C; t-test de Student pairé, $p = 0,006$).

| | Période (s) | variabilité de la période (%) | Amplitude relative | | | Présence de bouffées motrices | | |
|---------------|-------------|-------------------------------|--------------------|-----------|-----------|-------------------------------|----------|-------|
| | | | thoracique | lombaire | sacré | thoracique | lombaire | sacré |
| NMA/5HT | 3,6±0,1 | 9,30±1,34 | 1 | 1 | 1 | 98 | 100 | 76 |
| NMA/DA 50µM | 3,5±0,24 | 11,04±1,17 | 0,66±0,06 | 1,40±0,18 | 1,54±0,21 | 89 | 100 | 79 |
| NMA/NA 50µM | 3,8±0,16 | 20,68±2,76 | 1,18±0,29 | 1,22±0,17 | 2,68±0,45 | 90 | 100 | 100 |
| NMA/5HT/DA | 4,4±0,32 | 10,38±1,79 | 0,96±0,10 | 0,97±0,06 | 2,35±0,57 | 85 | 100 | 78 |
| NMA/5HT/NA | 3,8±0,36 | 13,03±1,00 | 1,04±0,11 | 1,24±0,09 | 2,81±0,37 | 81 | 100 | 83 |
| NMA/5HT/DA/NA | 5,6±0,42 | 12,65±3,40 | 1,06±0,17 | 1,09±0,09 | 3,35±0,57 | 67 | 100 | 92 |

Table 1 : Récapitulatif des effets des monoamines 5HT, DA et NA sur les différents paramètres du rythme locomoteur.

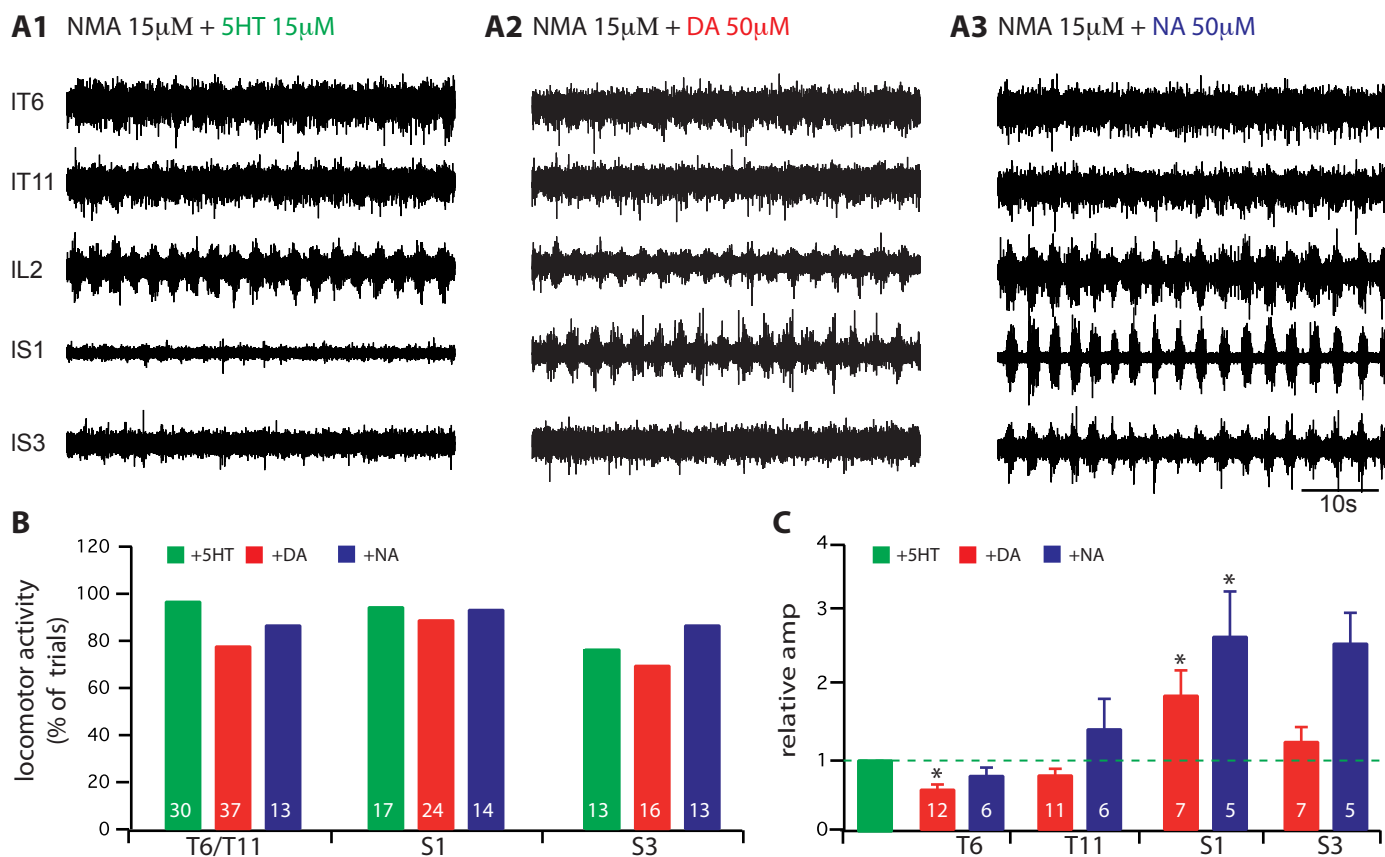


Figure 2 : Comparaison de l'activation du réseau locomoteur axial in vitro par les amines 5HT, ou DA ou NA.

(A) Chaque amine a été ajoutée à la solution saline contenant 15 μ M de NMA. L'activité a été enregistrée au niveau de la sixième et de la onzième racines ventrales thoraciques gauches (IT6, IT11), de la seconde racine ventrale lombaire gauche (IL2), et au niveau de la première et de la troisième racines ventrales sacrées gauches (IS1, IS3). (B) L'histogramme indique le pourcentage d'expériences dans lesquelles l'activité motrice rythmique a été observée à un niveau segmentaire donné. Dans ces expériences, l'activité locomotrice lombaire était toujours exprimée. (C) Amplitude moyenne relative normalisée par rapport à l'amplitude observée en condition NMA / 5HT (barre verte). Notez la sensibilité élevée des

C) Modulation de l'organisation temporelle de l'activité motrice

La combinaison de NMA avec les différentes amines déclenche une activité locomotrice rythmique coordonnée au niveau des différentes régions de la moelle épinière. Nous avons examiné si, en plus de leurs effets sur la période locomotrice et sur l'amplitude des bouffées, ces amines pouvaient façonner la locomotion fictive en modulant les relations de phases entre les différents segments spinaux. Les relations de phase ont été calculées en prenant comme trace de référence l'enregistrement de la racine ventrale ipsilatérale L2. La figure 3A présente la moyenne des cycles locomoteurs pour chaque racine, répliquée trois fois pour révéler la nature rythmique de l'activité, en présence de chacune des trois amines. Aucune des amines n'entraîne une relation de phase significativement différente dans la région lombaire entre l'alternance bilatérale et l'alternance flexion-extension, ni dans la durée des bouffées comme l'indique la superposition exacte de la moyenne des traces L2 et L5 enregistrées pendant l'application de NMA combinés avec les trois amines (valeurs moyennes de vecteurs de L2 de 0,43 en NMA/5HT ; 0,51 en NMA/DA ; 0,48 en NMA/DA ; et de L5 de 0,49 en NMA/5HT ; 0,44 en NMA/DA ; et 0,49 en NMA/NA).

En revanche, chaque amine établit une relation de phase distincte entre les segments thoraciques, sacrée et lombaires. La figure 3B illustre les relations de phase entre chaque racine enregistrée par rapport à la racine L2 de référence. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence qu'il n'y avait pas d'effet dose-dépendant de la concentration pour les trois amines sur les relations de phase et ce quel que soit le segment enregistré (multi-échantillon Watson Williams-Test, $p > 0,1$). Les données ont donc été regroupées dans des diagrammes circulaires. Chaque point dans le diagramme circulaire représente la valeur de phase moyenne obtenue dans une expérience, avec la direction du vecteur représentant la valeur de phase moyenne et la longueur représentant la force du couplage. En présence de 5HT on observe un retard de phase entre les segments thoraciques et lombaires, qui augmente de manière significative avec la distance (valeur moyenne du vecteur de 0,19 en T6 et 0,08 en T11 ; Mardia's two sample, $p < 0,05$; (Falgairolle & Cazalets, 2007), tandis que des bouffées d'activité presque synchrones sont enregistrées en présence de dopamine dans les segments thoraciques (valeur moyenne du vecteur de 0,93 en T6 et 0,88 en T11; Mardia's two sample, $p > 0,2$, Fig. 3) et en présence de noradrénaline (valeur moyenne du vecteur de 0,94 en T6 et 0,89 en T11; Mardia's two sample, $p > 0,2$, Fig. 3). Au niveau des segments

sacrés, un décalage de phase significatif par rapport à L2 apparaît, à la fois en présence de 5HT (valeur moyenne du vecteur de 0,61 en S1 et 0,52 en S3; Mardia's two sample, $p < 0,02$, Fig. 3), et de dopamine (valeur moyenne du vecteur de 0,91 en S1, et 0,61 en S3; Mardia's two sample, $p < 0,005$, Fig. 3). En revanche, la noradrénaline déclenche une activité locomotrice présentant des relations de phases synchrones au niveau sacré (valeur moyenne du vecteur de 0,97 en S1 et de 0,93 en S3; Mardia's two sample, $p > 0,05$, Fig. 3). Nous avons observé qu'en présence de 5HT et de dopamine, la variabilité entre expériences des valeurs de relations de phase de la région sacrée est plus importante que celle des régions lombaires ou thoraciques. Ces résultats démontrent que chaque amine possède une «signature» spécifique au regard de ces effets modulateurs sur l'organisation temporelle du patron moteur entre les différents segments spinaux.

D) Effets de combinaisons multiples d'amines sur le rythme locomoteur.

Enfin, nous avons étudié différentes combinaisons de neuromodulateurs en ajoutant au NMA deux ou même trois amines (Fig. 4). Dans la figure 4A, nous pouvons observer l'activité motrice déclenchée par l'application de NMA/5HT/DA (Fig 4A1), NMA/5HT/NA (Fig 4A2) et NMA/5HT/DA/NA (Fig 4A3) sur la même préparation. Ces cocktails neuromodulateurs déclenchent une activité de locomotion fictive rythmique sur l'ensemble des segments qui, à première vue, ne diffère pas sensiblement de la locomotion fictive induite par l'ajout d'une seule amine. Cependant, les bouffées d'activités rythmiques sont moins fréquemment observées au niveau des segments thoraciques dans la condition NMA/5HT/DA/NA (seules 67% des expériences expriment un rythme en thoracique, Table 1). En outre, la combinaison de NMA/5HT/DA et de NMA/5HT/DA/NA déclenche un rythme locomoteur avec des périodes de cycle beaucoup plus longues (figure 4B; test de Student non pairé; 5HT/DA, $p = 0,0057$; 5HT/DA/NA, $p = 0,0001$) et une augmentation de l'amplitude des bouffées dans les segments les plus caudaux (L5 et sacrés) (Fig. 4C; test de Student pairé; 5HT/NA en L2, $p = 0,04$; 5HT/NA en L5, $p = 0,04$; 5HT/NA en S1, $p = 0,002$; 5HT/NA/DA en S1, $p = 0,017$). La stabilité du rythme, indiquée par le coefficient de variation, est dans la même gamme de valeurs que lorsque la locomotion est induite par application de NMA/5HT ou NMA/DA (voir Fig. 1C) c'est-à-dire $10,4 \pm 1,2\%$ pour NMA/5HT/DA, $13 \pm 2\%$ pour NMA/5HT/NA et $12,6 \pm 3,4\%$ pour NMA/5HT/DA/NA.

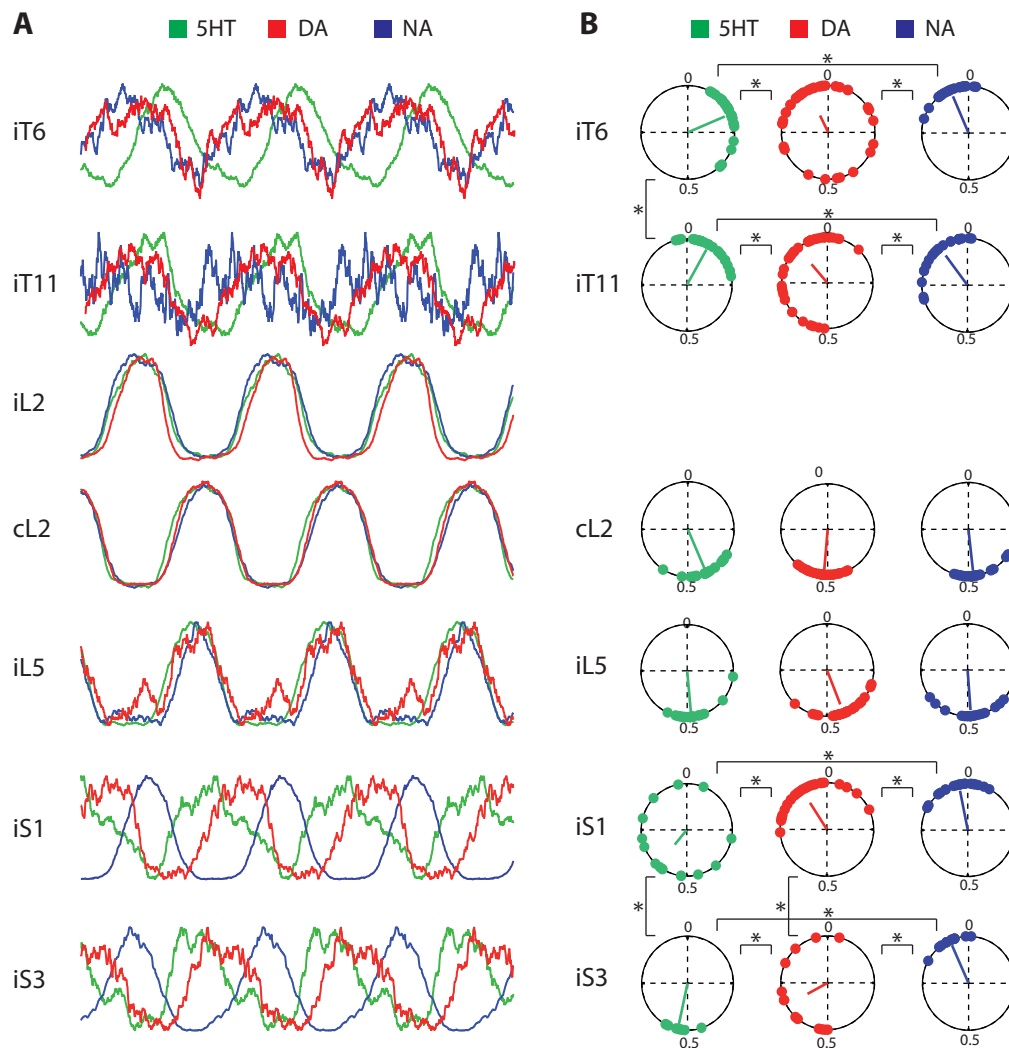


Figure 3 : Contrôle des relations de phase par la 5HT, DA, ou NA.

(A) Cycles locomoteurs moyennés et répétés, obtenus au cours de l'activité locomotrice induite par une combinaison de NMA (15 μ M) et l'une des trois amines (5HT 15 μ M, DA 50 μ M; NA 50 μ M). L'amplitude des bouffées a été normalisée. Noter le décalage des relations de phases se produisant dans les segments thoraciques et sacrés par rapport à la racine de référence L2. (B) Diagrammes circulaires montrant les valeurs de phase moyennes de l'activité motrices dans les six racines ventrales enregistrées par rapport à la racine ventrale L2, en présence de chacune des trois amines. Chaque point est une valeur de phase mesurée dans une expérience. La direction du vecteur représente la valeur moyenne de phase de l'ensemble des expériences, et sa longueur indique la force de couplage. Les données ont été regroupées à partir de toutes les concentrations testées. i : ipsilatérale; c : controlatéral. * $p < 0,05$

L'analyse des relations de phase (Fig. 5A), révèle que la relation de phase entre les racines fléchisseurs / extenseurs reste extrêmement stable dans toutes les conditions (Table 2). En revanche, et en particulier pour les segments sacrés, les relations de phase deviennent généralement plus variables avec une très petite longueur de vecteur (0,18 en S1 et 0,27 en S3 en condition NMA/5HT/DA et 0,16 en S1 et 0,21 en S3 en condition NMA/5HT/DA/NA). Cependant de manière intéressante, dans le segment thoracique (T6), les relations de phase observées en présence de l'ensemble des amines ou de 5HT/DA ou 5HT/NA sont très proches de celles observées en présence de 5HT seule (environ 0,19; voir la Table 2). Ainsi, lors de l'application simultanée des amines, la 5HT régulerait les relations de phase en thoracique, ce qui suggère que chaque amine jouerait un rôle spécifique dans le contrôle du patron moteur.

| | iT6 | | iT11 | | cL2 | | iL5 | | iS1 | | iS3 | |
|-------------------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|
| | ϕ | R | ϕ | R | ϕ | R | ϕ | R | ϕ | R | ϕ | R |
| NMA/5HT | 0,19 | 0,86 | 0,08 | 0,88 | 0,43 | 0,93 | 0,49 | 0,91 | 0,61 | 0,41 | 0,53 | 0,92 |
| NMA/DA 50 μ M | 0,96 | 0,40 | 0,89 | 0,54 | 0,51 | 0,94 | 0,44 | 0,80 | 0,91 | 0,67 | 0,67 | 0,49 |
| NMA/NA 50 μ M | 0,94 | 0,85 | 0,90 | 0,79 | 0,48 | 0,88 | 0,49 | 0,87 | 0,97 | 0,86 | 0,93 | 0,89 |
| NMA/5HT/DA | 0,19 | 0,90 | 0,12 | 0,63 | 0,48 | 0,71 | 0,49 | 0,61 | 0,41 | 0,18 | 0,30 | 0,27 |
| NMA/5HT/NA | 0,16 | 0,74 | 0,16 | 0,19 | 0,50 | 0,92 | 0,46 | 0,89 | 0,86 | 0,66 | 0,64 | 0,84 |
| NMA/5HT/DA/NA | 0,12 | 0,42 | 0,00 | 0,56 | 0,50 | 0,97 | 0,45 | 0,95 | 0,19 | 0,16 | 0,40 | 0,21 |

Table 2 : Relations de phases et vecteurs moyens (r) des bouffées d'activité des 6 racines ventrales par rapport à la racine de référence L2, pour les différentes combinaisons de NMA et de monoamines.

Discussion

A) Effet des amines sur le rythme moteur et sa stabilité

L'élaboration de stratégies thérapeutiques basées sur l'activation pharmacologique du CPG est un domaine d'étude important pour la récupération fonctionnelle suite à une lésion de la moelle épinière (Guertin, 2009). Ainsi, il est important d'identifier des molécules candidates qui pourraient devenir des traitements sur des patients présentant des lésions de la moelle épinière ou sur des modèles animaux. À ce jour de nombreuses études

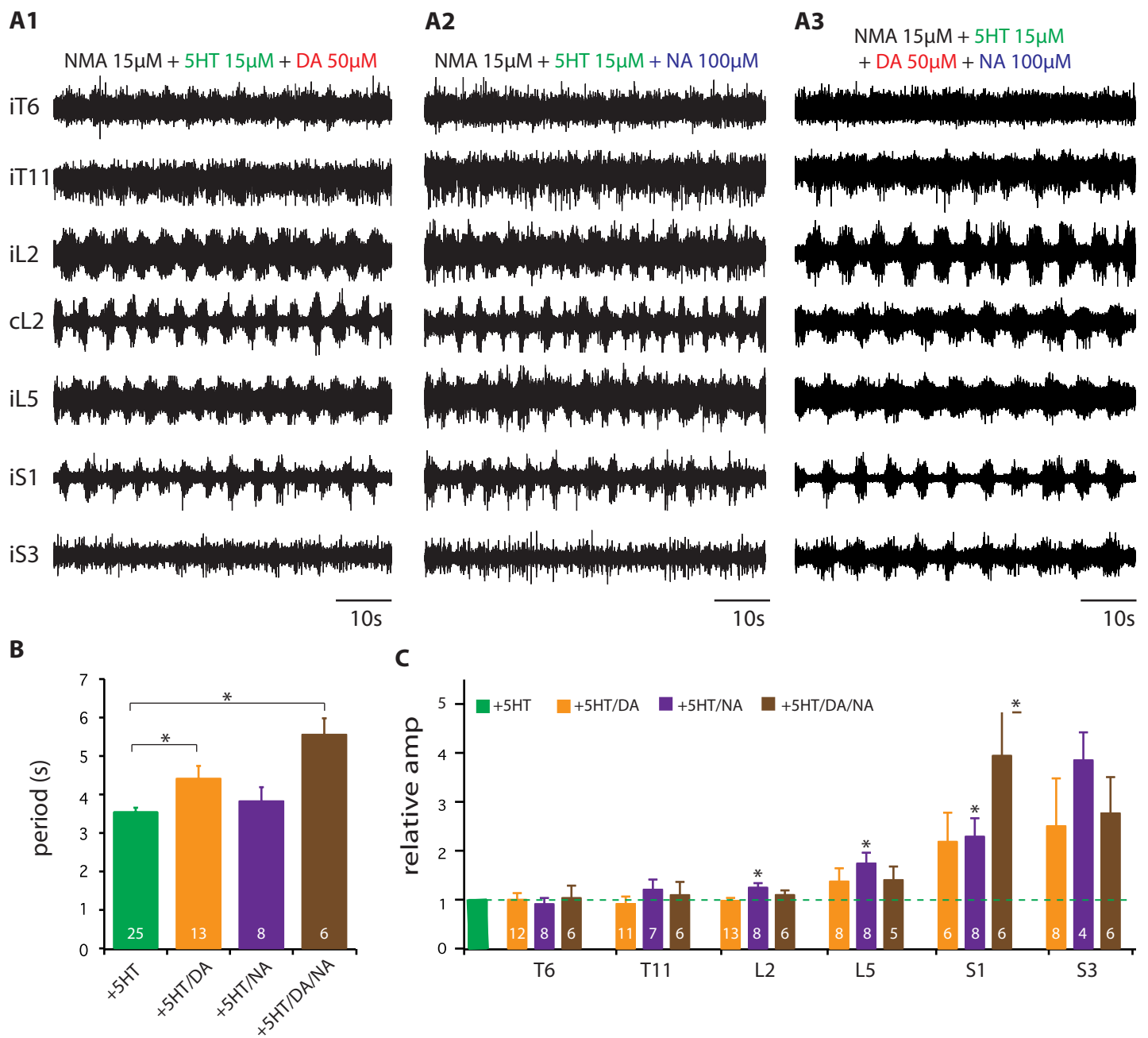


Figure 4 : Comparaison de l'activation du réseau locomoteur in vitro par diverses combinaisons de NMA et 5HT / DA / NA.

(A) Enregistrements simultanés de sept racines ventrales, en présence de diverses combinaisons entre les quatre amines. (B) Période moyenne des cycles locomoteurs lors de la perfusion de NMA (15 µM) et de 5HT (15 µM) associées à la DA (50 µM) et/ou la NA (50 µM). (C) Amplitudes relatives moyennes normalisées par rapport à l'amplitude des bouffées enregistrées en condition NMA/ 5HT NMA (barre verte).

pharmacologiques se sont intéressées à l'activation et la modulation des réseaux spinaux lombaires, contrôlant le rythme moteur des membres postérieurs. Dans ce contexte, le NMDA a été décrit comme étant la première molécule capable d'évoquer des épisodes de locomotion fictive sur des préparations de moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né (Smith *et al.*, 1987; Kudo & Yamada, 1987a). Plus tard, la 5HT a été établie comme un des principaux acteurs de l'activation du réseau locomoteur chez les rongeurs (Cazalets *et al.*, 1990; 1992), et l'application combinée de la 5HT et d'un acide aminé excitateur est un moyen très efficace pour déclencher une activité de locomotion fictive stable (Sqalli-Houssaini *et al.*, 1993). Depuis lors, ce mélange est devenu la méthode la plus largement utilisée pour déclencher une activité locomotrice sur cette préparation, et des centaines d'études ont été publiées sur la base de cette observation. En revanche, seules quelques études ont montré l'action combinée d'un mélange AAE/DA ou AAE/DA/5HT (Kiehn & Kjaerulff, 1996; Jiang *et al.*, 1999; Whelan *et al.*, 2000; Juvin & Morin, 2005; Zhong, 2006; Talpalar & Kiehn, 2010), ou AAE/NA (Kiehn *et al.*, 1999; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b), et dans chaque cas aucune comparaison directe de l'effet des différents neuromodulateurs sur les réseaux spinaux, ni aucune étude de leurs interactions n'a été réalisé. De plus, dans la plupart des études, aucune observation n'a été faite sur l'effet de ces neuromodulateurs sur les réseaux spinaux axiaux.

Le premier objectif de ce travail était de déterminer la sensibilité relative des trois régions spinales thoracique, lombaire et sacrée aux différentes amines, et de réaliser une comparaison directe de leurs effets. Dans notre étude, la même concentration de NMA a été le paramètre commun pour toutes les conditions, permettant ainsi une comparaison directe entre les différentes amines. L'application conjointe dans le bain de perfusion des agonistes des AAEs et des trois amines séparément ou en combinaison a permis de déclencher une activité locomotrice sur l'ensemble des segments (Fig. 1 et 4). La Table 1 résume les données recueillies dans notre étude. Elle comprend des données enregistrées au niveau thoracique, lombaire et sacré lors d'exposition à diverses combinaisons de drogues. Une comparaison de ces valeurs montre que plusieurs combinaisons de neurotransmetteurs sont capables d'induire un rythme locomoteur stable *in vitro*. Toutefois, certaines amines influencent plus fortement tels ou tels paramètres. Par exemple, l'amplitude des bouffées motrices est plus sensible à la noradrénaline (Fig. 2), alors que la stabilité du rythme est assurée par la 5HT ou

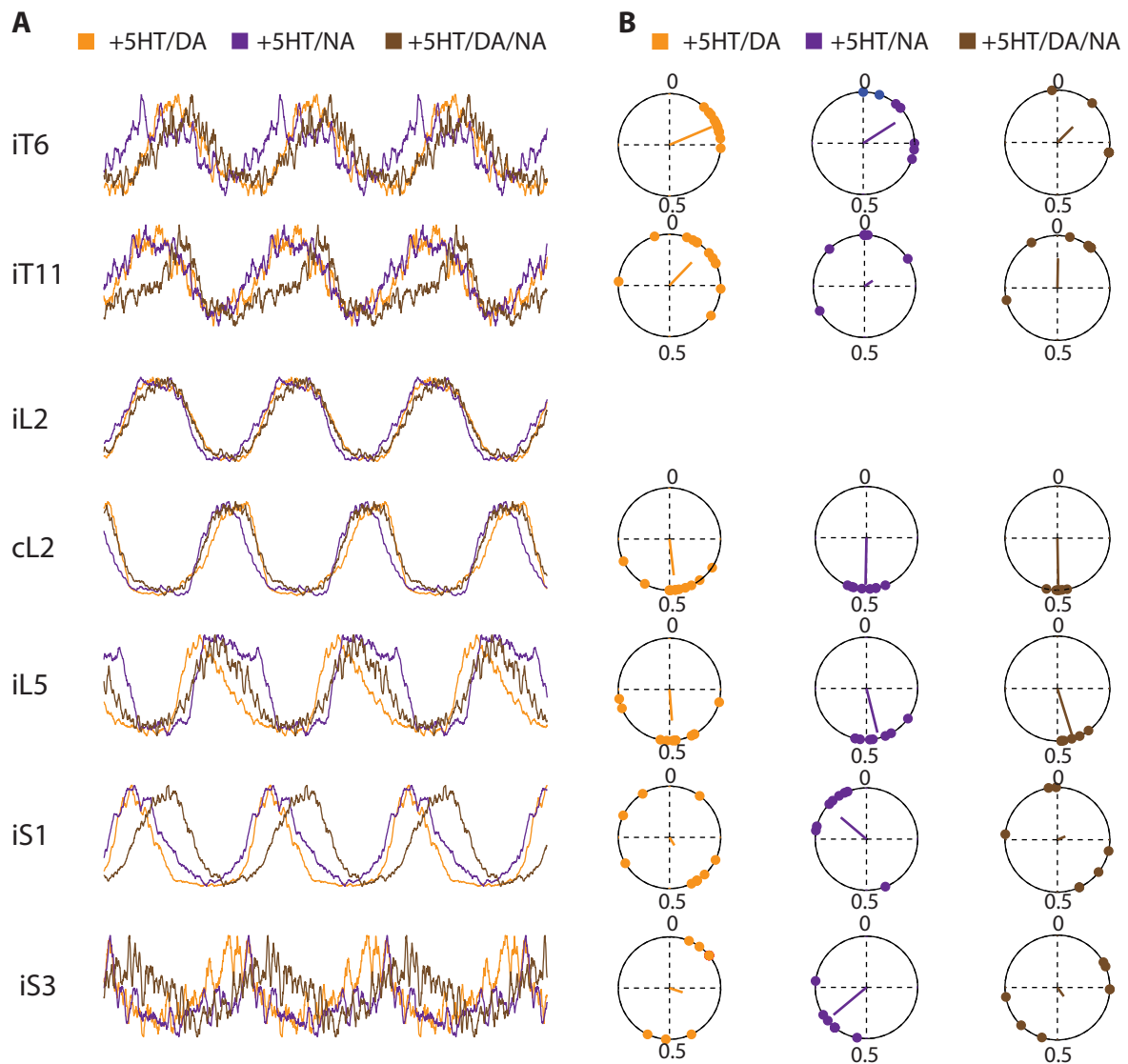


Figure 5 : Contrôle des relations de phase par diverses combinaisons de NMA et 5HT / DA / NA.

(A) Cycles locomoteurs moyennés et répétés, obtenus au cours de l'activité locomotrice induite par la perfusion de NMA (15 μ M) et d'une combinaison des trois différentes amines. (B) Diagrammes circulaires représentant les valeurs de phases moyennes calculées pour les six racines ventrales, par rapport à la racine de référence L2 en présence de NMA et des différents cocktails d'amines. Chaque point est une valeur de phase mesurée dans une expérience. La direction du vecteur représente la valeur moyenne de phase de l'ensemble des expériences, et sa longueur indique la force de couplage. Toutes les données présentées sont obtenues aux concentrations de drogues suivantes: NMA, 15 μ M; 5HT, 15 μ M; DA 50 μ M; NA 50 μ M.

* $p < 0,05$.

la dopamine (Fig. 1). De telles différences indiquent que les divers paramètres du rythme locomoteur peuvent être ajustés séparément en fonction de l'évolution des besoins comportementaux. Néanmoins, il reste évident que la combinaison AAE/5HT constitue un bon compromis en termes de stabilité de rythme, d'amplitude de la bouffée motrice et du recrutement des différents segments spinaux. Cependant, lors de l'étude spécifique des segments sacrés, il serait peut-être plus intéressant d'utiliser de la noradrénaline ou de la dopamine, qui augmentent spécifiquement l'amplitude des bouffées motrices sacrées.

Toutefois, il ne faut pas oublier que la fréquence de rythme obtenu *in vitro* dépend également de paramètres extérieurs tel que la température, car entre 25°C (la température ambiante moyenne typique utilisée dans la plupart des études *in vitro*) et 35°C (la température du corps des rats nouveau-nés et la température à laquelle les expériences *in vivo* sont effectuées) (Cazalets *et al.*, 1990), la période du cycle moteur diminue de plus de 50% (Sqalli-Houssaini *et al.*, 1991). Une observation similaire a été rapportée pour les concentrations de K⁺ dans la solution saline, qui sont fréquemment deux fois supérieures à la concentration normale mesurée dans l'animal intact (3 mM, (Somjen, 1979). Ainsi, il est défini que le rythme moteur « optimal » *in vitro* aurait une période d'environ 2 à 3 secondes (en prenant en compte le ralentissement de la période motrice résultant de l'état d'isolement du système nerveux central), avec des épisodes de locomotion fictive durant toute la durée de l'application (c'est-à-dire sans désensibilisation des récepteurs ou tout autre processus qui stopperait prématurément le rythme), avec des bouffées motrices aussi régulières que possible et avec peu variation dans leur amplitude et relations de phase.

B) Effets au niveau cellulaire des neuromodulateurs

À ce jour, les mécanismes cellulaires par lesquels les amines exercent leurs effets demeurent incertains. Il est probable que la modulation de chaque paramètre moteur (période motrice, amplitude et stabilité du rythme) implique diverses cibles cellulaires à la fois motoneuronales et pré-motoneuronales (Berger & Takahashi, 1990; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b; Kjaerulff & Kiehn, 2001; Gabbay *et al.*, 2002; Zhong, 2006; Han *et al.*, 2007). L'effet dose-dépendant sur la période du cycle moteur (Cazalets *et al.*, 1992; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000a) suggère que les amines accèdent directement aux composants du CPG. Étant donné que les AAEs et les amines augmentent l'excitabilité

neuronale individuellement, on pourrait s'attendre à ce que la période du rythme du moteur induite par leur action combinée soit encore plus courte que lorsque chaque composé agit séparément. Or ce n'est pas le cas, la période étant fixée à une valeur intermédiaire entre celle évoquée par l'AAE ou l'amine seul (Fig. 1, Table 1). Les données pharmacologiques fournissent une explication partielle de l'effet des amines sur la période. En effet, à la fois la 5HT et la noradrénaline peuvent ralentir le rythme locomoteur au travers d'une action inhibitrice via les récepteurs noradrénergiques $\alpha 2$ (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b; Gabbay, 2004), et les récepteurs sérotoninergiques 5-HT1 (Beato & Nistri, 1998), alors que l'activation des récepteurs noradrénergiques $\alpha 1$, et sérotoninergiques 5-HT7 et 5-HT2 a une action activatrice sur la génération du rythme moteur (Cazalets *et al.*, 1992; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000b; Madriaga *et al.*, 2004; Landry *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). De manière surprenante la dopamine qui a été rapportée pour avoir uniquement des effets activateurs, ralentit également le rythme locomoteur induit par la perfusion d'AAE (Fig. 1 (Barrière *et al.*, 2004)). Par conséquent, il est probable que plusieurs processus sous-jacents fonctionnent simultanément, tel que rapporté dans d'autres préparations (Harris-Warrick, 2011; Miles & Sillar, 2011; Clemens *et al.*, 2012). Par exemple chez la lamproie, l'allongement de la durée de la bouffée motrice et de la période par la sérotonine comprend au moins deux mécanismes : l'inhibition présynaptique de la libération de glutamate sur les neurones du CPG (Schwartz *et al.*, 2005) et le blocage post-synaptique de l'AHPs (Wallén *et al.*, 1989; Manira *et al.*, 1994).

C) La modulation aminergique des relations de phases lombaires.

Les principales caractéristiques de l'activité locomotrice rythmique fictive enregistrée sur une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* sont la période motrice, l'alternance gauche-droite et fléchisseurs-extenseurs, ainsi que la durée des bouffées motrices. Dans notre étude nous avons trouvé que ces paramètres sont étonnamment constants, quelle que soit la condition neuromodulatrice (Fig. 1, 4, Table 2). Ce manque de flexibilité peut refléter un besoin fonctionnel. En effet, lors de la locomotion il y a une réelle nécessité de maintenir des paramètres fondamentaux tels que l'alternance bilatérale dans le but de préserver l'équilibre et la vitesse. Toutefois, il ne faut pas oublier que l'approche pharmacologique que nous avons utilisée dans notre étude présente des limites, en particulier lorsque l'on considère les aspects temporels de la neuromodulation. Chez un

animal intact, il est probable que les voies descendantes aminergiques soient actives de manière phasique, alors que la perfusion continue des drogues dans le bain équivaut à une stimulation tonique, ce qui conduit à la disparition de la dimension temporelle de la neuromodulation. Ainsi, ce manque apparent de flexibilité pourrait être attribuable à un biais de la préparation *in vitro*. Une seconde limitation est que plusieurs applications de drogues sont effectuées sur la même moelle épinière. Lors de l'application répétée de NMA/5HT, des études précédente ont montré que l'activité motrice garde les mêmes caractéristiques tout le long de l'expérience (Cazalets *et al.*, 1999). À l'inverse, l'application exogène de dopamine entraîne des modifications persistantes des conductances ioniques (Rodgers *et al.*, 2011; Krenz *et al.*, 2014), et il a également été montré que la dopamine peut exercer des effets à long terme sur une préparation de moelle épinière isolée (voir Matériel et Méthodes, (Barrière *et al.*, 2004). C'est pour cette raison que dans nos expériences la dopamine a toujours été testée en dernier et à une concentration beaucoup plus faible que celle à laquelle ces effets à long terme ont été précédemment observés. Il n'existe aucune preuve que la noradrénaline exerce de telles actions persistantes.

D) La modulation aminergique des relations de phases axiales.

Dans plusieurs systèmes, les interactions entre des réseaux rythmiques distincts ont été décrites, comme par exemple entre la marche et les mouvements de la nageoire chez les crustacés (Cattaert & Clarac, 1983; Chrachri & Neil, 1993), entre l'activité du tronc et des membres inférieurs chez le Xénope (Beyeler *et al.*, 2008; Rauscent *et al.*, 2009), entre la locomotion et la respiration (Kawahara *et al.*, 1989; Morin & Viala, 2002; Le Gal *et al.*, 2014), et entre la respiration et la déglutition (Gestreau *et al.*, 2000). Chez la salamandre, l'activité des réseaux neuronaux axiaux passe d'une propagation séquentielle des bouffées motrices à une activation synchrone de ces mêmes muscles axiaux lorsque l'animal passe de la nage à la marche quadrupède (Delvolvé *et al.*, 1997).

Notre étude tend à montrer que les amines peuvent reconfigurer la coordination des différents segments spinaux, de manière différente en fonction du contexte neuromodulateur. Ainsi, il semblerait que chaque amine possède sa propre empreinte caractéristique lors de la modulation des relations de phase entre les différents segments de la moelle épinière (Fig. 3). Dans une étude précédente, dans laquelle seule l'action du mélange NMA/5HT a été étudiée sur les réseaux spinaux interconnectés, nous avons trouvé

un délai de propagation constant entre les segments lombaires et segments thoraciques, avec une propagation caudo-rostrale de l'activité motrice (Falgairolle & Cazalets, 2007). Ici, nous constatons que la dopamine et la noradrénaline, contrairement à l'action de la 5HT, diminuent considérablement le délai de propagation, entraînant une synchronisation des bouffées le long de la moelle épinière. Des modifications de la direction de la propagation rostro-caudale à une propagation caudo-rostrale sont également observées chez la lamproie, lors du passage de la nage vers l'avant à une nage vers l'arrière (Islam *et al.*, 2006). Bien que les cibles cellulaires ne soient pas identifiées, les interneurons commissuraux de la moelle épinière pourraient être une cible probable, car ils sont connus pour être modulés par la 5HT (Zhong, 2006), et de plus des expériences ont déjà établi que chez le rat nouveau-né, une hémisection partielle ou complète de la moelle supprime les retards de phase entre les segments sacrés (Falgairolle & Cazalets, 2007).

En conclusion, ce travail fournit de nouvelles données sur les mécanismes permettant la coordination entre les réseaux de la moelle épinière. Nous démontrons que chacune des trois amines : la 5HT, la dopamine, et la noradrénaline, quand elles sont associées avec des agonistes des récepteurs glutamatergiques, suscite un patron locomoteur spécifique, avec des caractéristiques temporelles, une amplitude des bouffées et des relations de phase intersegmentaire distinctes. Ces différences sont susceptibles d'être liées à l'évolution des exigences comportementales et permettraient à l'animal d'adapter son rythme locomoteur aux besoins de son environnement. Les neuromodulateurs aminergiques représentent donc une importante source potentielle de flexibilité au niveau des réseaux neuronaux centraux et du patron moteur qu'ils produisent.

Chapitre 3

Influence des noyaux vestibulaires sur les réseaux moteurs spinaux.

Les travaux présentés dans ce chapitre sont une étude préliminaire de l'influence des noyaux vestibulaires sur les segments spinaux. Il conviendra de compléter certaines expériences pour permettre une analyse qualitative plus poussée.

Introduction

Les projections vestibulospinales jouent un rôle important dans le contrôle de la posture et du mouvement chez les Vertébrés quadrupèdes. Chez le chat, il a été montré que les noyaux vestibulaires renseignent le système nerveux sur les mouvements de la tête en envoyant des informations phasiques sur les structures supraspinales (Barberini & Macpherson, 1998; Boyle, 2001). Mais ces noyaux envoient également des informations toniques non-spécifiques au niveau des noyaux moteurs du tronc cérébral et de la moelle épinière (Deliagina *et al.*, 1997). Une perturbation du système vestibulaire induite par une stimulation galvanique entraîne une réponse motrice au niveau des membres de l'animal, avec un réflexe postural augmenté du côté de l'électrode de stimulation positive et diminué du côté de l'électrode négative (Hsu *et al.*, 2012). Chez l'homme, une stimulation galvanique entraîne une réponse musculaire importante au niveau du tronc et des membres (Britton *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1997). De plus au cours de la marche, une stimulation entraîne une déviation du côté de l'anode (Fitzpatrick *et al.*, 1999; Bent *et al.*, 2000), ce qui indique que les noyaux vestibulaires participent au contrôle de l'équilibre à la fois lors de la station debout et au cours de la locomotion. La préparation de moelle épinière isolée de rat est un modèle d'étude intéressant pour comprendre l'influence des noyaux vestibulaires sur les réseaux posturaux spinaux, car elle permet de s'affranchir de toutes les informations corticales, cérébelleuses, visuelles et proprioceptives qui sont également impliquées dans le maintien de l'équilibre.

Chez le rat nouveau-né, les noyaux vestibulaires sont efficaces dès le premier jour postnatal (Curthoys, 1979). De plus, des études anatomiques ont mis en évidence que les voies vestibulospinales commencent à se développer chez l'embryon et atteignent les

segments cervicaux de la moelle épinière au stade embryonnaire E12.5 dans le cas du faisceau vestibulospinal latéral (LVST) et E14.5 pour le faisceau vestibulospinal médian (MVST) (Auclair *et al.*, 1999; Pasqualetti *et al.*, 2007). À la naissance, les connexions synaptiques entre le système vestibulaire et les motoneurones sont fonctionnelles et une organisation spécifique des faisceaux vestibulospinaux sur les segments spinaux est établie. Le faisceau vestibulospinal latéral projette sur les motoneurones cervicaux, thoraciques et lombaires tandis que le faisceau vestibulospinal médian projette sur les segments cervicaux uniquement (Kasumacic *et al.*, 2010). Des études réalisées en imagerie calciques ont montré que lors d'une stimulation du nerf VIII, une réponse est enregistrée bilatéralement au niveau des racines motrices ventrales de l'ensemble de ces segments (Kasumacic *et al.*, 2010).

Si de nombreuses études ont montré l'importance du système vestibulaire dans le maintien de l'équilibre debout et au cours de la marche, les mécanismes sous-jacents permettant ce contrôle sont à ce jour peu connus. Dans nos travaux, l'influence des afférences vestibulaires sur les régions spinales cervicales, thoraciques et lombaires sera étudiée grâce à des enregistrements extracellulaires des racines motrices ventrales, en condition contrôle et au cours de la locomotion, sur une préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né. Des enregistrements intracellulaires nous permettront d'étudier les entrées synaptiques vestibulaires arrivant sur les motoneurones lombaires.

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la stimulation du nerf vestibulaire déclenche une vague d'activité métachronale le long des segments spinaux, avec une rupture dans la vitesse de propagation entre les segments thoraciques et lombaires. Au cours d'épisodes de locomotion fictive induits pharmacologiquement, une stimulation du nerf vestibulaire entraîne des modifications à la fois dans le patron locomoteur et dans l'amplitude des bouffées motrices, ce qui suggère une influence des noyaux vestibulaires à la fois sur les interneurones prémoteurs et sur les motoneurones.

Matériels et méthodes

Dans cette étude, des préparations de tronc cérébral-moelle épinière isolée sont utilisées. Des stimulations des nerfs vestibulaires VIII sont réalisées et les réponses motrices induites sont enregistrées en extracellulaires au niveau des racines motrices ventrales

cervicales (C8), thoraciques, (de T6 à T8), et lombaires (L2 et L5). Les motoneurones lombaires L2 sont enregistrés en patch clamp.

Dès le début de l'expérience, le tronc cérébral est perfusé avec un liquide céphalorachidien à 4mM KCl, de manière à augmenter l'excitabilité des noyaux vestibulaires. La préparation est divisée en différents compartiments à l'aide de murs de Vaseline, placés en C3 et T11. La locomotion est induite par application pharmacologique de NMA (15 μ M) et de 5HT (15 μ M) soit sur l'ensemble de la moelle épinière soit uniquement sur la partie lombaire. Dans certaines expériences, les segments cervicaux et thoraciques ont été perfusés avec un milieu appauvri en calcium (et enrichi en magnésium) afin de bloquer la transmission synaptique.

Résultats

A) Réponses motrices à une stimulation vestibulaire, en condition contrôle.

Les neurones vestibulospinaux sont activés indirectement par une stimulation électrique des afférences du nerf VIII (Fig. 1A). Cette méthode permet d'activer synaptiquement les noyaux vestibulaires sans endommager les tissus du tronc cérébral avec l'électrode de stimulation. La réponse motrice générée est enregistrée bilatéralement dans les racines motrices ventrales de la moelle épinière (indiqué par des points dans la Figure1), le long des différents segments spinaux (Fig. 1). L'application de stimulations électriques répétitives en choc unique à deux fois le seuil (2T) déclenche une réponse motrice bilatérale dans les racines cervicales, thoraciques et lombaires (Fig. 1B1). L'activité se propage rostrocaudalement le long de la moelle avec un délai entre chaque segment. Pour déterminer avec plus de précision le début de la réponse, le signal est rectifié puis moyenné (Fig. 1B2). Nous avons pu mettre en évidence une rupture dans la propagation de l'activité motrice entre les segments thoraciques et lombaires (Fig. 1C). Deux zones ressortent ainsi clairement. Au niveau des segments cervicaux et thoraciques, l'activité apparaît avec un délai de $77 \pm 3,8$ ms en C8 (n=20), $84 \pm 3,1$ ms en T7 (n=20), et $73 \pm 1,5$ en T11 (n=3). En lombaire l'activité apparaît avec un délai de 107 ± 3 ms en L2 (n=31) et $117 \pm 3,4$ ms en L5 (n=28). Cette rupture dans la pente de propagation de l'activité est significative (t-test, $p < 0,001$). Lors d'une stimulation du nerf vestibulaire, certaines racines peuvent échouer à

répondre. De manière générale le nombre d'échecs est plus important dans la racine la plus distale (22,3% d'échecs en L5, Fig. 1D).

Des études précédentes ont déterminé les meilleurs paramètres de stimulation du nerf VIII pour déclencher une réponse au niveau des motoneurones ((Kasumacic *et al.*, 2010). Une stimulation de 5Hz pendant 5 secondes, à deux fois le seuil permet de déclencher une réponse d'une vingtaine de secondes au niveau des racines ventrales cervicales, thoraciques et lombaires (n=7 préparations). Dans la plupart des préparations (n=5 préparations) cette réponse est tonique, mais dans certains cas, une activité de locomotion fictive peut apparaître sur quelques cycles (n=2 préparations, Fig. 1E).

Dans une seconde partie de ces expériences, nous avons voulu déterminer si les voies vestibulospinales projettent de manière directe sur les segments lombaires, ou s'il existe des relais au niveau cervicaux et thoraciques. Pour cela, nous avons appliqué une solution de bas calcium-haut magnésium sur les segments cervicaux et thoraciques, afin de bloquer la transmission synaptique dans ces segments. Dans cette condition, nous avons pu observer une perte de la réponse dans ces segments respectifs au cours d'une stimulation du nerf VIII (Fig. 2A1-A2). La réponse enregistrée au niveau lombaire persiste (Fig. 2A2), ce qui indique que les voies vestibulospinales, ou une partie des voies, projetant au niveau lombaire ne réalisent pas de relais au niveau cervical et thoracique. Le délai d'apparition de l'activité au niveau lombaire dans cette condition n'est pas significativement différent de la condition contrôle ($115,8 \pm 6,25\text{ms}$ en L2, n=12 et $114,2 \pm 13,3\text{ms}$ en L5, n=7 ; t-test non paramétrique Mann-Whitney, $p < 0.05$). Pour déterminer si ces voies vestibulospinales projettent sur les neurones prémoteurs lombaires ou directement sur les motoneurones, nous avons réalisé des enregistrements en patch-clamp des motoneurones lombaire en L2 et nous avons bloqué les voies polysynaptique à l'aide d'une solution de haut calcium-haut magnésium dans la région lombaire (n=2 motoneurones). Dans la figure 2B, lors d'une stimulation du nerf VIII, un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) de $2,19 \pm 0,25\text{mV}$ est enregistré dans le motoneurone L2 (Fig. 2B1). Lors d'une application de haut calcium-haut magnésium sur les segments spinaux lombaires, la stimulation du nerf VIII déclenche un PPSE de $1,59 \pm 0,09\text{mV}$ dans le motoneurone L2 suggérant la présence d'une composante monosynaptique dans la voie vestibulospinale projetant sur les motoneurones lombaires. Toutefois, l'amplitude du

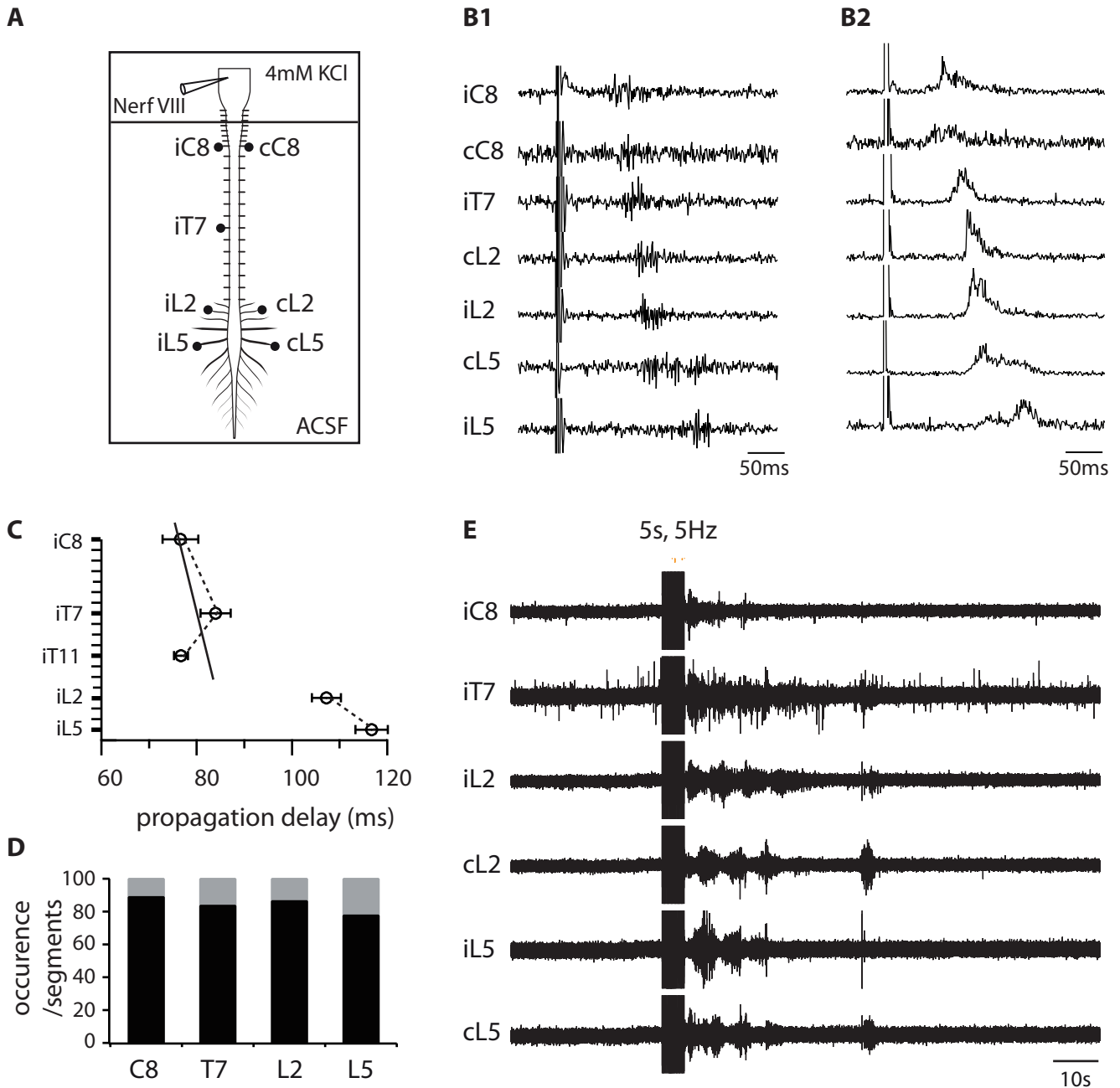


Figure 1 : Activité spinale en réponse à une stimulation du nerf vestibulaire

(A) Présentation du dispositif expérimental. (B1) La stimulation de la VIIIème paire de nerf crânien déclenche une activité motrice sur l'ensemble des racines cervicales (C8), thoraciques (T7) et lombaires (L2 et L5). (B2) Traces rectifiés et moyennés de l'enregistrement de la figure B1. Ce traitement du signal permet une meilleure détection du début des bouffées. (C) Histogramme représentant le délai d'apparition des bouffées dans chacun des segments spinaux enregistrés. Le trait noir représente la droite de régression linéaire au niveau des segments cervicaux et thoraciques. (D) Histogramme illustrant le pourcentage de préparations ayant répondu à une stimulation à une stimulation du nerf VIII (en noir), et le pourcentage n'ayant pas présenté de réponse (en gris), dans chaque segments enregistrés. (E) Illustration d'un épisode de locomotion fictive enregistré au niveau des racines thoracique (T7), et lombaires L2 et L5 droites et gauches (r et l respectivement), déclenché par une stimulation du nerf VIII. i, ipsilatéral; c, contralatéral.

PPSE est diminuée de 27% (Fig. 2B2), indiquant la présence d'une composante polysynaptique.

Il est intéressant de noter que le délai d'apparition de l'activité dans les motoneurones lombaires est nettement plus précoce (49ms) que l'activité enregistrée en extracellulaire (90ms). De plus, le blocage de la composante polysynaptique supprime l'apparition d'une activité extracellulaire. Il semble donc que dans nos conditions, le recrutement de voies polysynaptiques soit nécessaire pour permettre aux neurones de passer le seuil d'activation des potentiels d'actions et ainsi déclencher une activité enregistrable en extracellulaire.

Il a été montré que la première semaine postnatale est une période critique pour le développement de la posture dans les membres postérieurs du rat nouveau-né (Brocard *et al.*, 1999). Dans ces conditions, nous nous sommes intéressés aux connexions synaptiques vestibulospinales sur les motoneurones lombaires. Pour cela, nous avons enregistré en intracellulaire des motoneurones lombaires en L2 (Fig. 3A1 et B1, panneau de gauche). Un épisode de locomotion fictive est préalablement déclenché par application de NMA/5HT sur la moelle épinière pour déterminer la nature fléchisseur ou extenseur de ces motoneurones. En effet, bien que le segment L2 contienne majoritairement des motoneurones fléchisseurs, il existe également une petite proportion de motoneurones extenseurs. Dans l'ensemble de nos expériences, 11 motoneurones fléchisseurs ont été enregistrés en L2 lors d'une stimulation du nerf VIII ipsilatéral (Fig. 3A1 panneau de gauche). L'ensemble de ces neurones n'a pas présenté le même patron de décharge lors de cette stimulation. 7 motoneurones se sont dépolarisés et ont réalisé un PPSE après chaque stimulation (Fig. 4A1 panneau de droite). Le tracé rouge représente la moyenne des PPSEs pour un train de 30 stimulations, et sur le motoneurone de la figure 3A1 nous pouvons voir un PPSE moyen apparaissant avec un délai de 49,1 secondes après la stimulation. Dans cette même condition, 4 motoneurones sur 11 se sont dépolarisés de manière globale, mais n'ont pas réalisé de PPSEs associés à chaque stimulation, comme on peut le voir sur l'agrandissement de la trace (Fig. 3A2, tracés du bas) ou au travers de la moyenne de l'ensemble des 30 stimulations (Fig. 3A2, tracé rouge). La même expérience a été reproduite en simulant cette fois le nerf VIII contralatéral au motoneurone (Fig. 3B, panneau de gauche). Le neurone de la figure B1 est le même que celui de la figure A1, et nous pouvons voir que dans cette condition ce motoneurone réalise

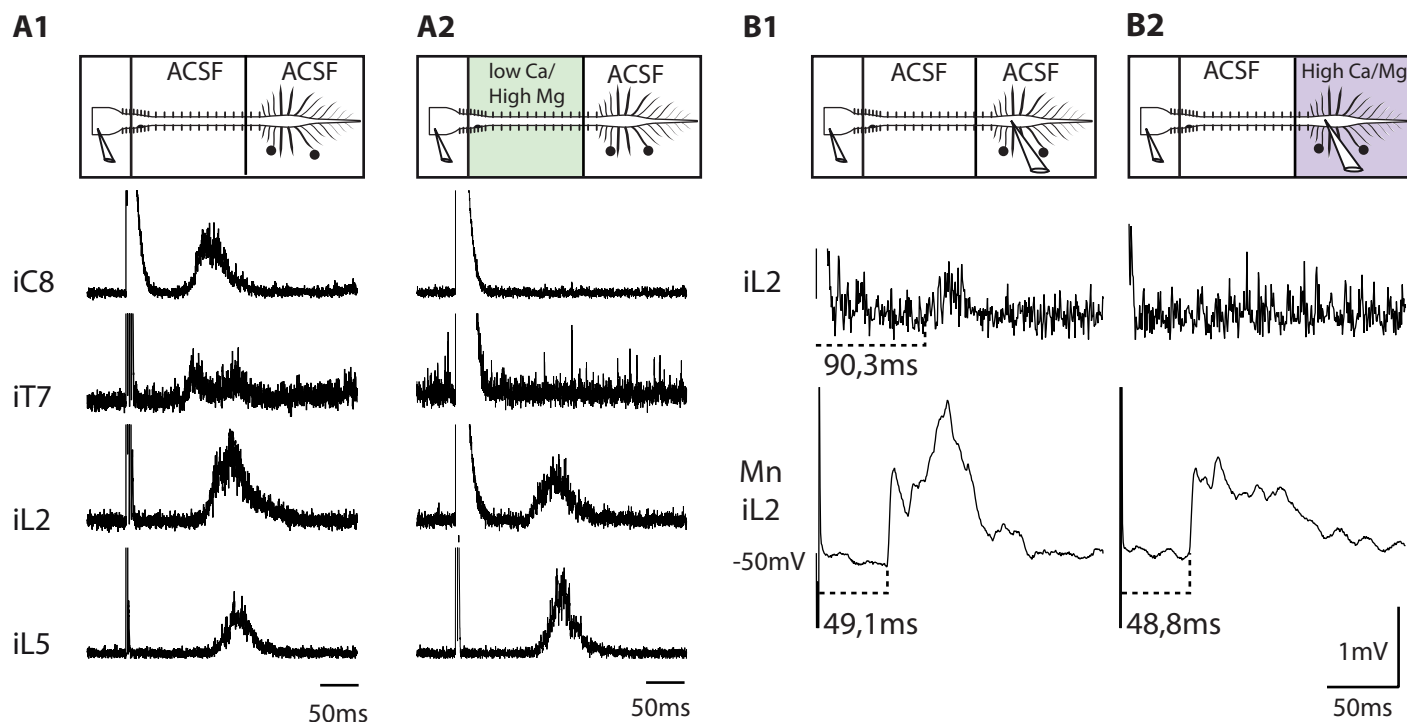


Figure 2. : Caractérisation des voies vestibulospinales.

(A1) Le panneau du haut présente le dispositif expérimental. La stimulation du nerf VIII déclenche une réponse motrices dans les racines cervicales (C8), thoraciques (T7) et lombaires (L2 et L5). (A2) La perfusion d'une solution de haut calcium- haut magnésium sur les segments cervicaux et thoraciques (panneau du haut) bloque l'activité au niveau de ces racines respectives (panneau du bas). L'activité enregistrée au niveau des racines lombaires L2 et L5 persiste dans cette condition. (B1) Activité enregistrée au niveau de la racine lombaire L2 lors d'une stimulation du nerf VIII. Un potentiel postsynaptique excitateur est enregistré en intracellulaire dans un motoneurone fléchisseur lombaire L2. Le délai d'apparition de l'activité extracellulaire et intracellulaire est indiqué sous chaque trace. (B2) La perfusion d'un milieu de haut calcium–haut magnésium sur les segments lombaires (panneau du haut) supprime l'activité en extracellulaire (L2) et diminue la réponse enregistrée en intracellulaire (MN L2) (panneau du bas). Le délai d'apparition de l'activité intracellulaire est indiqué sous la trace. i, ipsilatéral; c, contralatéral.

des potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) après chaque stimulation (Fig. 3B1, panneau de droite). Deux patrons de décharge sont également retrouvés dans le cas d'une stimulation du nerf VIII contralatéral ($n=3$, Fig. 3 B). 2 neurones ont réalisés des PPSI après chaque stimulation (Fig. 3B1), et un neurone s'est hyperpolarisé de manière globale, sans enregistrement de PPSI après chaque stimulation (Fig. 3B2).

B) Plasticité des voies vestibulospinales.

Une analyse plus poussée des PPSEs nous a permis de mettre en évidence des phénomènes plastiques synaptiques. Des trains de stimulation de 25 à 30 cycles ont été appliqués au niveau du nerf VIII ipsilatéral, à différentes fréquences : 0,2Hz, 2Hz et 5Hz sur 4 motoneurones L2. Ce protocole a induit deux types de réponses : une augmentation de l'amplitude moyenne des PPSEs a été observée dans 2 motoneurones lorsque la fréquence de stimulation est augmentée (Fig. 4A, panneau du haut) ; et une diminution progressive de l'amplitude a été observée dans les deux autres motoneurones lors de l'augmentation de la fréquence de stimulations (Fig. 4B, panneau du haut). Pour étudier de manière plus précise cette plasticité fréquence-dépendante nous avons exprimé l'amplitude des PPSE pour chacune des stimulations du train (Fig. 4, numéro de 1 à 30). Dans le motoneurone de la figure 4A, nous pouvons voir que l'amplitude des PPSEs augmente de manière importante à partir de la cinquième stimulation, lors d'un train effectué à 2Hz et 5Hz. Nous pouvons voir, que l'augmentation de l'amplitude persiste sur les 10 premières stimulations, avant de diminuer, ce qui suggère une facilitation à court terme. Ce résultat est confirmé par une étude de corrélation entre l'amplitude et le nombre de stimulations : il existe une corrélation significative à 2Hz ($r=0,75$, test de Spearman) et à 5Hz ($r=0,81$, test de Spearman), si on considère les 15 premières stimulations. Par contre la corrélation n'est pas significative lorsqu'elle est calculée pour l'ensemble des 30 stimulations ($r=-0,15$ à 2Hz, et $r=-0,17$ à 5Hz, test de Spearman). Aucune facilitation à court ou long terme n'est observée lors d'un train de stimulation à 0,2Hz ($r=-0,2$ pour 15 stimulations et $r=-0,1$ pour 30 stimulations ; test de Spearman). Lors d'une stimulation à 0,2Hz, ce neurone ne réalise pas de PPSE, comme on peut le voir sur le tracé moyenné des 30 stimulations (Fig.4A panneau du haut). La corrélation entre l'amplitude des PPSEs, en fonction du numéro de la stimulation, nous a permis de révéler la présence d'une dépression à long terme dans le neurone de la figure 4B ($r=-0,76$ à 0,2Hz et $r=-0,67$ à 5Hz, calculé pour les 30 stimulations,

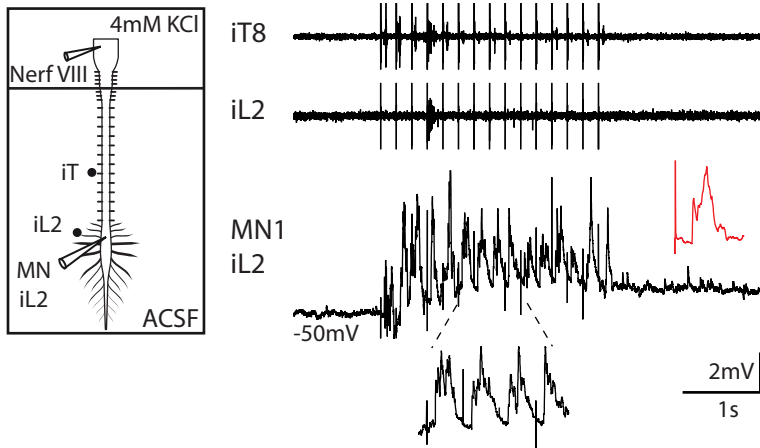
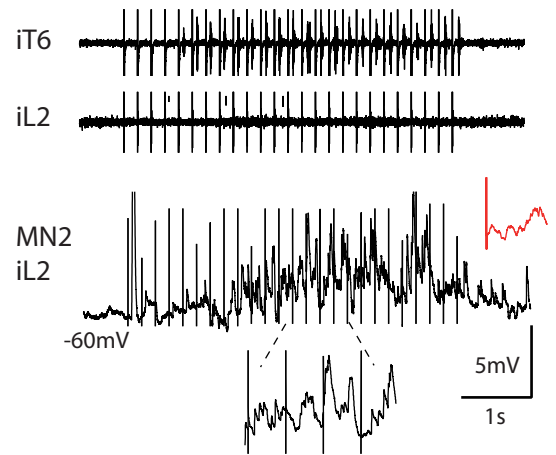
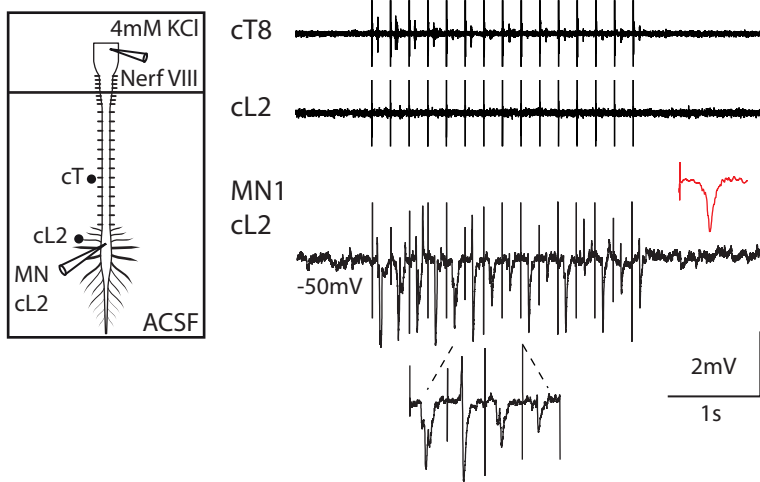
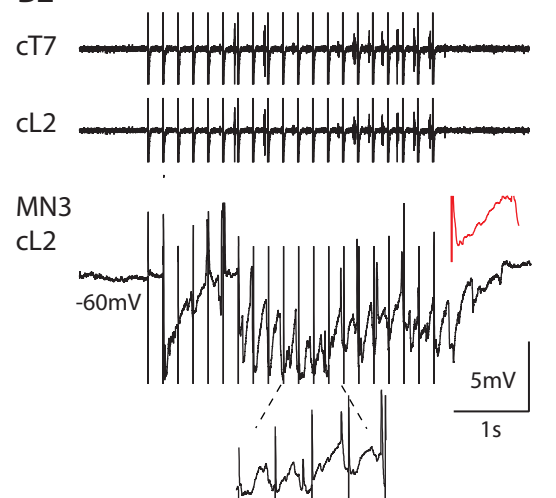
A1**A2****B1****B2**

Figure 3 : Caractérisation de la réponse intracellulaire des motoneurones lombaires en réponse à une stimulation vestibulaire.

(A1) : La réponse déclenchée par une stimulation du nerf VIII est enregistrée en extracellulaire au niveau des racines lombaires L2 bilatérales (iL2 et cL2), et en intracellulaire au niveau d'un motoneurone L2 ipsilatérale à la stimulation (MN1 iL2) (panneau de gauche). Lors de cette stimulation, le motoneurone se dépolarise et émet un PPSE après chaque stimulation. Le tracé du bas (panneau de droite) montre un agrandissement de l'activité du motoneurone. Le tracé rouge représente le PPSE moyen du train de stimulation. **(A2)** Un second motoneurone enregistré du côté ipsilatérale au nerf VIII stimulé (MN2 iL2) présente un patron moteur différent du MN1. En réponse à la stimulation, ce motoneurone se dépolarise mais n'émet pas de PPSEs réguliers après chaque stimulation comme le révèle l'agrandissement sur le tracé du bas ou la moyenne des PPSEs (tracé rouge). **(B1)** La réponse déclenchée par une stimulation du nerf VIII est enregistrée en extracellulaire au niveau des racines lombaires L2 bilatérales (iL2 et cL2), et en intracellulaire au niveau d'un motoneurone L2 contralatéral à la stimulation (MN1 cL2) (panneau de gauche). Lors de cette stimulation, le motoneurone émet un PPSI après chaque stimulation. Le tracé du bas (panneau de droite) montre un agrandissement de l'activité du motoneurone. Le tracé rouge représente PPSI moyen du train de stimulation. Le motoneurone de la figure A1 est le même que celui de la figure B1 (MN1). **(B2)** Un motoneurone enregistré du côté ipsilatérale au nerf VIII stimulé (MN3 cL2) présente une hyperpolarisation de son potentiel de membrane mais n'émet pas de PPSIs réguliers après chaque stimulation comme le révèle l'agrandissement sur le tracé du bas ou la moyenne des PPSIs (tracé rouge). i, ipsilatéral; c, contralatéral.

test de Spearman). Ces résultats indiquent que les synapses vestibulospinales peuvent réaliser de la plasticité, ce qui permettrait d'augmenter (facilitation) ou au contraire de filtrer (dépression) les entrées vestibulaires arrivant au niveau lombaire.

C) Influence des noyaux vestibulaires au cours de la locomotion.

L'étude de l'influence de la stimulation du nerf VIII sur la locomotion a été réalisée par différentes approches. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les entrées vestibulospinales pouvaient réinitialiser le patron moteur comme cela peut être observé lors de la stimulation des afférences proprioceptives lombaires (Kiehn *et al.*, 1992; Sqalli-Houssaini *et al.*, 1993; Iizuka *et al.*, 1997). Un train de stimulation (5Hz, 1s à 2 x le seuil, chocs de 0,5ms, n= 6 préparations) est appliqué au niveau du nerf VIII au cours d'un épisode de locomotion fictive, déclenché par application de NMA/5HT sur l'ensemble de la moelle épinière. L'activation de la voie vestibulospinale engendre une réinitialisation généralisée des rythmes locomoteurs au niveau lombaires en fonction de la période du cycle dans lequel elle est appliquée (Fig. 5A). Une stimulation appliquée pendant la phase d'activation de la racine L2 ipsilatérale (0 à 10% du cycle, Fig. 5B) va bloquer l'apparition de la bouffée et retarder l'apparition d'une nouvelle bouffée de potentiels d'action (Fig. 5A3). Si la stimulation intervient dans les 60 à 80% du cycle locomoteur de la racine L2 ipsilatérale (Fig. 5B), la mise en jeu de ces voies vestibulospinales inhibe la bouffée locomotrice dans laquelle la stimulation est appliquée, et le patron moteur est réinitialisé (Fig. 5A1 et A2). Dans cette configuration deux cas de figures ont été observés : dans 67% des préparations (n= 4/6), la bouffée suivante est retardée et on observe un allongement de la bouffée en L5 ipsilatérale (Fig. 5A1). Dans 33% des cas (n= 2/6), la bouffée suivante est avancée au niveau de la racine L2 ipsilatérale (Fig. 5A2), tandis que la bouffée enregistrée sur la racine L2 contralatérale est raccourcie. Ce phénomène de réinitialisation est validé par l'absence de changement significatif de la période locomotrice après réinitialisation complète du rythme ($3,55 \pm 0,18s$ avant stimulation et $3,54 \pm 0,18s$ après réinitialisation, t-test non paramétrique Mann Withney, $p < 0,05$).

Ces stimulations courtes (1s) ont un effet sur le rythme locomoteur, mais nous avons mis en évidence qu'une stimulation prolongée de 10s à 5Hz (2x le seuil) entraîne des modifications importantes de l'amplitude des bouffées motrices (Fig. 5D). Lors de la

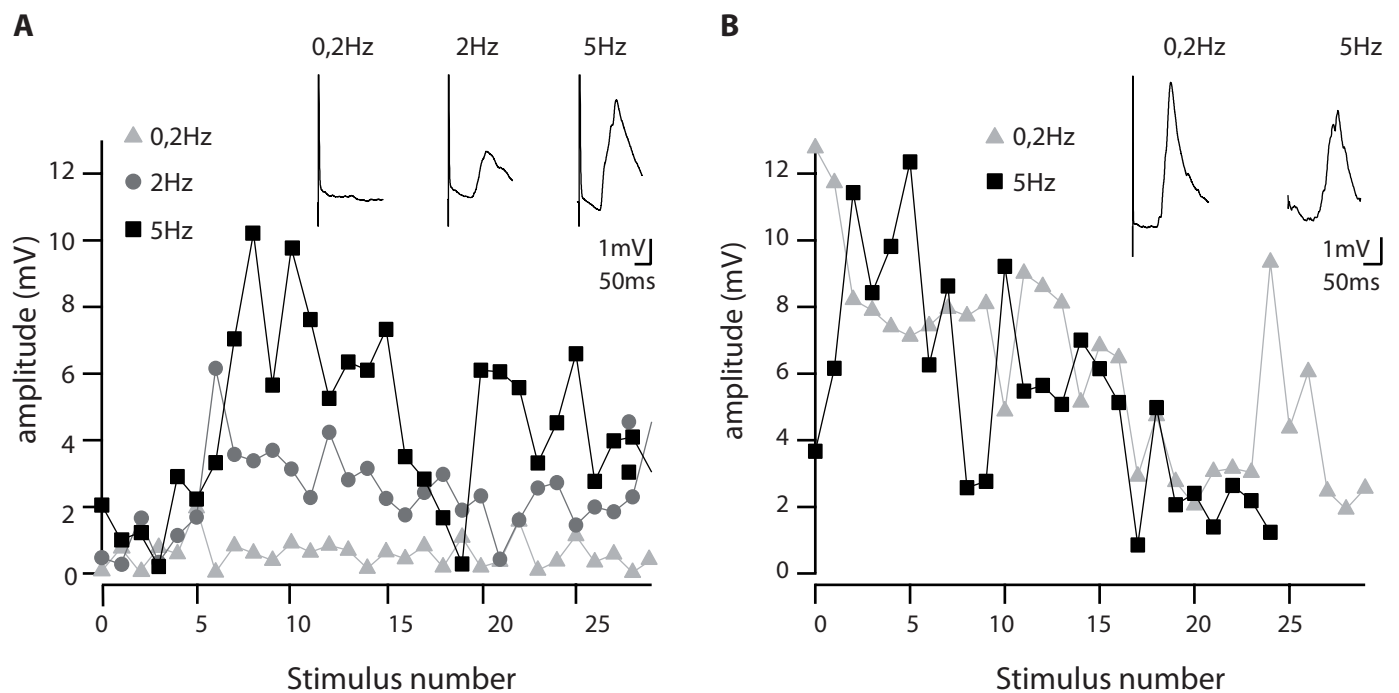


Figure 4 : Plasticité dépendante de la fréquence de stimulation des afférences vestibulaires aux synapses des motoneurones lombaires ipsilatéraux.

(A) L'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) enregistrés à partir d'un motoneurone tenu à -60 mV, et représenté en fonction du nombre de stimuli dans le train, révèle une facilitation à court terme en réponse aux trains de stimulations appliqués au niveau du nerf vestibulaire à des fréquences de plus en plus élevées (0,2Hz, 2Hz, 5Hz). Le panneau du haut montre le PPSE moyen calculé sur la base de 30 stimulations du train. (B) L'amplitude des PPSEs représentés en fonction du nombre de stimuli dans des trains de 0,2Hz et 5Hz, révèle une dépression synaptique. Les PPSEs moyens pour ces deux trains de stimulations sont représentés dans le panneau du haut.

stimulation du nerf VIII, l'activité motrice de la racine L2 ipsilatérale est inhibée pendant toute la durée de la stimulation. À l'inverse l'amplitude de la bouffée dans la racine L2 contralatérale augmente de $33,6 \pm 15\%$ ainsi que l'amplitude dans la racine L5 ipsilatérale à la stimulation ($79,8 \pm 24\%$). De plus le patron moteur de ces racines est modifié, avec un allongement de la durée des bouffées, qui dure tout le temps de la stimulation. Aucune différence significative de l'amplitude ni de la durée des bouffées n'a été observée dans la racine L5 contralatérale à la stimulation (Fig. 5D).

Les modifications d'amplitude observées lors des réinitialisations sont retrouvées lors de trains de stimulations de 30 à 40s à 5Hz au cours d'un épisode de locomotion fictive induit par application de NMA/5HT sur l'ensemble de la moelle épinière (Fig. 6A1, A2, n=4 préparations). Dans cette condition nous avons pu observer un renforcement de l'activité enregistrée en thoracique, avec une augmentation de l'amplitude des bouffées motrice (Fig. 6A1, n=2 préparations) ou l'apparition d'une bouffée tonique se prolongeant sur toute la durée de la stimulation (Fig. 6A2, n= 2 préparations). Au niveau lombaire, ce renforcement de l'activité motrice peut être retrouvé sur l'ensemble des racines L2 et L5, avec une augmentation de l'amplitude (Fig. 6A1, n=2 préparations). Dans la figure 6A2, nous pouvons observer des variations de l'amplitude au niveau des racines lombaires, similaires à celles observées dans la figure 5D. Une disparition du rythme moteur est enregistrée au niveau de la racine L2 ipsilatérale, ainsi qu'une modification du patron moteur en L2 contralatérale et L5 ipsilatérale avec un allongement de la durée des bouffées (n=2 préparations).

Lorsque la locomotion fictive est déclenchée uniquement au niveau lombaire (n=5 préparations), une stimulation du nerf VIII entraîne une réponse importante au niveau thoracique qui est similaire à celle observé lorsque la stimulation est appliquée en l'absence de stimulation pharmacologique. La perturbation du rythme moteur est observée uniquement lors de la première bouffée d'activité, puis le rythme récupère un patron normal (Fig. 6B). Dans la même préparation, au cours de l'application d'une solution de bas calcium-haut magnésium sur les segments cervicaux et thoraciques, permettant de bloquer l'activité neuronale à ces niveaux, la stimulation du nerf VIII n'entraîne aucune modification du rythme locomoteur enregistré au niveau lombaire (n= 4 préparations). Ce résultat suggère que le segment thoracique participe au contrôle de l'activité lombaire au cours de la locomotion lors d'une stimulation vestibulaire.

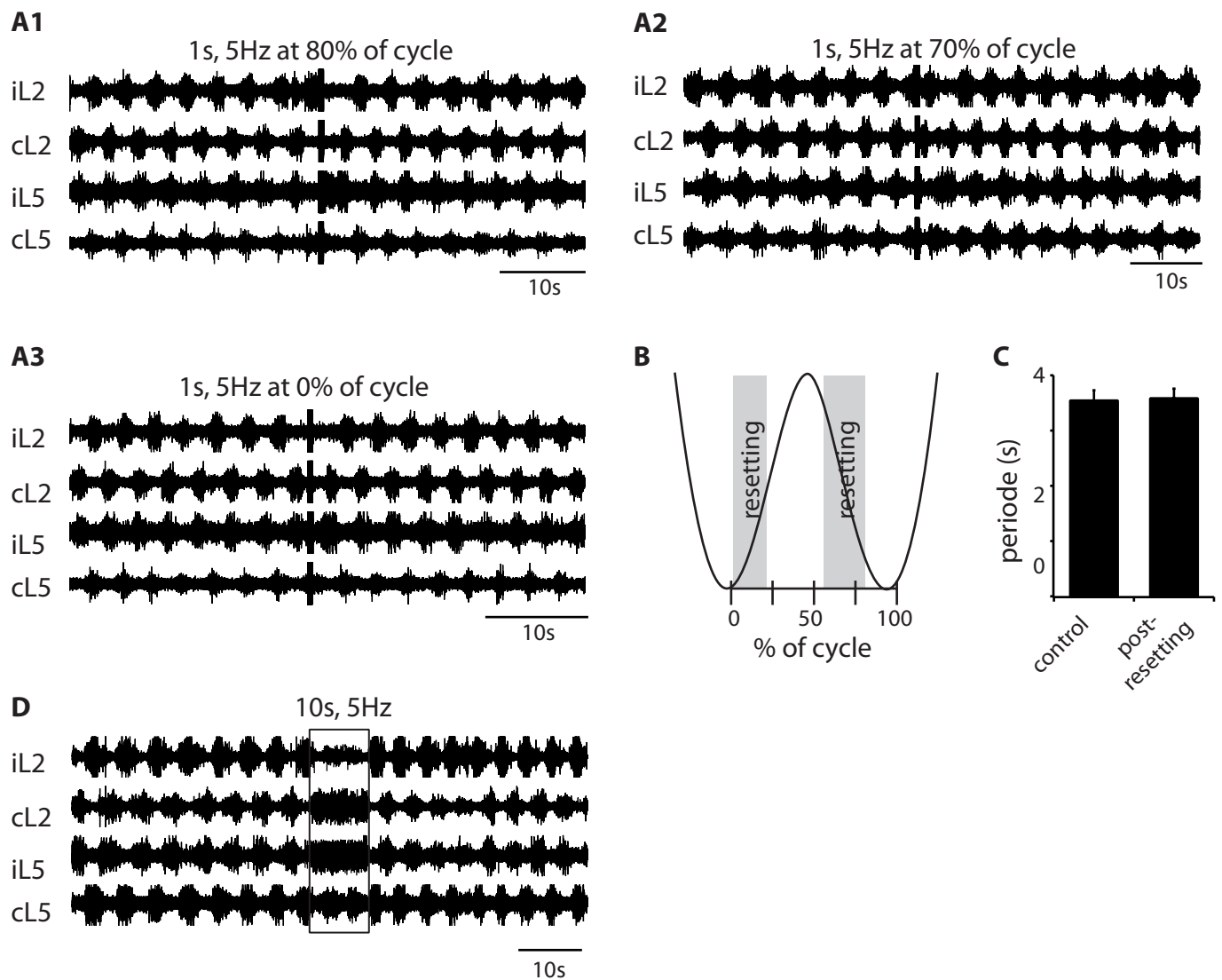


Figure 5 : Reinitialisation de la locomotion.

(A1) Dans 77% des préparations, une stimulation du nerf vestibulaire appliqué à 70% du cycle entraîne un retard de la bouffée d'activité suivante en L2 ipsilatérale (A2) et dans 33% des préparations provoque une avance de la décharge de la bouffée suivante. (A3) La stimulation appliquée à 0% du cycle provoque en retard de la décharge au niveau de la racine L2 ipsilatérale dans 100% des préparations testées. (B) Représentation schématique d'un cycle moteur. Les rectangles gris indiquent les phases du cycle locomoteur dans lesquelles une stimulation provoque un recadrage de l'activité motrice. (C) Histogramme montrant l'évolution de la période locomotrice avant et après la reinitialisation. (D) Une stimulation de 10 secondes du nerf vestibulaire provoque des modifications de l'amplitude des bouffées d'activités motrices enregistrées bilatéralement au niveau lombaire L2 et L5. i, ipsilatéral; c, contralatéral.

Discussion

A) Réponses motrices à une stimulation du nerf VIII

A l'aide d'une approche électrophysiologique extracellulaire et intracellulaire, nous avons pu étudier les connexions fonctionnelles entre les noyaux vestibulospinaux et les différents segments de la moelle épinière, au repos et au cours de la locomotion (Fig. 7). L'activation des noyaux vestibulaires s'est faite de manière indirecte par une stimulation des afférences du nerf VIII. À cause de limitations techniques, la totalité du nerf VIII a été stimulé, sans séparer les composantes vestibulaires et auditives. De plus il nous est impossible de séparer les afférences en provenance des différentes structures vestibulaires (organes otolithique et canaux semi-circulaire). En effet, la petite taille du système labyrinthique chez le rat nouveau-né rend une dissection précise impossible. Chez la souris adulte, une activation sélective des afférences en provenance soit des organes otolithique soit des canaux semi-circulaires génère une réponse au niveau des motoneurones spinaux (Takemura & King, 2005; Sheykholeslami *et al.*, 2009). La réponse enregistrée dans notre étude est donc due à l'activation de l'ensemble de ces afférences.

Comme précédemment démontré chez la souris (Kasumacic *et al.*, 2010), la stimulation du nerf VIII permet de déclencher une activité motrice se propageant rostro-caudalement le long de la moelle épinière. Nous avons remarqué qu'il existe un point de rupture dans la vitesse de propagation de cette activité entre les segments thoraciques et lombaires (Fig. 1C). Nous avons vu que ces voies vestibulospinales projettent pour partie de manière directe sur les segments lombaires sans réaliser de relais au niveau cervical et thoracique (Fig. 2A), et que le délai d'apparition de la réponse au niveau lombaire dans cette condition est similaire à celui enregistré en contrôle. Cela suggère que les mécanismes impliqués dans le changement de la vitesse de la propagation se situent au niveau lombaire. Nous avons vu qu'une partie des voies vestibulospinales réalise un relais au niveau pré-motoneuronal avant d'activer les motoneurones lombaires L2 (Fig. 2B). Ce délai intersegmentaire entre les régions thoraciques et lombaires pourrait être causé par la présence des CPGs. En effet, cette rupture de la vitesse de propagation métachronale rappelle celle observée au cours de la nage chez la salamandre (Delvolvé *et al.*, 1999), où une vitesse de propagation non uniforme a été enregistrée le long des différentes régions

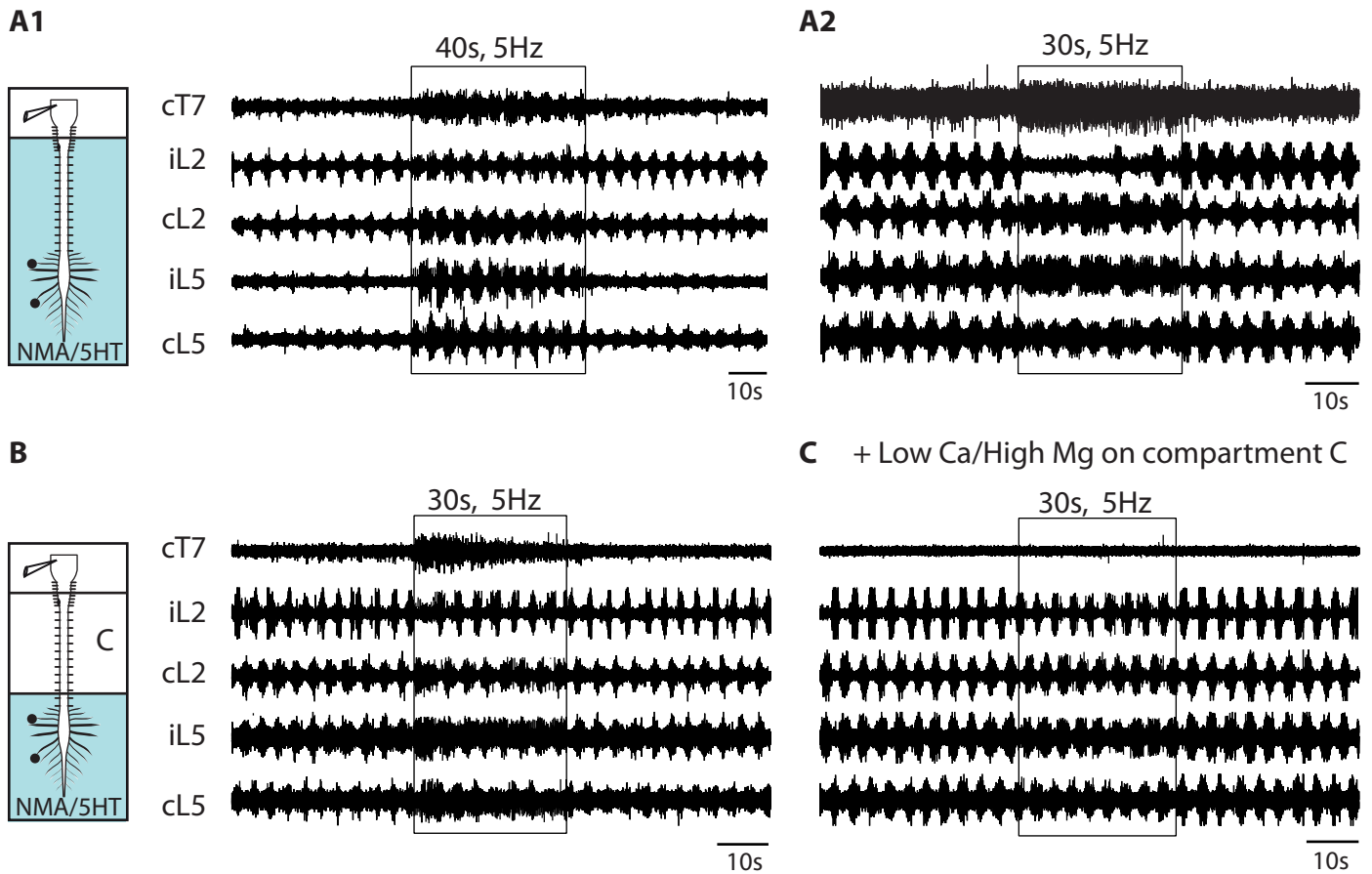


Figure 6 : Effet d'une stimulation des noyaux vestibulaires sur la locomotion.

(A1) Une stimulation du nerf VIII de 40s augmente l'amplitude des bouffées motrices déclenchées par la perfusion de NMA/5HT sur l'ensemble de la préparation dans 50% des préparations, (A2) et perturbe l'activité rythmique dans les 50% autres préparations. (B) Au cours d'une activité de locomotion fictive lombaire déclenché par la perfusion des segments lombo-sacrés uniquement, la stimulation du nerf VIII déclenche un bouffée d'activité tonique au niveau thoracique et perturbe la régularité du rythme lombaire. (C) Dans cette même condition, la perfusion des segment cervicaux et thoraciques (compartiment C) par un milieu bas calcium-haut magnésium bloque l'activité au niveau thoracique. La stimulation du nerf VIII ne déclenche aucune perturbation dans le rythme lombaire. i, ispilatéral; c, contralatéral.

spinales, et qui serait due à la présence des réseaux neuronaux des membres antérieurs et postérieurs (Delvolvé *et al.*, 1997).

La stimulation du nerf VIII peut déclencher une réponse locomotrice sur plusieurs cycles (Fig 1E). Chez le rat, les neurones réticulospinaux projettent sur les différents segments spinaux dès le stade embryonnaire E17, et les connexions réticulospinales sont fonctionnelles à la naissance (Kudo *et al.*, 1993; Lakke, 1997). Une activation indirecte de ces neurones réticulospinaux par les afférences vestibulaires permettrait d'induire le rythme locomoteur enregistré dans plusieurs préparations.

B) Réponses des motoneurones à une stimulation vestibulaire.

L'étude des connexions synaptiques entre les noyaux vestibulospinaux et les motoneurones fléchisseurs lombaires L2 nous a permis de montrer qu'une stimulation du nerf VIII entraîne une dépolarisation au niveau des motoneurones fléchisseurs ipsilatéraux et une hyperpolarisation au niveau des motoneurones contralatéraux à la stimulation. Or suite à une stimulation du nerf VIII en condition de repos, une activité est enregistrée bilatéralement en extracellulaire. Cette réponse est vraisemblablement due au fait que différents types de motoneurones (fléchisseurs et extenseurs) coexistent au sein d'un même segment spinal lombaire, nos enregistrements extracellulaires ne nous permettant pas de les différencier. Des études menées *in vivo* chez des chats anesthésiés ont montré que la stimulation des neurones vestibulaires latéraux peut avoir un effet excitateur ou un effet inhibiteur, à la fois sur les muscles fléchisseurs et extenseurs des membres postérieurs, au cours d'épisodes de locomotion fictive déclenchés par une stimulation de la MLR (Takahashi *et al.*, 1998). Cette flexibilité de la réponse motrice pourrait être particulièrement importante au cours de la locomotion où la réponse des membres est dépendante de la phase du cycle moteur dans laquelle a lieu la perturbation.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons pu mettre en évidence que des stimulations courtes (1s) influencent le rythme locomoteur alors que des stimulations plus longues (10s) entraînent des variations à la fois du rythme et de l'amplitude des bouffées motrices (Fig. 5 et 6). Cela suggère que les noyaux vestibulaires ont un accès direct au CPG et aux motoneurones. Ces résultats sont en accord avec l'existence d'une voie monosynaptique et d'une voie polysynaptique vestibulospinale projetant sur les réseaux lombaires (Fig. 2B). L'existence d'une composante polysynaptique en provenance du noyau vestibulaire latéral

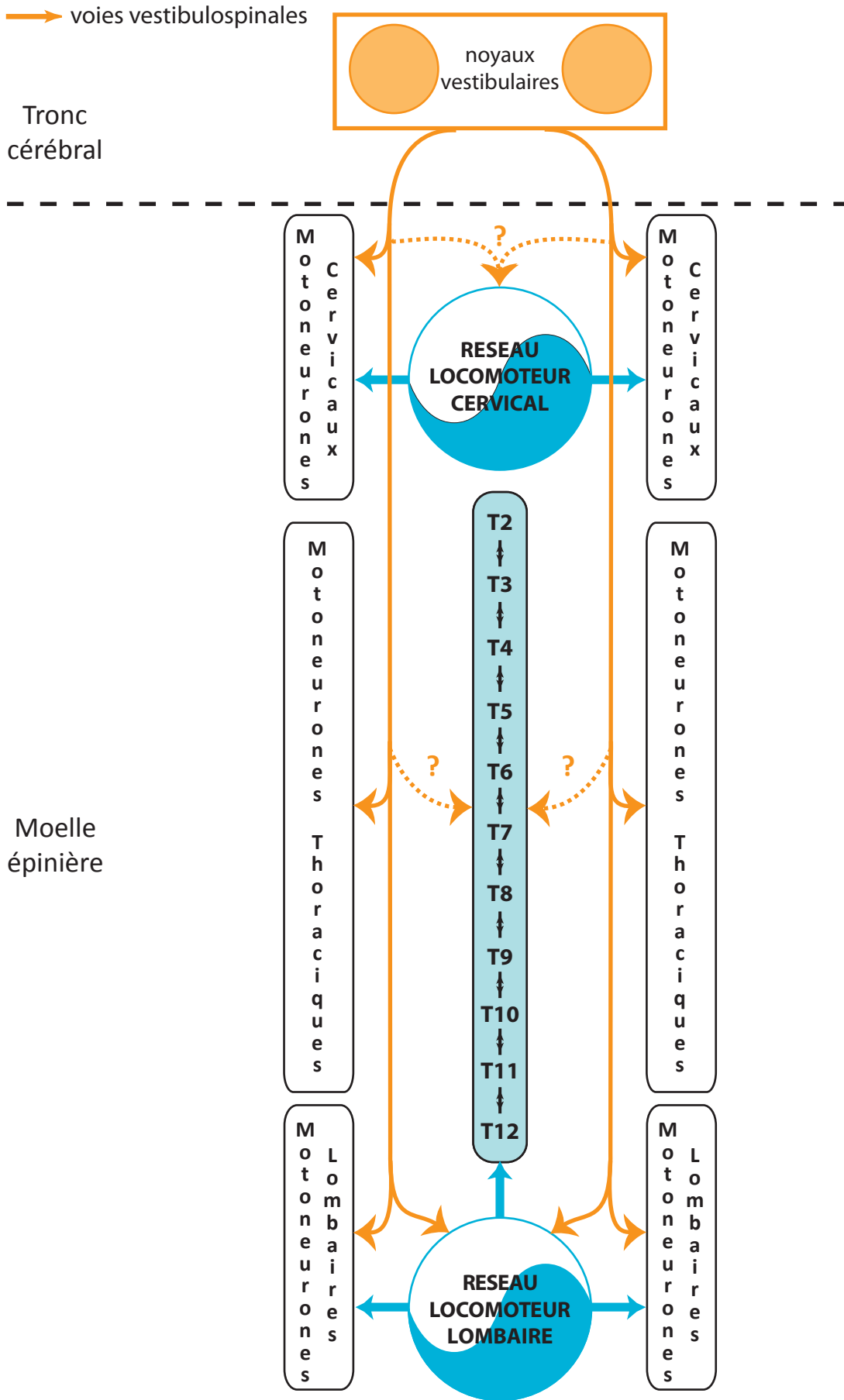


Figure 7: Schéma récapitulatif des connexions vestibulospinales.

Ce schéma résume les données obtenues dans ce chapitre. Nous avons mis en évidence que les noyaux vestibulospinaux projettent sur l'ensemble de la moelle épinière, de manière bilatérale. Nous avons montré une projection sur le réseau locomoteur lombaire et les motoneurones lombaires. Il reste à déterminer les projections vestibulospinales sur les réseaux axiaux et le réseau locomoteur cervical.

sur les motoneurones lombaires a été mise en évidence chez le chat, avec l'implication de plusieurs relais prémotoneuronaux (Gossard et al., 1996). Ces interneurons prémoteurs intégreraient les informations en provenance des voies vestibulospinales et les retours sensorielles en provenance des membres, et permettraient la modulation de l'activité des motoneurones en fonction de la phase du cycle moteur (Leblond & Gossard, 1997). Ainsi la stimulation du noyau vestibulaire latéral facilite les motoneurones fléchisseurs au cours de la phase de flexion et inhibe les motoneurones extenseurs au cours de la phase de flexion alors qu'il augmente l'activité des motoneurones extenseurs au cours de la phase d'extension (Gossard et al., 1996).

L'application d'une stimulation courte est celle qui se rapproche le plus d'une perturbation du système vestibulaire en condition physiologique. Dans cette condition, l'activité de la racine L2 ipsilatérale est inhibée, tandis que l'activité enregistrée dans la racine L2 contralatérale et L5 ipsilatérale est renforcée (Fig. 5). Un réarrangement du patron moteur est également observé chez le chat *in vivo*, où ce dernier va réaliser un pas correcteur du côté de l'électrode négative lors d'une stimulation galvanique (Hsu *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que comme observé *in vivo*, cette modification du patron moteur dépend de la phase du cycle dans laquelle elle a lieu. Chez l'homme, une stimulation galvanique entraîne un déplacement du pied plus important s'il a lieu au cours de la phase d'appui, plutôt qu'au cours de la phase de transfert (Bent *et al.*, 2004). Dans nos expériences, nous avons pu mettre en évidence que la stimulation du nerf VIII provoque une réinitialisation si elle a lieu au début ou entre 60 et 80% du cycle moteur de la racine L2 fléchisseur ipsilatérale, ce qui correspondrait aux transitions de la phase d'appui vers la phase de transfert puis de la phase de transfert vers la phase d'appui respectivement.

Lors de stimulations plus longues (30 à 40s), le patron moteur est perturbé avec l'apparition de bouffées prolongées au niveau des racines L2 contralatérale et L5 ipsilatérale (Fig. 6A). Ces perturbations durent toute la durée de la stimulation, or au cours d'une stimulation galvanique chez le chat ou chez l'homme, un pas suffit pour corriger l'équilibre. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'*in vivo*, la perturbation des systèmes vestibulaires ne dure que quelques secondes, avant d'entraîner des corrections posturales qui permettront à l'animal de retrouver l'équilibre. Cette réponse prolongée pourrait être un biais de la préparation *in vitro*. *In vivo*, des enregistrements effectués au niveau des

neurones vestibulaires ont montré que ces derniers reçoivent des retours somatosensoriels en provenance des membres, ce qui leur permet de connaître la position des membres (Welgampola & Colebatch, 2001; Grasso *et al.*, 2011). Or ces retours sensoriels ne sont plus présents dans notre préparation. Dans cette condition les noyaux vestibulaires n'ont plus le moyen d'appréhender l'état du système.

C) Importance des segments thoraciques dans la réponse vestibulaire.

Quand l'activité des réseaux thoraciques est bloquée sur préparation en condition de repos, une stimulation vestibulaire déclenche quand même une réponse au niveau lombaire (Fig. 2). Cela montre que les réseaux thoraciques ne sont pas nécessaires pour transmettre l'information vestibulaire jusqu'aux réseaux lombaires. Toutefois, la perfusion différentielle des segments thoracique et lombaire nous a permis de mettre en évidence l'importance des segments thoraciques au cours de la locomotion. Lorsque la locomotion est induite sur l'ensemble de la moelle épinière, un renforcement de l'activité au niveau thoracique est observé avec une augmentation de l'amplitude des bouffées motrices (Fig. 6A1). Lors de l'activation de la locomotion uniquement au niveau lombaire, nous avons pu voir que la stimulation du nerf VIII déclenche une réponse importante au niveau thoracique, similaire à celle enregistrée en condition contrôle (Fig. 6B). Dans ces conditions, la réorganisation du patron moteur en lombaire est observée uniquement dans les premiers cycles locomoteurs. Mais lors de la perfusion d'une solution de bas calcium-haut magnésium sur les segments thoraciques, la réponse à une stimulation du nerf vestibulaire ne déclenche pas de réponse en thoracique et aucune réorganisation du patron moteur lombaire n'est observée (Fig. 6C). Ces résultats peuvent être liés à un rôle particulier du tronc qui est un élément important dans le maintien de la posture au cours de la locomotion. Chez le rat, le développement du tonus musculaire des muscles du tronc mature jusqu'à l'âge de P15 (Geisler *et al.*, 1993; 1996). À cet âge l'activité du tronc devient en phase avec celle des membres et le rat est capable de réaliser des activités motrices complexes (Westerga & Gramsbergen, 1990; Clarac *et al.*, 1998). Lorsqu'une labyrinthectomie est réalisée sur des rats nouveau-nés âgés de 5 jours, un retard du développement moteur est observé. Chez ces animaux la perte d'informations vestibulaires entraîne un retard dans le développement de la stabilisation du tronc et dans la coordination des muscles du dos, ce qui provoque un retard du

développement moteur (Geisler *et al.*, 1997). L'importance du tronc dans la correction posturale induite par une perturbation du système vestibulaire est aussi retrouvée chez l'homme. Lors d'une stimulation galvanique, la réponse enregistrée en EMGs au niveau des bras, du tronc et des jambes est observée avec des délais respectifs de 41ms, 59ms, et 55-65ms (Britton *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 2002; Iles *et al.*, 2007). Toutefois, ces activités musculaires n'engendrent pas d'ajustements posturaux susceptibles de compenser le déséquilibre induit par la stimulation galvanique, les premières activités fonctionnelles au niveau des jambes n'intervenant qu'après un délai de 140 à 240ms (Iles *et al.*, 2007). Ce délai entre la réponse fonctionnelle du tronc et des jambes, pourrait être expliqué par le fait que les entrées vestibulaires soient fortement impliquées dans le maintien de l'orientation du tronc, mais que les patrons d'activités EMG des jambes permettant une rééquilibration (après 150ms) seraient la conséquence des modifications posturales du tronc (Iles *et al.*, 2007). Le tronc est donc une composante essentielle pour le contrôle postural au cours de la locomotion.

En conclusion, ces résultats nous ont permis une première caractérisation des connexions vestibulospinales sur les segments spinaux et plus particulièrement sur les segments thoraciques et lombaires. Nous avons pu mettre en évidence que l'activité se propage via des voies mono et polysynaptiques sur les réseaux lombaires, sans réaliser de relais aux niveaux cervicaux et thoraciques. De plus l'enregistrement des motoneurones lombaires nous a permis de montrer deux types de réponses possibles à la fois lors d'une stimulation ipsilatérale et contralatérale. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation des motoneurones fléchisseurs mais également extenseurs. En effet nos expériences en condition de locomotion fictive nous ont montré un effet vestibulospinale sur ces deux segments lombaires.

Discussion générale

Les travaux présentés dans cette thèse mettent pour la première fois en lumière les mécanismes neuronaux sous-tendant le couplage des réseaux locomoteurs et posturaux spinaux et supraspinaux (Fig. 1). Nos résultats obtenus sur une préparation de moelle épinière de rat nouveau-né isolée *in vitro* ont montré que l'activité locomotrice des réseaux lombaires contrôlant les membres postérieurs et des réseaux thoraciques et sacrés contrôlant la musculature axiale, est coordonnée selon une organisation temporelle précise. Les amines (5HT, DA et NA) sont capables d'agir sur divers paramètres moteurs (période, amplitude de l'activité...) pour moduler l'activité locomotrice, et chaque famine imprime une organisation spécifique des activités thoraco-lombo-sacrées.

Grâce à des enregistrements intracellulaires des motoneurons thoraciques, nous avons montré que les réseaux locomoteurs lombaires envoient une commande locomotrice au niveau d'un groupe de motoneurons thoraciques axiaux. Nous avons montré que cette commande locomotrice est excitatrice glutamatergique et inhibitrice glycinergique, et implique des voies mono et polysynaptiques.

Finalement, nous avons montré que les noyaux vestibulaires envoient une commande au niveau de l'ensemble des réseaux spinaux cervicaux, thoraciques et lombaires. Cette commande est capable de moduler l'activité de locomotion fictive déclenchée au niveau thoracique et lombaire.

A) Deux réseaux indépendants mais coordonnés.

Le tronc et les membres sont deux systèmes biomécaniques musculaires distincts qui peuvent fonctionner de manière indépendante. Par exemple, lorsqu'un sujet est assis, le tronc peut réaliser certaines tâches motrices (par exemple l'inclinaison du buste), alors que les membres restent inactifs. Cela sous-entend que ces muscles sont contrôlés par des réseaux neuronaux distincts.

Chez les quadrupèdes, cependant, l'influence des membres est extrêmement prégnante, et le tronc ne participe pas directement à la genèse du mouvement de propulsion, contrairement aux Vertébrés inférieurs comme la lamproie et la salamandre qui ont un mode de locomotion anguilliforme. Ainsi, chez la lamproie, les segments axiaux sont capables de générer une activité rythmique, et les mécanismes neuronaux générant cette activité rythmique sont bien connus. À ce jour, aucun mécanisme de ce genre n'a été

retrouvé chez des animaux quadrupèdes ou bipèdes. Toutefois, notre étude ainsi que des données précédentes obtenues chez le rat (Cazalets, 2005) ont montré que les réseaux axiaux thoraciques et sacrés sont capables de produire un rythme, indépendamment des CPGs des membres, lorsqu'ils sont physiquement ou pharmacologiquement déconnectés de ces derniers. L'activité produite est lente, et ne présente pas les caractéristiques d'un rythme locomoteur (période de 3 à 7 secondes, alternance bilatérale et fléchisseurs-extenseurs). On peut supposer que cette activité rythmique thoracique participe au maintien d'un certain tonus musculaire au niveau des muscles du tronc. Au cours de la locomotion, ces capacités rythmogènes du tronc pourraient faciliter les oscillations locomotrices des réseaux thoraciques entraînés par les réseaux locomoteurs lombaires.

La coordination de l'activité des réseaux axiaux et lombaires devient toutefois critique dans certaines circonstances, notamment au cours de la locomotion. La marche quadrupède a vu l'apparition des CPGs gouvernant la production et l'organisation de l'activité rythmique des membres. Il a été montré que les muscles du dos chez les mammifères sont rythmiquement actifs au cours de la locomotion (Thorstensson *et al.*, 1982; Zomlefer *et al.*, 1984b; Koehler *et al.*, 1984; Geisler *et al.*, 1996). Dans notre étude nous avons mis en évidence une population de motoneurons axiaux directement contrôlée par les réseaux moteurs lombaires. Ces motoneurons semblent être responsables de la courbure du tronc observé au cours de la locomotion chez le rat, et participeraient au couplage nécessaire entre l'activité locomotrice et l'activité posturale dynamique du tronc.

Une organisation temporelle précise de l'activité de ces deux régions est enregistrée sur une préparation de moelle épinière de rat nouveau-né. Plusieurs mécanismes semblent participer au contrôle de cette organisation. Nous avons vu que les relations de phases thoraco-lombo-sacrées dépendent du contexte neuromodulateur, chaque amine déclenchant un patron moteur spécifique. *In vivo*, ces amines proviennent des structures supérieures et sont relarguées dans la moelle épinière par les voies descendantes. Nous avons vu que lors de la perfusion de plusieurs amines en simultanée sur une préparation de moelle épinière isolée, l'organisation temporelle qui prédomine est celle déclenchée par l'application de 5HT. Ce résultat est peut-être dû à la très grande sensibilité des réseaux thoraciques à la 5HT, par rapport à la dopamine et la noradrénaline. De plus la 5HT déclenche une onde de propagation métachronale le long des segments lombo-thoraciques

- entrées excitatrices
- entrées inhibitrices
- voies vestibulospinales
- motoneurones entraînés par la locomotion
- motoneurones non-entraînés par la locomotion

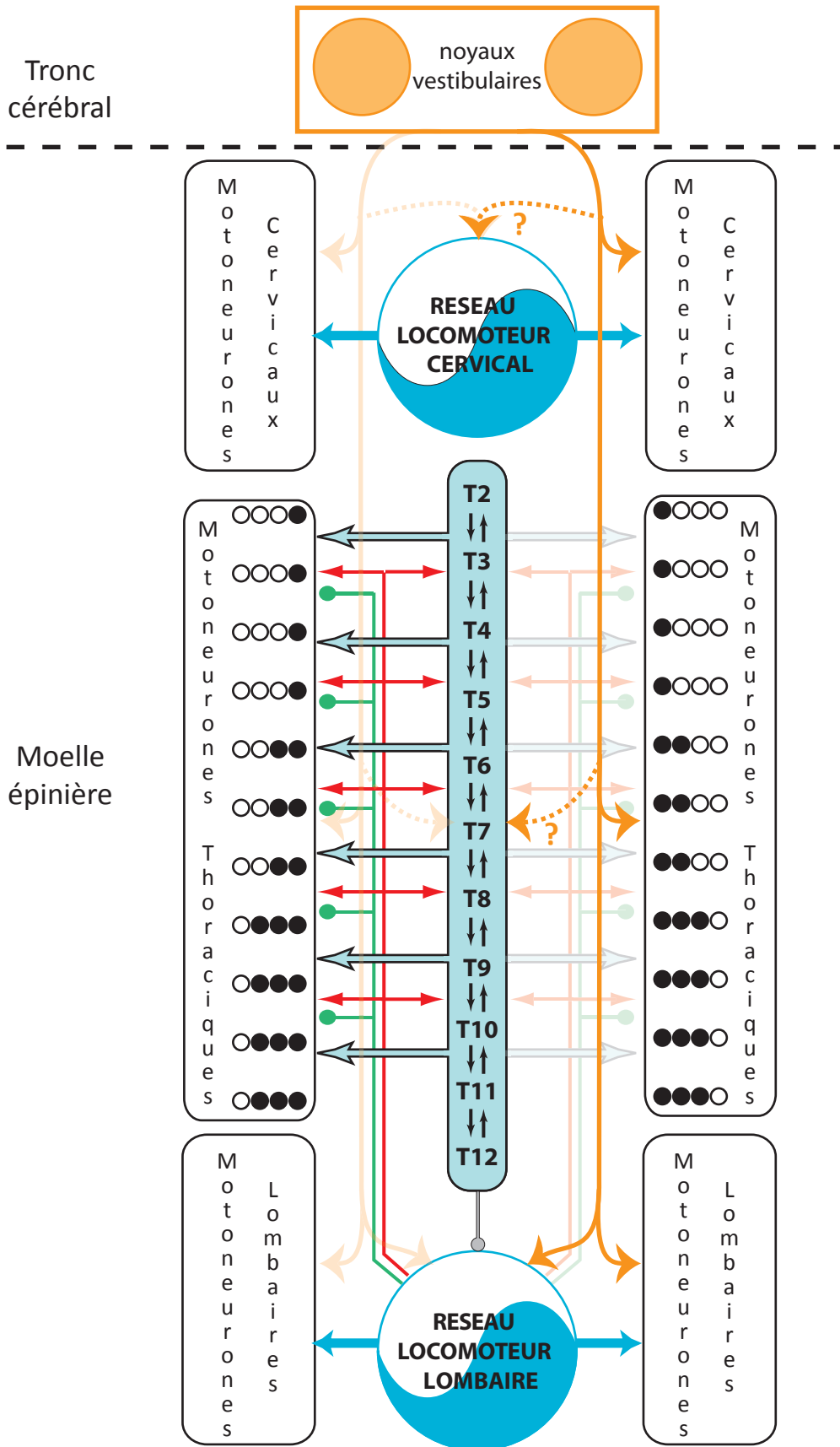


Figure 1 : Représentation schématique des voies de projections impliquées dans le couplage des réseaux thoraciques et lombaires, et des voies vestibulospinales.

et pourrait donc être responsable du mouvement de flexion enregistré dans les muscles du dos au cours de la marche. Il a été montré chez l'homme que l'onde de flexion du dos varie en fonction de l'allure de l'individu. Ainsi, lors d'un mouvement locomoteur à grande vitesse, le tronc devient rigide de manière à permettre un mouvement locomoteur optimal (de Seze *et al.*, 2008). Nous avons mis en évidence dans notre préparation que la perfusion de noradrénaline synchronise les activités motrices lombaires et thoraciques. Cela suggère que la noradrénaline pourrait être responsable de la rigidité du tronc au cours d'un mouvement à grande vitesse. Tous ces résultats soulignent la nécessité d'un contrôle précis de la coordination entre les réseaux thoraciques et lombaires pour favoriser l'ensemble des comportements locomoteurs.

Comme chez les Vertébrés inférieurs, la présence de longues fibres propriospinales impliquées dans la locomotion a été mise à jour dans les segments thoraciques chez le rat (Juvén & Morin, 2005; Cazalets, 2005). Mais nous avons également montré la présence de relais pré-motoneuronaux au niveau thoracique. Il semblerait que ces relais participent à l'organisation temporelle du patron d'activité locomoteur entre les segments lombaires et thoraciques. En effet, lors de leur mise au silence par une application d'une solution de bas calcium-haut magnésium, les relations de phases entre les activités motrices lombaires et thoraciques sont modifiées. Le rôle exact de cette double commande n'est pas encore bien établi, mais elle pourrait participer à augmenter la flexibilité de ces réseaux, en jouant par exemple sur le recrutement et l'excitabilité des neurones moteurs. De plus ces relais thoraciques pourraient participer à la propagation métachronale rostro-caudale de la commande locomotrice observée *in vivo* et *in vitro* (Falgairolle & Cazalets, 2007) chapitre 1 et 2 des résultats).

B) Mécanismes sous-tendant le couplage de diverses fonctions motrices.

Dans le but de produire un mouvement moteur optimal, le couplage de plusieurs fonctions motrices est nécessaire. Dans cette thèse nous avons montré l'importance d'une interaction entre la fonction locomotrice et posturale, et notamment entre les réseaux lombaires et thoraciques. Chez les espèces quadrupèdes, la locomotion est assurée par les réseaux locomoteurs cervicaux et lombaires, responsables de l'activation des membres antérieurs et postérieurs respectivement (Cazalets *et al.*, 1995; Kjaerulff & Kiehn, 1996; Ballion *et al.*, 2001). Dans l'optique de produire un comportement moteur efficace il est

donc indispensable que ces réseaux engagés dans la même fonction, interagissent en permanence afin de produire des activités motrices hautement coordonnées. Il a été montré une asymétrie dans les mécanismes de coordination entre les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires. En effet, lorsque les réseaux locomoteurs lombosacrés sont activés pharmacologiquement, ces derniers peuvent entraîner à leur propre rythme les CPGs cervicaux (Juvín & Morin, 2005). À l'inverse, l'activation pharmacologique des réseaux locomoteurs cervicaux n'induit pas l'activation des réseaux locomoteurs lombaires. Ces données révèlent l'existence de projections caudo-rostrales excitatrices directes entre les CPGs locomoteurs lombaires et cervicaux. De par leur localisation entre les réseaux lombaires et les centres supraspinaux, les réseaux thoraciques propagent des informations ascendantes et descendantes et pourraient jouer un rôle important dans la transmission de cette commande locomotrice lombaire sur les CPGs cervicaux. En effet, leur activation augmente la force de coordination entre l'activité générée par les réseaux cervicaux et lombaires (Juvín & Morin, 2005). À l'inverse, le blocage de la transmission synaptique des réseaux thoraciques entraîne une diminution de cette coordination (Juvín *et al.*, 2012). Ainsi, ces projections ascendantes, impliquant des relais thoraciques, participe à la création d'un gradient d'excitabilité caudo-rostral, permettant la coordination des membres antérieurs et postérieurs. Il a été proposé que ces relais thoraciques impliqués dans les coordinations intrappendiculaires pourraient participer au contrôle des différentes formes de couplages observés entre les membres antérieurs et postérieurs durant diverses allures locomotrices (marche, bond) (Juvín & Morin, 2005; Juvín *et al.*, 2012).

La coordination entre les fonctions motrices et respiratoires est également extrêmement importante. La respiration est une fonction motrice spontanée, générée chez les Vertébrés supérieurs par des CPGs localisés au niveau bulbo-pontique : le complexe pre-Bötzinger (preBöC) et le groupe respiratoire parafacial (pFRG). C'est une fonction soumise à des ajustements permanents. Par exemple lors d'un exercice physique intense, il est indispensable que l'activité ventilatoire soit modulée afin de répondre à l'augmentation des besoins en O₂ de l'organisme. Ainsi lors d'un épisode de locomotion, une augmentation de la fréquence respiratoire couplée à l'activité locomotrice est observée à la fois *in vivo* (Bramble & Carrier, 1983) et *in vitro* (Le Gal *et al.*, 2014). Cette coordination locomotion-respiration reposerait en partie sur la présence de projections ascendantes directes issues des réseaux

locomoteurs spinaux sur les centres respiratoires du bulbe rachidien (Le Gal *et al.*, 2014). Ces entrées en provenance des centres locomoteurs lombaires augmentent l'excitabilité de centres respiratoires bulbaires et ainsi induisent une augmentation de la fréquence respiratoire.

La présence de longues voies de projections ascendantes en provenance des réseaux moteurs a également été mise en évidence dans les mécanismes de stabilisation du regard. Si le tronc est activé rythmiquement au cours de la locomotion, les mouvements de la tête sont également coordonnés à l'activité locomotrice. Ces mouvements provoquent des déplacements de l'image sur la rétine, ce qui cause une dégradation du processus d'intégration des informations visuelles. Or il est nécessaire de percevoir correctement son environnement au cours de la marche. Afin de stabiliser le regard et de maintenir l'acuité visuelle lors de la locomotion, la déviation de l'image sur la rétine est minimisée par une réaction dynamique de l'œil et / ou des corrections des mouvements de la tête qui chez les Vertébrés, sont classiquement attribués à l'action de réflexes visio-vestibulaires et proprioceptifs (Angelaki & Hess, 2005). Des études menées chez le poisson zèbre et le Xénope ont montré qu'outre ces systèmes sensoriels, la stabilisation du regard impliquerait un système de contrôle basé sur des copies d'efférences des informations motrices spinales (Stehouwer, 1987; Combes *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2012). Chez la larve de Xénope, la nage est produite par des oscillations du corps se propageant de la tête vers la queue, provoquant des mouvements de la tête dans le plan horizontal. Ces mouvements sont accompagnés par des rotations des yeux dans le sens opposé aux mouvements du corps (Combes *et al.*, 2012), contrôlés par une paire de muscles extraoculaires latéraux et médians fonctionnant en synergie. De manière intéressante ces mouvements des yeux persistent après immobilisation de la tête et suppression des organes vestibulaires, lors de mouvements locomoteurs de la queue. Sur une préparation réduite de Xénope où la moelle épinière est isolée et où les yeux sont conservés, des épisodes de nage fictive déclenchent des rotations des yeux. L'activité musculaire enregistrée au niveau des muscles extraoculaires révèle des bouffées d'activité en opposition de phases avec l'activité enregistrée au niveau d'une racine ventrale spinale ipsilatérale (Fig. 2) (Combes *et al.*, 2012). Ces résultats sont retrouvés chez l'adulte lors d'épisodes de nage appendiculaires où l'activité des nerfs extraoculaires est synchrone avec l'activité enregistrée au niveau du nerf

innervant les muscles extenseurs des membres postérieurs (Uckermann *et al.*, 2013). Ces données indiquent que les mouvements correcteurs des yeux au cours de la locomotion ne dépendent pas des retours somatosensoriels, ni des noyaux vestibulaires, mais sont contrôlés par les CPGs locomoteurs spinaux.

Malgré l'apparente facilité du mouvement locomoteur, basé sur l'alternance des membres, la locomotion est en fait au centre de couplages complexes entre différents systèmes moteurs et sensoriels. Étonnamment, ces couplages fonctionnels (locomotion-posture, locomotion-respiration, stabilisation du regard) reposent sur des mécanismes similaires. L'ensemble de ces données révèle le rôle prépondérant des voies de projections ascendantes, directes ou indirectes, en provenance des réseaux locomoteurs lombaires dans le couplage des différentes fonctions motrices. Il semble que les réseaux lombaires jouent un rôle de chef d'orchestre dans la coordination des systèmes moteurs en envoyant des copies d'efférences aux différents réseaux moteurs. Ces copies d'efférences issues des CPGs sont largement présentes chez les Vertébrés, faisant partie par exemple de la boucle spino-bulbo-spinale chez la lamproie (Buchanan & Einum, 2008), ou encore des voies spino-rubrales (Vinay *et al.*, 1993) et des voies spino-cérébelleuses chez le chat (Fedirchuk *et al.*, 2013). Cette connectivité contribuerait ainsi à favoriser une coordination rapide et efficace entre deux systèmes moteurs anatomiquement et fonctionnellement distincts.

C) Conséquences physiopathologiques

Un intérêt particulier de notre modèle d'étude est le fait que les mécanismes neuronaux de base chez les bipèdes et les quadrupèdes sont partagés, y compris les circuits spinaux des réseaux locomoteurs et axiaux, et les voies propriospinales qui coordonnent ces réseaux (Wannier *et al.*, 2001; Dietz & Michel, 2002).

Or comprendre les mécanismes impliqués dans la coordination entre les membres et les réseaux axiaux revêt un aspect crucial dans un contexte de réhabilitation fonctionnelle après une lésion médullaire. En effet, un des défis les plus importants dans la récupération d'un contrôle de la fonction locomotrice, est de recouvrer un équilibre postural dynamique, compatible avec l'exécution de mouvements locomoteurs. Des données cinématiques et électromyographiques récentes suggèrent que des patients présentant une lésion médullaire, totale ou partielle, peuvent en utilisant de manière intensive leur bras et/ou leur

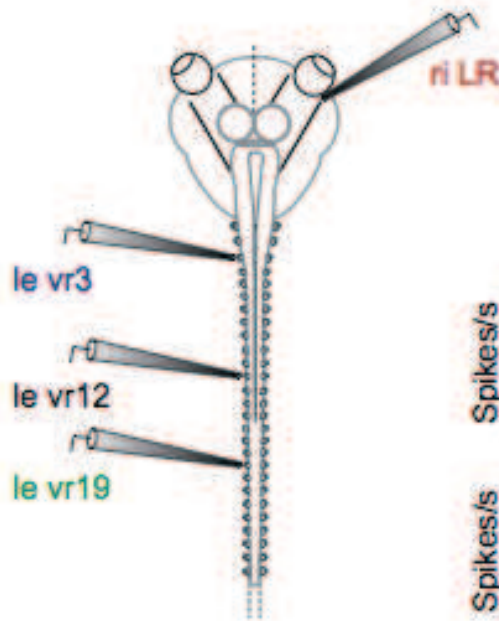
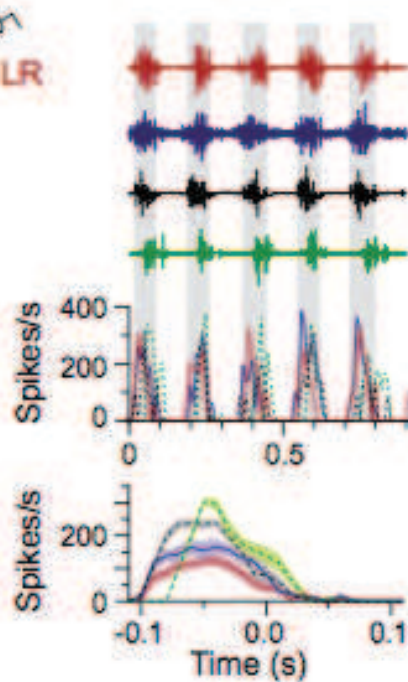
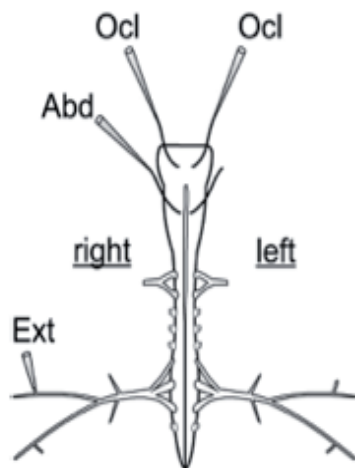
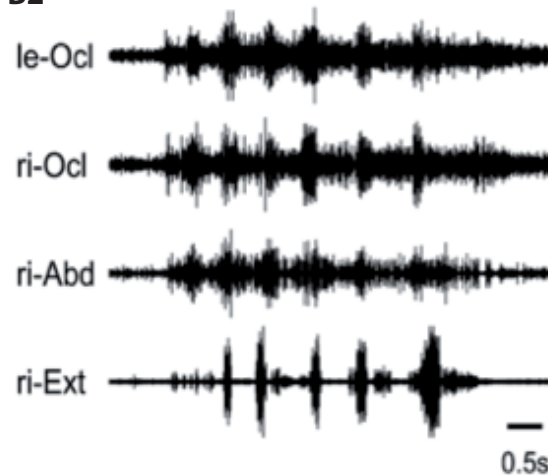
A1**A2****B1****B2**

Figure 2 : Contrôle de l'activité des nerfs moteurs extraoculaires par la moelle épinière, chez le Xénope. (A1) Préparation de moelle épinière-tronc cérébral in vitro de larve de Xénope illustrant le dispositif expérimental. (A2) Les bouffées d'activités rythmiques sont coordonnées entre la racine ventrale spinale 12 (noir) et les nerfs moteurs extraoculaires gauche (bleu) et droit (rouge). Les panneaux inférieurs montrent la décharge lors des cinq cycles présentés dans le panneau supérieur, et la décharge moyenne (\pm SEM, zone ombrée sur chaque trace) pour un cycle locomoteur moyen, calculé à partir de 25 cycles consécutifs. (modifié d'après Lambert *et al.*, 2012) (B1) Préparation de moelle épinière-tronc cérébral in vitro de Xénope juvénile illustrant le dispositif expérimental. (B2) L'activité enregistrée au niveau des nerfs extraoculaires (ri-Ocl, le-Ocl, ri-Abd) est coordonnée avec l'activité motrice enregistrée au niveau du nerf extenseur droit lors d'épisodes de nage fictive spontanés (ri-Ext). (modifié d'après von Uckermann *et al.*, 2013)

rachis supra lésionnel, activer la moelle sous lésionnelle et ainsi récupérer une activité locomotrice des membres inférieurs (Grasso *et al.*, 2004). Cette étude suggère que la musculature axiale peut contribuer à une amélioration de la fonction locomotrice via un couplage mécanique et musculaire le long du tronc pour recruter, dans la partie caudale sous lésionnelle, les motoneurones thoraciques bas et les motoneurones lombaires via des réflexes d'étirement.

Chez un humain présentant une lésion de la moelle épinière, la capacité de ré-exprimer un mouvement locomoteur augmente avec le niveau de la lésion spinale (Dietz *et al.*, 1999). Ces résultats sont également compatibles avec les découvertes récentes obtenues chez le rat nouveau-né, où le degré de couplage entre les réseaux des membres locomoteurs antérieurs et postérieurs est renforcé quand l'intégrité fonctionnelle des circuits thoraco-lombaire est augmentée dans la direction rostrale (Juvén & Morin, 2005). Dans ce contexte il est donc particulièrement pertinent d'examiner la possibilité que les réseaux neuronaux axiaux puissent être toujours actifs et puissent interagir avec les réseaux lombaires contrôlant les jambes. Ainsi, la capacité rythmogène des réseaux spinaux du tronc pourrait donc être une base pour de futures stratégies de rééducation thérapeutiques.

Les lésions spinales ne sont pas les seuls troubles physiopathologiques entraînant des problèmes locomoteurs et posturaux. Une posture anormale est une caractéristique récurrente dans la maladie de Parkinson, avec plus de 30% des patients présentant une déformation de leurs membres, de la nuque, et du tronc. Certains patients atteints de la maladie de Parkinson (2% -12,3%) présente des anomalies graves de l'alignement du tronc, avec par exemple une camptocormie (une courbure accentuée du tronc vers l'avant), un syndrome de Pise (flexion latérale du tronc), et un antecollis (flexion soutenue de la nuque). Ces troubles posturaux induisent à la fois une déficience fonctionnelle avec une restriction des mouvements du tronc, des maux de dos, une dépréciation de l'équilibre, et une difficulté pour marcher, causant un risque accru de chutes. Peu de traitements sont disponibles pour ces symptômes, en effet certains troubles comme par exemple la camptocormie ne sont pas sensibles à la L-DOPA, traitement phare de la maladie de Parkinson (Djaldetti *et al.*, 1999; Azher & Jankovic, 2005). Des injections de toxine botulique dans certains muscles du tronc (rectus abdominis, iliopsoas et des muscles paraspinaux) sont parfois utilisés avec succès chez certains patients ((Azher & Jankovic, 2005), mais cette méthode reste encore très peu

utilisée. Les stimulations sous-thalamiques profondes ont donné des résultats très variables dans le traitement de la camptocormie, avec une nette amélioration de la posture observée chez certains patients (Yamada *et al.*, 2006; Hellmann *et al.*, 2006; Sako *et al.*, 2009), ou aucune amélioration observée chez d'autres (Capelle *et al.*, 2011). Des chirurgies spinales ont été utilisées pour corriger les déformations posturales, en particulier après l'échec des traitements décrits précédemment, chez des patients Parkinsoniens. Cette approche reste compliquée mais améliore la condition de certains sujets (Peek *et al.*, 2009; Koller *et al.*, 2010; Wadia *et al.*, 2011).

Les flexions du tronc sont une observation clinique très fréquente chez les patients atteints de la maladie de Parkinson mais la physiopathologie de l'instabilité posturale dans la maladie de Parkinson reste mal comprise. Des études menées sur des modèles de rats hémiparkinsonien (causé par une injection unilatérale de 6-OHDA dans l'aire tegmentale ventrale) ont montré qu'une dégénérescence unilatérale de la voie nigrostriée déclenche des rotations spontanées de l'animal du côté de la lésion (Ungerstedt & Arbuthnott, 1970). Ces observations comportementales sont consistantes avec les découvertes cliniques montrant que l'inclinaison du tronc penche vers le côté du corps le plus affecté chez un patient Parkinsonien (Duvoisin & Marsden, 1975).

La rigidité musculaire est définie comme une augmentation persistante du tonus musculaire ne dépendant pas de la vitesse. Des travaux récents ont montré que les patients atteints de la maladie de Parkinson (et ne présentant pas spécifiquement une atteinte de la posture axiale) ont un tonus de la musculature axiale supérieur aux sujets contrôles (Wright *et al.*, 2007). Ces patients Parkinsoniens présentent une diminution des mouvements le long de l'axe spinale (Schenkman *et al.*, 2001; Nikfekar *et al.*, 2002), et de plus ils répondent anormalement à des perturbations induites au cours de la phase de transfert du cycle locomoteur, montrant une flexibilité intersegmentaire réduite (Carpenter *et al.*, 2004; Horak *et al.*, 2005). Il a été suggéré que le mécanisme de stabilisation réactive du tronc, observée lorsque la posture est perturbée, est activé en continu chez les patients Parkinsonien, entraînant un recrutement et une activation musculaire anormale de la musculature axiale (Broussolle *et al.*, 2007).

Outre des aspects moteurs, le maintien de la posture dépend en partie de la capacité du système de contrôle postural à intégrer les informations sensorielles visuelles,

proprioceptives et vestibulaires. Des études ont montré qu'une déficience de la fonction vestibulaire peut provoquer des modifications posturales observées chez les patients parkinsoniens, présentant une flexion latérale du tronc (Vitale *et al.*, 2011). Un hypofonctionnement vestibulaire ipsilatérale au côté de la flexion a été identifié chez ces patients. Il a été montré que cet hypofonctionnement peut apparaître dès les stades précoces de la maladie de Parkinson, avant même l'apparition d'une flexion latérale (Vitale *et al.*, 2011). Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus chez le Xénope, où il a été montré qu'une labyrinthectomie unilatérale provoque une déformation scoliotique du côté lésé (Lambert *et al.*, 2013). Récemment une méthode de détection basée sur une analyse des réponses du système vestibulaire enregistré en électrovestibulographie suite à une inclinaison de l'ensemble du corps, a été proposée pour diagnostiquer la maladie de Parkinson (Dastgheib *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données montre le rôle central du tronc dans le maintien de l'équilibre, et l'intérêt fonctionnel et physiopathologique de comprendre les mécanismes neuronaux moteurs et sensoriels participant au contrôle de la musculature axiale.

E) Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral ont permis d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la coordination entre les fonctions locomotrice et posturale dynamiques, mais plusieurs points restent à aborder, notamment dans l'étude de l'influence des noyaux vestibulaires sur réseaux locomoteurs spinaux. Ainsi plusieurs questions sont soulevées par ces travaux :

Nous avons montré dans le chapitre 3 des résultats que les afférences vestibulaires projettent sur l'ensemble des segments spinaux cervicaux, thoraciques et lombaires. Nous avons mis en évidence une commande synaptique en provenance des noyaux vestibulaires sur les motoneurones fléchisseurs lombaires. Or nous savons que les muscles extenseurs antigravitaires jouent un rôle très important dans le maintien de l'équilibre. Dans ses travaux, Orlovsky a montré que la stimulation du nerf vestibulaire latéral chez le chat au repos déclenche une réponse dans les motoneurones extenseurs. Ce résultat est retrouvé lorsque le chat réalise des épisodes locomoteurs (Orlovsky, 1972). Il serait donc intéressant de poursuivre nos travaux en enregistrant les motoneurones extenseurs lombaires dans une

préparation de moelle épinière de rat. De plus nous avons vu que les réseaux thoraciques répondent de manière importante à une stimulation des noyaux vestibulaires. De la même manière nous pourrions enregistrer les motoneurones thoraciques ce qui nous révélerait la commande synaptique impliquée dans le contrôle du tronc.

Chez le Xénope, la stabilisation du regard implique des copies d'efférences en provenance des CPGs spinaux. La locomotion étant une fonction extrêmement bien conservée d'un point de vue évolutif, nous pouvons supposer qu'un tel mécanisme puisse être retrouvé chez le rat. Pour répondre à cette question nous proposons de développer une préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolée où les nerfs oculomoteurs seraient conservés. Il conviendra de léser les noyaux vestibulaires afin de supprimer une éventuelle influence de ces noyaux. Une activation pharmacologique de la moelle épinière permettra de déclencher des épisodes de locomotion fictive, et dans cette condition nous pourrions enregistrer les sorties motrices au niveau des nerfs oculomoteurs commun et/ ou externe (III et VI respectivement). Cela nous permettra de déterminer si leur activité est coordonnée avec l'activité motrice enregistrée au niveau des muscles locomoteurs fléchisseurs et extenseurs des membres postérieurs. En se basant sur ce qui a déjà été observé chez le Xénope juvénile (post-métamorphose) (Uckermann *et al.*, 2013), les résultats de cette étude pourraient mettre en évidence une synchronisation entre l'activité oculomotrice et l'activité des muscles extenseurs des membres postérieurs au cours d'épisodes de locomotion fictive.

Un inconvénient de notre modèle d'étude est la non-sélectivité de la stimulation du nerf VIII qui ne nous permet pas de discriminer l'effet des canaux semicirculaires, et des organes otolithiques. Nous proposons donc de développer un modèle de préparation semi-intact où la moelle épinière et le tronc cérébral seraient isolés de la même manière que précédemment, mais où les organes vestibulaires seraient conservés. Grâce à une table oscillante nous pourrions induire des rotations de la préparation qui activerait spécifiquement les canaux semicirculaires et ainsi enregistrer la réponse spécifique déclenchée au niveau spinal.

Bibliographie

- Abourachid A (2003). A new way of analysing symmetrical and asymmetrical gaits in quadrupeds. *C R Biol* **326**, 625–630.
- Al-Mosawie A, Wilson JM & Brownstone RM (2007). Heterogeneity of V2-derived interneurons in the adult mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience* **26**, 3003–3015.
- Ali AS, Rowen KA & Iles JF (2002). Vestibular actions on back and lower limb muscles during postural tasks in man. *J Physiol* **546**, 615–624.
- Allum JH & Pfaltz CR (1985). Visual and vestibular contributions to pitch sway stabilization in the ankle muscles of normals and patients with bilateral peripheral vestibular deficits. *Exp Brain Res* **58**, 82–94.
- Allum JH, Honegger F & Acuña H (1995). Differential control of leg and trunk muscle activity by vestibulo-spinal and proprioceptive signals during human balance corrections. *Acta Otolaryngol* **115**, 124–129.
- Allum JH, Honegger F & Pfaltz CR (1989). The role of stretch and vestibulo-spinal reflexes in the generation of human equilibrating reactions. *Prog Brain Res* **80**, 399–409–discussion395–7.
- Alvarez FJ, Jonas PC, Sapir T, Hartley R, Berrocal MC, Geiman EJ, Todd AJ & Goulding M (2005). Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *J Comp Neurol* **493**, 177–192.
- Alvarez FJ, Pearson JC, Harrington D, Dewey D, Torbeck L & Fyffe RE (1998). Distribution of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive boutons on alpha-motoneurons in the lumbar spinal cord of adult cats. *J Comp Neurol* **393**, 69–83.
- Anderson TM, Abbinanti MD, Peck JH, Gilmour M, Brownstone RM & Masino MA (2012). Low-threshold calcium currents contribute to locomotor-like activity in neonatal mice. *Journal of Neurophysiology* **107**, 103–113.
- Angelaki DE & Hess BJM (2005). Self-motion-induced eye movements: effects on visual acuity and navigation. *Nat Rev Neurosci* **6**, 966–976.
- Anon (2006). Long descending motor tract axons and their control of neck and axial muscles. In *Progress in Brain Research*, pp. 527–563. Elsevier. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612305510173>.
- Antri M, Barthe JY, Mouffle C & Orsal D (2005). Long-lasting recovery of locomotor function in chronic spinal rat following chronic combined pharmacological stimulation of serotonergic receptors with 8-OHDPAT and quipazine. *Neuroscience Letters* **384**, 162–167.
- Antri M, Mellen N & Cazalets J-R (2011). Functional organization of locomotor interneurons in the ventral lumbar spinal cord of the newborn rat. ed. Antri M, Mellen N & Cazalets J-R. **6**, e20529.
- Armstrong DM (1986). Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat. *Prog Neurobiol* **26**, 273–361.
- Arshavskii II, Berkinblit MB, Gelfand IM, Orlovskii GN & Fukson OI (1972). [Activity of ventral spino-cerebellar tract neurons during locomotion of cats with deafferented hindlimbs]. *Biofizika* **17**, 1112–1118.
- Arshavsky Y, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM & Orlovsky GN (1972). Recording of neurones of the dorsal spinocerebellar tract during evoked locomotion. *Brain Res* **43**, 272–275.
- Asanome M, Matsuyama K & Mori S (1998). Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white

- matter in the acute decerebrate cat. *Neuroscience Research* **30**, 257–269.
- Auclair F, Marchand R & Glover JC (1999). Regional patterning of reticulospinal and vestibulospinal neurons in the hindbrain of mouse and rat embryos. *J Comp Neurol* **411**, 288–300.
- Azher SN & Jankovic J (2005). Camptocormia: pathogenesis, classification, and response to therapy. *Neurology* **65**, 355–359.
- Ballion B, Branchereau P, Chapron J & Viala D (2002). Ontogeny of descending serotonergic innervation and evidence for intraspinal 5-HT neurons in the mouse spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res* **137**, 81–88.
- Ballion B, Morin D & Viala D (2001). Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* **14**, 1727–1738.
- Banks RW (1994). The motor innervation of mammalian muscle spindles. *Prog Neurobiol* **43**, 323–362.
- Barbeau H & Rossignol S (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* **412**, 84–95.
- Barbeau H & Rossignol S (1990). The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat. *Brain Res* **514**, 55–67.
- Barbeau H & Rossignol S (1991). Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res* **546**, 250–260.
- Barberini CL & Macpherson JM (1998). Effect of head position on postural orientation and equilibrium. *Exp Brain Res* **122**, 175–184.
- Bard P & Macht MB (1958). The behaviour of chronically decerebrate cats. ... -*Neurological Basis of Behaviour*.
- Barmack NH (2003). Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res Bull* **60**, 511–541.
- Barriere G, Frigon A, Leblond H, Provencher J & Rossignol S (2010). Dual Spinal Lesion Paradigm in the Cat: Evolution of the Kinematic Locomotor Pattern. *Journal of Neurophysiology* **104**, 1119–1133.
- Barrière G, Mellen N & Cazalets J-R (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* **19**, 1325–1335.
- Barrière G, Tartas M, Cazalets J-R & Bertrand SS (2008). Interplay between neuromodulator-induced switching of short-term plasticity at sensorimotor synapses in the neonatal rat spinal cord. *The Journal of Physiology* **586**, 1903–1920.
- Beato M & Nistri A (1998). Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT₁ receptor class. *Proc Biol Sci* **265**, 2073–2080.
- Beato M, Bracci E & Nistri A (1997). Contribution of NMDA and non-NMDA glutamate receptors to locomotor pattern generation in the neonatal rat spinal cord. *Proc Biol Sci* **264**, 877–884.
- Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN & Deliagina TG (2005). Activity of Pyramidal Tract Neurons in the Cat During Postural Corrections. *Journal of Neurophysiology* **93**, 1831–1844.
- Beloozerova IN, Sirota MG, Swadlow HA, Orlovsky GN, Popova LB & Deliagina TG (2003a). Activity of different classes of neurons of the motor cortex during postural corrections. *J Neurosci* **23**, 7844–7853.
- Beloozerova IN, Zelenin PV, Popova LB, Orlovsky GN, Grillner S & Deliagina TG (2003b).

- Postural Control in the Rabbit Maintaining Balance on the Tilting Platform. *Journal of Neurophysiology* **90**, 3783–3793.
- Bennett DJ, Hultborn H, Fedirchuk B & Gorassini M (1998). Synaptic activation of plateaus in hindlimb motoneurons of decerebrate cats. *Journal of Neurophysiology* **80**, 2023–2037.
- Bennett DJ, Li Y & Siu M (2001). Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *Journal of Neurophysiology* **86**, 1955–1971.
- Bent LR, Inglis JT & McFadyen BJ (2004). When is vestibular information important during walking? *Journal of Neurophysiology* **92**, 1269–1275.
- Bent LR, McFadyen BJ & Inglis JT (2002). Visual-vestibular interactions in postural control during the execution of a dynamic task. *Exp Brain Res* **146**, 490–500.
- Bent LR, McFadyen BJ, Merkle VF, Kennedy PM & Inglis JT (2000). Magnitude effects of galvanic vestibular stimulation on the trajectory of human gait. *Neuroscience Letters* **279**, 157–160.
- Beraneck M, Hachemaoui M, Idoux E, Ris L, Uno A, Godaux E, Vidal PP, Moore LE & Vibert N (2003). Long-Term Plasticity of Ipsilesional Medial Vestibular Nucleus Neurons After Unilateral Labyrinthectomy. *Journal of Neurophysiology* **90**, 184–203.
- Beraneck M, Idoux E, Uno A, Vidal P-P, Moore LE & Vibert N (2004). Unilateral Labyrinthectomy Modifies the Membrane Properties of Contralesional Vestibular Neurons. *Journal of Neurophysiology* **92**, 1668–1684.
- Beraneck M, Pfanzelt S, Vassias I, Rohregger M, Vibert N, Vidal PP, Moore LE & Straka H (2007). Differential Intrinsic Response Dynamics Determine Synaptic Signal Processing in Frog Vestibular Neurons. *J Neurosci* **27**, 4283–4296.
- Berens P (2009). CircStat: A MATLAB Toolbox for Circular Statistics. 1–21.
- Berger AJ & Takahashi T (1990). Serotonin enhances a low-voltage-activated calcium current in rat spinal motoneurons. *Journal of Neuroscience* **10**, 1922–1928.
- Berry MS & Pentreath VW (1976). Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res* **105**, 1–20.
- Bertrand S & Cazalets J-R (1998a). GABAA and GABAB modulations of synaptic transmission between L1-L2 locomotor network and the motoneurons in the newborn rat isolated spinal cord. *Annals of the New York Academy of Sciences* **860**, 470–471.
- Bertrand S & Cazalets J-R (1999). Presynaptic GABAergic control of the locomotor drive in the isolated spinal cord of neonatal rats. *Eur J Neurosci* **11**, 583–592.
- Bertrand S & Cazalets J-R (2002). The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* **16**, 1741–1750.
- Bertrand SS & Cazalets JRJ (1998b). Postinhibitory rebound during locomotor-like activity in neonatal rat motoneurons in vitro. *Journal of Neurophysiology* **79**, 342–351.
- Beyeler A, Metais C, Combes D, Simmers J & Le Ray D (2008). Metamorphosis-Induced Changes in the Coupling of Spinal Thoraco-Lumbar Motor Outputs During Swimming in *Xenopus laevis*. *Journal of Neurophysiology* **100**, 1372–1383.
- Bjerkefors A, Carpenter MG, Cresswell AG & Thorstensson A (2009). Trunk muscle activation in a person with clinically complete thoracic spinal cord injury. *J Rehabil Med* **41**, 390–392.
- Bjursten LM, Norrsell K & Norrsell U (1976). Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy. *Exp Brain Res* **25**, 115–130.
- Bolton DAE & Misiaszek JE (2009). Contribution of Hindpaw Cutaneous Inputs to the Control of Lateral Stability During Walking in the Cat. *Journal of Neurophysiology* **102**, 1711–

1724.

- Bonnot A, Morin D & Viala D (1998). Organization of rhythmic motor patterns in the lumbosacral spinal cord of neonate mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences* **860**, 432–435.
- Bonnot A, Whelan PJ, Mentis GZ & O'Donovan MJ (2002). Locomotor-like activity generated by the neonatal mouse spinal cord. *Brain Res Brain Res Rev* **40**, 141–151.
- Borowska J, Jones CT, Zhang H, Blacklaws J, Goulding M & Zhang Y (2013). Functional Subpopulations of V3 Interneurons in the Mature Mouse Spinal Cord. *J Neurosci* **33**, 18553–18565.
- Bosco G & Poppele RE (2003). Modulation of Dorsal Spinocerebellar Responses to Limb Movement. II. Effect of Sensory Input. *Journal of Neurophysiology* **90**, 3372–3383.
- Bouhadfane M, Tazerart S, Moqrish A, Vinay L & Brocard F (2013). Sodium-Mediated Plateau Potentials in Lumbar Motoneurons of Neonatal Rats. *J Neurosci* **33**, 15626–15641.
- Bouyer LJG & Rossignol S (2003). Contribution of Cutaneous Inputs From the Hindpaw to the Control of Locomotion. II. Spinal Cats. *Journal of Neurophysiology* **90**, 3640–3653.
- Boyle R (2001). Vestibulospinal control of reflex and voluntary head movement. *Annals of the New York Academy of Sciences* **942**, 364–380.
- Bracci EE, Ballerini LL & Nistri AA (1996). Spontaneous rhythmic bursts induced by pharmacological block of inhibition in lumbar motoneurons of the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **75**, 640–647.
- Bramble DM & Carrier DR (1983). Running and breathing in mammals. *Science* **219**, 251–256.
- Britton TC, Day BL, Brown P, Rothwell JC, Thompson PD & Marsden CD (1993). Postural electromyographic responses in the arm and leg following galvanic vestibular stimulation in man. *Exp Brain Res* **94**, 143–151.
- Brocard F, Vinay L & Clarac F (1999). Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* **117**, 81–89.
- Brockett EG, Seenan PG, Bannatyne BA & Maxwell DJ (2013). Ascending and descending propriospinal pathways between lumbar and cervical segments in the rat: evidence for a substantial ascending excitatory pathway. *Neuroscience* **240**, 83–97.
- Brodin L, Grillner S, Dubuc R, Ohta Y, Kasicki S & Hökfelt T (1988). Reticulospinal neurons in lamprey: transmitters, synaptic interactions and their role during locomotion. *Arch Ital Biol* **126**, 317–345.
- Broussolle E, Krack P, Thobois S, Xie-Brustolin J, Pollak P & Goetz CG (2007). *Contribution of Jules Froment to the study of parkinsonian rigidity*.
- Brownstone RM (2006). Beginning at the end: Repetitive firing properties in the final common pathway. *Prog Neurobiol* **78**, 156–172.
- Buchanan JT & Einum JF (2008). The spinobulbar system in lamprey. *Brain Research Reviews* **57**, 37–45.
- Butt SJB & Kiehn O (2003). Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals. *Neuron* **38**, 953–963.
- Cangiano L (2003). Fast and Slow Locomotor Burst Generation in the Hemispinal Cord of the Lamprey. *Journal of Neurophysiology* **89**, 2931–2942.
- Capelle H-H, Schrader C, Blahak C, Fogel W, Kinfe TM, Baezner H & Krauss JK (2011). Deep brain stimulation for camptocormia in dystonia and Parkinson's disease. *J Neurol* **258**, 96–103.
- Carlin KP (2005). Cholinergic and Serotonergic Excitation of Ascending Commissural Neurons in the Thoraco-Lumbar Spinal Cord of the Neonatal Mouse. *Journal of Neurophysiology*

- 95**, 1278–1284.
- Carlin KP, Jones KE, Jiang Z, Jordan LM & Brownstone RM (2000). Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* **12**, 1635–1646.
- Carlson H & Thorstensson A (1988). Lumbar back muscle activity during locomotion: effects of voluntary modifications of normal trunk movements. *Acta physiologica ...*
- Carlson H, Halbertsma J & Zomlefer M (1979). Control of the trunk during walking in the cat. *Acta Physiol Scand* **105**, 251–253.
- Carp JS & Anderson RJ (1982). Dopamine receptor-mediated depression of spinal monosynaptic transmission. *Brain Res* **242**, 247–254.
- Carpenter MG, Allum JHJ, Honegger F, Adkin AL & Bloem BR (2004). Postural abnormalities to multidirectional stance perturbations in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **75**, 1245–1254.
- Carr PA, Pearson JC & Fyffe RE (1999). Distribution of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive boutons on immunohistochemically-identified Renshaw cells in cat and rat lumbar spinal cord. *Brain Res* **823**, 198–201.
- Cattaert D & Clarac F (1983). Influence of walking on swimmeret beating in the lobster *Homarus gammarus*. *J Neurobiol* **14**, 421–439.
- Cazalets J-R (2005). Metachronal propagation of motoneurone burst activation in isolated spinal cord of newborn rat. *The Journal of Physiology* **568**, 583–597.
- Cazalets J-R & Bertrand S (2000). Coupling between lumbar and sacral motor networks in the neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **12**, 2993–3002.
- Cazalets J-R, Borde M & Clarac F (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *Journal of Neuroscience* **15**, 4943–4951.
- Cazalets J-R, Borde M & Clarac F (1996). The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurons in the newborn rat. *Journal of Neuroscience* **16**, 298–306.
- Cazalets J-R, Gardette M & Hilaire G (2000). Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *Journal of Neurophysiology* **83**, 2468–2470.
- Cazalets J-R, Grillner P, Menard I, Cremieux J & Clarac F (1990). Two types of motor rhythm induced by NMDA and amines in an in vitro spinal cord preparation of neonatal rat. *Neuroscience Letters* **111**, 116–121.
- Cazalets J-R, Sqalli-Houssaini Y & Clarac F (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *The Journal of Physiology* **455**, 187–204.
- Cazalets J-R, Sqalli-Houssaini Y & Clarac F (1994). GABAergic inactivation of the central pattern generators for locomotion in isolated neonatal rat spinal cord. *The Journal of Physiology* **474**, 173–181.
- Cazalets J-R, Sqalli-Houssaini Y & Magoul R (1999). Differential effects of potassium channel blockers on the activity of the locomotor network in neonatal rat. *Brain Res* **827**, 185–197.
- Cazin L, Precht W & Lannou J (1980). Pathways mediating optokinetic responses of vestibular nucleus neurons in the rat. *Pflugers Arch* **384**, 19–29.
- Ceccato J-C, de Seze M, Azevedo C & Cazalets J-R (2009). Comparison of trunk activity during gait initiation and walking in humans. **4**, e8193.
- Charles KJ, Calver AR, Jourdain S & Pangalos MN (2003). Distribution of a GABA B-like receptor protein in the rat central nervous system. *Brain Res* **989**, 135–146.

- Chau CC, Barbeau HH & Rossignol SS (1998). Effects of intrathecal alpha1- and alpha2-noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology* **79**, 2941–2963.
- Chrachri A & Neil DM (1993). Interaction and synchronization between two abdominal motor systems in crayfish. *Journal of Neurophysiology* **69**, 1373–1383.
- Cina C & Hochman S (2000). Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin-evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*.
- Clarac F, Vinay L, Cazalets J-R, Fady J-C & Jamon M (1998). Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews* **28**, 35–43.
- Clemens S & Hochman S (2004). Conversion of the Modulatory Actions of Dopamine on Spinal Reflexes from Depression to Facilitation in D3 Receptor Knock-Out Mice. *J Neurosci* **24**, 11337–11345.
- Clemens S, Belin-Rauscent A, Simmers J & Combes D (2012). Opposing modulatory effects of D1- and D2-like receptor activation on a spinal central pattern generator. *Journal of Neurophysiology* **107**, 2250–2259.
- Cochilla AJ & Alford S (1998). Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 1007–1016.
- Cohen AH (1987). Effects of oscillator frequency on phase-locking in the lamprey central pattern generator. *J Neurosci Methods* **21**, 113–125.
- Cohen AH & Wallén P (1980). The neuronal correlate of locomotion in fish. *Exp Brain Res*.
- Combes D, Le Ray D, Lambert FM, Simmers J & Straka H (2008). An intrinsic feed-forward mechanism for vertebrate gaze stabilization. *Current Biology* **18**, R241–R243.
- Combes D, Sillar KT & Simmers J (2012). A switch in aminergic modulation of locomotor CPG output during amphibian metamorphosis. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**, 1364–1374.
- Conway BA, Hultborn H & Kiehn O (1987). Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Exp Brain Res* **68**, 643–656.
- Conway BA, Hultborn H, Kiehn O & Mintz I (1988). Plateau potentials in alpha-motoneurons induced by intravenous injection of L-dopa and clonidine in the spinal cat. *J Physiol* **405**, 369–384.
- Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR & Sofroniew MV (2008). Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* **14**, 69–74.
- Cowley KC & Schmidt BJ (1994). A comparison of motor patterns induced by N-methyl-D-aspartate, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Neuroscience Letters* **171**, 147–150.
- Cowley KC & Schmidt BJ (1995). Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **74**, 1109–1117.
- Cowley KC & Schmidt BJ (1997a). Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **77**, 247–259.
- Cowley KC & Schmidt BJ (1997b). Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **77**, 247–259.
- Cowley KC, Zaporozhets E & Schmidt BJ (2008). Propriospinal neurons are sufficient for bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord. *The Journal of Physiology* **586**, 1623–1635.

- Crone C, Hultborn H, Kiehn O, Mazieres L & Wigström H (1988). Maintained changes in motoneuronal excitability by short-lasting synaptic inputs in the decerebrate cat. *J Physiol* **405**, 321–343.
- Crone SA, Quinlan KA, Zagoraïou L, Droho S, Restrepo CE, Lundfald L, Endo T, Setlak J, Jessell TM, Kiehn O & Sharma K (2008). Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron* **60**, 70–83.
- Crone SA, Zhong G, Harris-Warrick R & Sharma K (2009). In Mice Lacking V2a Interneurons, Gait Depends on Speed of Locomotion. *J Neurosci* **29**, 7098–7109.
- Curthoys IS (1979). The development of function of horizontal semicircular canal primary neurons in the rat. *Brain Res* **167**, 41–52.
- Curthoys IS & Halmagyi GM (1995). Vestibular compensation: a review of the oculomotor, neural, and clinical consequences of unilateral vestibular loss. *J Vestib Res* **5**, 67–107.
- Dai Y & Jordan LM (2010). Multiple Patterns and Components of Persistent Inward Current With Serotonergic Modulation in Locomotor Activity-Related Neurons in Cfos-EGFP Mice. *Journal of Neurophysiology* **103**, 1712–1727.
- Dai Y, Carlin KP, Li Z, McMahon DG, Brownstone RM & Jordan LM (2009). Electrophysiological and pharmacological properties of locomotor activity-related neurons in cfos-EGFP mice. *Journal of Neurophysiology* **102**, 3365–3383.
- Dastgheib ZA, Lithgow B & Moussavi Z (2012). Vestibular spontaneous response as a potential signature for Parkinson's disease. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2012**, 3704–3707.
- Day BL, Séverac Cauquil A, Bartolomei L, Pastor MA & Lyon IN (1997). Human body-segment tilts induced by galvanic stimulation: a vestibularly driven balance protection mechanism. *J Physiol* **500 (Pt 3)**, 661–672.
- de Leon RD, Hodgson JA, Roy RR & Edgerton VR (1998). Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. *Journal of Neurophysiology* **79**, 1329–1340.
- de Seze M, Falgairolle M, Viel S, Assaiante C & Cazalets J-R (2008). Sequential activation of axial muscles during different forms of rhythmic behavior in man. *Exp Brain Res* **185**, 237–247.
- Deliagina T, Beloozerova IN, Popova LB, Sirota MG, Swadlow HA, Grant G & Orlovsky GN (2000a). Role of different sensory inputs for maintenance of body posture in sitting rat and rabbit. *Motor Control* **4**, 439–452.
- Deliagina TG & Orlovsky GN (2002). Comparative neurobiology of postural control. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 652–657.
- Deliagina TG, Beloozerova IN, Zelenin PV & Orlovsky GN (2008). Spinal and supraspinal postural networks. *Brain Research Reviews* **57**, 212–221.
- Deliagina TG, Grillner S, Orlovsky GN & Ullen F (1993). Visual input affects the response to roll in reticulospinal neurons of the lamprey. *Exp Brain Res* **95**, 421–428.
- Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S & Wallén P (1992). Vestibular control of swimming in lamprey. III. Activity of vestibular afferents: convergence of vestibular inputs on reticulospinal neurons. *Exp Brain Res* **90**, 499–507.
- Deliagina TG, Popova LB & Grant G (1997). The role of tonic vestibular input for postural control in rats. *Arch Ital Biol* **135**, 239–261.
- Deliagina TG, Sirota MG, Zelenin PV, Orlovsky GN & Beloozerova IN (2006). Interlimb postural coordination in the standing cat. *J Physiol* **573**, 211–224.
- Deliagina TG, Zelenin PV & Orlovsky GN (2002). Encoding and decoding of reticulospinal

- commands. *Brain Res Brain Res Rev* **40**, 166–177.
- Deliagina TG, Zelenin PV, Fagerstedt P, Grillner S & Orlovsky GN (2000b). Activity of reticulospinal neurons during locomotion in the freely behaving lamprey. *Journal of Neurophysiology* **83**, 853–863.
- Delvolvé I, Bem T & Cabelguyen J-M (1997). Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*. *Journal of Neurophysiology* **78**, 638–650.
- Delvolvé I, Branchereau P, Dubuc R & Cabelguyen JM (1999). Fictive rhythmic motor patterns induced by NMDA in an in vitro brain stem-spinal cord preparation from an adult urodele. *Journal of Neurophysiology* **82**, 1074–1077.
- Dieringer N (1995). “Vestibular compensation”: neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. *Prog Neurobiol* **46**, 97–129.
- Dietz V & Michel J (2002). Human bipeds use quadrupedal coordination during locomotion. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1164**, 97–103.
- Dietz V, Nakazawa K, Wirz M & Erni T (1999). Level of spinal cord lesion determines locomotor activity in spinal man. *Exp Brain Res* **128**, 405–409.
- Djaldetti R, Mosberg-Galili R, Sroka H, Merims D & Melamed E (1999). Camptocormia (bent spine) in patients with Parkinson's disease--characterization and possible pathogenesis of an unusual phenomenon. *Mov Disord* **14**, 443–447.
- Dougherty KJ & Kiehn O (2010a). Functional organization of V2a-related locomotor circuits in the rodent spinal cord. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1198**, 85–93.
- Dougherty KJ & Kiehn O (2010b). Firing and Cellular Properties of V2a Interneurons in the Rodent Spinal Cord. *J Neurosci* **30**, 24–37.
- Drew T (1993). Motor cortical activity during voluntary gait modifications in the cat. I. Cells related to the forelimbs. *Journal of Neurophysiology* **70**, 179–199.
- Drew T & Rossignol S (1987). A kinematic and electromyographic study of cutaneous reflexes evoked from the forelimb of unrestrained walking cats. *Journal of Neurophysiology* **57**, 1160–1184.
- Drew T, Andujar J-E, Lajoie K & Yakovenko S (2008a). Cortical mechanisms involved in visuomotor coordination during precision walking. *Brain Research Reviews* **57**, 199–211.
- Drew T, Kalaska J & Krouchev N (2008b). Muscle synergies during locomotion in the cat: a model for motor cortex control. *J Physiol* **586**, 1239–1245.
- Dunbar MJ, Tran MA & Whelan PJ (2010). Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *J Physiol* **588**, 139–156.
- Duvoisin RC & Marsden CD (1975). Note on the scoliosis of Parkinsonism. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **38**, 787–793.
- Duysens J & Van de Crommert HW (1998). Neural control of locomotion; Part 1: The central pattern generator from cats to humans. *Gait Posture* **7**, 131–141.
- Duysens J, Clarac F & Cruse H (2000). Load-regulating mechanisms in gait and posture: comparative aspects. *Physiol Rev* **80**, 83–133.
- Dyck J & Gosgnach S (2009). Whole Cell Recordings From Visualized Neurons in the Inner Laminae of the Functionally Intact Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **102**, 590–597.
- Dyck J, Lanuza GM & Gosgnach S (2012). Functional characterization of dl6 interneurons in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **107**, 3256–3266.
- Edgerton VR, Leon RD, Harkema SJ, Hodgson JA, London N, Reinkensmeyer DJ, Roy RR,

- Talmadge RJ, Tillakaratne NJ, Timoszyk W & Tobin A (2001). Retraining the injured spinal cord. *J Physiol* **533**, 15–22.
- Eken T & Kiehn O (1989). Bistable firing properties of soleus motor units in unrestrained rats. *Acta Physiol Scand* **136**, 383–394.
- Eken T, Hultborn H & Kiehn O (1989). Possible functions of transmitter-controlled plateau potentials in alpha motoneurons. *Prog Brain Res* **80**, 257–67–discussion239–42.
- Elliott PJ, Mason GS, Graham EA, Turpin MP & Hagan RM (1991). Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins. *Behav Brain Res* **51**, 77–82.
- Etlin A, Finkel E, Mor Y, O'Donovan MJ, Anglister L & Lev-Tov A (2013). Characterization of Sacral Interneurons That Mediate Activation of Locomotor Pattern Generators by Sacrocaudal Afferent Input. *J Neurosci* **33**, 734–747.
- Eugène D, Idoux E, Beraneck M, Moore LE & Vidal P-P (2011). Intrinsic membrane properties of central vestibular neurons in rodents. *Exp Brain Res* **210**, 423–436.
- Fady JCJ, Jamon MM & Clarac FF (1998). Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. *Brain Res Dev Brain Res* **108**, 111–123.
- Falgairolle M & Cazalets J-R (2007). Metachronal coupling between spinal neuronal networks during locomotor activity in newborn rat. *The Journal of Physiology* **580**, 87–102.
- Falgairolle M, Ceccato J-C, Seze M de, Herbin M & Cazalets J-R (2013). Metachronal propagation of motor activity. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**, 820–837.
- Falgairolle M, de Seze M, Juvin L, Morin D & Cazalets J-R (2006). Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *J Physiol Paris* **100**, 304–316.
- Fedirchuk B & Dai Y (2004). Monoamines increase the excitability of spinal neurones in the neonatal rat by hyperpolarizing the threshold for action potential production. *J Physiol* **557**, 355–361.
- Fedirchuk B, Stecina K, Kristensen KK, Zhang M, Meehan CF, Bennett DJ & Hultborn H (2013). Rhythmic activity of feline dorsal and ventral spinocerebellar tract neurons during fictive motor actions. *Journal of Neurophysiology* **109**, 375–388.
- Feldman AG & Orlovsky GN (1975). Activity of interneurons mediating reciprocal 1a inhibition during locomotion. *Brain Res* **84**, 181–194.
- Fitzpatrick R, Burke D & Gandevia SC (1994a). Task-dependent reflex responses and movement illusions evoked by galvanic vestibular stimulation in standing humans. *J Physiol* **478 (Pt 2)**, 363–372.
- Fitzpatrick R, Rogers DK & McCloskey DI (1994b). Stable human standing with lower-limb muscle afferents providing the only sensory input. *J Physiol* **480 (Pt 2)**, 395–403.
- Fitzpatrick RC, Wardman DL & Taylor JL (1999). Effects of galvanic vestibular stimulation during human walking. *J Physiol* **517 (Pt 3)**, 931–939.
- Forsberg H (1979). Stumbling corrective reaction: a phase-dependent compensatory reaction during locomotion. *Journal of Neurophysiology* **42**, 936–953.
- Forsberg H & Grillner S (1972). The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine. 1–3.
- Forsberg H, Grillner S & Rossignol S (1975). Phase dependent reflex reversal during walking in chronic spinal cats. *Brain Res* **85**, 103–107.
- Forsberg H, Grillner S & Rossignol S (1977). Phasic gain control of reflexes from the dorsum of the paw during spinal locomotion. *Brain Res* **132**, 121–139.
- Frigon A & Rossignol S (2006). Experiments and models of sensorimotor interactions during locomotion. *Biol Cybern* **95**, 607–627.
- Gabbay H (2004). Alpha-1 Adrenoceptor Agonists Generate a “Fast” NMDA Receptor-

- Independent Motor Rhythm in the Neonatal Rat Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **92**, 997–1010.
- Gabbay H, Delvolvé I & Lev-Tov A (2002). Pattern generation in caudal-lumbar and sacrococcygeal segments of the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **88**, 732–739.
- Gabriel JP, Mahmood R, Walter AM, Kyriakatos A, Hauptmann G, Calabrese RL & Manira El A (2008). Locomotor pattern in the adult zebrafish spinal cord in vitro. *Journal of Neurophysiology* **99**, 37–48.
- Garcia-Rill E (1986). The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res* **396**, 47–63.
- Garcia-Rill E & Skinner RD (1987). The mesencephalic locomotor region. I. Activation of a medullary projection site. *Brain Res* **411**, 1–12.
- Geisler HC, van der Fits IB & Gramsbergen A (1997). The effects of early vestibular deprivation on the motor development in the rat. *Behav Brain Res* **86**, 89–96.
- Geisler HC, Westerga J & Gramsbergen A (1993). Development of posture in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **53**, 517–523.
- Geisler HC, Westerga J & Gramsbergen A (1996). The function of the long back muscles during postural development in the rat. *Behav Brain Res* **80**, 211–215.
- Gestreau C, Grélot L & Bianchi AL (2000). Activity of respiratory laryngeal motoneurons during fictive coughing and swallowing. *Exp Brain Res* **130**, 27–34.
- Giroux N, Rossignol S & Reader TA (1999). Autoradiographic study of alpha1- and alpha2-noradrenergic and serotonin1A receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *J Comp Neurol* **406**, 402–414.
- Gladden MH, Maxwell DJ, Sahal A & Jankowska E (2000). Coupling between serotonergic and noradrenergic neurones and gamma-motoneurones in the cat. *J Physiol* **527 Pt 2**, 213–223.
- Glover JC (2000). Neuroepithelial “compartments” and the specification of vestibular projections. *Prog Brain Res* **124**, 3–21.
- Glover JC & Petursdottir G (1988). Pathway specificity of reticulospinal and vestibulospinal projections in the 11-day chicken embryo. *J Comp Neurol* **270**, 25–38–60–1.
- Gordon ITI & Whelan PJP (2006). Monoaminergic control of cauda-equina-evoked locomotion in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **96**, 3122–3129.
- Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJB, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O & Goulding M (2006). V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* **440**, 215–219.
- Goslow GE, Reinking RM & Stuart DG (1973). The cat step cycle: hind limb joint angles and muscle lengths during unrestrained locomotion. *J Morphol* **141**, 1–41.
- Gossard JP, Brownstone RM, Barajon I & Hultborn H (1994). Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Exp Brain Res* **98**, 213–228.
- Gossard JP, Floeter MK, Degtyarenko AM, Simon ES & Burke RE (1996). Disynaptic vestibulospinal and reticulospinal excitation in cat lumbosacral motoneurons: modulation during fictive locomotion. *Exp Brain Res* **109**, 277–288.
- Goulding M (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. 1–12.
- Gramsbergen A, Geisler HC, Taekema H & van Eykern LA (1999). The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* **112**, 217–228.

- Grant G, Wiksten B, Berkley KJ & Aldskogius H (1982). The location of cerebellar-projecting neurons within the lumbosacral spinal cord in the cat. An anatomical study with HRP and retrograde chromatolysis. *J Comp Neurol* **204**, 336–348.
- Grasso C, Barresi M, Scattina E, Orsini P, Vignali E, Bruschini L & Manzoni D (2011). Human Movement Science. *Human Movement Science* **30**, 296–313.
- Grasso R, Ivanenko YP, Zago M, Molinari M, Scivoletto G, Castellano V, Macellari V & Lacquaniti F (2004). Distributed plasticity of locomotor pattern generators in spinal cord injured patients. *Brain* **127**, 1019–1034.
- Grillner S (1985). Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* **228**, 143–149.
- Grillner S (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* **4**, 573–586.
- Grillner S (2006). Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* **52**, 751–766.
- Grillner S & Wallén P (2002). Cellular bases of a vertebrate locomotor system—steering, intersegmental and segmental co-ordination and sensory control. *Brain Res Brain Res Rev* **40**, 92–106.
- Grillner S & Zangger P (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res* **34**, 241–261.
- Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, Manira El A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN & Wallén P (1995). Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends in Neurosciences* **18**, 270–279.
- Grillner S, Wallén P, Brodin L & Lansner A (1991). Neuronal network generating locomotor behavior in lamprey: circuitry, transmitters, membrane properties, and simulation. *Annu Rev Neurosci* **14**, 169–199.
- Grinsted A & Moore JC (2004). Application of the cross wavelet transform and wavelet coherence to geophysical time series. ... *in geophysics*.
- Gross MK, Dottori M & Goulding M (2002). Lbx1 Specifies Somatosensory Association Interneurons in the Dorsal Spinal Cord. *Neuron* **34**, 535–549.
- Guertin PA (2009). Recovery of locomotor function with combinatory drug treatments designed to synergistically activate specific neuronal networks. *Curr Med Chem* **16**, 1366–1371.
- Gustafsson B & Lindström S (1973). Recurrent control from motor axon collaterals of Ia inhibitory pathways to ventral spinocerebellar tract neurones. *Acta Physiol Scand* **89**, 457–481.
- Hagevik A & McClellan AD (1999). Coordination of locomotor activity in the lamprey: role of descending drive to oscillators along the spinal cord. *Exp Brain Res* **128**, 481–490.
- Hammar I, Bannatyne BA, Maxwell DJ, Edgley SA & Jankowska E (2004). The actions of monoamines and distribution of noradrenergic and serotonergic contacts on different subpopulations of commissural interneurons in the cat spinal cord. *Eur J Neurosci* **19**, 1305–1316.
- Hammar I, Stecina K & Jankowska E (2007). Differential modulation by monoamine membrane receptor agonists of reticulospinal input to lamina VIII feline spinal commissural interneurons. *European Journal of Neuroscience* **26**, 1205–1212.
- Han P & Whelan PJ (2009). MODULATION OF AMPA CURRENTS BY D. *Neuroscience* **158**, 1699–1707.
- Han P, Nakanishi ST, Tran MA & Whelan PJ (2007). Dopaminergic Modulation of Spinal

- Neuronal Excitability. *J Neurosci* **27**, 13192–13204.
- Harris-Warrick RM (2011). Neuromodulation and flexibility in Central Pattern Generator networks. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 685–692.
- Harvey PJ (2006a). Persistent Sodium Currents and Repetitive Firing in Motoneurons of the Sacrocaudal Spinal Cord of Adult Rats. *Journal of Neurophysiology* **96**, 1141–1157.
- Harvey PJ (2006b). 5-HT₂ 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**, 1158–1170.
- Hägglund M, Borgius L, Dougherty KJ & Kiehn O (2010). Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nature Publishing Group* **13**, 246–252.
- Hägglund M, Dougherty KJ, Borgius L, Itohara S, Iwasato T & Kiehn O (2013). Optogenetic dissection reveals multiple rhythmogenic modules underlying locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 11589–11594.
- Helgren ME & Goldberger ME (1993). The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. *Exp Neurol* **123**, 17–34.
- Hellmann MA, Djaldetti R, Israel Z & Melamed E (2006). Effect of deep brain subthalamic stimulation on camptocormia and postural abnormalities in idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* **21**, 2008–2010.
- Hikosaka O (1991). Basal ganglia--possible role in motor coordination and learning. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 638–643.
- Hinckley CA, Hartley R, Wu L, Todd AJ & Ziskind-Conhaim L (2005). Locomotor-Like Rhythms in a Genetically Distinct Cluster of Interneurons in the Mammalian Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **93**, 1439–1449.
- Hochman S, Jordan LM & Schmidt BJ (1994). TTX-resistant NMDA receptor-mediated voltage oscillations in mammalian lumbar motoneurons. *Journal of Neurophysiology* **72**, 2559–2562.
- Hoffmann WW (1966). Electrical responses of mammalian slow and fast fibres. *Nature* **212**, 904–906.
- Holstege JC, Van Dijken H, Buijs RM, Goedknecht H, Gosens T & Bongers CM (1996). Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord. *J Comp Neurol* **376**, 631–652.
- Horak FB, Dimitrova D & Nutt JG (2005). Direction-specific postural instability in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol* **193**, 504–521.
- Horak FB, Shupert CL, Dietz V & Horstmann G (1994). Vestibular and somatosensory contributions to responses to head and body displacements in stance. *Exp Brain Res* **100**, 93–106.
- Houngaard J, Hultborn H, Jespersen B & Kiehn O (1984). Intrinsic membrane properties causing a bistable behaviour of alpha-motoneurons. *Exp Brain Res* **55**, 391–394.
- Houngaard J, Hultborn H, Jespersen B & Kiehn O (1988). Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J Physiol* **405**, 345–367.
- Houngaard JJ & Kiehn OO (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* **414**, 265–282.
- Hsu L-J, Orlovsky GN & Zelenin PV (2014). Different forms of locomotion in the spinal lamprey. *Eur J Neurosci* **39**, 2037–2049.

- Hsu LJ, Zelenin PV, Orlovsky GN & Deliagina TG (2012). Effects of galvanic vestibular stimulation on postural limb reflexes and neurons of spinal postural network. *Journal of Neurophysiology* **108**, 300–313.
- Hu H, Meijer OG, Hodges PW, Bruijn SM, Strijers RL, Nanayakkara PWB, van Royen BJ, Wu WH, Xia C & van Dieën JH (2012). Control of the lateral abdominal muscles during walking. *Human Movement Science* **31**, 880–896.
- Hultborn H, Jankowska E & Lindström S (1971). Recurrent inhibition of interneurons monosynaptically activated from group Ia afferents. *J Physiol* **215**, 613–636.
- Hultborn H, Wigström H & Wängberg B (1975). Prolonged activation of soleus motoneurons following a conditioning train in soleus Ia afferents - A case for a reverberating loop? *Neuroscience Letters* **1**, 147–152.
- Igarashi M (1967). Dimensional study of the vestibular apparatus. *Laryngoscope* **77**, 1806–1817.
- Iizuka M, Kiehn O & Kudo N (1997). Development in neonatal rats of the sensory resetting of the locomotor rhythm induced by NMDA and 5-HT. *Exp Brain Res* **114**, 193–204.
- Iles JF, Baderin R, Tanner R & Simon A (2007). Human standing and walking: comparison of the effects of stimulation of the vestibular system. *Exp Brain Res* **178**, 151–166.
- Inglis JT & Macpherson JM (1995). Bilateral labyrinthectomy in the cat: effects on the postural response to translation. *Journal of Neurophysiology* **73**, 1181–1191.
- Inglis JT, Horak FB, Shupert CL & Jones-Rycewicz C (1994). The importance of somatosensory information in triggering and scaling automatic postural responses in humans. *Exp Brain Res* **101**, 159–164.
- Ioffe ME, Ustinova KI, Chernikova LA, Luk'ianova IA, Ivanova-Smolenskaia IA & Kulikov MA (2003). [Features of learning voluntary control of posture after pyramidal and nigrostriatal lesions]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **53**, 306–312.
- Islam SS, Zelenin PV, Orlovskii GN, Grillner S & Deliagina TG (2006). Pattern of Motor Coordination Underlying Backward Swimming in the Lamprey. *Journal of Neurophysiology* **96**, 451–460.
- Iwagaki N & Miles GB (2011). Activation of group I metabotropic glutamate receptors modulates locomotor-related motoneuron output in mice. *Journal of Neurophysiology* **105**, 2108–2120.
- Jacobs R & Macpherson JM (1996). Two functional muscle groupings during postural equilibrium tasks in standing cats. *Journal of Neurophysiology* **76**, 2402–2411.
- Jahr CE & Yoshioka K (2005). Ia afferent excitation of motoneurons in the in vitro new-born rat spinal cord is selectively antagonized by kynurenate. *J Physiol* **370**, 515–530.
- Jamon M, Maloum I, Riviere G & Bruguerolle B (2002). Air-stepping in neonatal rats: A comparison of L-dopa injection and olfactory stimulation. *Behav Neurosci* **116**, 1014–1021.
- Jamon MM & Clarac FF (1998). Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav Neurosci* **112**, 1218–1228.
- Jankowska E, Hammar I, Chojnicka B & Hedén CH (2000). Effects of monoamines on interneurons in four spinal reflex pathways from group I and/or group II muscle afferents. *Eur J Neurosci* **12**, 701–714.
- Jiang Z, Carlin KP & Brownstone RM (1999). An in vitro functionally mature mouse spinal cord preparation for the study of spinal motor networks. *Brain Res* **816**, 493–499.
- Johnston AR, MacLeod NK & Dutia MB (1994). Ionic conductances contributing to spike repolarization and after-potentials in rat medial vestibular nucleus neurones. *J Physiol*

481 (Pt 1), 61–77.

- Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, Akay T & Pearson KG (2008). Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Research Reviews* **57**, 183–191.
- Juvin L & Morin D (2005). Descending respiratory polysynaptic inputs to cervical and thoracic motoneurons diminish during early postnatal maturation in rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **21**, 808–813.
- Juvin L, Le Gal J-P, Simmers J & Morin D (2012). Cervicolumbar coordination in mammalian quadrupedal locomotion: role of spinal thoracic circuitry and limb sensory inputs. *J Neurosci* **32**, 953–965.
- Juvin L, Simmers J & Morin D (2005). Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J Neurosci* **25**, 6025–6035.
- Karayannidou A, Beloozerova IN, Zelenin PV, Stout EE, Sirota MG, Orlovsky GN & Deliagina TG (2009a). Activity of pyramidal tract neurons in the cat during standing and walking on an inclined plane. *J Physiol* **587**, 3795–3811.
- Karayannidou A, Deliagina TG, Tamarova ZA, Sirota MG, Zelenin PV, Orlovsky GN & Beloozerova IN (2008). Influences of sensory input from the limbs on feline corticospinal neurons during postural responses. *J Physiol* **586**, 247–263.
- Karayannidou A, Zelenin PV, Orlovsky GN & Deliagina TG (2007). Responses of Reticulospinal Neurons in the Lamprey to Lateral Turns. *Journal of Neurophysiology* **97**, 512–521.
- Karayannidou A, Zelenin PV, Orlovsky GN, Sirota MG, Beloozerova IN & Deliagina TG (2009b). Maintenance of Lateral Stability During Standing and Walking in the Cat. *Journal of Neurophysiology* **101**, 8–19.
- Kasumacic N, Glover JC & Perreault M-C (2010). Segmental patterns of vestibular-mediated synaptic inputs to axial and limb motoneurons in the neonatal mouse assessed by optical recording. *The Journal of Physiology* **588**, 4905–4925.
- Kato M, Murakami S, Hirayama H & Hikino K (1985). Recovery of postural control following chronic bilateral hemisections at different spinal cord levels in adult cats. *Exp Neurol* **90**, 350–364.
- Kawahara K, Nakazono Y, Yamauchi Y & Miyamoto Y (1989). Coupling between respiratory and locomotor rhythms during fictive locomotion in decerebrate cats. *Neuroscience Letters* **103**, 326–330.
- Kernell D (1986). Organization and properties of spinal motoneurons and motor units. *Prog Brain Res* **64**, 21–30.
- Kettunen P, Krieger P, Hess D & Manira El A (2002). Signaling mechanisms of metabotropic glutamate receptor 5 subtype and its endogenous role in a locomotor network. *J Neurosci* **22**, 1868–1873.
- Kiehn O (1991). Plateau potentials and active integration in the “final common pathway” for motor behaviour. *Trends in Neurosciences* **14**, 68–73.
- Kiehn O & Kjaerulff O (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *Journal of Neurophysiology* **75**, 1472–1482.
- Kiehn O, Hultborn H & Conway BA (1992). Spinal locomotor activity in acutely spinalized cats induced by intrathecal application of noradrenaline. *Neuroscience Letters* **143**, 243–246.
- Kiehn O, Johnson BR & Raastad M (1996). Plateau properties in mammalian spinal interneurons during transmitter-induced locomotor activity. *Neuroscience* **75**, 263–273.
- Kiehn O, Kjaerulff O, Tresch MC & Harris-Warrick RM (2000). Contributions of intrinsic motor neuron properties to the production of rhythmic motor output in the mammalian spinal

- cord. *Brain Res Bull* **53**, 649–659.
- Kiehn O, Quinlan KA, Restrepo CE, Lundfald L, Borgius L, Talpalar AE & Endo T (2008). Excitatory components of the mammalian locomotor CPG. *Brain Research Reviews* **57**, 56–63.
- Kiehn OO, Sillar KTK, Kjaerulff OO & McDermid JRJ (1999). Effects of noradrenaline on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **82**, 741–746.
- Kjaerulff O & Kiehn O (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study. *Journal of Neuroscience* **16**, 5777–5794.
- Kjaerulff O & Kiehn O (2001). 5-HT modulation of multiple inward rectifiers in motoneurons in intact preparations of the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **85**, 580–593.
- Kjaerulff O, Barajon I & Kiehn O (1994). Sulphorhodamine-labelled cells in the neonatal rat spinal cord following chemically induced locomotor activity in vitro. *J Physiol* **478 (Pt 2)**, 265–273.
- Kjaerulff OO & Kiehn OO (1997). Crossed rhythmic synaptic input to motoneurons during selective activation of the contralateral spinal locomotor network. *Journal of Neuroscience* **17**, 9433–9447.
- Koehler WJ, Schomburg ED & Steffens H (1984). Phasic modulation of trunk muscle efferents during fictive spinal locomotion in cats. *J Physiol* **353**, 187–197.
- Koller H, Acosta F, Zenner J, Ferraris L, Hitzl W, Meier O, Ondra S, Koski T & Schmidt R (2010). Spinal surgery in patients with Parkinson's disease: experiences with the challenges posed by sagittal imbalance and the Parkinson's spine. *Eur Spine J* **19**, 1785–1794.
- Kremer E & Lev-Tov A (1997). Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *Journal of Neurophysiology* **77**, 1155–1170.
- Krenz W-DC, Parker AR, Rodgers EW & Baro DJ (2014). Dopaminergic tone persistently regulates voltage-gated ion current densities through the D1R-PKA axis, RNA polymerase II transcription, RNAi, mTORC1, and translation. *Front Cell Neurosci* **8**, 39.
- Krieger P, Grillner S & Manira El A (1998). Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors contributes to burst frequency regulation in the lamprey locomotor network. *Eur J Neurosci* **10**, 3333–3342.
- Krieger P, Manira El A & Grillner S (1996). Activation of pharmacologically distinct metabotropic glutamate receptors depresses reticulospinal-evoked monosynaptic EPSPs in the lamprey spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **76**, 3834–3841.
- Kriellaars DJ, Brownstone RM, Noga BR & Jordan LM (1994). Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat. *Journal of Neurophysiology* **71**, 2074–2086.
- Kudo N & Yamada T (1987a). Morphological and physiological studies of development of the monosynaptic reflex pathway in the rat lumbar spinal cord. *J Physiol* **389**, 441–459.
- Kudo N & Yamada T (1987b). N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro. *Neuroscience Letters* **75**, 43–48.
- Kudo N, Furukawa F & Okado N (1993). Development of descending fibers to the rat embryonic spinal cord. *Neuroscience Research* **16**, 131–141.
- Kuhtz-Buschbeck JP, Boczek-Funcke A, Mauter A, Nacimiento W & Weinhardt C (1996). Recovery of locomotion after spinal cord hemisection: an X-ray study of the cat

- hindlimb. *Exp Neurol* **137**, 212–224.
- Kwan AC, Dietz SB, Webb WW & Harris-Warrick RM (2009). Activity of Hb9 Interneurons during Fictive Locomotion in Mouse Spinal Cord. *J Neurosci* **29**, 11601–11613.
- Lac du S & Lisberger SG (1995). Membrane and firing properties of avian medial vestibular nucleus neurons in vitro. *J Comp Physiol A* **176**, 641–651.
- Lacquaniti F & Maioli C (1994). Independent control of limb position and contact forces in cat posture. *Journal of Neurophysiology* **72**, 1476–1495.
- Lai YY & Siegel JM (1990). Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *Journal of Neuroscience* **10**, 2727–2734.
- Lai YY, Clements JR, Wu XY, Shalita T, Wu JP, Kuo JS & Siegel JM (1999). Brainstem projections to the ventromedial medulla in cat: retrograde transport horseradish peroxidase and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* **408**, 419–436.
- Lakke EAE (1997). The projections to the spinal cord of the rat during development: a timetable of descent. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **135**, 1–143.
- Lambert FM, Combes D, Simmers J & Straka H (2012). Gaze Stabilization by Efference Copy Signaling without Sensory Feedback during Vertebrate Locomotion. *Current Biology* **22**, 1649–1658.
- Lambert FM, Malinvaud D, Gratacap M, Straka H & Vidal PP (2013). Restricted Neural Plasticity in Vestibulospinal Pathways after Unilateral Labyrinthectomy as the Origin for Scoliotic Deformations. *J Neurosci* **33**, 6845–6856.
- Landry ES, Lapointe NP, Rouillard C, Levesque D, Hedlund PB & Guertin PA (2006). Contribution of spinal 5-HT 1A and 5-HT 7 receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cord-transected mice. *European Journal of Neuroscience* **24**, 535–546.
- Lanuza GM, Gosgnach S, Pierani A, Jessell TM & Goulding M (2004). Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* **42**, 375–386.
- Lapointe NP & Guertin PA (2008). Synergistic Effects of D1/5 and 5-HT1A/7 Receptor Agonists on Locomotor Movement Induction in Complete Spinal Cord-Transected Mice. *Journal of Neurophysiology* **100**, 160–168.
- Lapointe NP, Rouleau P, Ung RV & Guertin PA (2009). Specific role of dopamine D1 receptors in spinal network activation and rhythmic movement induction in vertebrates. *J Physiol* **587**, 1499–1511.
- Lapointe NP, Ung RV, Rouleau P & Guertin PA (2008). Effects of Spinal α -2-Adrenoceptor and I1-Imidazoline Receptor Activation on Hindlimb Movement Induction in Spinal Cord-Injured Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **325**, 994–1006.
- Le Gal J-P, Juvin L, Cardoit L, Thoby-Brisson M & Morin D (2014). Remote Control of Respiratory Neural Network by Spinal Locomotor Generators ed. Hochman S. **9**, e89670.
- Leblond H & Gossard JP (1997). Supraspinal and segmental signals can be transmitted through separate spinal cord pathways to enhance locomotor activity in extensor muscles in the cat. *Exp Brain Res* **114**, 188–192.
- Lee RH & Heckman CJ (1998). Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in persistent inward currents. *Journal of Neurophysiology* **80**, 583–593.
- Lee RH & Heckman CJ (1999). Enhancement of bistability in spinal motoneurons in vivo by the noradrenergic α 1 agonist methoxamine. *Journal of Neurophysiology* **81**, 2164–2174.

- Lev-Tov A, Delvolvé I & Kremer E (2000). Sacrocaudal afferents induce rhythmic efferent bursting in isolated spinal cords of neonatal rats. *Journal of Neurophysiology* **83**, 888–894.
- Li X, Murray K, Harvey PJ, Ballou EW & Bennett DJ (2007). Serotonin facilitates a persistent calcium current in motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology* **97**, 1236–1246.
- Li Y & Bennett DJ (2003). Persistent Sodium and Calcium Currents Cause Plateau Potentials in Motoneurons of Chronic Spinal Rats. *Journal of Neurophysiology* **90**, 857–869.
- Liu J (2005). Stimulation of the Parapyramidal Region of the Neonatal Rat Brain Stem Produces Locomotor-Like Activity Involving Spinal 5-HT7 and 5-HT2A Receptors. *Journal of Neurophysiology* **94**, 1392–1404.
- Liu J, Akay T, Hedlund PB, Pearson KG & Jordan LM (2009). Spinal 5-HT7 Receptors Are Critical for Alternating Activity During Locomotion: In Vitro Neonatal and In Vivo Adult Studies Using 5-HT7 Receptor Knockout Mice. *Journal of Neurophysiology* **102**, 337–348.
- Lundberg A (1971). Function of the ventral spinocerebellar tract. A new hypothesis. *Exp Brain Res* **12**, 317–330.
- Lundberg A & Weight F (1971). Functional organization of connexions to the ventral spinocerebellar tract. *Exp Brain Res* **12**, 295–316.
- Lundfald L, Restrepo CE, Butt SJB, Peng C-Y, Droho S, Endo T, Zeilhofer HU, Sharma K & Kiehn O (2007). Phenotype of V2-derived interneurons and their relationship to the axon guidance molecule EphA4 in the developing mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience* **26**, 2989–3002.
- Lyalka VF, Zelenin PV, Orlovsky GN, Grillner S & Deliagina TG (2005). Impairment and Recovery of Postural Control in Rabbits With Spinal Cord Lesions. *Journal of Neurophysiology* **94**, 3677–3690.
- Machacek DW & Hochman S (2006). Noradrenaline unmasks novel self-reinforcing motor circuits within the mammalian spinal cord. *Journal of Neuroscience* **26**, 5920–5928.
- Maclean JN & Schmidt BJ (2001). Voltage-sensitivity of motoneuron NMDA receptor channels is modulated by serotonin in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **86**, 1131–1138.
- Maclean JN, Cowley KC & Schmidt BJ (1998). NMDA receptor-mediated oscillatory activity in the neonatal rat spinal cord is serotonin dependent. *Journal of Neurophysiology* **79**, 2804–2808.
- MacLean JN, Schmidt BJ & Hochman S (1997). NMDA receptor activation triggers voltage oscillations, plateau potentials and bursting in neonatal rat lumbar motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* **9**, 2702–2711.
- MacLellan MJ, Ivanenko YP, Cappellini G, Sylos Labini F & Lacquaniti F (2011). Features of hand-foot crawling behavior in human adults. *Journal of Neurophysiology* **107**, 114–125.
- Macpherson JM (1988a). Strategies that simplify the control of quadrupedal stance. I. Forces at the ground. *Journal of Neurophysiology* **60**, 204–217.
- Macpherson JM (1988b). Strategies that simplify the control of quadrupedal stance. II. Electromyographic activity. *Journal of Neurophysiology* **60**, 218–231.
- Macpherson JM & Fung J (1999). Weight support and balance during perturbed stance in the chronic spinal cat. *Journal of Neurophysiology* **82**, 3066–3081.
- Macpherson JM, Fung J & Jacobs R (1997). Postural orientation, equilibrium, and the spinal cord. *Adv Neurol* **72**, 227–232.
- Madriaga M, McPhee LC, Chersa T, Christie KJ & Whelan PJ (2004). Modulation of Locomotor

- Activity by Multiple 5-HT and Dopaminergic Receptor Subtypes in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **92**, 1566–1576.
- Magnusson M, Enbom H, Johansson R & Wiklund J (1990). Significance of pressor input from the human feet in lateral postural control. The effect of hypothermia on galvanically induced body-sway. *Acta Otolaryngol* **110**, 321–327.
- Manira El A, Kettunen P, Hess D & Krieger P (2002). Metabotropic glutamate receptors provide intrinsic modulation of the lamprey locomotor network. *Brain Res Brain Res Rev* **40**, 9–18.
- Manira El A, Tegnér J & Grillner S (1994). Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *Journal of Neurophysiology* **72**, 1852–1861.
- Mann MD (1973). Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review. *Brain Behav Evol* **7**, 34–83.
- Manuel M & Zytynski D (2011). Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *J Integr Neurosci* **10**, 243–276.
- Marchetti C, Taccola G & Nistri A (2003). Distinct subtypes of group I metabotropic glutamate receptors on rat spinal neurons mediate complex facilitatory and inhibitory effects. *Eur J Neurosci* **18**, 1873–1883.
- Marchetti C, Taccola G & Nistri A (2005). Activation of group I metabotropic glutamate receptors depresses recurrent inhibition of motoneurons in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Exp Brain Res* **164**, 406–410.
- Marple-Horvat DE, Amos AJ, Armstrong DM & Criado JM (1993). Changes in the discharge patterns of cat motor cortex neurones during unexpected perturbations of on-going locomotion. *J Physiol* **462**, 87–113.
- Marsden JF, Castellote J & Day BL (2002). Bipedal distribution of human vestibular-evoked postural responses during asymmetrical standing. *J Physiol* **542**, 323–331.
- Masino MA & Fetcho JR (2005). Fictive swimming motor patterns in wild type and mutant larval zebrafish. *Journal of Neurophysiology* **93**, 3177–3188.
- Massion J (1992). Movement, posture and equilibrium: interaction and coordination. *Prog Neurobiol* **38**, 35–56.
- Matsushima T & Grillner S (1992). Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **67**, 373–388.
- Matsushita M & Ikeda M (1970). Spinal projections to the cerebellar nuclei in the cat. *Exp Brain Res* **10**, 501–511.
- Matsuyama K & Drew T (2000). Vestibulospinal and reticulospinal neuronal activity during locomotion in the intact cat. II. Walking on an inclined plane. *Journal of Neurophysiology* **84**, 2257–2276.
- Maxwell DJ, Riddell JS & Jankowska E (2000). Serotonergic and noradrenergic axonal contacts associated with premotor interneurons in spinal pathways from group II muscle afferents. *Eur J Neurosci* **12**, 1271–1280.
- McClellan AD & Hagevik A (1997). Descending control of turning locomotor activity in larval lamprey: neurophysiology and computer modeling. *Journal of Neurophysiology* **78**, 214–228.
- McClellan AD & Hagevik A (1999). Coordination of spinal locomotor activity in the lamprey: long-distance coupling of spinal oscillators. *Exp Brain Res* **126**, 93–108.
- McCrea AE, Stehouwer DJ & Van Hartesveldt C (1997). Dopamine D1 and D2 antagonists

- block L-DOPA-induced air-stepping in decerebrate neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res* **100**, 130–132.
- McCrea DA, Pratt CA & Jordan LM (1980). Renshaw cell activity and recurrent effects on motoneurons during fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology* **44**, 475–488.
- Menelaou E & McLean DL (2012). A Gradient in Endogenous Rhythmicity and Oscillatory Drive Matches Recruitment Order in an Axial Motor Pool. *J Neurosci* **32**, 10925–10939.
- Meyer PF, Oddsson LIE & De Luca CJ (2004). The role of plantar cutaneous sensation in unperturbed stance. *Exp Brain Res* **156**, 505–512.
- Miles GB & Sillar KT (2011). Neuromodulation of Vertebrate Locomotor Control Networks. *Physiology* **26**, 393–411.
- Miller S, Van Der Burg J & Van Der Meché F (1975). Locomotion in the cat: basic programmes of movement. *Brain Res* **91**, 239–253.
- Miller WL & Sigvardt KA (2000). Extent and role of multisegmental coupling in the Lamprey spinal locomotor pattern generator. *Journal of Neurophysiology* **83**, 465–476.
- Misiaszek JE (2006). Control of frontal plane motion of the hindlimbs in the unrestrained walking cat. *Journal of Neurophysiology* **96**, 1816–1828.
- Mor Y & Lev-Tov A (2007). Analysis of Rhythmic Patterns Produced by Spinal Neural Networks. *Journal of Neurophysiology* **98**, 2807–2817.
- Mori S, Kawahara K & Sakamoto T (1983). Supraspinal aspects of locomotion in the mesencephalic cat. *Symp Soc Exp Biol* **37**, 445–468.
- Mori S, Sakamoto T, Ohta Y, Takakusaki K & Matsuyama K (1989). Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Res* **505**, 66–74.
- Morin D & Viala D (2002). Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs. *J Neurosci* **22**, 4756–4765.
- Musienko PE, Deliagina TG, Gerasimenko YP, Orlovsky GN & Zelenin PV (2014). Limb and Trunk Mechanisms for Balance Control during Locomotion in Quadrupeds. *J Neurosci* **34**, 5704–5716.
- Musienko PE, Zelenin PV, Orlovsky GN & Deliagina TG (2010). Facilitation of Postural Limb Reflexes With Epidural Stimulation in Spinal Rabbits. *Journal of Neurophysiology* **103**, 1080–1092.
- Naganuma H, Tokumasu K, Okamoto M, Hashimoto S & Yamashina S (2003). Three-dimensional analysis of morphological aspects of the human utricular macula. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **112**, 419–424.
- Nakajima T, Mezzarane RA, Klarner T, Barss TS, Hundza SR, Komiyama T & Zehr EP (2013). Neural Mechanisms Influencing Interlimb Coordination during Locomotion in Humans: Presynaptic Modulation of Forearm H-Reflexes during Leg Cycling ed. Jones KE. **8**, e76313.
- Nikfekar E, Kerr K, Attfield S & Playford DE (2002). Trunk movement in Parkinson's disease during rising from seated position. *Mov Disord* **17**, 274–282.
- Nishimaru H, Takizawa H & Kudo N (1999). 5-Hydroxytryptamine-induced locomotor rhythm in the neonatal mouse spinal cord in vitro. *Neuroscience Letters* **280**, 187–190.
- Noga BR, Johnson D & Riesgo MI (2011). Locomotor-activated neurons of the cat. II. Noradrenergic innervation and colocalization with NE α 1a or NE α 2b receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *Journal of ...*
- Noga BR, Kriellaars DJ & Jordan LM (1991). The effect of selective brainstem or spinal cord lesions on treadmill locomotion evoked by stimulation of the mesencephalic or

- pontomedullary locomotor regions. *Journal of Neuroscience* **11**, 1691–1700.
- Ono H & Fukuda H (1995). Pharmacology of descending noradrenergic systems in relation to motor function. *Pharmacol Ther* **68**, 105–112.
- Orlovsky GN (1972). The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion. *Brain Res* **40**, 359–371.
- Panek I, Bui T, Wright AT & Brownstone RM (2014). Cutaneous afferent regulation of motor function. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **74**, 158–171.
- Pasqualetti M, Diaz C, Renaud JS, Rijli FM & Glover JC (2007). Fate-Mapping the Mammalian Hindbrain: Segmental Origins of Vestibular Projection Neurons Assessed Using Rhombomere-Specific Hoxa2 Enhancer Elements in the Mouse Embryo. *J Neurosci* **27**, 9670–9681.
- Pavlova EL & Deliagina TG (2002). Responses of reticulospinal neurons in intact lamprey to pitch tilt. *Journal of Neurophysiology* **88**, 1136–1146.
- Pavlova EL, Popova LB, Orlovsky GN & Deliagina TG (2004). Vestibular compensation in lampreys: restoration of symmetry in reticulospinal commands. *J Exp Biol* **207**, 4595–4603.
- Pearlstein E, Ben Mabrouk F, Pflieger JF & Vinay L (2005). Serotonin refines the locomotor-related alternations in the in vitroneonatal rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* **21**, 1338–1346.
- Pearson KG (2008). Role of sensory feedback in the control of stance duration in walking cats. *Brain Research Reviews* **57**, 222–227.
- Peek AC, Quinn N, Casey ATH & Etherington G (2009). Thoracolumbar spinal fixation for camptocormia in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **80**, 1275–1278.
- Perez T, Tapia JA, Mirasso CR, Garcia-Ojalvo J, Quevedo J, Cuellar CA & Manjarrez E (2009). An Intersegmental Neuronal Architecture for Spinal Wave Propagation under Deletions. *J Neurosci* **29**, 10254–10263.
- Perrier JF (2002). 5-HT₂ Receptors Promote Plateau Potentials in Turtle Spinal Motoneurons by Facilitating an L-Type Calcium Current. *Journal of Neurophysiology* **89**, 954–959.
- Philippson M (1905). *L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux*.
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C & Jessell TM (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**, 903–915.
- Pierani A, Moran-Rivard L, Sunshine MJ, Littman DR, Goulding M & Jessell TM (2001). Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* **29**, 367–384.
- Pierce ML, Deuchars J & Deuchars SA (2010). Spontaneous rhythmogenic capabilities of sympathetic neuronal assemblies in the rat spinal cord slice. *Neuroscience* **170**, 827–838.
- Pratt CA & Jordan LM (1987). Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells as contributors to the spinal mechanisms of fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology* **57**, 56–71.
- Quinlan KA & Kiehn O (2007). Segmental, synaptic actions of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *J Neurosci* **27**, 6521–6530.
- Rajaofetra N, Ridet JL, Poulat P, Marlier L, Sandillon F, Geffard M & Privat A (1992). Immunocytochemical mapping of noradrenergic projections to the rat spinal cord with an antiserum against noradrenaline. *J Neurocytol* **21**, 481–494.
- Rauscent A, Einum J, Le Ray D, Simmers J & Combes D (2009). Opposing Aminergic Modulation of Distinct Spinal Locomotor Circuits and Their Functional Coupling during Amphibian Metamorphosis. *J Neurosci* **29**, 1163–1174.

- Reed WR & Magnuson DSK (2013). Cervical response among ascending ventrolateral funiculus pathways of the neonatal rat. *Brain Res* **1491**, 136–146.
- Reed WR, Shum-Siu A, Onifer SM & Magnuson DSK (2006). Inter-enlargement pathways in the ventrolateral funiculus of the adult rat spinal cord. *Neuroscience* **142**, 1195–1207.
- Reed WR, Shum-Siu A, Whelan A, Onifer SM & Magnuson DSK (2009). Anterograde labeling of ventrolateral funiculus pathways with spinal enlargement connections in the adult rat spinal cord. *Brain Res* **1302**, 76–84.
- Renshaw B (1946). Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots. *Journal of Neurophysiology* **9**, 191–204.
- Richardson JK, Ching C & Hurvitz EA (1992). The relationship between electromyographically documented peripheral neuropathy and falls. *J Am Geriatr Soc* **40**, 1008–1012.
- Roberts A (1990). How does a nervous system produce behaviour? A case study in neurobiology. *Sci Prog* **74**, 31–51.
- Roberts A, Soffe SR, Wolf ES, Yoshida M & Zhao FY (1998). Central circuits controlling locomotion in young frog tadpoles. *Annals of the New York Academy of Sciences* **860**, 19–34.
- Rodgers EW, Krenz WDC & Baro DJ (2011). Tonic Dopamine Induces Persistent Changes in the Transient Potassium Current through Translational Regulation. *J Neurosci* **31**, 13046–13056.
- Rossignol S (1996). Neural control of stereotypic limb movements. *Comprehensive Physiology*.
- Rossignol S, Dubuc R & jp G (2006). Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion. *Physiol Rev* **86**, 89–154.
- Roudet CC, Mouchet PP, Feuerstein CC & Savasta MM (1994). Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci Res* **39**, 319–329.
- Sako W, Nishio M, Maruo T, Shimazu H, Matsuzaki K, Tamura T, Mure H, Ushio Y, Nagahiro S, Kaji R & Goto S (2009). Subthalamic nucleus deep brain stimulation for camptocormia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* **24**, 1076–1079.
- Sapir T, Geiman EJ, Wang Z, Velasquez T, Mitsui S, Yoshikara Y, Frank E, Alvarez FJ & Goulding M (2004). Pax6 and Engrailed 1 Regulate Two Distinct Aspects of Renshaw Cell Development. *J Neurosci* **24**, 1255–1264.
- Schenkman ML, Clark K, Xie T, Kuchibhatla M, Shinberg M & Ray L (2001). Spinal movement and performance of a standing reach task in participants with and without Parkinson disease. *Phys Ther* **81**, 1400–1411.
- Schmidt A & Fischer MS (2010). Arboreal locomotion in rats - the challenge of maintaining stability. *J Exp Biol* **213**, 3615–3624.
- Schmidt BJ & Jordan LM (2000). The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull* **53**, 689–710.
- Schmidt BJ, Hochman S & MacLean JN (1998). NMDA receptor-mediated oscillatory properties: potential role in rhythm generation in the mammalian spinal cord. *Annals of the New York Academy of Sciences* **860**, 189–202.
- Schwartz EJ, Gerachsenko T & Alford S (2005). 5-HT Prolongs Ventral Root Bursting Via Presynaptic Inhibition of Synaptic Activity During Fictive Locomotion in Lamprey. *Journal of Neurophysiology* **93**, 980–988.
- Serafin M, De Waele C, Khateb A, Vidal PP & Mühlethaler M (1991). Medial vestibular nucleus in the guinea-pig. I. Intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp Brain*

- Res* **84**, 417–425.
- Shefchyk S, McCrea D, Kriellaars D, Fortier P & Jordan L (1990). Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Exp Brain Res* **80**, 290–295.
- Sherrington SCS (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*.
- Sheykhosslami K, Megerian CA & Zheng QY (2009). Vestibular evoked myogenic potentials in normal mice and Phex mice with spontaneous endolymphatic hydrops. *Otol Neurotol* **30**, 535–544.
- Shik ML, Severin FV & Orlovskii GN (1966). [Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]. *Biofizika* **11**, 659–666.
- Shimazu H & Precht W (1966). Inhibition of central vestibular neurons from the contralateral labyrinth and its mediating pathway. *Journal of Neurophysiology* **29**, 467–492.
- Skinner RD, Kinjo N, Henderson V & Garcia-Rill E (1990). Locomotor projections from the pedunculopontine nucleus to the spinal cord. *NeuroReport* **1**, 183–186.
- Smith CL & Hollyday M (1983). The development and postnatal organization of motor nuclei in the rat thoracic spinal cord. *J Comp Neurol* **220**, 16–28.
- Smith JC & Feldman JL (1987). In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J Neurosci Methods* **21**, 321–333.
- Smith JC, Feldman JL & Schmidt BJ (1987). Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. *FASEB J* **2**, 2283–2288.
- Soffe SR (1996). Motor patterns for two distinct rhythmic behaviors evoked by excitatory amino acid agonists in the *Xenopus* embryo spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **75**, 1815–1825.
- Somjen GG (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol* **41**, 159–177.
- Sorock GS & Labiner DM (1992). Peripheral neuromuscular dysfunction and falls in an elderly cohort. *Am J Epidemiol* **136**, 584–591.
- Sqalli-Houssaini Y & Cazalets J-R (2000a). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Res* **852**, 100–109.
- Sqalli-Houssaini Y & Cazalets J-R (2000b). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Res* **852**, 100–109.
- Sqalli-Houssaini Y, Cazalets J-R & Clarac F (1993). Oscillatory properties of the central pattern generator for locomotion in neonatal rats. *Journal of Neurophysiology* **70**, 803–813.
- Sqalli-Houssaini Y, Cazalets J-R, Fabre JC & Clarac F (1991). A cooling/heating system for use with in vitro preparations: study of temperature effects on newborn rat rhythmic activities. *J Neurosci Methods* **39**, 131–139.
- Stapley PJ & Drew T (2009). The Pontomedullary Reticular Formation Contributes to the Compensatory Postural Responses Observed Following Removal of the Support Surface in the Standing Cat. *Journal of Neurophysiology* **101**, 1334–1350.
- Stehouwer DJ (1987). Compensatory eye movements produced during fictive swimming of a deafferented, reduced preparation in vitro. *Brain Res* **410**, 264–268.
- Stehouwer DJ, McCrea AE & Van Hartesveldt C (1994). L-dopa-induced air-stepping in preweanling rats. II. Kinematic analyses. *Brain Res Dev Brain Res* **82**, 143–151.
- Straka H, Beraneck M, Rohregger M, Moore LE, Vidal PP & Vibert N (2004). Second-Order Vestibular Neurons Form Separate Populations With Different Membrane and Discharge Properties. *Journal of Neurophysiology* **92**, 845–861.
- Straka H, Lambert FM, Pfanzelt S & Beraneck M (2009). Vestibulo-ocular Signal

- Transformation in Frequency-Tuned Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1164**, 37–44.
- Taccola G, Marchetti C & Nistri A (2004a). Role of group II and III metabotropic glutamate receptors in rhythmic patterns of the neonatal rat spinal cord in vitro. *Exp Brain Res* **156**, 495–504.
- Taccola GG, Marchetti CC & Nistri AA (2004b). Modulation of rhythmic patterns and cumulative depolarization by group I metabotropic glutamate receptors in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Eur J Neurosci* **19**, 533–541.
- Takahashi K, Wada N & Tokuriki M (1998). Effects of the lateral vestibulospinal tract on rhythmic discharges induced by stimulation of the mesencephalic locomotor region (MLR) in the decerebrated cat. *J Vet Med Sci* **60**, 139–141.
- Takahashi T (1990a). Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J Physiol* **423**, 47–62.
- Takahashi T (1990b). Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal cord. *J Physiol* **423**, 27–46.
- Takemura K & King WM (2005). Vestibulo-colic reflex (VCR) in mice. *Exp Brain Res* **167**, 103–107.
- Talpalár AE & Kiehn O (2010). Glutamatergic mechanisms for speed control and network operation in the rodent locomotor CpG. *Front Neural Circuits*; DOI: 10.3389/fncir.2010.00019.
- Talpalár AE, Bouvier J, Borgius L, Fortin G, Pierani A & Kiehn O (2013). Dual-mode operation of neuronal networks involved in left-right alternation. *Nature* **500**, 85–88.
- Tartas M, Morin F, Barrière G, Goillandeau M, Lacaille J, Cazalets J-R & Bertrand SS (2010). Noradrenergic modulation of intrinsic and synaptic properties of lumbar motoneurons in the neonatal rat spinal cord. *Front Neural Circuits*; DOI: 10.3389/neuro.04.004.2010.
- Theiss RD & Heckman CJ (2005). Systematic variation in effects of serotonin and norepinephrine on repetitive firing properties of ventral horn neurons. *Neuroscience* **134**, 803–815.
- Thorstensson A, Carlson H, Zomlefer MR & Nilsson J (1982). Lumbar back muscle activity in relation to trunk movements during locomotion in man. *Acta Physiol Scand* **116**, 13–20.
- Thorstensson A, Nilsson J, Carlson H & Zomlefer MR (1984). Trunk movements in human locomotion. *Acta Physiol Scand* **121**, 9–22.
- Torrence C & Campo G (1998). A Practical Guide to Wavelet Analysis. 1–18.
- Towers S, Princivalle A, Billinton A, Edmunds M, Bettler B, Urban L, Castro-Lopes J & Bowery NG (2000). GABAB receptor protein and mRNA distribution in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* **12**, 3201–3210.
- Tunstall MJ & Roberts A (1991). Longitudinal coordination of motor output during swimming in *Xenopus* embryos. *Proc Biol Sci* **244**, 27–32.
- Tunstall MJ & Roberts A (1994). A longitudinal gradient of synaptic drive in the spinal cord of *Xenopus* embryos and its role in co-ordination of swimming. *J Physiol* **474**, 393–405.
- Uchino Y & Kushiro K (2011). Differences between otolith and semicircular canal activated neural circuitry in the vestibular system. *Neuroscience Research* **71**, 315–327.
- Uckermann von G, Le Ray D, Combes D, Straka H & Simmers J (2013). Spinal Efference Copy Signaling and Gaze Stabilization during Locomotion in Juvenile *Xenopus* Frogs. *J Neurosci* **33**, 4253–4264.
- Ullén F, Deliagina T, Orlovsky G & Grillner S (1995). Spatial orientation in the lamprey. I. Control of pitch and roll. *J Exp Biol* **198**, 665–673.

- Ungerstedt U & Arbuthnott GW (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **24**, 485–493.
- Vallstedt A & Kullander K (2013). Dorsally derived spinal interneurons in locomotor circuits. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1279**, 32–42.
- Van Hartesveldt C, Sickles AE, Porter JD & Stehouwer DJ (1991). L-dopa-induced air-stepping in developing rats. *Brain Res Dev Brain Res* **58**, 251–255.
- Van Wezel BM, Ottenhoff FA & Duysens J (1997). Dynamic control of location-specific information in tactile cutaneous reflexes from the foot during human walking. *Journal of Neuroscience* **17**, 3804–3814.
- Viala D & Buser P (1971). [Methods of obtaining locomotor rhythms in the spinal rabbit by pharmacological treatments (DOPA, 5-HTP, D-amphetamine)]. *Brain Res* **35**, 151–165.
- Viala D, Buisseret-Delmas C & Portal JJ (1988). An attempt to localize the lumbar locomotor generator in the rabbit using 2-deoxy-[14C]glucose autoradiography. *Neuroscience Letters* **86**, 139–143.
- Vinay L, Padel Y, Bourbonnais D & Steffens H (1993). An ascending spinal pathway transmitting a central rhythmic pattern to the magnocellular red nucleus in the cat. *Exp Brain Res* **97**, 61–70.
- Vitale C, Marcelli V, Furia T, Santangelo G, Cozzolino A, Longo K, Allocca R, Amboni M, Marciano E & Barone P (2011). Vestibular impairment and adaptive postural imbalance in parkinsonian patients with lateral trunk flexion. *Mov Disord* **26**, 1458–1463.
- Wadia PM, Tan G, Munhoz RP, Fox SH, Lewis SJ & Lang AE (2011). Surgical correction of kyphosis in patients with camptocormia due to Parkinson's disease: a retrospective evaluation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **82**, 364–368.
- Wallén P & Grillner S (2003). N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *Journal of Neuroscience* **7**, 2745–2755.
- Wallén P & Williams TL (1984). Fictive locomotion in the lamprey spinal cord in vitro compared with swimming in the intact and spinal animal. *J Physiol* **347**, 225–239.
- Wallén P, Christenson J, Brodin L, Hill R, Lansner A & Grillner S (1989). Mechanisms underlying the serotonergic modulation of the spinal circuitry for locomotion in lamprey. *Prog Brain Res* **80**, 321–7–discussion315–9.
- Wang MY & Dun NJ (1990). Phaclofen-insensitive presynaptic inhibitory action of (+/-)-baclofen in neonatal rat motoneurons in vitro. *Br J Pharmacol* **99**, 413–421.
- Wannier T, Bastiaanse C, Colombo G & Dietz V (2001). Arm to leg coordination in humans during walking, creeping and swimming activities. *Exp Brain Res* **141**, 375–379.
- Wannier T, Deliagina TG, Orlovsky GN & Grillner S (1998). Differential effects of the reticulospinal system on locomotion in lamprey. *Journal of Neurophysiology* **80**, 103–112.
- Weil-Fugazza J & Godefroy F (1993). Dorsal and ventral dopaminergic innervation of the spinal cord: functional implications. *Brain Res Bull* **30**, 319–324.
- Welgampola MS & Colebatch JG (2001). Vestibulospinal reflexes: quantitative effects of sensory feedback and postural task. *Exp Brain Res* **139**, 345–353.
- Westerga J & Gramsbergen A (1990). The development of locomotion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* **57**, 163–174.
- Westlund KN, Bowker RM, Ziegler MG & Coulter JD (1983). Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res* **263**, 15–31.

- Whelan P, Bonnot A & O'Donovan MJ (2000). Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *Journal of Neurophysiology* **84**, 2821–2833.
- Wilson JM, Hartley R, Maxwell DJ, Todd AJ, Lieberam I, Yoshida Y, Jessell TM & Brownstone RM (2005). Conditional Rhythmicity of Ventral Spinal Interneurons Defined by Expression of the Hb9 Homeodomain Protein. *J Neurosci* **25**, 5710–5719.
- Wilson VJ & Peterson BW (1978). Peripheral and central substrates of vestibulospinal reflexes. *Physiol Rev* **58**, 80–105.
- Wilson VJ, Boyle R, Fukushima K, Rose PK, Shinoda Y, Sugiuchi Y & Uchino Y (1995). The vestibulocollic reflex. *J Vestib Res* **5**, 147–170.
- Wright WG, Gurfinkel VS, Nutt J, Horak FB & Cordo PJ (2007). Axial hypertonicity in Parkinson's disease: direct measurements of trunk and hip torque. *Exp Neurol* **208**, 38–46.
- Xu Q & Grant G (1994). Course of spinocerebellar axons in the ventral and lateral funiculi of the spinal cord with projections to the anterior lobe: an experimental anatomical study in the cat with retrograde tracing techniques. *J Comp Neurol* **345**, 288–302.
- Yamada K, Goto S, Matsuzaki K, Tamura T, Murase N, Shimazu H, Nagahiro S, Kuratsu J-I & Kaji R (2006). Alleviation of camptocormia by bilateral subthalamic nucleus stimulation in a patient with Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* **12**, 372–375.
- Zagoraiou L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM & Miles GB (2009). A Cluster of Cholinergic Premotor Interneurons Modulates Mouse Locomotor Activity. *Neuron* **64**, 645–662.
- Zaporozhets E, Cowley KC & Schmidt BJ (2004). A reliable technique for the induction of locomotor-like activity in the in vitro neonatal rat spinal cord using brainstem electrical stimulation. *J Neurosci Methods* **139**, 33–41.
- Zaporozhets E, Cowley KC & Schmidt BJ (2011). Neurochemical excitation of propriospinal neurons facilitates locomotor command signal transmission in the lesioned spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **105**, 2818–2829.
- Zehr EP, Komiyama T & Stein RB (1997). Cutaneous reflexes during human gait: electromyographic and kinematic responses to electrical stimulation. *Journal of Neurophysiology* **77**, 3311–3325.
- Zelenin PV, Grillner S, Orlovsky GN & Deliagina TG (2003). The pattern of motor coordination underlying the roll in the lamprey. *J Exp Biol* **206**, 2557–2566.
- Zelenin PV, Orlovsky GN & Deliagina TG (2007). Sensory-Motor Transformation by Individual Command Neurons. *J Neurosci* **27**, 1024–1032.
- Zengel JE, Reid SA, Sypert GW & Munson JB (1985). Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *Journal of Neurophysiology* **53**, 1323–1344.
- Zhang J, Lanuza GM, Britz O, Wang Z, Siembab VC, Zhang Y, Velasquez T, Alvarez FJ, Frank E & Goulding M (2014). V1 and V2b Interneurons Secure the Alternating Flexor-Extensor Motor Activity Mice Require for Limbed Locomotion. *Neuron* **82**, 138–150.
- Zhang Y, Narayan S, Geiman E, Lanuza GM, Velasquez T, Shanks B, Akay T, Dyck J, Pearson K, Gosgnach S, Fan C-M & Goulding M (2008). V3 Spinal Neurons Establish a Robust and Balanced Locomotor Rhythm during Walking. *Neuron* **60**, 84–96.
- Zhong G (2006). Serotonin Modulates the Properties of Ascending Commissural Interneurons in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **95**, 1545–1555.
- Zhong G, Droho S, Crone SA, Dietz S, Kwan AC, Webb WW, Sharma K & Harris-Warrick RM

- (2010). Electrophysiological Characterization of V2a Interneurons and Their Locomotor-Related Activity in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *J Neurosci* **30**, 170–182.
- Zhu H, Clemens S, Sawchuk M & Hochman S (2007). Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D1–D5) in the mouse lumbar spinal cord: A real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience* **149**, 885–897.
- Zhu H, Clemens S, Sawchuk M & Hochman S (2008). Unaltered D1, D2, D4, and D5 dopamine receptor mRNA expression and distribution in the spinal cord of the D3 receptor knockout mouse. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **194**, 957–962.
- Ziskind-Conhaim L, Mentis GZ, Wiesner EP & Titus DJ (2010). Synaptic integration of rhythmogenic neurons in the locomotor circuitry: the case of Hb9 interneurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1198**, 72–84.
- Ziskind-Conhaim L, Wu L & Wiesner EP (2008). Persistent Sodium Current Contributes to Induced Voltage Oscillations in Locomotor-Related Hb9 Interneurons in the Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **100**, 2254–2264.
- Zomlefer MR, Provencher J, Blanchette G & Rossignol S (1984a). Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats. *Brain Res* **290**, 249–260.
- Zomlefer MR, Provencher J, Blanchette G & Rossignol S (1984b). Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats. *Brain Res* **290**, 249–260.

Annexes



Multiple monoaminergic modulation of posturo-locomotor network activity in the newborn rat spinal cord

Lauriane Beliez, Gregory Barrière, Sandrine S. Bertrand and Jean-René Cazalets*

CNRS UMR 5287, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Edited by:

Shawn Hochman, Emory University, USA

Reviewed by:

Deborah Baro, Georgia State University, USA

Wolfgang Stein, Illinois State University, USA

Aharon Lev-Tov, Hebrew University Medical School, Israel

*Correspondence:

Jean-René Cazalets, CNRS UMR 5287, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Université de Bordeaux, Zone nord, Bat 2 2e étage, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France
e-mail: jean-rene.cazalets@u-bordeaux.fr

Studies devoted to understanding locomotor control have mainly addressed the functioning of the neural circuits controlling leg movements and relatively little is known of the operation of networks that activate trunk muscles in coordination with limb movements. The aim of the present work was (1) to identify the exogenous neurotransmitter cocktail that most strongly activates postural thoracic circuitry; (2) to investigate how the biogenic amines serotonin (5-HT), dopamine (DA), and noradrenaline (NA) modulate the coordination between limb and axial motor networks. Experiments were carried out on *in vitro* isolated spinal cord preparations from newborn rats. We recorded from ventral roots to monitor hindlimb locomotor and axial postural network activity. Each combination of the three amines with excitatory amino acids (EAAs) elicited coordinated rhythmic motor activity at all segmental levels with specific characteristics. The variability in cycle period was similar with 5-HT and DA while it was significantly higher with NA. DA elicited motor bursts of smaller amplitude in thoracic segments compared to 5-HT and NA, while both DA and NA elicited motor bursts of higher amplitude than 5-HT in the lumbar and sacral segments. The amines modulated the phase relationships of bursts in various segments with respect to the reference lumbar segment. At the thoracic level there was a phase lag between all recorded segments in the presence of 5-HT, while DA and NA elicited synchronous bursting. At the sacral level, 5-HT and DA induced an intersegmental phase shift while relationships became phase-locked with NA. Various combinations of EAAs with two or even all three amines elicited rhythmic motor output that was more variable than with one amine alone. Our results provide new data on the coordinating processes between spinal cord networks, demonstrating that each amine has a characteristic "signature" regarding its specific effect on intersegmental phase relationships.

Keywords: dopamine, serotonin, noradrenaline, locomotion, posture, spinal cord, neuromodulation

INTRODUCTION

The achievement of efficient locomotory movements necessary for survival in a demanding external environment requires the integrated functioning and synergistic action of many muscle groups in order to ensure the appropriate positioning of all body regions during self-motion (Cazalets, 2000; Falgairolle et al., 2006). However, most studies devoted to understanding locomotor control in humans and quadrupeds (Rossignol, 1996; Duysens and Van de Crommert, 1998) have only addressed the functioning of the neural circuits controlling leg movements, and relatively little is known about the functioning of neuronal networks that activate trunk muscles in coordination with limb movements (Thorstensson et al., 1982; Koehler et al., 1984; Zomlefer et al., 1984; Gramsbergen et al., 1999; De Sèze et al., 2008; Rauscent et al., 2009; Combes et al., 2012). Similarly, the role of the forelimbs during locomotion remains poorly understood (Akazawa et al., 1982; Duenas et al., 1990; Ballion et al., 2001; Zehr and Duysens, 2004). Indeed all these motor networks do not operate in isolation but interact with each other, and it is only recently that increasing attention has been paid to the interactive functioning of various spinal segments in quadrupedal mammals and humans during

locomotion (Cazalets, 2000; Wannier et al., 2001; Dietz, 2002; Falgairolle et al., 2006, 2013; Maclellan et al., 2011; Nakajima et al., 2013).

Several seminal reviews (Harris-Warrick, 2011; Miles and Sil-lar, 2011) have recently highlighted the role of neuromodulators in governing the functional flexibility of spinal circuitry. The motor networks responsible for locomotor activity and which are the potential targets of neuromodulators are intrinsic to the spinal cord and can generate rhythmic motor activity in the absence of sensory feedback. The cervical and lumbar enlargements contain the neural machinery necessary to operate the fore- and hind-limbs, respectively, while thoracic and sacral segments control the axial systems. As underlined by Harris-Warrick (2011), neuromodulatory actions are required for the normal function of these networks. In using the *in vitro* isolated spinal cord from new born rat, the neuromodulatory impact of the three biogenic amines serotonin, dopamine (DA), and noradrenaline (NA) on locomotion has been extensively studied. Their effect had been previously established for the motor activity generated by the lumbar segments and subsequent studies further investigated aspects of their pharmacological features (Cazalets et al., 1992; Kiehn and Kjaerulff, 1996; Kiehn et al.,

1999; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Barriere et al., 2004; Madriaga et al., 2004; Pearlstein et al., 2005; Gordon and Whelan, 2006; Liu et al., 2009). It has been shown that they may differentially modulate a motor pattern according to the specific receptor subtypes they activate (for review, see Miles and Sil-lar, 2011). 5-HT exerts an excitatory (permissive) effect through an activation of 5-HT₂ and 5-HT₇ receptors (Madriaga et al., 2004; Pearlstein et al., 2005; Liu et al., 2009) or an inhibitory (suppressive) action through 5-HT₁ receptor activation (Beato and Nistri, 1998) on motoneurons or interneurons (Zhong et al., 2006a). Similarly, NA (Kiehn et al., 1999; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000), exerts a multi-modal control of lumbar loco-motor networks through an α 1 receptor mediated activation and an α 2 receptors mediated inhibition (Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Gabbay et al., 2002; Gordon and Whelan, 2006). The dopaminergic modulation of lumbar locomotor patterns (Kiehn and Kjaerulff, 1996; Whelan et al., 2000; Madriaga et al., 2004) is mediated via D1 and D2 receptor activation leading to an increase in motoneuron and Hb-9 interneuron excitability (Han et al., 2007). Most of the effects reported for these drugs were also found to occur in spinally transected adult rodents (Landry et al., 2006; Lapointe and Guertin, 2008; Lapointe et al., 2008, 2009). Surprisingly, however, despite the numerous studies that have investigated the individual action of each amine alone or in combination with excitatory amino acids (EAAs), there has not been a study that has systematically compared the action of the three amines, alone or in various combinations, on locomotor pattern genesis.

The aim of the present study therefore was (1) to identify the neuromodulator mixture that most strongly activates spinal motor networks involved in hindlimb and axial muscle control; (2) to investigate how the biogenic amines serotonin (5-HT), DA, and NA, shape the operation of and the interactions between the limb and axial motor networks during ongoing locomotor-like rhythmogenesis initiated by excitatory amino-acid receptor activation.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed on the *in vitro* isolated spinal cord of newborn Sprague–Dawley rats aged between 1 and 5 post-natal days (P1–P5, $n = 25$ preparations). All procedures were conducted in accordance with the local ethics committee of the University of Bordeaux and the European Committee Council Directive. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals.

IN VITRO ISOLATED SPINAL CORD

Rat pups were anesthetized using isoflurane until no reflex could be elicited in response to tail or toe pinching. Animals were decapitated, the skin of the back removed, and the preparations were placed ventral side up in a dissecting chamber. A laminectomy was performed to expose the spinal cord that was then dissected out using fine forceps and microscissors under binocular microscope control. Dissections and recording procedures were performed under the continuous perfusion of an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) equilibrated with 95% O₂–5% CO₂, pH7.4 at room temperature (24–26°C) and containing (mM): NaCl 130, KCl 3, CaCl₂

2.5, MgSO₄ 1.3, NaH₂PO₄ 0.58, NaHCO₃ 25 and glucose 10. Spinal cords were sectioned at the T2 level at the beginning of the experiment.

ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS AND ANALYSIS

Extracellular motor activities were recorded from various spinal cord ventral roots using Vaseline-insulated, stainless steel pin electrodes at the lumbar level and glass suction electrodes for the shorter thoracic ventral roots. Recorded activities were amplified using custom-made amplifiers then digitized (Digidata 1322A, Molecular Device, CA, USA) using an interface driven by Axograph software (Axograph, AU). The raw signals were high-passed (50 Hz), rectified and integrated before analysis. Burst amplitudes (trough to peak) and locomotor pattern cycle periods were calculated using a program developed in Matlab (Mathworks) based on burst onset and offset detection. Since it is not possible to compare absolute amplitude values of extracellular data between experiments, we calculated only the relative change in amplitude from a control condition. Such amplitude changes could be either due to changes in firing frequency of already active motor units or to a recruitment of previously silent units. Due to the difficulty in establishing stable and persistent rhythmic locomotor-like activity with bath-application of EAAs alone, the combination of EAAs and 5-HT that is the most commonly used cocktail to induce locomotor-related activity *in vitro* (Sqalli-Houssaini et al., 1993) was taken as the reference condition to compare the actions of the amines.

We used recordings at L2 as the reference trace because it invariably exhibited the best signal-to-noise ratio. Pair-wise phase relationships between bursting activities recorded simultaneously from different ventral roots were calculated using wavelet transform analysis (for an extensive description of the method see Grinsted et al., 2004; Mor and Lev-Tov, 2007; Torrence and Compo, 2010). For this purpose, we used custom-made software based on the MatLab wavelet coherence package provided by Aslak Grinsted (<http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>). For each pair-wise recording we performed both a cross wavelet transform and a wavelet coherence determination. The results obtained with both algorithms were combined into a single time-frequency map so as to extract phase relationships from delineated coherent common high power frequency regions. Phase values were plotted as a circular representation (0–1 rad), with the mean phase being indicated by the direction of the vector, and its length (range from 0 to 1) indicating the strength of the mean.

PHARMACOLOGY

Episodes of locomotor-like activity were elicited by the exogenous application of a mixture of 15 μ M N-methyl-D,L-aspartate (NMA, Sigma) and serotonin (5-HT, Sigma) and/or DA (Sigma), and/or NA (Sigma). DA and NA were freshly prepared and protected from light exposure during bath superfusion in order to prevent photo-degradation. Sodium metabisulfite (0.1%; Sigma) was also added to the DA supply in order to prevent oxidation (Barriere et al., 2004). Drugs were bath-applied using a peristaltic pump (flow rate 4 ml/min; recording chamber volume 4 ml). The effects of the drugs were monitored from 5 to 10 min after reaching the Petri

dish (the time required for total replacement of the normal saline and diffusion into the tissue).

Different drug combinations were tested on the same preparation in a random order except for DA. Since we previously demonstrated that high DA concentrations (500 μM) may exert long-lasting effects on the *in vitro* newborn rat spinal cord (Barriere et al., 2004), this amine was always tested after the other amines in a given experiment and at a 10 times lower concentration than that found to exert prolonged actions (i.e., 50 μM instead of 500 μM). When different drug concentrations were tested in the same preparation, we always began with the lowest concentration. Total drug application lasted 20 min. During an episode of locomotor-like activity, cycle periods were initially longer and then shortened progressively until stable rhythmicity was reached within 5 min (Sqalli-Houssaini et al., 1993; Cazalets et al., 1999). All measurements were performed on 30 consecutive cycles during this steady-state condition. Each drug bath-application was followed by a prolonged wash out with normal saline for at least 30 min.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were tested for normality, and in its absence, non-parametric analysis was applied. Statistical analyses were performed using Prism software (Graphpad software, CA, USA). The coefficient of variation (COV), known as “relative variability,” was determined by the SD divided by the mean and expressed as a percent. In each experiment it was calculated from the same recording sequence as the motor period and amplitude. The degree of variability (or stability) of the motor pattern cycle period was assessed by computing the COV. Comparisons between conditions were performed using Student’s *t*-test, one-way or two-way ANOVA with Tukey’s test *post hoc* analysis. The equality of group variance was tested using the Bartlett’s test or the *F* test.

Statistical analyses of circular data were performed on raw data by descriptive statistics of circular distribution using IgoPro software (Wavemetrics, OR, USA) and Oriana software (KCS, UK). The Rayleigh test was used to determine the coupling strength. The Watson–Williams test (a circular analog of the one-factor ANOVA, Berens, 2009) and a non-parametric second-order two-sample test (which is less sensitive to departure from normality) consisting of pre-processing where the grand mean is subtracted from the two inputs followed by application of Watson’s *U*₂-test (IgoPro software, Wavemetrics, OR, USA) were used.

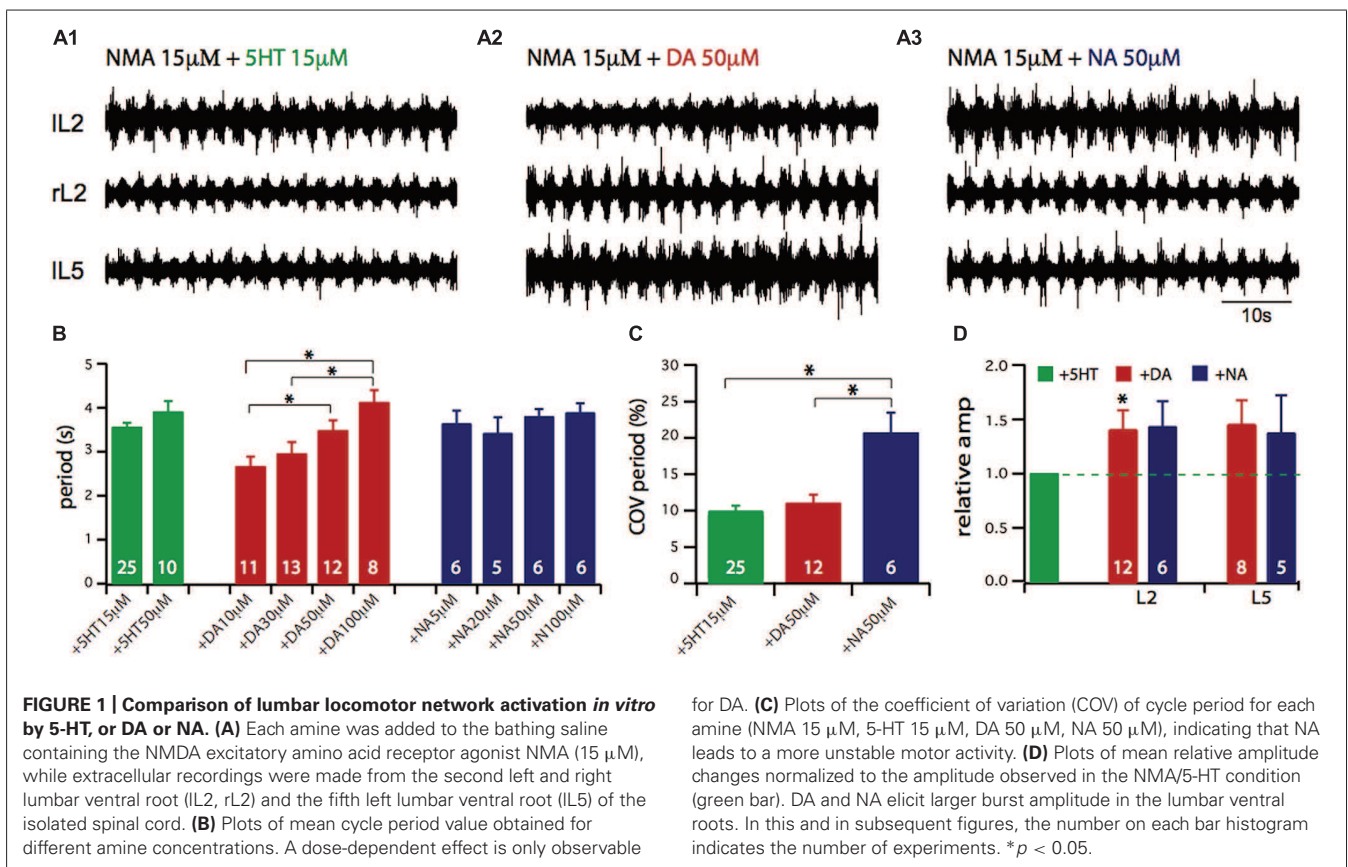
The significance threshold was taken to be $p < 0.05$ unless otherwise specified. All data values in the text are means \pm SEM.

RESULTS

Since no direct comparison of the neuromodulatory action of the three monoamines 5-HT, NA and DA has been so far reported, we first established how they each modulate the basic rhythmic motor activity elicited by EAAs. For this purpose we recorded ipsi- and contra-lateral L2 and L5 lumbar ventral roots to respectively monitor the flexor and extensor phases of the motor pattern cycle (Figures 1A1–A3). From a given experiment we selected representative episodes of locomotor-like activity with comparable cycle periods elicited by the conjoint bath-application of the EAA agonist NMA and one amine in order to highlight possible

differences between other parameters (such as COV, phase relationship, and motor burst amplitude). Several parameters that characterize the ongoing locomotor patterned activity were then calculated, namely the cycle period (the time that separates the onsets of two successive bursts of activity, Figure 1B), the COV of cycle period which is an index of the temporal regularity of the motor pattern (Figure 1C) and the burst amplitude (Figure 1D). As previously found (Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Barriere et al., 2004), there was a significant dose-dependent action for DA on cycle period (one-way ANOVA, $F = 6.06$, $p = 0.0016$) but not for NA (one-way ANOVA, $F = 0.8$, $p = 0.5$) and 5-HT (Student’s *t*-test, $t = 1.53$, $p = 0.14$), over the range of concentrations tested. In the present study, subsequent experiments were performed using DA at 50 μM , an intermediate concentration in the dose-dependent range. When comparing the variance of cycle period in the presence of the three amines at the concentrations used in Figure 1A (and throughout the study), we found that values were significantly different (Bartlett’s test for equal variance, Bartlett’s statistics = 10.5, $p = 0.005$). This variability in cycle period revealed by the COV calculation (Figure 1C), was comparable for NMA/5-HT and NMA/DA ($9.3 \pm 1.3\%$ and $11 \pm 2\%$, respectively) while it was significantly higher for NMA/NA ($20.7 \pm 2.8\%$, one-way ANOVA, $F = 10.5$, $p = 0.0002$). For each amine, there was no evident dose-dependency for period variability. Figure 1D shows the relative changes in motor burst amplitude. For each trial, the mean burst amplitude of activity in an individual ventral root under NMA/5-HT was considered as the control condition and measurements under other pharmacological conditions were normalized to this value. Both DA and NA significantly increased the amplitude of flexor (L2) and extensor (L5) motor bursts. Altogether, these results confirm the previously reported individual effects of the amines on EAA-induced locomotor-related rhythmicity, although our comparative assessment indicates that each amine exerts a specific action on hindlimb motor network activity.

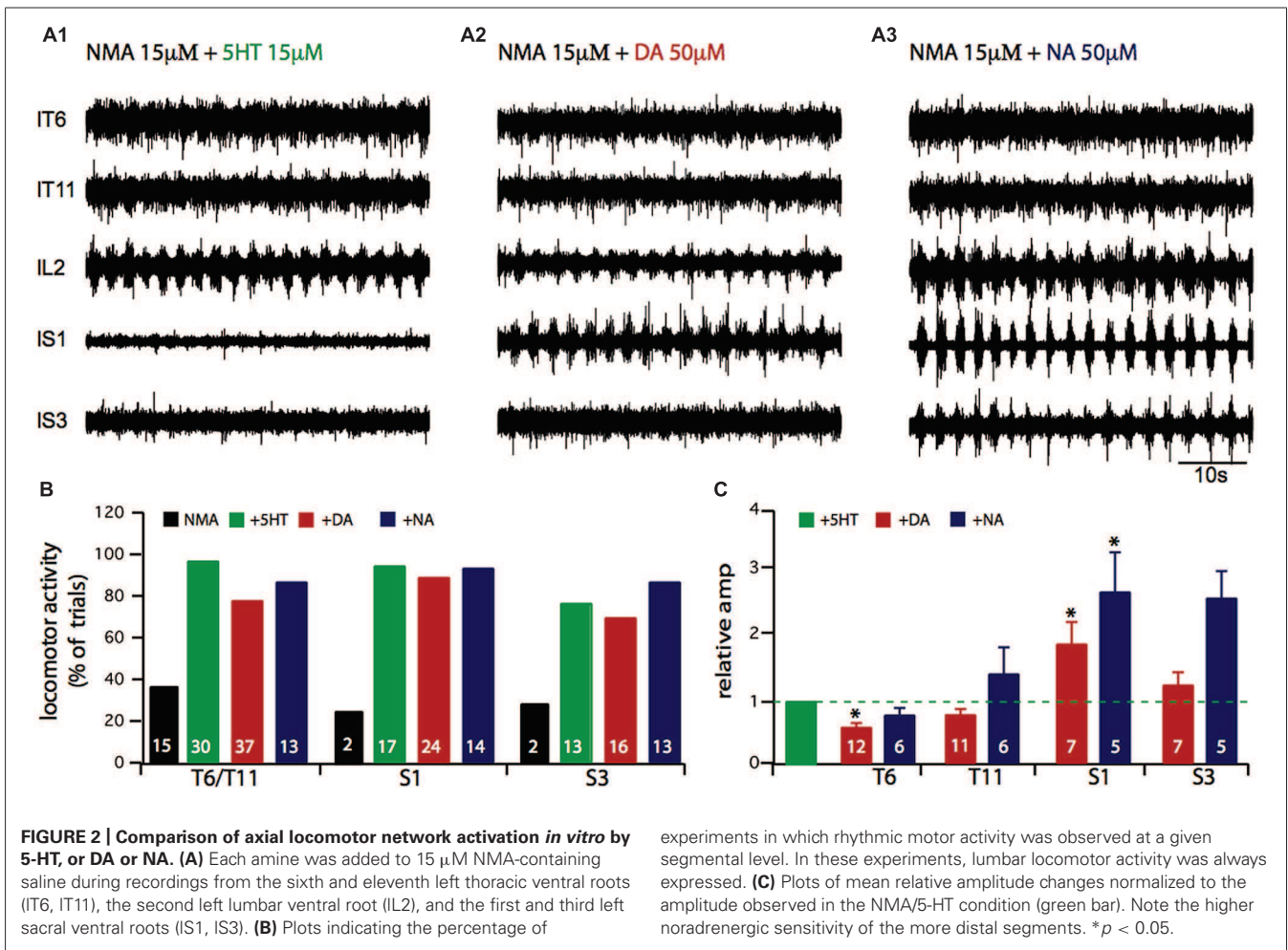
In a next step, we tested which amine most strongly activates the axial and hindlimb motor networks. Figure 2A presents typical simultaneous recordings from thoracic (T6 and T11), lumbar (L2) and sacral (S1, S3) ipsilateral ventral roots obtained from the same experiment in the presence of NMA and successively 5-HT (A1), DA (A2), and NA (A3) at amine concentrations that elicited motor rhythms with similar cycle periods. Each amine elicited coordinated motor burst at all segmental levels, although with qualitative differences. Visual trace inspection suggests that the most striking changes took place in the sacral burst amplitude in the presence of DA and especially NA. In the thoracic region, motor bursts were more distinguishable in the presence of 5-HT than either DA or NA. Figure 2B indicates the proportion of experiments in which motor bursts were recorded from thoracic and sacral segments when sustained lumbar locomotor-like activity was elicited as defined in Figure 1. In this respect, 5-HT and NA were noticeably more effective than DA. Moreover, relative amplitude calculations indicate that burst amplitudes in thoracic segments were significantly decreased by DA (Figure 2C; paired Student’s *t*-test, $t = 5.4$, $p = 0.0002$), while burst amplitude in the sacral segments was significantly increased by DA (Figure 2C; paired Student’s *t*-test,



$t = 2.8$, $p = 0.03$) and NA (Figure 2C; Student's t -test, $t = 4.5$, $p = 0.006$).

Since the combination of NMA and the amines elicited coordinated rhythmic motor activity in the various spinal cord areas, we examined whether, in addition to their effects on cycle period and burst amplitude, they were able to shape locomotor-related activity by modulating the phase relationships between the various segmental levels. Phase relationships were calculated by taking the ipsilateral L2 ventral root recording as the reference trace (see Materials and Methods). Figure 3A presents averaged individual cycles replicated in a continuous sequence to reveal the rhythmic nature of the activity (see Figure 6A in Falgairolle and Cazalets, 2007), in the presence of each of the three amines. Each time a burst was detected in the reference L2 trace, it was sampled with the other associated recorded traces. Individual cycles were superimposed and then averaged. This process allowed switching from a continuous mode of recording to an episodic one (Figures 3A and 4B) so as to increase the signal-to-noise ratio in order to obtain a more accurate detection of burst peaks (Falgairolle and Cazalets, 2007). None of the amines elicited significantly different phase relationships in the lumbar left/right alternating pattern, the flexor and extensor coordination nor burst durations, as indicated by the strict superimposition of L2 and L5 traces under all three amine conditions. In contrast, each amine established a distinct phase relationship between the thoracic, sacral and lumbar segments. Figure 3B illustrates the phase relationships between each recording location and reference

L2. Data were pooled for all concentrations tested as there was no dose-dependent effect of concentration for any amine and any ventral root (multisample Watson-Williams test, $p > 0.1$). Each point in the polar plots represents the mean phase value obtained in a single experiment, with the vector direction representing the mean phase value and its length the coupling strength. Inspection of the polar plots reveals that with 5-HT and DA, the phase values were more variable between experiments in the sacral region than in the lumbar or thoracic segments. In the presence of 5-HT there was a phase lag between lumbar and thoracic segments that was previously shown to increase significantly with the intervening distance (Falgairolle and Cazalets, 2007), while almost synchronous bursting occurred in the recorded thoracic segments with no phase lag increase with segmental distance in the presence of DA (mean vector value 0.93 in T6 and 0.88 in T11; Mardia's two sample U 0.08, $p > 0.2$, Figure 3) and NA (mean vector value 0.94 in T6 and 0.89 in T11; Mardia's two sample U 0.07, $p > 0.2$, Figure 3). At the sacral level, a significant progressive phase shift relative to L2 occurred both in the presence of 5-HT (mean vector value 0.61 in S1 and 0.52 in S3; Mardia's two sample U 0.24, $p < 0.02$, Figure 3), and DA (mean vector value 0.91 in S1, 0.61 in S3; Mardia's two sample U 0.3, $p < 0.005$, Figure 3). In contrast, NA elicited a phase-locked motor pattern with a similar phase relationship at all sacral levels (mean vector value 0.97 in S1 and 0.93 in S3; Mardia's two sample U 0.18, $p > 0.05$, Figure 3). These results therefore demonstrate that each amine possesses a specific instructive "signature" regarding



its modulatory affect on the distributed temporal aspects of the motor pattern.

Finally, we investigated different neuromodulatory combinations by mixing EAA receptor agonists with two or even the three amines (Figure 4). A typical experiment in which the four drugs were added to the bath saline is shown in Figure 4A. This neuromodulatory cocktail still elicited rhythmic motor output that, at a first glance, did not differ markedly from the condition with one amine alone. However, rhythmic bursting was less frequently observed (67% of experiments, Table 1), in the thoracic compartment under the multiple amine condition. Moreover, the amines in combination elicited motor rhythms with significantly longer cycle periods (Figure 4B; unpaired Student's *t*-test; 5-HT/DA, $t = 2.96$, $p = 0.0057$; 5-HT/DA/NA, $t = 6.82$, $p = 0.0001$) and increased burst amplitude in the most caudal (L5 and sacral) segments (Figure 4C; paired Student's *t*-test; 5-HT/NA in L2, $t = 2.5$, $p = 0.04$; 5-HT/NA in L5, $t = 2.5$, $p = 0.04$; 5-HT/NA in S1, $t = 4.8$, $p = 0.002$; 5-HT/NA/DA in S1, $t = 3.5$, $p = 0.017$). The rhythm stability, as indicated by the COV was within the same range as values with the mixture of NMA/5-HT or NMA/DA (see Figure 1C), i.e. $10.4 \pm 1.2\%$ for NMA/5-HT/DA, $13 \pm 2\%$ for NMA/5-HT/NA and $12.6 \pm 3.4\%$ for NMA/5-HT/DA/NA. Moreover,

phase analysis (Figure 4D), revealed that the flexor/extensor relationship remained extremely stable under all conditions (see also Figure 3B). In contrast, and especially for the sacral segments, the phase relationships generally became more variable with a very small vector length. Interestingly, however, in the mid-thoracic segment (T6), the phase relationships observed in the presence of all three amines or 5-HT/DA or 5-HT/NA was close to that observed in the presence of 5-HT alone (i.e., at about 0.19; see Table 2).

DISCUSSION COMBINATORY ACTION OF DRUGS ON MOTOR RHYTHM GENERATION AND STABILITY

As pointed out by Guertin (2009) there is a need in the field of spinal cord injury and recovery for elaborating therapeutic strategies based on drug-induced CPG activation. Hence the identification of candidate molecules that could become first-in-class treatments for spinal cord injured patients in animal models becomes a prerequisite. The first objective of the present work was therefore to determine which neuromodulator cocktail most effectively activates spinal motor networks involved in locomotion. In pioneering studies (Kudo and Yamada, 1987; Smith and Feldman, 1987), the EAA receptor agonist NMDA was reported

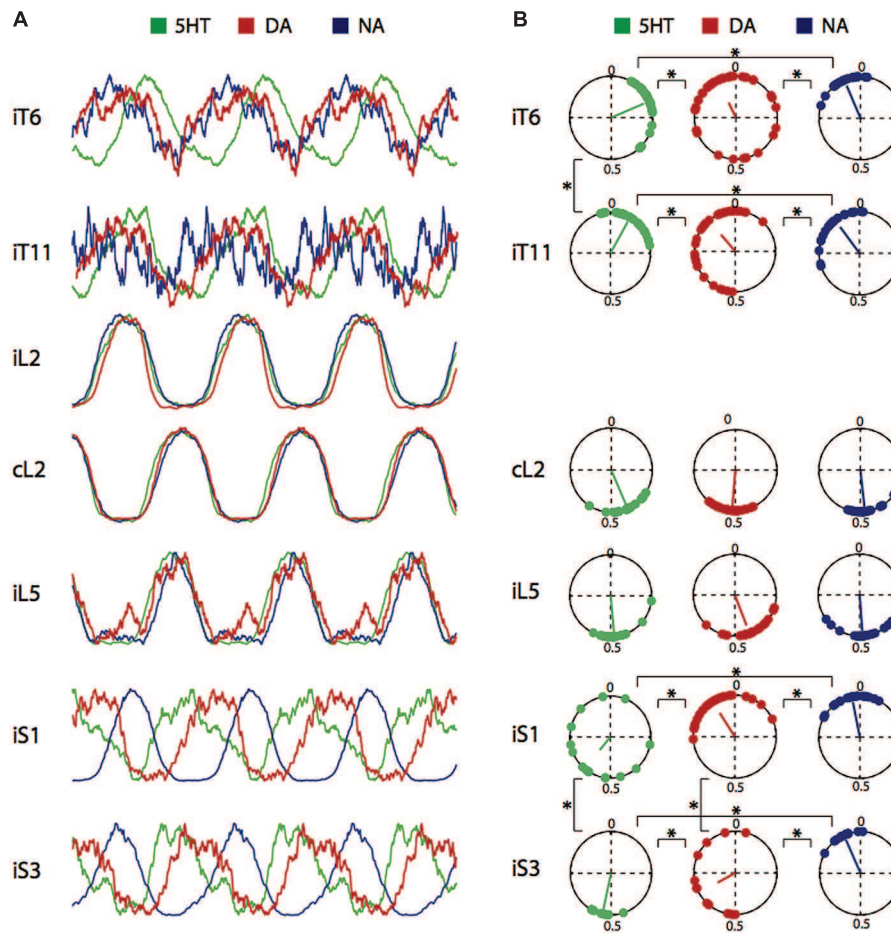


FIGURE 3 | Control of phase relationships by 5-HT, DA, or NA.

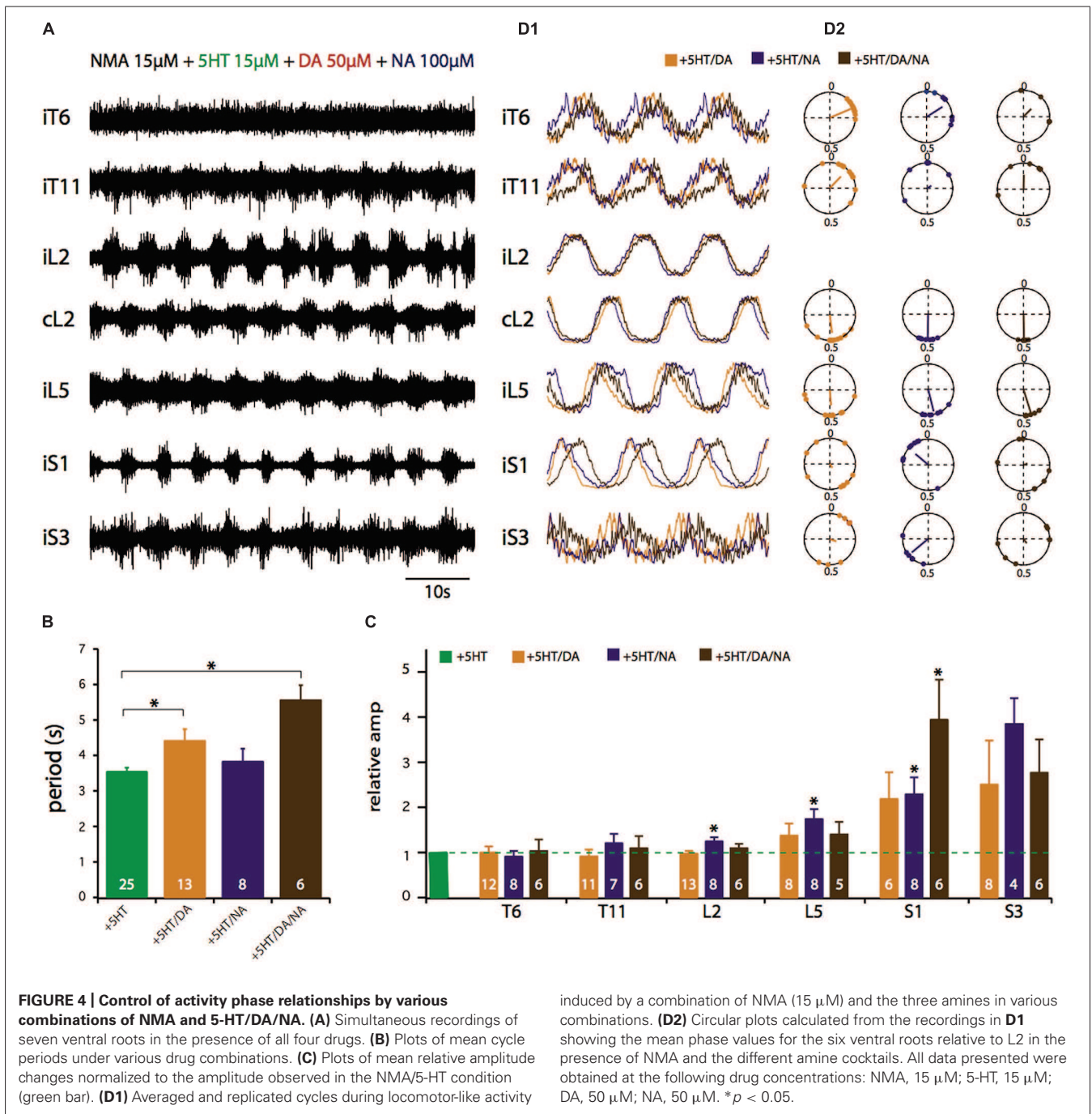
(A) Averaged and replicated cycle sequences during locomotor-like activity induced by a combination of NMA (15 μ M) and one of the three amines (5-HT, 15 μ M; DA, 50 μ M; NA, 50 μ M). Bursts were normalized for the amplitude. Note phase differences relative to reference L2 bursts shift occurring in the thoracic and sacral segments. **(B)** Circular plots showing

the mean phase values for burst activity in the six ventral roots recorded in A relative to the L2 ventral root in the presence of each three amines. Each point is the phase value measured from one experiment. The vector direction represents the grand mean phase value and its length is a function of the coupling strength. Data were pooled from all concentrations tested. i; ipsilateral; c, contralateral. * $p < 0.05$.

as the first molecule to evoke locomotor-like episodes in the isolated neonatal rat spinal cord. Later on, we established 5-HT as one of the main actors in locomotor network activation in rodents (Cazalets et al., 1990, 1992), and discovered that the combined bath-application of 5-HT and EAA agonists was a very effective way to reliably elicit sustained episodes of locomotor-like activity (Sqalli-Houssaini et al., 1991, 1993). Since then, it has become the most widely used method to elicit locomotor-like activity in this preparation, and hundreds of reports have been released based on this seminal observation. In contrast, only few studies have documented the combined activating action of EAA/DA or EAA/DA/5-HT (Kiehn and Kjaerulff, 1996; Jiang et al., 1999; Whelan et al., 2000; Juvin et al., 2005; Zhong et al., 2007; Talpalar and Kiehn, 2010), or EAA/NA (Kiehn et al., 1999; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000), and in each case there was no clear experimental rationale for employing this combined EAA/amine approach. Surprisingly, despite the outstanding opportunity provided by the use of an *in vitro* preparation, no study has systematically

addressed the issue of combined drug actions and no comparative study of permissive neuromodulator interactions is available. Although some idea of the influences of these amines together can be gleaned indirectly from the literature, the disparity in protocols used (saline composition, temperature, rat strain, . . .) has prevented a direct comparison to be made. Furthermore in most studies, motor output from only the lumbar cord region was investigated.

An important prerequisite is to clearly define the limits and the terms of what can be considered as the “optimal” form of locomotor output *in vitro*. There is a general consensus in the field that spinally generated rhythmic motor activity is considered as “locomotor-like” when alternating flexor and extensor bursts are recorded extracellularly from the L2 and L5 ventral roots (Cazalets et al., 1992; Kiehn and Kjaerulff, 1996) and when the pattern cycle period falls within a range similar to that observed in the intact animal at the same age (1s; Cazalets et al., 1990; Jamon and Clarac, 1998). However, caveats in the respect include the



effect of temperature on the *in vitro* rhythm frequency, since from 25°C (the typical mean room temperature used in most *in vitro* studies) to 35°C (the usual pup body temperature and the temperature at which *in vivo* experiments are performed (Cazalets et al., 1990), the cycle period decreases by more than 50% (Sqalli-Houssaini et al., 1991). A similar observation has been reported for saline K⁺ concentration that is frequently twice the normal concentration (3 mM; Somjen, 1979) measured in the intact animal. As such, the “best” *in vitro* motor output pattern would have a cycle period of ~2–3 s (when taking into account the

slowing down of the motor period resulting from the isolated CNS conditions), with fictive locomotor episodes lasting for the duration of drug bath-application (i.e., without receptor desensitization or any other processes that would prematurely curtail rhythmogenesis) and ventral root bursts that, in a given drug condition, occur as regularly as possible and with little variation both in their amplitude and inter-root phase relationships. Based on these premises, Table 1 summarizes the data collected in the present and previous studies. It includes data of thoracic, lumbar and sacral motor output and under exposure to various drug

Table 1 | Summary of the effects of 5-HT, DA and NA.

| | Episode duration | Period (s) | Period variability (%) | Relative Amplitude | | | Presence of motor bursts (%) | | |
|----------------|----------------------|-------------|------------------------|--------------------|-------------|-------------|------------------------------|--------|--------|
| | | | | Thoracic | Lumbar | Sacral | Thoracic | Lumbar | Sacral |
| NMA | | 3.04 ± 0.5 | | | | | | | |
| NMA/5-HT | All bath-application | 3.55 ± 0.10 | 9.30 ± 1.34 | 1 | 1 | 1 | 98 | 100 | 76 |
| NMA/DA 50μM | All bath-application | 3.47 ± 0.24 | 11.04 ± 1.17 | 0.66 ± 0.06 | 1.40 ± 0.18 | 1.54 ± 0.21 | 89 | 100 | 79 |
| NMA/NA 50μM | All bath-application | 3.8 ± 0.16 | 20.68 ± 2.76 | 1.18 ± 0.29 | 1.22 ± 0.17 | 2.68 ± 0.45 | 90 | 100 | 100 |
| NMA/5-HT/DA | All bath-application | 4.41 ± 0.32 | 10.38 ± 1.79 | 0.96 ± 0.10 | 0.97 ± 0.06 | 2.35 ± 0.57 | 85 | 100 | 78 |
| NMA/5-HT/NA | All bath-application | 3.82 ± 0.36 | 13.03 ± 1.00 | 1.04 ± 0.11 | 1.24 ± 0.09 | 2.81 ± 0.37 | 81 | 100 | 83 |
| NMA/5-HT/DA/NA | All bath-application | 5.56 ± 0.42 | 12.65 ± 3.40 | 1.06 ± 0.17 | 1.09 ± 0.09 | 3.35 ± 0.57 | 67 | 100 | 92 |

Note that the category "episode duration" indicates that a given neuromodulator cocktail induced rhythmic motor activity throughout bath-application.

Table 2 | Phase and mean vector length (*r*) value for burst activity in the six ventral roots (Figure 4D2) relative to the L2 ventral root in the presence of various combinations of NMA and 5-HT/DA/NA.

| | iT6 | iT11 | cL2 | iL5 | iS1 | iS3 |
|----------------|----------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Phase (<i>n</i>) R | Phase R | Phase R | Phase R | Phase R | Phase R |
| NMA/5-HT | 0.19 (31) 0.86 | 0.08 (31) 0.88 | 0.43 (28) 0.93 | 0.49 (18) 0.91 | 0.61 (15) 0.41 | 0.53 (9) 0.92 |
| NMA/DA | 0.93 (39) 0.40 | 0.89 (45) 0.54 | 0.51 (47) 0.94 | 0.44 (38) 0.80 | 0.91 (25) 0.67 | 0.67 (13) 0.49 |
| NMA/NA | 0.94 (21) 0.85 | 0.90 (23) 0.794 | 0.48 (26) 0.88 | 0.49 (23) 0.87 | 0.97 (21) 0.86 | 0.93 (13) 0.89 |
| NMA/5-HT/DA | 0.19 (11) 0.90 | 0.12 (12) 0.63 | 0.48 (12) 0.71 | 0.49 (10) 0.61 | 0.41 (8) 0.18 | 0.30 (6) 0.27 |
| NMA/5-HT/NA | 0.16 (5) 0.74 | 0.16 (8) 0.19 | 0.50 (8) 0.92 | 0.46 (8) 0.89 | 0.86 (8) 0.66 | 0.64 (5) 0.84 |
| NMA/5-HT/DA/NA | 0.12 (3) 0.42 | 0.00 (5) 0.56 | 0.50 (6) 0.97 | 0.45 (5) 0.95 | 0.19 (6) 0.16 | 0.40 (6) 0.21 |

combinations. A comparison of the compiled values indicates that there is no optimal way to elicit locomotor-like activity *in vitro* since several neurotransmitter combinations are able to elicit stable rhythmicity with *in vitro* locomotor compatible periods and phase-relationships. For example, motor burst amplitude is evidently more sensitive to NA, whereas rhythm stability is provided by DA or 5-HT. Presumably such differences indicate that the various parameters of the spinal motor system can be separately adjusted according to changing behavioral requirements. Nevertheless, it remains apparent that the combination of EAA/5-HT constitutes a good compromise in terms of rhythm stability, burst amplitude, and the recruitment of the different spinal compartments. However, specifically for sacral activity, it would be perhaps more interesting to use NA or DA which elicit higher burst amplitudes. To date it is not possible to determine the location at which the neuromodulatory processes described here may occur. With increasing age, there is a decrease in the motor period variability in the intact animal (Cazalets et al., 1990). Both the bath-application technique used here and the developmental changes undergone by neuromodulatory pathways themselves do not allow us to draw any conclusion about the precise functional role played by each amine in the intact adult animal.

Rhythmic motor activity elicited by the conjoint bath-application of EAA agonists and the three amines separately or in combination always led to locomotor pattern genesis

(Figures 1 and 4). Our previous studies have already described the pharmacological action of the three amines and how they modulate NMA-induced locomotor-like activity (Sqalli-Houssaini et al., 1993; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Barriere et al., 2004). In the present study, the same NMA concentration was the common parameter for all conditions, thus allowing direct comparison to be made between the different amine actions. Of the three amines, however, only 5-HT triggered activity that corresponded most closely to actual locomotion in terms of cycle period and inter-segmental phase relationships. In contrast, neither NA nor DA alone evokes locomotor-compatible rhythms, the latter in terms of cycle periods (Kiehn and Kjaerulff, 1996; Barriere et al., 2004) and the former in terms of cycle periods and flexor/extensor phase relationships (Kiehn et al., 1999; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Gabbay and Lev-Tov, 2004). On this basis, therefore, it could be that the locomotor signature of spinal output rhythmicity is provided mainly by EAAs since the activity they elicit possess the closest parameters to the cycle periods and flexor and extensor alternation observed *in vivo* (Kudo and Yamada, 1987; Cazalets et al., 1992). In such a framework, EAAs could establish basal temporal features of the motor rhythm with a cycle period that varies according to the amount of endogenous EAA released (Kudo and Yamada, 1987; Cazalets et al., 1992; Beato et al., 1997; Talpalar and Kiehn, 2010). During real CPG operation, the main task of the amines would

be to modulate this “primary” EAA-induced pattern via their combinatorial release.

To date, the cellular mechanisms by which the amines exert their effects remain unclear, although undoubtedly they will be multiple and complex (Harris-Warrick, 2011). It is likely that each parameter set by an amine – motor burst period, amplitude and stability – involves various cellular targets. For example, all three amines strengthen burst activity, i.e. they increase the amplitude and regularity of bursting by increasing neuronal excitability at the motoneuronal and/or premotoneuronal levels (Berger and Takahashi, 1990; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Kjaerulff and Kiehn, 2001; Gabbay et al., 2002; Zhong et al., 2006b; Han et al., 2007).

Their dose-dependent action on rhythm cycle period (Cazalets et al., 1992; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000) suggests that the amines directly access components of the spinal CPG itself. Moreover, since EAAs and amines individually increase neuronal excitability, it could be expected that the period of the motor rhythm induced by their combined presence would be even shorter than when each compound is acting separately. This was not the case, and indeed the cycle period was found to be set at an intermediate value between that evoked by EAA or the amine alone (**Figure 1; Table 1**). Pharmacological data provide a partial explanation for the aminergic effect on cycle period, since as mentioned previously, both NA and 5-HT slow down the locomotor rhythm through an inhibitory action via $\alpha 2$ receptors (Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Gabbay and Lev-Tov, 2004), and 5-HT1 (Beato and Nistri, 1998), while $\alpha 1$, 5-HT7, and 5-HT2 receptor agonists have an activatory action on pattern generation (Cazalets et al., 1992; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Madriaga et al., 2004; Landry et al., 2006; Liu et al., 2009). Surprisingly, however, DA which has been reported solely to have activatory effects also slows down the EAA-induced spinal motor rhythm (**Figure 1; Barriere et al., 2004**). Therefore, it is likely that several underlying processes are operating simultaneously, as reported in other preparations (Harris-Warrick, 2011; Miles and Sillar, 2011; Clemens et al., 2012). For example, in the lamprey the serotonin-induced prolongation of motor burst duration and cycle period involves at least two mechanisms, presynaptic inhibition of glutamate release on CPG neurons (Schwartz et al., 2005) and post-synaptic blockade of sAHP (Wallen et al., 1989; El Manira et al., 1994).

AMINERGIC SHAPING OF THE SPINAL MOTOR PATTERN

The physiology of locomotion in quadrupeds relies mostly on a simplified dichotomy between dynamic locomotor activity in which only hindlimb movements are considered and postural activity during static tasks. The main characteristics of locomotor-like rhythmic activity recorded in the *in vitro* spinal cord preparation essentially consist of burst cycle period, alternating left/right and flexor/extensor phase relationships, and burst duration. We found here that these parameters were amazingly constant whatever the neuromodulatory condition (**Figures 1 and 4; Table 2**). This lack of flexibility may reflect a real functional situation since during ongoing locomotion there is an absolute requirement for fundamental parameters such as right/left movement alternation to be strictly maintained in order to preserve balance and speed. Alternatively, the apparent lack of modulator-induced flexibility

may be attributable to an *in vitro* bias. In the isolated spinal cord preparation, simultaneous ventral root recordings provide only a global view of various temporally overlapping motor activities and, for example, the slightly differing temporal relationships that exist between various muscle groups, as has been observed with electromyographic recordings in the intact animal (Leblond et al., 2003), may not be evident.

In several systems, interactions between distinct rhythmically active networks have been also described, as for example between walking and swimmeret movements in crustaceans (Cattaert and Clarac, 1983; Chrachri and Neil, 1993), gastric and pyloric motor rhythms in the crustacean stomatogastric system (Bartos et al., 1999; Faumont et al., 2005), trunk and hindlimb activities in *Xenopus* (Beyeler et al., 2008; Rauscent et al., 2009), locomotion and respiration (Kawahara et al., 1989; Morin and Viala, 2002), scratching and locomotion (Hao et al., 2011), respiration and swallowing (Gestreau et al., 2000). In the newt, axial neuronal networks switch from sequential motor burst propagation to stationary phase-locked activation of the same axial muscles when the animal switches from swimming to quadrupedal locomotion (Delvolve et al., 1997). To date, however, the link between the systems level and the underlying cellular mechanisms has only been established in simpler invertebrate systems in which identified neurons can be individually activated and recorded (Cang and Friesen, 2002; Smarandache et al., 2009). Indeed the pharmacological approach that we have used in the present study also has some limitations, especially when considering the temporal aspects of neuromodulation. During functioning in the intact animal it is likely that descending aminergic pathways are momentarily active whereas the pharmacological protocol used here necessarily consists of tonic, continuous bath-application that in turn leads to the disappearance of the temporal dimension of neuromodulation. A second limitation is the state dependence of the system when several bath-applications are performed on the same spinal cord. Indeed, for the NMA/5-HT combination, we observed in a previous study that successive applications elicited sequences of locomotor-like activity with the same characteristics (Cazalets et al., 1999). Exogenous DA has been shown in other systems to lead to persistent changes in ionic conductances (Rodgers et al., 2011; Krenz et al., 2014), and we also reported in the isolated spinal cord preparation (see Materials and Methods, Barriere et al., 2004) that it may exert long-lasting effects. It is for this reason that DA was always the last drug tested in our experiments and at a much lower concentration than that at which these long-lasting effects were previously observed. There is no evidence that NA exerts such persistent actions.

When considering the integrated functioning of hindlimb and axial networks involved in dynamic posture, a different perspective is required since as we demonstrate, this «metanetwork» can be configured into various functional states according to the neuromodulatory environment. As shown in **Figures 1 and 2**, although the amines and EAAs have a qualitatively cumulative effect on rhythm stability and burst amplitude, each amine has its own characteristic imprint. DA and NA specifically enhance sacral motor bursts (**Figure 2**) while 5-HT and DA better stabilize the temporal parameters of the motor pattern (**Figure 1**). Each amine can also specify distinct phase relationships between the various spinal

segments (**Figure 3**). In a previous study, in which only the action of a mixture of NMA/5-HT on the interconnected spinal networks was investigated, we found a constant lag between lumbar and thoracic segments, with a significant tendency for caudo-rostral propagation (Falgairolle and Cazalets, 2007). Here, we find that DA and NA, in contrast to 5-HT's action, substantially decreases the phase lags along the cord so that almost synchronous bursting occurs throughout the spinal cord. Changes from rostral-caudal to caudo-rostral propagation are also observed in the lamprey, when switching from forward to backward swimming occurs (Islam et al., 2006). Although, the cellular targets have not been identified, spinal commissural interneurons could be one possible target as they are known to be modulated by 5-HT (Zhong et al., 2006a), and since we previously established in the neonatal rat that a partial or complete hemicord section suppressed the phase delays between sacral segments (Falgairolle and Cazalets, 2007).

In conclusion, the present paper provides new data on the coordinating processes between spinal cord networks. We demonstrate that each of three amines 5-HT, DA, and NA, when associated with EAA receptor agonists elicits a specific locomotor pattern whose temporal characteristics, motor burst amplitude and intersegmental phase relationships have a distinct signature. These differences are likely to be related to changing behavioral requirements. Furthermore, we find here that the various amines acting in combination do not elicit more robust locomotor-like activity than when bath-applied alone (i.e., more is not better!). The aminergic neuromodulators thus represent an important potential source of adaptive flexibility at the level of the underlying central neuronal networks and the motor output patterns they produce.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Simmers for correcting the English. We also thank P. Berrens and Warren Kovach for their advices on statistical methods. This work was funded in part by the Institut de Recherche sur la Moelle Epinière (IRME) and the Institute for Research in Paraplegia (IRP).

REFERENCES

- Akazawa, K., Aldridge, J. W., Steeves, J. D., and Stein, R. B. (1982). Modulation of stretch reflexes during locomotion in the mesencephalic cat. *J. Physiol.* 329, 553–567.
- Ballion, B., Morin, D., and Viala, D. (2001). Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1727–1738. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01794.x
- Barriere, G., Mellen, N., and Cazalets, J.-R. (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1325–1335. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03210.x
- Bartos, M., Manor, Y., Nadim, F., Marder, E., and Nusbaum, M. P. (1999). Coordination of fast and slow rhythmic neuronal circuits. *J. Neurosci.* 19, 6650–6660.
- Beato, M., Bracci, E., and Nistri, A. (1997). Contribution of NMDA and non-NMDA glutamate receptors to locomotor pattern generation in the neonatal rat spinal cord. *Proc. Biol. Sci.* 264, 877–884. doi: 10.1098/rspb.1997.0122
- Beato, M., and Nistri, A. (1998). Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT₁ receptor class. *Proc. Biol. Sci.* 265, 2073–2080. doi: 10.1098/rspb.1998.0542
- Berens, P. (2009). CircStat: a MATLAB toolbox for circular statistics. *J. Stat. Softw.* 31, 1–21.
- Berger, A. J., and Takahashi, T. (1990). Serotonin enhances a low-voltage-activated calcium current in rat spinal motoneurons. *J. Neurosci.* 10, 1922–1928.
- Beyeler, A., Metais, C., Combes, D., Simmers, J., and Le Ray, D. (2008). Metamorphosis-induced changes in the coupling of spinal thoraco-lumbar motor outputs during swimming in *Xenopus laevis*. *J. Neurophysiol.* 100, 1372–1383. doi: 10.1152/jn.00023.2008
- Cang, J., and Friesen, W. O. (2002). Model for intersegmental coordination of leech swimming: central and sensory mechanisms. *J. Neurophysiol.* 87, 2760–2769.
- Cattaert, D., and Clarac, F. (1983). Influence of walking on swimmeret beating in the lobster *Homarus gammarus*. *J. Neurobiol.* 14, 421–439. doi: 10.1002/neu.480140603
- Cazalets, J. R. (2000). "Organization of the spinal locomotor network in neonatal rat," in *Neurobiology of Spinal Cord Injury*, eds R. Kalb, and S. M. Strittmatter (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), 89–111. doi: 10.1007/978-1-59259-200-5_4
- Cazalets, J. R., Grillner, P., Menard, I., Cremieux, J., and Clarac, F. (1990). Two types of motor rhythm induced by NMDA and amines in an in vitro spinal cord preparation of neonatal rat. *Neurosci. Lett.* 111, 116–121. doi: 10.1016/0304-3940(90)90354-C
- Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., and Clarac, F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J. Physiol.* 455, 187–204.
- Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., and Magoul, R. (1999). Differential effects of potassium channel blockers on the activity of the locomotor network in neonatal rat. *Brain Res.* 827, 185–197. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01342-6
- Chrchri, A., and Neil, D. M. (1993). Interaction and synchronization between two abdominal motor systems in crayfish. *J. Neurophysiol.* 69, 1373–1383.
- Clemens, S., Belin-Rauscent, A., Simmers, J., and Combes, D. (2012). Opposing modulatory effects of D1- and D2-like receptor activation on a spinal central pattern generator. *J. Neurophysiol.* 107, 2250–2259. doi: 10.1152/jn.00366.2011
- Combes, D., Sillar, K. T., and Simmers, J. (2012). A switch in aminergic modulation of locomotor CPG output during amphibian metamorphosis. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* 4:1364–1374.
- Delvolle, I., Bem, T., and Cabelguen, J. M. (1997). Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltli*. *J. Neurophysiol.* 78, 638–650.
- De Sèze, M., Falgairolle, M., Viel, S., Assaiante, C., and Cazalets, J.-R. (2008). Sequential activation of axial muscles during different forms of rhythmic behavior in man. *Exp. Brain Res.* 185, 237–247. doi: 10.1007/s00221-007-1146-2
- Dietz, V. (2002). Do human bipeds use quadrupedal coordination? *Trends Neurosci.* 25, 462–467. doi: 10.1016/S0166-2236(02)02229-4
- Duenas, S. H., Loeb, G. E., and Marks, W. B. (1990). Monosynaptic and dorsal root reflexes during locomotion in normal and thalamic cats. *J. Neurophysiol.* 63, 1467–1476.
- Duysens, J., and Van de Crommert, H. W. (1998). Neural control of locomotion: the central pattern generator from cats to humans. *Gait Posture* 7, 131–141. doi: 10.1016/S0966-6362(97)00042-8
- El Manira, A., Tegner, J., and Grillner, S. (1994). Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *J. Neurophysiol.* 72, 1852–1861.
- Falgairolle, M., and Cazalets, J. R. (2007). Metachronal coupling between spinal neuronal networks during locomotor activity in newborn rat. *J. Physiol.* 580, 87–102. doi: 10.1113/jphysiol.2006.115709
- Falgairolle, M., Ceccato, J.-C., Seze, M. D., Herbin, M., and Cazalets, J.-R. (2013). Metachronal propagation of motor activity. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 18:820–837.
- Falgairolle, M., De Seze, M., Juvin, L., Morin, D., and Cazalets, J. R. (2006). Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *J. Physiol. Paris* 100, 304–316. doi: 10.1016/j.jphysparis.2007.05.003
- Faumont, S., Combes, D., Meyrand, P., and Simmers, J. (2005). Reconfiguration of multiple motor networks by short- and long-term actions of an identified modulatory neuron. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2489–2502. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04442.x
- Gabbay, H., Delvolle, I., and Lev-Tov, A. (2002). Pattern generation in caudal-lumbar and sacrococcygeal segments of the neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 88, 732–739.
- Gabbay, H., and Lev-Tov, A. (2004). Alpha-1 adrenoceptor agonists generate a "fast" NMDA receptor-independent motor rhythm in the neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 92, 997–1010. doi: 10.1152/jn.00205.2004

- Gestreau, C., Grelot, L., and Bianchi, A. L. (2000). Activity of respiratory laryngeal motoneurons during fictive coughing and swallowing. *Exp. Brain Res.* 130, 27–34. doi: 10.1007/s002210050003
- Gordon, I. T., and Whelan, P. J. (2006). Monoaminergic control of cauda-equina-evoked locomotion in the neonatal mouse spinal cord. *J. Neurophysiol.* 96, 3122–3129. doi: 10.1152/jn.00606.2006
- Gramsbergen, A., Geisler, H. C., Taekema, H., and Van Eykern, L. A. (1999). The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 112, 217–228. doi: 10.1016/S0165-3806(98)00184-9
- Grinsted, A., Moore, J. C., and Jevrejeva, S. (2004). NPG – Abstract – application of the cross wavelet transform and wavelet coherence to geophysical time series. *Nonlinear Process. Geophys.* 11, 561–566. doi: 10.5194/npg-11-561-2004
- Guertin, P. A. (2009). Recovery of locomotor function with combinatory drug treatments designed to synergistically activate specific neuronal networks. *Curr. Med. Chem.* 16, 1366–1371. doi: 10.2174/092986709787846541
- Han, P., Nakanishi, S. T., Tran, M. A., and Whelan, P. J. (2007). Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability. *J. Neurosci.* 27, 13192–13204. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1279-07.2007
- Hao, Z. Z., Spardy, L. E., Nguyen, E. B., Rubin, J. E., and Berkowitz, A. (2011). Strong interactions between spinal cord networks for locomotion and scratching. *J. Neurophysiol.* 106, 1766–1781. doi: 10.1152/jn.00460.2011
- Harris-Warrick, R. M. (2011). Neuromodulation and flexibility in central pattern generator networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 685–692. doi: 10.1016/j.conb.2011.05.011
- Islam, S. S., Zelenin, P. V., Orlovsky, G. N., Grillner, S., and Deliagina, T. G. (2006). Pattern of motor coordination underlying backward swimming in the lamprey. *J. Neurophysiol.* 96, 451–460. doi: 10.1152/jn.01277.2005
- Jamon, M., and Clarac, F. (1998). Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav. Neurosci.* 112, 1218–1228. doi: 10.1037/0735-7044.112.5.1218
- Jiang, Z., Carlin, K. P., and Brownstone, R. M. (1999). An in vitro functionally mature mouse spinal cord preparation for the study of spinal motor networks. *Brain Res.* 816, 493–499. doi: 10.1016/S0006-8993(98)01199-8
- Juvin, L., Simmers, J., and Morin, D. (2005). Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J. Neurosci.* 25, 6025–6035. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0696-05.2005
- Kawahara, K., Nakazono, Y., Yamauchi, Y., and Miyamoto, Y. (1989). Coupling between respiratory and locomotor rhythms during fictive locomotion in decerebrate cats. *Neurosci. Lett.* 103, 326–330. doi: 10.1016/0304-3940(89)90121-3
- Kiehn, O., and Kjaerulff, O. (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *J. Neurophysiol.* 75, 1472–1482.
- Kiehn, O., Sillar, K. T., Kjaerulff, O., and McDearmid, J. R. (1999). Effects of norepinephrine on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 82, 741–746.
- Kjaerulff, O., and Kiehn, O. (2001). 5-HT modulation of multiple inward rectifiers in motoneurons in intact preparations of the neonatal rat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 85, 580–593.
- Koehler, W. J., Schomburg, E. D., and Steffens, H. (1984). Phasic modulation of trunk muscle efferents during fictive spinal locomotion in cats. *J. Physiol.* 353, 187–197.
- Krenz, W. D., Parker, A. R., Rodgers, E. W., and Baro, D. J. (2014). Dopaminergic tone persistently regulates voltage-gated ion current densities through the D1R-PKA axis, RNA polymerase II transcription, RNAi, mTORC1, and translation. *Front. Cell. Neurosci.* 8:39. doi: 10.3389/fncel.2014.00039
- Kudo, N., and Yamada, T. (1987). N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro. *Neurosci. Lett.* 75, 43–48. doi: 10.1016/0304-3940(87)90072-3
- Landry, E. S., Lapointe, N. P., Rouillard, C., Levesque, D., Hedlund, P. B., and Guertin, P. A. (2006). Contribution of spinal 5-HT1A and 5-HT7 receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cord-transected mice. *Eur. J. Neurosci.* 24, 535–546. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04917.x
- Lapointe, N. P., and Guertin, P. A. (2008). Synergistic effects of D1/5 and 5-HT1A/7 receptor agonists on locomotor movement induction in complete spinal cord-transected mice. *J. Neurophysiol.* 100, 160–168. doi: 10.1152/jn.90339.2008
- Lapointe, N. P., Rouleau, P., Ung, R. V., and Guertin, P. A. (2009). Specific role of dopamine D1 receptors in spinal network activation and rhythmic movement induction in vertebrates. *J. Physiol.* 587, 1499–1511. doi: 10.1113/jphysiol.2008.166314
- Lapointe, N. P., Ung, R. V., Rouleau, P., and Guertin, P. A. (2008). Effects of spinal alpha(2)-adrenoceptor and I(1)-imidazoline receptor activation on hindlimb movement induction in spinal cord-injured mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 994–1006. doi: 10.1124/jpet.107.134874
- Leblond, H., L'esperance, M., Orsal, D., and Rossignol, S. (2003). Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse. *J. Neurosci.* 23, 11411–11419.
- Liu, J., Akay, T., Hedlund, P. B., Pearson, K. G., and Jordan, L. M. (2009). Spinal 5-HT7 receptors are critical for alternating activity during locomotion: in vitro neonatal and in vivo adult studies using 5-HT7 receptor knockout mice. *J. Neurophysiol.* 102, 337–348. doi: 10.1152/jn.91239.2008
- MacLellan, M. J., Ivanenko, Y. P., Cappellini, G., Sylos Labini, F., and Lacquaniti, F. (2011). Features of hand-foot crawling behavior in human adults. *J. Neurophysiol.* 107, 114–125. doi: 10.1152/jn.00693.2011
- Madriaga, M. A., McPhee, L. C., Chersa, T., Christie, K. J., and Whelan, P. J. (2004). Modulation of locomotor activity by multiple 5-HT and dopaminergic receptor subtypes in the neonatal mouse spinal cord. *J. Neurophysiol.* 92, 1566–1576. doi: 10.1152/jn.01181.2003
- Miles, G. B., and Sillar, K. T. (2011). Neuromodulation of vertebrate locomotor control networks. *Physiology (Bethesda)* 26, 393–411. doi: 10.1152/physiol.00013.2011
- Mor, Y., and Lev-Tov, A. (2007). Analysis of rhythmic patterns produced by spinal neural networks. *J. Neurophysiol.* 98, 2807–2817. doi: 10.1152/jn.00740.2007
- Morin, D., and Viala, D. (2002). Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs. *J. Neurosci.* 22, 4756–4765.
- Nakajima, T., Mezzarane, R. A., Klarner, T., Barss, T. S., Hundza, S. R., Komiyama, T., et al. (2013). Neural mechanisms influencing interlimb coordination during locomotion in humans: presynaptic modulation of forearm H-reflexes during leg cycling. *PLoS ONE* 8:e76313. doi: 10.1371/journal.pone.0076313
- Pearlstein, E., Ben Mabrouk, F., Pflieger, J. F., and Vinay, L. (2005). Serotonin refines the locomotor-related alternations in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1338–1346. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03971.x
- Rauscent, A., Einum, J., Le Ray, D., Simmers, J., and Combes, D. (2009). Opposing aminergic modulation of distinct spinal locomotor circuits and their functional coupling during amphibian metamorphosis. *J. Neurosci.* 29, 1163–1174. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5255-08.2009
- Rodgers, E. W., Krenz, W. D., and Baro, D. J. (2011). Tonic dopamine induces persistent changes in the transient potassium current through translational regulation. *J. Neurosci.* 31, 13046–13056. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2194-11.2011
- Rossignol, S. (1996). “Neural control of stereotypic limb movements,” in *Handbook of Physiology, Section 12. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*, eds B. Rowell and J. T. Sheperd (Bethesda, MD: American Physiological Society), 173–216.
- Schwartz, E. J., Gerachshenko, T., and Alford, S. (2005). 5-HT prolongs ventral root bursting via presynaptic inhibition of synaptic activity during fictive locomotion in lamprey. *J. Neurophysiol.* 93, 980–988. doi: 10.1152/jn.00669.2004
- Smarandache, C., Hall, W. M., and Mulloney, B. (2009). Coordination of rhythmic motor activity by gradients of synaptic strength in a neural circuit that couples modular neural oscillators. *J. Neurosci.* 29, 9351–9360. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1744-09.2009
- Smith, J. C., and Feldman, J. L. (1987). In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J. Neurosci. Methods* 21, 321–333. doi: 10.1016/0165-0270(87)90126-9
- Somjen, G. G. (1979). Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 41, 159–177. doi: 10.1146/annurev.ph.41.030179.001111
- Sqalli-Houssaini, Y., and Cazalets, J. R. (2000). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Res.* 852, 100–109. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02219-2
- Sqalli-Houssaini, Y., Cazalets, J. R., and Clarac, F. (1993). Oscillatory properties of the central pattern generator for locomotion in neonatal rats. *J. Neurophysiol.* 70, 803–813.
- Sqalli-Houssaini, Y., Cazalets, J. R., Fabre, J. C., and Clarac, F. (1991). A cooling/heating system for use with in vitro preparations: study of temperature effects on newborn rat rhythmic activities. *J. Neurosci. Methods* 39, 131–139. doi: 10.1016/0165-0270(91)90079-F

- Talpalari, A. E., and Kiehn, O. (2010). Glutamatergic mechanisms for speed control and network operation in the rodent locomotor CPG. *Front. Neural Circuits* 4:19. doi: 10.3389/fncir.2010.00019
- Thorstensson, A., Carlson, H., Zomlefer, M. R., and Nilsson, J. (1982). Lumbar back muscle activity in relation to trunk movements during locomotion in man. *Acta Physiol. Scand.* 116, 13–20. doi: 10.1111/j.1748-1716.1982.tb10593.x
- Torrence, C., and Compo, G. P. (2010). A practical guide to wavelet analysis. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 79, 61–78. doi: 10.1175/1520-0477(1998)079<0061:APGTWA>2.0.CO;2
- Wallen, P., Christenson, J., Brodin, L., Hill, R., Lansner, A., and Grillner, S. (1989). Mechanisms underlying the serotonergic modulation of the spinal circuitry for locomotion in lamprey. *Prog. Brain Res.* 80, 321–327; discussion 315–329. doi: 10.1016/S0079-6123(08)62227-X
- Wannier, T., Bastiaanse, C., Colombo, G., and Dietz, V. (2001). Arm to leg coordination in humans during walking, creeping and swimming activities. *Exp. Brain Res.* 141, 375–379. doi: 10.1007/s002210100875
- Whelan, P., Bonnot, A., and O'donovan, M. J. (2000). Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J. Neurophysiol.* 84, 2821–2833.
- Zehr, E. P., and Duysens, J. (2004). Regulation of arm and leg movement during human locomotion. *Neuroscientist* 10, 347–361. doi: 10.1177/1073858404264680
- Zhong, G., Diaz-Rios, M., and Harris-Warrick, R. M. (2006a). Intrinsic and functional differences among commissural interneurons during fictive locomotion and serotonergic modulation in the neonatal mouse. *J. Neurosci.* 26, 6509–6517. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1410-06.2006
- Zhong, G., Diaz-Rios, M., and Harris-Warrick, R. M. (2006b). Serotonin modulates the properties of ascending commissural interneurons in the neonatal mouse spinal cord. *J. Neurophysiol.* 95, 1545–1555. doi: 10.1152/jn.01103.2005
- Zhong, G., Masino, M. A., and Harris-Warrick, R. M. (2007). Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 27, 4507–4518. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0124-07.2007
- Zomlefer, M. R., Provencher, J., Blanchette, G., and Rossignol, S. (1984). Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats. *Brain Res.* 290, 249–260. doi: 10.1016/0006-8993(84)90942-9

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

Received: 23 April 2014; accepted: 30 July 2014; published online: 15 August 2014.

Citation: Beliez L, Barrière G, Bertrand SS and Cazalets J-R (2014) Multiple monoaminergic modulation of posturo-locomotor network activity in the newborn rat spinal cord. *Front. Neural Circuits* 8:99. doi: 10.3389/fncir.2014.00099

This article was submitted to the journal *Frontiers in Neural Circuits*.

Copyright © 2014 Beliez, Barrière, Bertrand and Cazalets. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Origin of thoracic spinal networks activity during locomotor-like activity in neonatal rat / Coupling of lumbar and thoracic networks during locomotor-like activity in neonatal rat

Abbreviated title: (50 characters max) **Lumbar locomotor CPG control of thoracic networks**

Beliez Lauriane, Barrière Grégory, Bertrand Sandrine S, Cazalets Jean-René

Affiliation: Université Bordeaux, CNRS UMR 5287, INCIA, Zone nord, Bat 2, 2e étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex France

Corresponding Author: Jean-René Cazalets, Université Bordeaux CNRS UMR 5287, INCIA, Zone nord, Bat 2, 2e étage, 146, rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

Telephone: +33 5.57.57.46.26

Fax: +33 5.56.90.14.21

E mail address: jean-rene.cazalets@u-bordeaux.fr

Manuscript: **24** pages

Number of figures: **8**

Number of table: 0

Abstract: **244** Words

Introduction: **483** words

Discussion: **1468** words

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement: The authors are very thankful to the IRME foundation (Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière et l'Encéphale) and the IRP foundation (Institut pour la Recherche sur la Paraplégie) for their funding contributions to this work. We are also grateful to Laura Cardoit for her help with immunohistological acquisition. The authors thank Aslak Grinsted for the matlab wavelet coherence package (<http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>) and Philipp Berens for the circular statistics toolbox (<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/10676-circular-statistics-toolbox-directional-statistics>).

Abstract (250 words max)

Effective quadrupedal locomotor behaviors require the coordination of many muscles from the limbs, back, neck and tail. Because of the spinal motoneuronal somatotopic organization, motor coordination implies interactions between distant spinal cord networks. In the present work, we have investigated part of the interactions between the lumbar locomotor network controlling limb movements and the thoracic networks in which motoneurons controlling axial muscles involved in trunk movement are located. For this purpose, we used an *in vitro* isolated newborn rat spinal cord (from T2 to sacrococcygeal). Using extracellular ventral root recordings, we showed that the isolated thoracic cord do not get the endogenous capacity to organize its own rhythmic locomotor-like pattern. Actually, thoracic locomotor bursts were less easily obtained than at the lumbar level and undoubtedly requires the pharmacological co-activation of the thoracic and lumbar segments. Blocking synaptic transmission in some thoracic areas revealed that the lumbar locomotor network could trigger locomotor bursting in distant thoracic segments through short and long propriospinal pathways. Patch clamp recordings of thoracic motoneurons revealed that 72% of them (locomotor-driven motoneurons) expressed membrane potential oscillations and spiking activity coordinated to the locomotor activity expressed in the lumbar cord. Although a biphasic excitatory/inhibitory synaptic drive has been previously shown in lumbar motoneurons, only a NMDA and non-NMDA receptors dependent glutamatergic excitatory drive could be clearly highlighted in thoracic locomotor-driven motoneurons. Finally, we found evidence that part of this locomotor drive involved a monosynaptic component coming directly from the lumbar locomotor network.

Introduction (500 words max)

Locomotor behaviors not only require the production of forces exerted towards the substrate to propel the body, but also the maintenance of the body balance that is dynamically challenged during each locomotor cycle. Kinematic and electromyographic analyses of locomotor behavior in vertebrates have shown that this is achieved through organized pattern of activation of hindlimbs, forelimbs and axial body segments muscles. This implies that synergistic operations take place between the supraspinal and spinal pre-motoneuronal networks involved in locomotion and posture (Grillner et al., 1995; Falgairolle et al., 2006; Rossignol et al., 2006; Deliagina et al., 2008).

Coordination of trunk and limb muscles during locomotion has been described in man (Thorstensson et al., 1982; Sèze et al., 2008; Ceccato et al., 2009), rat (Gramsbergen et al., 1999) and cat (Carlsson et al. 1979, Zomlefer, 1984), and evidence for a central coordination mechanism was obtained from experiments in cats (Koehler et al., 1984) and neonatal rats (Falgairolle and Cazalets, 2007). So far, however, most of our knowledge about the organization of the motor control of the trunk during locomotion derived from undulatory species in which the trunk is the core of the locomotor system (Roberts, 1990; Grillner, 2002; Falgairolle 2013, Cohen, 1987; Matsushima & Grillner, 1992; Roberts *et al.* 1998; McClellan & Hagevik, 1999; Grillner & Wallen, 2002; for review see Falgairolle et al., 2013). Surprisingly, little is known about the cellular mechanisms involved in the control of trunk movement during locomotion in limbed vertebrates.

Recently, using an isolated spinal cord preparation of newborn rat, we showed that the thoracic segments, in which back muscles motoneurons are distributed, displayed motor bursts with 1:1 phase relationship with lumbar motor bursts during locomotor-like activity (Falgairolle and Cazalets, 2007). Interestingly, we showed that the temporal organization of these *in vitro* activities, propagating in the caudo-rostral direction along the thoracic cord could account for the travelling bending wave observed along the body axis of rat pups during actual locomotor movements. This indicated that intraspinal coupling mechanisms might contribute to the coordination of the body segments observed during actual locomotion. In the present work, we have used the same preparation to go one step further in the identification of some of the mechanisms involved in the coupling of lumbar and thoracic activities during fictive locomotion. We provide evidence that the expression of a locomotor pattern at the thoracic level depends on the activation of the lumbar locomotor network itself. At the cellular level, we identified two thoracic motoneuron sub-populations: (1) locomotor driven motoneurons that displayed membrane potential oscillations and spiking activity in relationship with the locomotor cycle and (2) non locomotor driven motoneurons whose

membrane potential fluctuations and spiking activity were not correlated with locomotor-like activity. In the former group, we showed that part of the locomotor-related synaptic drive directly arises from the lumbar locomotor network whose command spreads up throughout thoracic segments via short and long propriospinal pathways.

Materials and methods

Experiments were performed from *in vitro* isolated spinal cord of newborn Sprague-Dawley rats aged from one to five post-natal days (P1-P5, n= 79 preparations). All procedures were conducted in accordance with the local ethics committee of the University of Bordeaux and the European Committee Council Directive. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals.

In vitro isolated spinal cord preparation. Rat pups were anesthetized using isofluorane until no reflexe could be elicited in response to tail or toe pinching. Animals were decapitated and the skin of the back removed before placing the preparations dorsal side up in a dissecting chamber. A laminectomy was performed to expose the spinal cord that was carefully dissected out using fine forceps and microscissors under a binocular magnifier. Dissections and recording procedures were performed under the continuous superfusion of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) equilibrated with 95%O₂-5%CO₂, pH7.4 at room temperature (24-26°C) and containing (in mM): NaCl 130, KCl 3, CaCl₂ 2.5, MgSo₄ 1.3, NaH₂PO₄ 0.58, NaHCO₃ 25 and glucose 10. Spinal cords were sectioned at the T2 level at the beginning of the experiment. In some experiments, the spinal cord was artificially partitioned using Vaseline walls as previously described (Cazalets et al., 1995), to restrict the bath application of pharmacological agents to specific spinal segments. The watertightness of the barriers was systematically checked at the end of the experiment by observing the movements of methylene blue added to the bathing medium on one side of the Vaseline bridge.

Electrophysiological recordings and analyses. To readily get access to axial muscle motoneurons, we developed a specific preparation in which a transverse section of the spinal cord at a given thoracic segment was performed using fine scissors (Moria, MC-26B). The cut surface of the spinal cord was positioned on a Sylgard block in order to be set upright and facilitate glass micro-electrode positioning (Fig4B). From the 59 motoneurons used in the present study, 32 were patch clamp recorded in whole cell configuration and 27 recorded with intracellular sharp microelectrodes using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular device, USA). Motoneurons were identified by the presence of antidromic action potentials elicited by

segmental ventral root stimulations. Only motoneurons with a resting membrane potential below -50 mV and a spike amplitude of at least 50 mV were considered. Patch clamp glass microelectrodes (4-7M Ω) were filled with the following solution (in mM): K-gluconate 120, KCl 20, MgCl₂ 0.1, EGTA 1, HEPES 10, CaCl₂ 0.1, 0.1mM GTP, 0.2mM cAMP, 0.1mM Leupeptin, 77mM d-Mannitol, and 3mM Na₂-ATP, pH 7.3. Sharp glass microelectrodes (70M Ω) were filled with 2M K acetate. Extracellular motor activities were recorded from various spinal cord ventral roots using vaseline-insulated stainless steel pin electrodes for long ventral roots at the lumbar level and glass suction electrodes for the short thoracic ventral roots. Extracellular activities were amplified using custom-made amplifiers. Electrophysiological recordings were digitized using an A/D interface (Heka, Germany) driven by the Axograph software (Axograph, AU). Extracellular raw signals were high-passed (50Hz), rectified and integrated before analysis. Locomotor parameters were computed using custom-made routines written in Matlab (Mathworks). Mean cycles were computed using one L2 ventral root as the reference because it invariably exhibited the best signal-to-noise ratio (see Fig 1). Wavelet transform analyses (Mor and Lev-Tov, 2007) were performed using the Matlab wavelet coherence package provided by Aslak Grinsted (<http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>). A detailed explanation of the wavelet based methodology used in the present work had been previously presented by Mor and Lev-Tov (2007, see also (Torrence and Compo, 1998; Grinsted et al., 2004). For this purpose, raw extracellular signals were high-passed (50Hz), rectified and smoothed. Each pre-treated signal was decomposed in the frequency domain over time using continuous wavelet transform (Morlet wavelet, 10 octaves per scale). Cross-wavelet and wavelet coherence algorithms were applied to paired pre-treated signals to highlight common high power frequencies (color coded) and significant correlation (color coded) between each frequency component between signals over time. The changes in rhythmic activity frequencies and the coherence and phase relationships between signals were then extracted from region of interests defined from maps combining the results of the cross wavelet and wavelet coherence (Mor and Lev-Tov, 2007).

Pharmacology. Episodes of locomotor-like activities were elicited by exogenous application of a mixture of 15 μ M N-methyl-D,L-aspartate (NMA, Sigma) and 15 μ M serotonin (5-HT, Sigma, Sqalli-Houssaini et al., 1991). Glycinergic receptors were blocked using strychnine (1 μ M, Sigma) and glutamatergic NMDA and non-NMDA receptors by the (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (APV, 0.5 μ M, Sigma) and the 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 0.5 μ M, Sigma) respectively. We have also occasionally replaced the normal saline by a

modified aCSF that contains a low calcium / high magnesium concentrations (0.1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂) to locally block the chemical synaptic transmission (Richards and Sercombe, 1970; Morin and Viala, 2002) or by an isotonic sucrose solution (339 mM in distilled water, adjusted to pH7.4) to reversibly block neuronal activity in some segments (Sqalli-Houssaini et al., 1993). A high cation-containing aCSF (7.5mM CaCl₂ and 8mM MgSO₄) was also used to decrease polysynaptic transmission in spinal segments (Berry and Pentreath, 1976; Jahr and Yoshioka, 1986; Cazalets et al., 1995).

Immunocytochemistry: Spinal cords were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4°C, cryoprotected in 20% sucrose, embedded in OCT Tissue-Tek, frozen and cut transversally on a cryostat (30µM). The slices were mounted on slides and processed for Choline Acetyl Transferase (ChAT) immunodetection using a goat anti-CHAT antibody (1/100, Millipore) revealed with an Alexa fluor 488 donkey anti-goat secondary antibody (1/500). Images of ChAT-immunopositive cells were acquired with a Nikon AZ100M microscope.

Statistical analysis: Statistical analyses were performed on raw data with non-parametric t-tests using Prism software (Graphpad). Wilcoxon matched pairs test was used to compare two series of data. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to test more than two groups. The level of significance was set at $p < 0.05$. All data are expressed as means \pm SEM in the text and in the figures. The asterisks in the figures indicate positive significance levels, and the numbers in or above the histogram bars refer to the number of neurons tested. Circular statistics were performed using the Circular statistic toolbox in Matlab (Berens, 2009) and Oriana (Kovach Computing Services).

Retrograde labeling of back muscles motoneurons: Neonatal rats (P1 to P3) were anesthetized with isoflurane until the loss of reflex movement in response to tail or toe pinching, and then placed on a cold pad. Small incisions of the skin were made to expose back muscles. Crystals of the retrograde tracer, cholera toxin β subunit Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes, OR, USA) were carefully inserted using insect pins into right back muscles at different levels along the axis. The skin was bonded with surgical glue and pups were progressively warmed up and checked during the recovery from the anesthetic before returning to their mother. Two days after tracer injection, pups were anesthetized using isoflurane, their spinal cord dissected out and post-fixed in 4% paraformaldehyde in

0.2M phosphate buffer. After dehydration, the spinal cord was cut and prepared for choline acetyl transferase (ChAT) immunocytochemistry.

Results

Coordination of thoraco-lumbar activity pattern during fictive locomotion

In this series of experiments, locomotor-like activity was elicited from isolated spinal cord preparations using exogenous applications of NMA (15 μ M) and serotonin (5-HT, 15 μ M). When bath-applied to the whole thoraco-lumbo-sacral spinal cord, this cocktail elicited sustained episodes of stable locomotor-like activity at the lumbar level in all the preparations tested ($n=79$, mean period 3.32 ± 0.09 s) characterized by a bilateral alternation of segmental motor bursts together with homolateral alternation of flexor-like and extensor-like motor bursts recorded from the L2 and L5 ventral roots respectively. In this experimental condition, thoracic ventral roots showed rhythmical bursting activities in 46/79 preparations (58%, Figure 1A). In the remaining 33/79 preparations, the locomotor activity recorded at the lumbar level did not spread up to the thoracic segments where a tonic activity was only observed (data not shown). In the 46 preparations from which thoracic motor bursts could be evoked, we computed the level of tonic depolarization from baseline materialized by the gray area below each rectified and smoothed ventral roots recordings in the left panel of Figure 1B. The ratio between the burst amplitude and the tonic background level of the recorded activities was smaller in the thoracic than in the lumbar segments. On average, the mean ratio obtained from L2 ventral roots in all experiments ($n= 46$ preparations, $1.75 \pm 0,08$) was significantly greater than the mean ratio obtained from pooled thoracic recordings (1.09 ± 0.01 , $p<0.0001$, Mann–Whitney test). A serotonergic activation of sympathetic related neurons in the intermediolateral cell column at the thoracic level may contribute to decrease the ratio at this level (Pierce et al., 2010). In this context, we decided to use wavelet transform based method to investigate the relationships of thoracic and lumbar activities. This methodology is indeed more accurate than conventional manually or semi-automated burst detection methods especially when one is dealing with low signal to noise ratio recordings (Mor and Lev-Tov, 2007). Using this method one can get access to the evolution of the frequency content of the signal over time. Of particular interest is the possibility to extract using cross wavelet transform (XWT) and wavelet coherence (WC) the common power, correlation and phase between two signals acquired simultaneously (Torrence and Compo, 1998; Grinsted et al., 2004). This is illustrated in Figure 1C (top panel) in which the time-frequency map presented between 0.0625 and 2 Hz was obtained by a XWT of the bilateral L2 ventral roots recordings presented in figure 1A. From this time-frequency map, in

which the power of each frequency is coded from cold (low power) to hot (high power) colors, we can see that both L2 share a high power in a frequency band ranging from 0.25 to 0.4 Hz. This band was included in an area within which both signals were highly coherent as shown from the coherence spectrum obtained using wavelet coherence (Figure 1C, middle panel). For convenience, the cross-wavelet and coherence spectrums were combined so as to remove non-coherent areas from the cross wavelet spectrum (Mor and Lev-Tov, 2007), Figure 1C, bottom map). From this map, we defined a region of interest (dashed white rectangle) from which the locomotor frequency (0.28 ± 0.01 Hz, mean \pm SD) and coherence values (0.96 ± 0.01 , mean \pm SD) were extracted (from the cross wavelet and coherence spectrum, respectively) and plotted over time (Figure 1C, bottom plot). Finally, we could extract from the cross wavelet transform the phase relationship between both L2 ($172.2 \pm 8.6^\circ$, mean \pm SD) within the frequency range of interest. The polar plots in Figure 1D present the phase relationships between all recorded ventral roots and the right L2 taken as reference using the same procedure. It indicates that bursting activity recorded at the thoracic level were phase-locked to the lumbar locomotor activity. As previously observed there was a progressive caudo-rostral propagation of motor bursts along the thoracic segments (Falgairolle and Cazalets, 2007; Beliez et al., 2014). Indeed, computing the phase relationships between the bursting activity recorded from the various ventral roots and the right L2 showed that the phase value increased from caudal to rostral ipsilateral thoracic segments (rT12/rL2, $17.8 \pm 10.2^\circ$; rT10/rL2, $40.7 \pm 11.7^\circ$; rT6/rL2, $62.0 \pm 12.5^\circ$; rT4/rL2, $63.2 \pm 16.8^\circ$). In addition to the segmental alternating activity (lL2/rL2, $172.3 \pm 8.6^\circ$) and between homolateral extensor-like and flexor-like activities (rL5/rL2, $155.3 \pm 9.8^\circ$) during fictive locomotion, segmental thoracic bursts also alternated as shown by the opposite direction of the mean vector computed from the left T12 and right T12 bursting activities and the right L2 (lT12/rL2, $175.5 \pm 11.8^\circ$; rT12/rL2, $17.8 \pm 10.2^\circ$).

Conditional rhythmogenic capacity of the isolated thoracic cord

To investigate the rhythmogenic capacity of the thoracic segments, the spinal cord was artificially partitioned at the T12/T13 level (n=28 preparations) so as to restrict the bath application of NMA/5-HT to the thoracic or lumbosacral segments. In control condition, i.e. when NMA/5HT was bath applied in both compartments, the rhythmic activity in the two regions was synchronized (Figure 2A1). In the same preparations, restricting the NMA/5-HT bath-application to the lumbosacral segments triggered locomotor-like activity at the lumbar level while the thoracic segments remained silent (Figure 2A2). In this later case, however, the lumbar locomotor period (2.68 ± 0.14 s, n=28 preparations) was significantly decreased

compared to control (3.16 ± 0.14 s, $p < 0.05$, paired t-test), indicating that the thoracic segments contribute to regulate the cycle duration of the lumbar locomotor network (Figure 2B). In all cases, applying NMA/5-HT to the single thoracic segments only triggered a tonic activity at the thoracic level and failed to initiate any rhythmical activity (Figure 2A3).

In a previous work, we have shown that the thoracic cord was nonetheless able to generate rhythmic bursting when isolated from the lumbar enlargement by a transection of the cord at the T12/T13 level (Falgairolle and Cazalets, 2007). In the present work, following the same transection, NMA/5-HT bath-application elicited rhythmic activity in 6/18 preparations as illustrated in Figure 2C1-C2. In control condition, i.e. before transection, NMA/5-HT applied over the whole spinal cord triggered coordinated locomotor bursting activities between the thoracic and lumbar cord (Figure 2C1). Following the transection, a new application of NMA/5-HT elicited a slow rhythmic bursting activity at the thoracic level that was no longer related to lumbar locomotor-like activity (Figure 2C2). The thoracic and lumbar cycle periods were significantly increased (7.87 ± 0.87 s, $n = 62$ cycles) and decreased (2.6 ± 0.01 s, $n = 202$ cycles) respectively, compared to the control cycle period measured before transection (3.00 ± 0.09 s, $n = 51$ cycles, $p < 0.05$, Mann-Whitney test). Under the same condition however, 12/18 preparations only expressed a tonic activity following the transection. In these later preparations, increasing the excitability of the thoracic networks by adding a GABAergic antagonist (gabazine, $1 \mu\text{M}$) to the NMA/5-HT containing saline solution triggered a slow motor activity ($n = 9$ preparations, 7.82 ± 0.76 s) similar to the one described above (data not shown).

Because the use of transection in this preparation can lead to an underestimation of the endogenous rhythmic capacities of restricted spinal cord segments (Juvin et al., 2005), we also bath-applied NMA/5-HT to the thoracic cord after a blockade of neuronal activity with an isotonic sucrose solution superfused on the lumbo-sacral segments (see Material and Methods). Under this condition, we observed the same slow pattern of thoracic bursting than observed after transection (compare Figure 2D1-D2), with a significant increase of the bursting period ($n = 7$ preparations, 8.23 ± 1.06 s) compared to the control locomotor period (3.57 ± 0.37 s).

The coordinating mechanisms between the thoracic and lumbar networks may involve long ascending propriospinal pathways and/or segmentally relayed ascending inputs propagating from one thoracic segment to another. In order to test these hypotheses, the spinal cord was artificially divided in three compartments (T3-T5, T6-T11, T12-cauda equina) using Vaseline walls. In all 6 preparations tested, applying NMA/5-HT simultaneously in the three compartments triggered coordinated locomotor bursts along the spinal cord (Figure

3A). A blockade of synaptic activity by local application of low Ca^{2+} /high Mg^{2+} containing-aCSF over the T6-T11 segments did not prevent the expression of locomotor bursting in the upper thoracic segments that remained locked to the lumbar activity (Figure 3B). This synaptic blockade of interposed thoracic relays, elicited, however, a significant phase shift ($p < 0.005$, Watson U^2 test) of upper thoracic motor bursting at the T5 (mean phase value: control, $54.0 \pm 28.8^\circ$; low Ca^{2+} /high Mg^{2+} , $122.4 \pm 39.6^\circ$) and T3 (mean phase value : control, $79.2 \pm 43.2^\circ$; low Ca^{2+} /high Mg^{2+} , $140.4 \pm 39.6^\circ$, Figure 3C) levels. This indicates that both long ascending propriospinal fibers and segmentally relayed ascending information contribute to the coordination of thoracic and lumbar bursting activities.

Localization of thoracic motoneurons innervating paraspinal back muscles

In a previous study, we have shown that motoneurons innervating back muscles (*longissimus* and *multifidus dorsalis* muscles) were organized in column along the thoraco-lumbar spinal cord (Falgairolle and Cazalets, 2007), but their location in the transversal plane was not defined. Prior to achieve intracellular recordings from axial thoracic motoneurons, it was a prerequisite to precisely determine where they are located in the spinal cord. Choline acetyl-transferase immunolabelling revealed the two main motoneuronal populations in lamina IX (Figure 4A, left panel) along the thoracic cord. In order to locate back muscles motoneurons, Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin β subunit (CT β -AF 488) crystals were inserted into the *longissimus* and *multifidus dorsalis* muscles on one side ($n=3$ preparations). In agreement with the literature (Smith and Hollyday, 1983), retrogrady labeled motoneuron somata from these muscles (Figure 4A, middle panel) were exclusively located in the ventromedian motoneuronal population (Figure 4A, right panel).

Locomotor and non locomotor-driven thoracic motoneurons

Intracellular patch clamp recordings from motoneurons were performed along the thoracic cord (from T3 to T12) to investigate the activity of thoracic axial motoneurons during episodes of locomotor-like activity. For this purpose, we used a spinal cord preparation that was transversally cut at various recording levels so that ventromedially located motoneurons could be visually targeted (see Methods, Figure 4B). Our results are based on the recordings made from 59 antidromically identified thoracic motoneurons (Figure 4B, left trace) that could be recorded for more than 1h.

During NMA/5-HT bath-application to the thoraco-lumbo-sacral spinal cord preparations, we found that 25/33 of recorded motoneurons fired action potentials bursts coordinated to the locomotor activity recorded from the lumbar ventral roots. Figure 4C

provides a representative example of the changes that occurred in a thoracic *locomotor-driven* motoneuron when the locomotor networks were activated. During the first few minutes of NMA/5-HT application, a tonic activity was observed in the ventral roots before a stable locomotor activity took place at the lumbar level. Concomitantly, the thoracic motoneuron membrane potential underwent a gradual depolarization associated with an increase of synaptic inputs (data not shown; see also Figure 6A). Thereafter, motoneurons started to fire action potentials during the depolarization phase of membrane potential oscillations (Figure 4C, middle panel). Plots of spike distribution during the various motor cycle phases (arbitrarily divided into 10 bins; Figure 4C, right panel) showed a clear locomotor-related modulation. In contrast, in the remaining 8/33 thoracic *non-locomotor driven* motoneurons, the spiking activity was uniformly distributed and was not related to any particular phase of the motor cycle (Figure 4D, right panel).

In order to assess whether the absence of bursting activity in thoracic ventral roots observed following the restricted pharmacological activation of lumbo-sacral segments was due to sub-threshold activation of thoracic motoneurons, we performed intracellular recordings from thoracic motoneurons (Figure 5). When an NMA/5-HT-supplemented aCSF was specifically superfused on the lumbo-sacral cord, 13 motoneurons out of the 25 tested presented membrane potential oscillations that were rhythmically synchronized with the locomotor-like activity recorded at the lumbar level. In the representative example provided in Figure 5A1, membrane potential oscillations appeared clearly time locked to the L2 ventral root bursting activity. The bottom panel of Figure 5A illustrates both the mean extracellular activity and intracellular voltage variations recorded during one locomotor cycle (repeated two fold). The remaining 12/25 motoneurons tested in the same experimental conditions did not demonstrate any membrane potential oscillation (Figure 5B1). The motoneuron nature, i.e. *locomotor-driven* and *non locomotor-driven*, was not affected by the experimental condition, i.e. NMA/5-HT applied over the thoraco-lumbar segments or at the lumbar level alone (n= 20 motoneurons), indicated that two functionally different thoracic motoneuronal populations co-exist. From the 59 motoneurons recorded in one or both experimental conditions, 38 (64%) were locomotor-driven motoneurons as they expressed phasic membrane potential oscillations coordinated to the locomotor pattern, while the remaining 21 motoneurons did not express any coordinated activity during locomotor-like activity (Figure 5C). These observations suggest that the absence of extracellular motor burst reported when the single lumbo-sacral cord was pharmacologically activated is primarily due to a subthreshold activation of thoracic motoneurons. Interestingly, the proportion of locomotor-driven motoneurons is not uniform along the thoracic cord since we observed that

the proportion decreases in the caudo-rostral direction (T8-T10: 81%, T6-T7: 64%, T3-T5: 50%, $p < 0.0001$, Chi Square, Figure 5D).

Characterization of the locomotor synaptic drive in thoracic motoneurons

To determine the nature of the synaptic drive received by *locomotor-driven* motoneurons ($n=6$ from 6 different preparations), the spinal cord was partitioned with a Vaseline wall at the T12/T13 level to selectively bath-apply receptors antagonists to the thoracic level during locomotor episodes elicited by NMA/5-HT superfusion to the lumbosacral cord (Figure 6). Figure 6A1 presents a T7 motoneuron recorded the course of a locomotor episode. This slow time scale shows that motoneuron membrane potential shows a slow depolarization of 6 mV during the establishment of the locomotor activity. An expanded view of the sequence (Fig. 6B1) revealed locomotor-related membrane potential oscillations (5.9 ± 0.23 mV, $n=30$ cycles) on top of the slow depolarization. Following the bath-application of the AMPA/Kainate receptor antagonist, DNQX ($5\mu\text{M}$), to the thoracic compartment, both the slow depolarization and the locomotor-related oscillations amplitude were decreased by 13% (5.2 mV) and 59% (2.4 ± 0.08 mV, $n=29$ cycles) respectively (Fig. 6A2-B2). The subsequent addition of the NMDA receptor antagonist, AP5 ($5\mu\text{M}$) to the DNQX-containing saline, further decreased the amplitude of the slow depolarization (1.9 mV, $\sim 68\%$ decrease from the control depolarization) and phasic drive (1.8 ± 0.07 mV, 69% decrease compared to control amplitude, $n=29$ cycles, Figure 6A3-B3). We also found that thoracic motoneurons receive glycinergic inputs during locomotor like activity. In the T10 motoneuron presented in Figure 6C1, the phasic membrane potential oscillations were abolished when strychnine ($2\mu\text{M}$) was added to the DNQX-AP5 containing saline superfused to the thoracic compartment (Fig. 6C2). Altogether, these experiments indicate that the synaptic drive sustaining the phasic activity of locomotor-driven motoneurons at the thoracic level is mediated through the activation of NMDA / non NMDA glutamatergic receptors and glycinergic receptors.

The lumbar locomotor network sends a monosynaptic drive to thoracic motoneurons.

Finally, we tested whether the locomotor synaptic drive received by locomotor-driven thoracic motoneurons directly originates from the lumbar locomotor network. Following the induction of fictive locomotion by the selective superfusion of NMA/5-HT on the lumbo-sacral segments, the effects of the bath-application of a high cation containing aCSF, known to depress polysynaptic transmission (Berry and Pentreath, 1976; Jahr and Yoshioka, 1986; Cazalets et al., 1995), to the thoracic cord was tested in intracellularly recorded locomotor-

driven thoracic motoneurons (n= 5 from 5 different preparations). Figure 7 shows the locomotor synaptic drive of a T5 motoneuron in control condition (Figure 7A) and in the presence of the high cation-containing aCSF (Figure 7B). While the synaptic drive received by the motoneuron was strongly depressed (4.95 ± 0.15 mV in control condition, 2.49 ± 0.04 mV in the presence of the high cation solution), it was still possible to discriminate locomotor related synaptic inputs when thoracic relays were depressed (Figure 7C). On average, the amplitude of the locomotor drive was decreased by $43.2 \pm 21.5\%$ (n=5 motoneurons) by the high cation-containing solution compared to control condition. This observation thus provides evidence that part of the locomotor synaptic drive sent by the lumbar central pattern generator (CPG) to the thoracic *locomotor-driven* motoneurons is monosynaptic.

Discussion (1468 words max)

One of the main results of the study, which are summarized in the diagram in Figure 8, is that the lumbar central pattern generator for locomotion makes an important contribution to the emergence of locomotor-like activities at the thoracic level. Using combined intracellular recordings of thoracic motoneurons, and pharmacological manipulation of the thoracic segments, we have shown that part of the thoracic motoneurons, referred as locomotor-driven motoneurons, express locomotor-related membrane potential oscillations. Membrane potential oscillation in these later motoneurons are biphasic including an excitatory and an inhibitory phase of glutamatergic and glycinergic origin, respectively. Importantly, we showed for the first time that the lumbar locomotor network itself is directly impinging onto thoracic motoneurons and contributed to the drive of their membrane potential oscillations.

Caudo-rostral organization of axial thoracic bursts during fictive locomotion

In the isolated neonatal rat spinal cord, although the cervical, lumbar and sacrococcygeal networks controlling the fore-, hindlimbs and tail locomotor movements, respectively, can be independently activated (Cazalets et al., 1995; Lev-Tov et al., 2000; Ballion et al., 2001; Gabbay et al., 2002), they produce a coordinated activity when simultaneously stimulated (Kremer and Lev-Tov, 1997; Cazalets and Bertrand, 2000a; 2000b; Gabbay et al., 2002; Juvin et al., 2005; 2012). Here, we focused on the thoracic networks involved in the control of axial back muscles. Using simultaneous extracellular ventral root recordings from various spinal segments we confirmed that thoracic segments can be pharmacologically activated and express a bursting activity with a 1:1 phase relationship with the lumbar fictive locomotor output (Falgairolle and Cazalets, 2007). Using continuous wavelet transform analyses, a set of objective mathematical analytical tool

validated in the field (Figure 1, (Torrence and Compo, 1998; Grinsted et al., 2004; Mor and Lev-Tov, 2007; Hägglund et al., 2013; Talpalar et al., 2013), we also confirmed that the thoracic locomotor bursts were organized as ascending travelling wave along the thoracic cord during fictive locomotion. This ascending organization of the thoracic axial bursts that matched the bending of the body axis during actual locomotor cycles in rat pups contrasts with the rostro-caudal direction of the travelling wave during forward locomotion in swimming vertebrates (Wallén and Williams, 1984; Tunstall and Roberts, 1991; Matsushima and Grillner, 1992; Masino, 2005; Gabriel et al., 2007). Consequently, it appears that the wave propagation of locomotor bursts along the axial system is one basic locomotor mechanism in vertebrates that was adapted during evolution to sustain the development of limb-based propulsion modes (Delvolvé et al., 1997).

Lumbar locomotor network control of thoracic locomotor activities

In contrast with the cervical, lumbar and sacral regions of the spinal cord (Cazalets et al., 1995; Lev-Tov et al., 2000; Ballion et al., 2001; Gabbay et al., 2002), the endogenous rhythmogenic capacity of the thoracic networks is highly dependent on lumbar spinal cord networks. Indeed, the activation of lumbar segments is needed to observe locomotor like activities in thoracic segments. The present data further suggest that the lumbo-sacral region exerts a tonic inhibitory influence over the thoracic segments as non locomotor bursting activity could be observed in thoracic ventral roots only when thoracic segments are physically or pharmacologically isolated from the lumbo-sacral spinal cord (Figure 2, see also (Cowley and Schmidt, 1997; Kremer and Lev-Tov, 1997; Falgairolle and Cazalets, 2007). We have recently demonstrated that rhythmogenic capabilities and coordinations between the various spinal levels is function of the neurochemical compounds used to elicit fictive locomotion (Beliez et al., 2014). Although the NMA/5-HT cocktail used in the present work was the most appropriate pharmacological means to trigger robust locomotor pattern in the thoracic area in the whole spinal cord preparation (Beliez et al., 2014), further work will be needed to investigate further the rhythmogenic capabilities of isolated thoracic circuits, as it has been done for the sacrococcygeal networks (Kremer and Lev-Tov, 1997; Cazalets and Bertrand, 2000a; Gabbay et al., 2002).

The expression of thoracic locomotor activity involved ascending propriospinal pathways arising from lumbar segments (Reed et al., 2006; 2009; Brockett et al., 2013; Reed and Magnuson, 2013). In agreement with previous observations made in the lamprey spinal networks (Hagevik and McClellan, 1999; Miller and Sigvardt, 2000), long ascending pathways were sufficient to maintain a 1:1 coordination between the locomotor activity of the

rostral thoracic and lumbar cord segments, when synaptic transmission was blocked in interposed segments in the neonatal rat spinal cord (Figure 3). Also similar to what has been reported in the lamprey (Hagevik and McClellan, 1999; Miller and Sigvardt), segmentally relayed information contributed to set the timing of thoracic motor outputs in the rat spinal cord (Hagevik and McClellan, 1999; Miller and Sigvardt, 2000; Cazalets, 2005; Falgairolle and Cazalets, 2007). These observations further emphasize the importance of these two kinds of pathways (long and segmental) to the coordination of spinal networks. They have indeed been previously shown to be involved cervical and lumbar locomotor network interactions (Juvin et al., 2005; 2012) and in conveying descending supraspinal locomotor commands (Courtine et al., 2008; Cowley et al., 2008; Zaporozhets et al., 2011).

We found that the locomotor period was decreased when the lumbosacral segments were activated independently from the thoracic networks (Figure 3). This result suggests that thoracic neuron excitability impacts and modulates the lumbar CPG motor output. The relationships between the thoracic and lumbar networks then appear reciprocal. Overall, our data, however, do not challenge the asymmetrical nature of the relationship between the lumbar locomotor network and the cervical, thoracic and sacral motor networks, the former imposing more of its own rhythm and/or contributing to set the temporal bursting patterns of the others (Kremer and Lev-Tov, 1997; Cazalets and Bertrand, 2000a; 2000b; Gabbay et al., 2002; Juvin et al., 2005).

The locomotor drive received by thoracic motoneurons

Intracellular recording from thoracic motoneurons revealed two different populations along the thoracic cord (Figure 4-5). The first population gathers locomotor-driven motoneurons that express phasic membrane potential oscillation during fictive locomotion, while the second population regroups non-locomotor driven motoneurons which did not exhibit any locomotor related synaptic drive. It is likely that locomotor-driven motoneurons may correspond to ventromedial motoneurons innervating back/abdominal muscles that have been shown to be rhythmically active during locomotion (Carlson et al., 1979; Thorstensson et al., 1982; Smith and Hollyday, 1983; Zomlefer et al., 1984; Carlson et al., 1988; Delvolvé et al., 1997; Gramsbergen et al., 1999; Sèze et al., 2008; Hu et al., 2012). Conversely, non-locomotor driven motoneurons could correspond to motoneurons innervating respiratory muscles located more dorsally and laterally in the lamina IX (Tani et al., 1994; Giraudin et al., 2008). However, we cannot rule out that in our experimental conditions, the number of locomotor-driven motoneurons may have been underestimated. First, the fact that their proportion decreased caudorostrally along the spinal cord (Figure 5) raises the possibility

that part of them, especially in rostral segments, could be recruited when the cervical locomotor network is active (Ballion et al., 2001). Second, the recruitment of segmental thoracic motoneurons may not be uniform along the cord (Tunstall and Roberts, 1994; Menelaou and McLean, 2012). For instance, the recruitment of specific axial motoneurons during swimming in larval zebrafish was shown to result from complex interactions between motoneuron endogenous properties and synaptic strength of incoming inputs (Tunstall and Roberts, 1994; Menelaou and McLean, 2012).

The locomotor drive recorded from thoracic motoneurons was biphasic, including an excitatory and an inhibitory component (Figure 6). This locomotor drive is similar to the one that has been described in lumbar motoneurons (Cazalets et al., 1996). Interestingly, we showed that the lumbar locomotor network connects monosynaptically the thoracic motoneurons (Figure 7). The reduced amplitude of membrane potential oscillations observed when polysynaptic transmission was blocked in the thoracic cord indicates that the thoracic circuitry actually contributed to the synaptic driving force. To our knowledge, we provide here the first evidence that the lumbar locomotor network can contribute to the timing of motor output produced in distant segments through a dual access to pre-motoneuronal and motoneuronal elements. Further work will be required to evaluate whether the lumbar locomotor network can also get access to sacral and cervical motoneurons.

Conclusion

Although the trunk plays a central role in posture and limbed locomotion, while supporting and integrating the mechanical work of the limbs and contributing to gait pattern adaptation (Carlson et al., 1988; Sèze et al., 2008; Schmidt and Fischer, 2010), the thoracic networks controlling trunk muscles remained so far largely unstudied in mammals. In this context, we have gone one step further in the understanding of the functional coupling between the lumbar locomotor network and the axial thoracic networks. We showed that the lumbar locomotor network plays a central role in the generation of locomotor outputs in the thoracic cord by acting at both the pre-motoneuronal and motoneuronal level. This work is part of a global approach of the functioning of the spinal networks (Juvin et al., 2005; Falgairolle et al., 2006; Falgairolle and Cazalets, 2007; Juvin et al., 2012) the understanding of which will be probably helpful to design innovative therapeutic strategies to restore motor activities following spinal cord injuries (Bjerkefors et al., 2009).

References

- Ballion B, Morin D, Viala D (2001) Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 14:1727–1738.
- Beliez L, Barrière G, Bertrand SS, Cazalets J-R (2014) Multiple monoaminergic modulation of posturo-locomotor network activity in the newborn rat spinal cord. *Front Neural Circuits* 8:99.
- Berens P (2009) CircStat: A MATLAB Toolbox for Circular Statistics. *Journal of Statistical Software* 31:1–21.
- Berry MS, Pentreath VW (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res* 105:1–20.
- Bjerkefors A, Carpenter MG, Cresswell AG, Thorstensson A (2009) Trunk muscle activation in a person with clinically complete thoracic spinal cord injury. *J Rehabil Med* 41:390–392.
- Brockett EG, Seenan PG, Bannatyne BA, Maxwell DJ (2013) Ascending and descending propriospinal pathways between lumbar and cervical segments in the rat: Evidence for a substantial ascending excitatory pathway. *Neuroscience* 240:83–97.
- Carlson H, Halbertsma J, Zomlefer M (1979) Control of the trunk during walking in the cat. *Acta Physiol Scand* 105:251–253.
- Carlson H, Thorstensson A, Nillson J (1988) Lumbar back muscle activity during locomotion: effects of voluntary modifications of normal trunk movements. *Acta Physiol Scand* 133:343–353.
- Cazalets J-R (2005) Metachronal propagation of motoneurone burst activation in isolated spinal cord of newborn rat. *J Physiol (Lond)* 568:583–597.
- Cazalets JR, Bertrand S (2000a) Coupling between lumbar and sacral motor networks in the neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 12:2993–3002.
- Cazalets JR, Bertrand S (2000b) Ubiquity of motor networks in the spinal cord of vertebrates. *Brain Res Bull* 53:627–634.
- Cazalets JR, Borde M, Clarac F (1995) Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J Neurosci* 15:4943–4951.
- Cazalets JR, Borde M, Clarac F (1996) The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurons in the newborn rat. *J Neurosci* 16:298–306.
- Ceccato J-C, Sèze M de, Azevedo C, Cazalets J-R (2009) Comparison of Trunk Activity during Gait Initiation and Walking in Humans. *PLoS ONE* 4.
- Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, Qi J, Edgerton VR, Sofroniew MV (2008) Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* 14:69–74.
- Cowley KC, Schmidt BJ (1997) Regional distribution of the locomotor pattern-generating

- network in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 77:247–259.
- Cowley KC, Zaporozhets E, Schmidt BJ (2008) Propriospinal neurons are sufficient for bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord. *J Physiol (Lond)* 586:1623–1635.
- Deliagina TG, Beloozerova IN, Zelenin PV, Orlovsky GN (2008) Spinal and supraspinal postural networks. *Brain Research Reviews* 57:212–221.
- Delvolvé I, Bem T, Cabelguen JM (1997) Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*. *J Neurophysiol* 78:638–650.
- Falgairolle M, Cazalets J-R (2007) Metachronal coupling between spinal neuronal networks during locomotor activity in newborn rat. *J Physiol (Lond)* 580:87–102.
- Falgairolle M, de Seze M, Juvin L, Morin D, Cazalets J-R (2006) Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *J Physiol Paris* 100:304–316.
- Gabbay H, Delvolvé I, Lev-Tov A (2002) Pattern Generation in Caudal-Lumbar and Sacrococcygeal Segments of the Neonatal Rat Spinal Cord. *J Neurophysiol* 88:732.
- Gabriel JP, Mahmood R, Walter AM, Kyriakatos A, Hauptmann G, Calabrese RL, Manira EI A (2007) Locomotor Pattern in the Adult Zebrafish Spinal Cord In Vitro. *J Neurophysiol* 99:37–48.
- Giraudin A, Cabirol-Pol M-J, Simmers J, Morin D (2008) Intercostal and abdominal respiratory motoneurons in the neonatal rat spinal cord: spatiotemporal organization and responses to limb afferent stimulation. *J Neurophysiol* 99:2626–2640.
- Gramsbergen A, Geisler HC, Taekema H, van Eykern LA (1999) The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 112:217–228.
- Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, Manira EI A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN, Wallén P (1995) Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* 18:270–279.
- Grinsted A, Moore JC, Jevrejeva S (2004) Application of the cross wavelet transform and wavelet coherence to geophysical time series. HAL - CCSD.
- Hagevik A, McClellan AD (1999) Coordination of locomotor activity in the lamprey: role of descending drive to oscillators along the spinal cord. *Exp Brain Res* 128:481–490.
- Häggglund M, Dougherty KJ, Borgius L, Itohara S, Iwasato T, Kiehn O (2013) Optogenetic dissection reveals multiple rhythmogenic modules underlying locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:11589–11594.
- Hu H, Meijer OG, Hodges PW, Bruijn SM, Strijers RL, Nanayakkara PWB, van Royen BJ, Wu WH, Xia C, van Dieën JH (2012) Control of the lateral abdominal muscles during walking. *Human Movement Science* 31:880–896.
- Jahr CE, Yoshioka K (1986) Ia afferent excitation of motoneurons in the in vitro new-born rat spinal cord is selectively antagonized by kynurenate. *J Physiol (Lond)* 370:515–530.
- Juvin L, Le Gal J-P, Simmers J, Morin D (2012) Cervicolumbar coordination in mammalian

- quadrupedal locomotion: role of spinal thoracic circuitry and limb sensory inputs. *Journal of Neuroscience* 32:953–965.
- Juvin L, Simmers J, Morin D (2005) Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J Neurosci* 25:6025–6035.
- Koehler WJ, Schomburg ED, Steffens H (1984) Phasic modulation of trunk muscle efferents during fictive spinal locomotion in cats. *J Physiol (Lond)* 353:187–197.
- Kremer E, Lev-Tov A (1997) Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *J Neurophysiol* 77:1155–1170.
- Lev-Tov A, Delvolve I, Kremer E (2000) Sacrocaudal Afferents Induce Rhythmic Efferent Bursting in Isolated Spinal Cords of Neonatal Rats. *J Neurophysiol* 83:888.
- Masino MA (2005) Fictive Swimming Motor Patterns in Wild Type and Mutant Larval Zebrafish. *J Neurophysiol* 93:3177–3188.
- Matsushima T, Grillner S (1992) Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord. *J Neurophysiol* 67:373–388.
- Menelaou E, McLean DL (2012) A gradient in endogenous rhythmicity and oscillatory drive matches recruitment order in an axial motor pool. *Journal of Neuroscience* 32:10925–10939.
- Miller WL, Sigvardt KA (2000) Extent and Role of Multisegmental Coupling in the Lamprey Spinal Locomotor Pattern Generator. *J Neurophysiol* 83:465–476.
- Mor Y, Lev-Tov A (2007) Analysis of Rhythmic Patterns Produced by Spinal Neural Networks. *J Neurophysiol* 98:2807.
- Morin D, Viala D (2002) Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs. *J Neurosci* 22:4756–4765.
- Pierce ML, Deuchars J, Deuchars SA (2010) Spontaneous rhythmogenic capabilities of sympathetic neuronal assemblies in the rat spinal cord slice. *Neuroscience* 170:827–838.
- Reed WR, Magnuson DSK (2013) Cervical response among ascending ventrolateral funiculus pathways of the neonatal rat. *Brain Res* 1491:136–146.
- Reed WR, Shum-Siu A, Onifer SM, Magnuson DSK (2006) Inter-enlargement pathways in the ventrolateral funiculus of the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 142:1195–1207.
- Reed WR, Shum-Siu A, Whelan A, Onifer SM, Magnuson DSK (2009) Anterograde labeling of ventrolateral funiculus pathways with spinal enlargement connections in the adult rat spinal cord. *Brain Res* 1302:76–84.
- Richards CD, Sercombe R (1970) Calcium, magnesium and the electrical activity of guinea-pig olfactory cox in vitro. *J Physiol (Lond)* 211:571–584.
- Rossignol S, Dubuc R, Gossard J-P (2006) Dynamic sensorimotor interactions in locomotion.

Physiol Rev 86:89–154.

- Schmidt A, Fischer MS (2010) Arboreal locomotion in rats - the challenge of maintaining stability. *Journal of Experimental Biology* 213:3615–3624.
- Sèze M de, Falgairolle M, Viel S, Assaiante C, Cazalets J-R (2008) Sequential activation of axial muscles during different forms of rhythmic behavior in man. *Exp Brain Res* 185:237–247.
- Smith CL, Hollyday M (1983) The development and postnatal organization of motor nuclei in the rat thoracic spinal cord. *J Comp Neurol* 220:16–28.
- Talpalar AE, Bouvier J, Borgius L, Fortin G, Pierani A, Kiehn O (2013) Dual-mode operation of neuronal networks involved in left–right alternation. *Nature*.
- Tani M, Kida MY, Akita K (1994) Relationship between the arrangement of motoneuron pools in the ventral horn and ramification pattern of the spinal nerve innervating trunk muscles in the cat (*Felis domestica*). *Exp Neurol* 128:290–300.
- Thorstensson A, Carlson H, Zomlefer MR, Nilsson J (1982) Lumbar back muscle activity in relation to trunk movements during locomotion in man. *Acta Physiol Scand* 116:13–20.
- Torrence C, Compo GP (1998) *A Practical Guide to Wavelet Analysis*. *Bull Am Meteorol Soc* 79:61–78.
- Tunstall MJ, Roberts A (1991) Longitudinal coordination of motor output during swimming in *Xenopus* embryos. *Proc Biol Sci* 244:27–32.
- Tunstall MJ, Roberts A (1994) A longitudinal gradient of synaptic drive in the spinal cord of *Xenopus* embryos and its role in co-ordination of swimming. *J Physiol (Lond)* 474:393–405.
- Wallén P, Williams TL (1984) Fictive locomotion in the lamprey spinal cord in vitro compared with swimming in the intact and spinal animal. *J Physiol (Lond)* 347:225–239.
- Zaporozhets E, Cowley KC, Schmidt BJ (2011) Neurochemical excitation of propriospinal neurons facilitates locomotor command signal transmission in the lesioned spinal cord. *J Neurophysiol* 105:2818–2829.
- Zomlefer MR, Provencher J, Blanchette G, Rossignol S (1984) Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats. *Brain Res* 290:249–260.

Figure legends

Figure 1. Thoraco-lumbar bursting coordination during fictive locomotion. (A) Schematic diagram of the experimental procedure (left panel). Simultaneous recordings from lumbar and thoracic ventral roots during an episode of locomotor-like activity induced by NMA ($15\mu\text{M}$) and 5-HT ($15\mu\text{M}$) (right panel). (B) High passed, rectified and smoothed traces (Left panel) taken from the sequence presented in A (grayed area). The right panel illustrates the mean normalized cycle repeated 2 times ($n=63$ cycles, right L2 taken as reference). (C) Example of the wavelet analysis performed between pairs of recordings. Cross wavelet transform (upper panel) and wavelet coherence between bilateral L2 activities revealed the common high power frequencies and correlation between signals over time, respectively. Frequencies' power and coherence between traces are color-coded with warm and cool colors indicating high and low values, respectively. Black contours delimitate areas within the 5% significance level. Regions of interest (ROI, white dashed rectangle) were defined from the map obtained while mixing the results of the cross-wavelet and wavelet coherence (bottom map). Arrows indicate the phase relationship between each significant frequency components (the left direction indicating out of phase relationship). Bottom graphs illustrate the evolution of the frequency (black markers) and coherence (red markers) over time within the ROI. Each marker represents the mean values obtained using bins of 1s. (D) Polar plot representations of the phase relationships between the bursting activities recorded from various ventral roots and the right L2. The direction and length of the red arrows indicates the mean phase value (normalized from 0 to 1) and the r value, respectively. Raw values distribution is also provided as histograms (using bins of 5°). r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 2. Conditional rhythmogenic capabilities of thoracic spinal segments. (A) Raw or integrated (\int) extracellular activities recorded coordinated rhythmical motor bursts recorded from the left thoracic T7 and left and right lumbar L2 ventral roots in the presence of NMA ($15\mu\text{M}$) and 5-HT ($15\mu\text{M}$) on the whole spinal cord (A1), on lumbar (A2) or on thoracic segments (A3). (B) Plot of the locomotor period as a function of the experimental condition (NMA/5-HT on the whole preparation or to the lumbar part, $n=28$ preparations). (C-D) Extracellular activities recorded from T10 or T8 and bilateral L2 ventral roots during NMA/5-HT applied to the whole spinal cord in control conditions (C1-D1), after a T12/T13 section (C2) or in the presence of a sucrose block on the lumbar segments (D2). r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 3. Evidence of long ascending pathways between lumbar and thoracic networks. (A) Coordinated locomotor-like activities recorded at different the thoraco-lumbar levels triggered by NMA/5-HT bath -applied to the whole spinal cord preparation. (B) Effects of the synaptic transmission blockade in T6-T12 segments with a low Ca^{2+} /high Mg^{2+} -containing aCSF on the NMA/5-HT induced locomotor activity. Note the absence of bursting activity on T9. (C) Polar plots of the phase relationships between T3 (bottom panels) or T5 (upper panels) and right L2 locomotor bursts taken as reference before (control, left panels) and after synaptic transmission blockade in mid thoracic segments (low Ca^{2+} /high Mg^{2+} , right panels). Note the clockwise shift of the mean phase observed at both thoracic levels in the presence of the low Ca^{2+} /high Mg^{2+} solution. r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 4. Localization and intracellular characterization of thoracic motoneurons. (A) Localization of motoneurons innervating axial back muscles in the T12 segment. Photomicrographs of choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactivity in T12 (A1) showing the ventromedial and lateral motoneuronal populations in lamina IX detailed at higher magnification in the upper left inset. (A2) Motoneurons retrogradely labeled with cholera toxin β subunit Alexa Fluor 488 conjugate (CT β) injected into back muscles. (A3) The merge panel shows that back muscles motoneurons are located in the ventral part of the ventromedial motoneuronal population. Arrows in A2 and A3 point to double labeled motoneurons. (B) Schematic of the experimental procedure (left panel). The spinal cord was transected at a given thoracic segment and placed on a sylgard support to access motoneurons with intracellular electrodes. Motoneurons were identified by the presence of antidromic action potential recorded in response to stimulations of the corresponding ventral root (right panel). (C-D) Diagrams of the experimental procedure (left panels). Fictive locomotion was induced by bath-applying NMA/5-HT to the whole spinal cord preparation. Extracellular recordings were performed from the left and right L2 ventral roots and thoracic motoneurons were intracellularly recorded at different thoracic levels. Representative traces recorded from a T9 motoneuron that rhythmically emitted burst of action potential in phase with the locomotor cycle, referred to as a locomotor driven motoneuron, and a T5 motoneuron that exhibited action potentials independently from the locomotor activity (D) therefore qualified as a non locomotor driven motoneuron. Bar histograms in right panels represent the number of spikes emitted during the locomotor cycle (normalized and averaged from the left L2 bursting activity and arbitrarily split into 10 subphases, top trace). The thick black line in the graph indicates the percentage of cycles during which almost one action potential was emitted in the various locomotor cycle subphases. r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 5. Restricted pharmacological activation of lumbar locomotor networks triggers membrane potential oscillations in thoracic locomotor driven motoneurons. (A1-B1) Schematic of the experimental procedure. A vaseline wall was built at the T12 level as to be able to activate the lumbar segments separately from the thoracic cord. Extracellular recordings were performed from the left and right L2 ventral roots and intracellular recordings from motoneurons were performed at different thoracic levels. the mixture of NMA/5-HT was applied to the lumbar cord to induce fictive locomotion. Representative traces of intracellularly recorded motoneurons that exhibited (A2, locomotor driven motoneurons, Mn) or that did not exhibited (B2, non locomotor driven Mn) locomotor membrane potential oscillations in this experimental condition. (A3-B3) Mean locomotor burst and synaptic drive computed from the recordings presented in A2 and B2 respectively. (C) Percentage of locomotor-driven motoneurons showing a synaptic drive in phase with the ipsi- (grey) or contralateral (white) L2 locomotor bursts. (D) Cumulative histograms of the percentages of locomotor-driven (black) and non locomotor-driven motoneurons in the upper (T3-T5), intermediate (T6-T7) and lower (T8-T10) thoracic segments. Numbers in brackets indicate the number of motoneurons. r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 6. Characterization of the synaptic drive received by locomotor-driven thoracic motoneurons. (A) Time courses of the overall membrane potential depolarization recorded from a T7 motoneuron from the onset to the end of a locomotor episode induced by restricted applications of NMA/5-HT to the lumbar cord in control condition (A1), and during thoracic bath-application of DNQX (5 μ M) alone (A2) or combined with AP5 (5 μ M, A3). Note the decreased amplitude of the slow depolarization in the presence of DNQX and DNQX/AP5. (B) Sequences of locomotor-like activity extracted from the episodes presented in A showing the membrane potential oscillations phased-locked to the locomotor activity. Bottom panels illustrate the mean cycle (repeated 4 times) obtained using the left L2 as reference in control condition and in the presence of DNQX and DNQX/AP5 at the thoracic level. (C) Representative traces of a thoracic motoneuron (T10) recorded during NMA/5-HT induced locomotion in control condition (C1) and in the presence of Strychnine (2 μ M), DNQX (5 μ M) and AP5 (5 μ M, C2) applied to the thoracic segments. r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 7. Monosynaptic contribution of the lumbar locomotor network to the synaptic driving of thoracic motoneurons. (A) Membrane potential oscillations recorded from a T8 motoneuron during NMA/5-HT induced locomotor-like activity in the lumbar spinal cord. (B)

Although decreased in amplitude a locomotor synaptic drive is still observed in the same motoneuron when a high cations containing solution is applied to the thoracic segment to depress polysynaptic pathways. (C) Mean synaptic drive computed from the recordings presented in A and B in normal aCSF (black trace) and in high cation-containing aCSF (grey trace). r, right; l, left; T, thoracic, L, lumbar.

Figure 8. Schematic diagram summarizing the relationships between the lumbar locomotor network and the thoracic circuitry. The lumbar locomotor network drives the thoracic activity while acting at both the premotoneuronal (dark grey) and motoneuronal levels through short and long propriospinal pathways. The descending arrow indicates that the thoracic networks can modulate the period of the activity generated by the lumbar locomotor network.

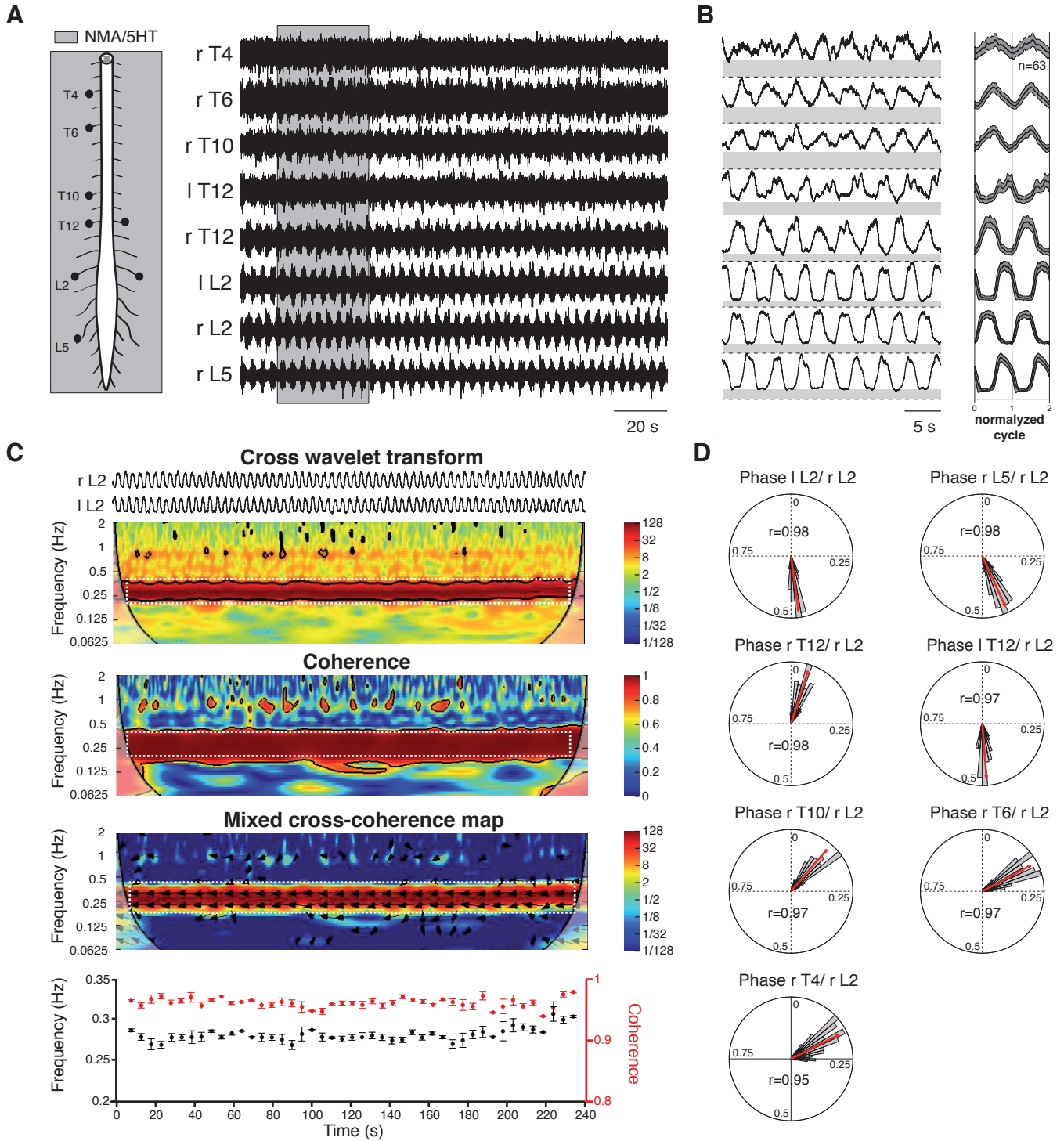


Figure 1

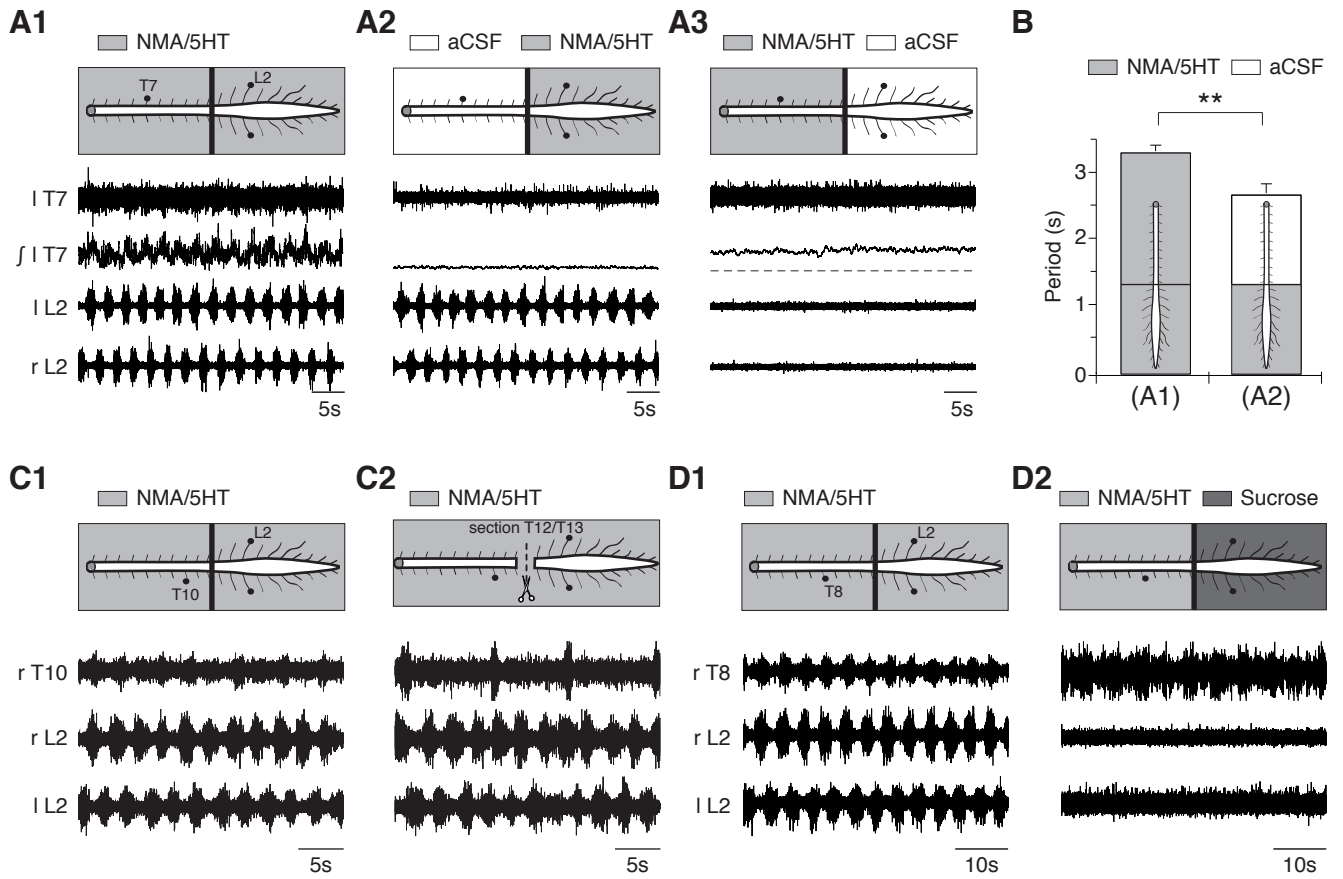


Figure 2

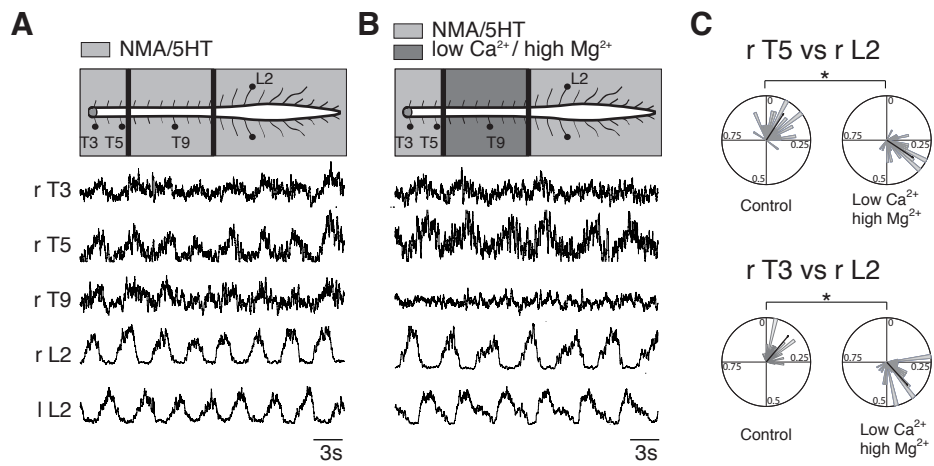


Figure 3

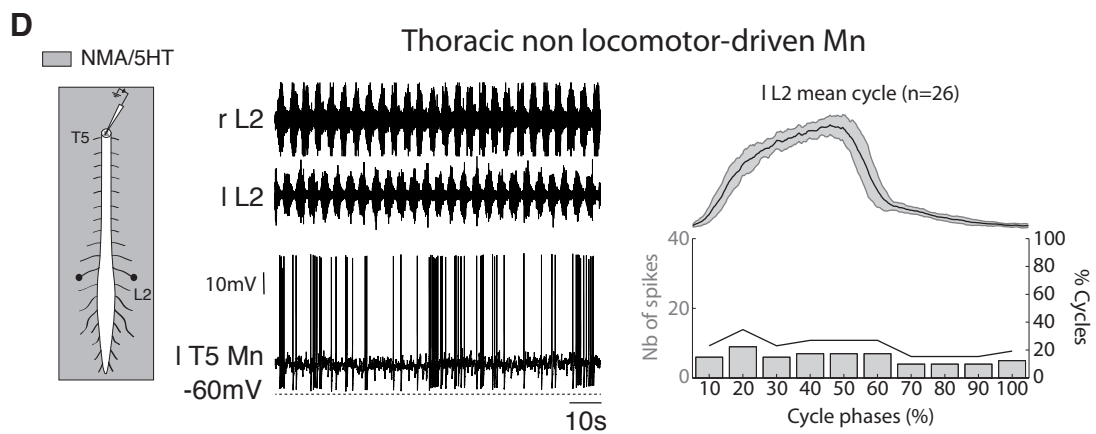
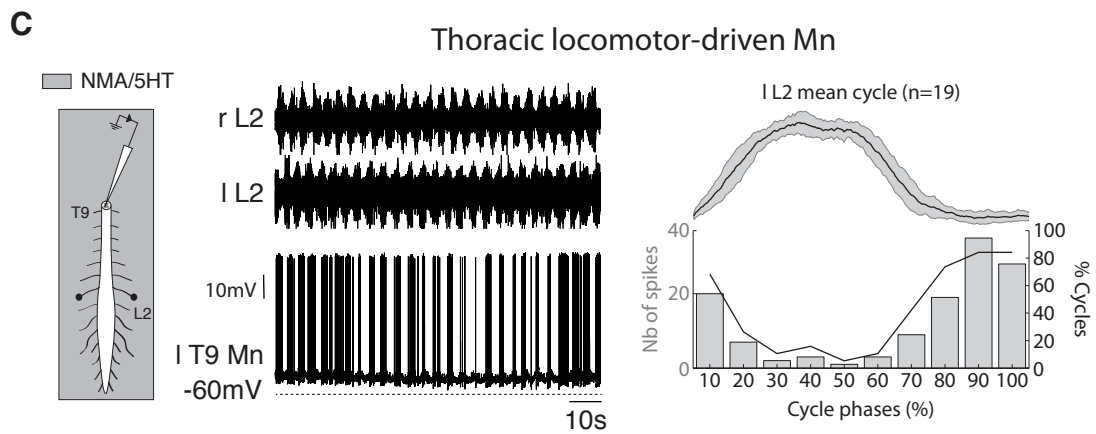
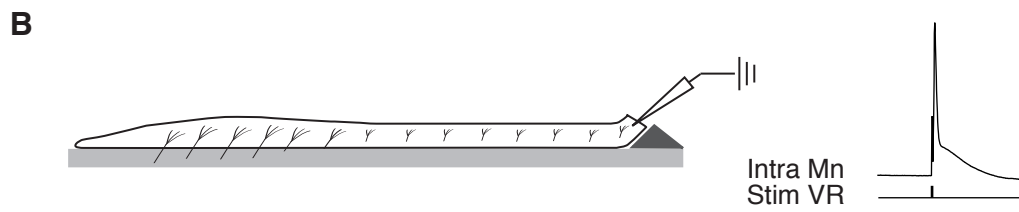
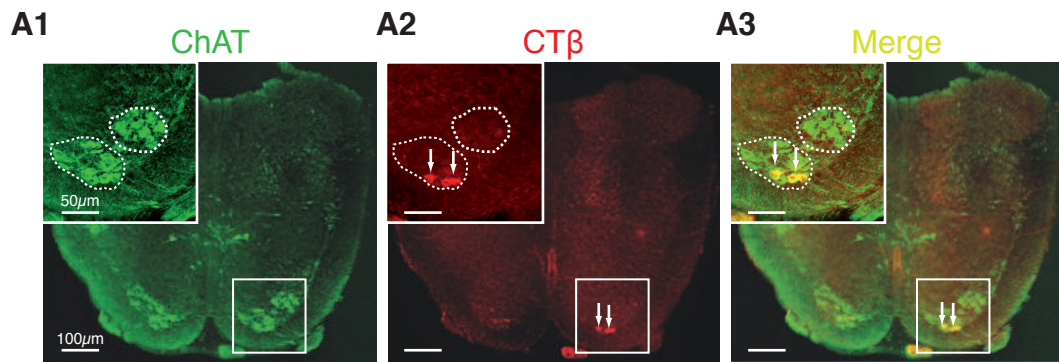


Figure 4

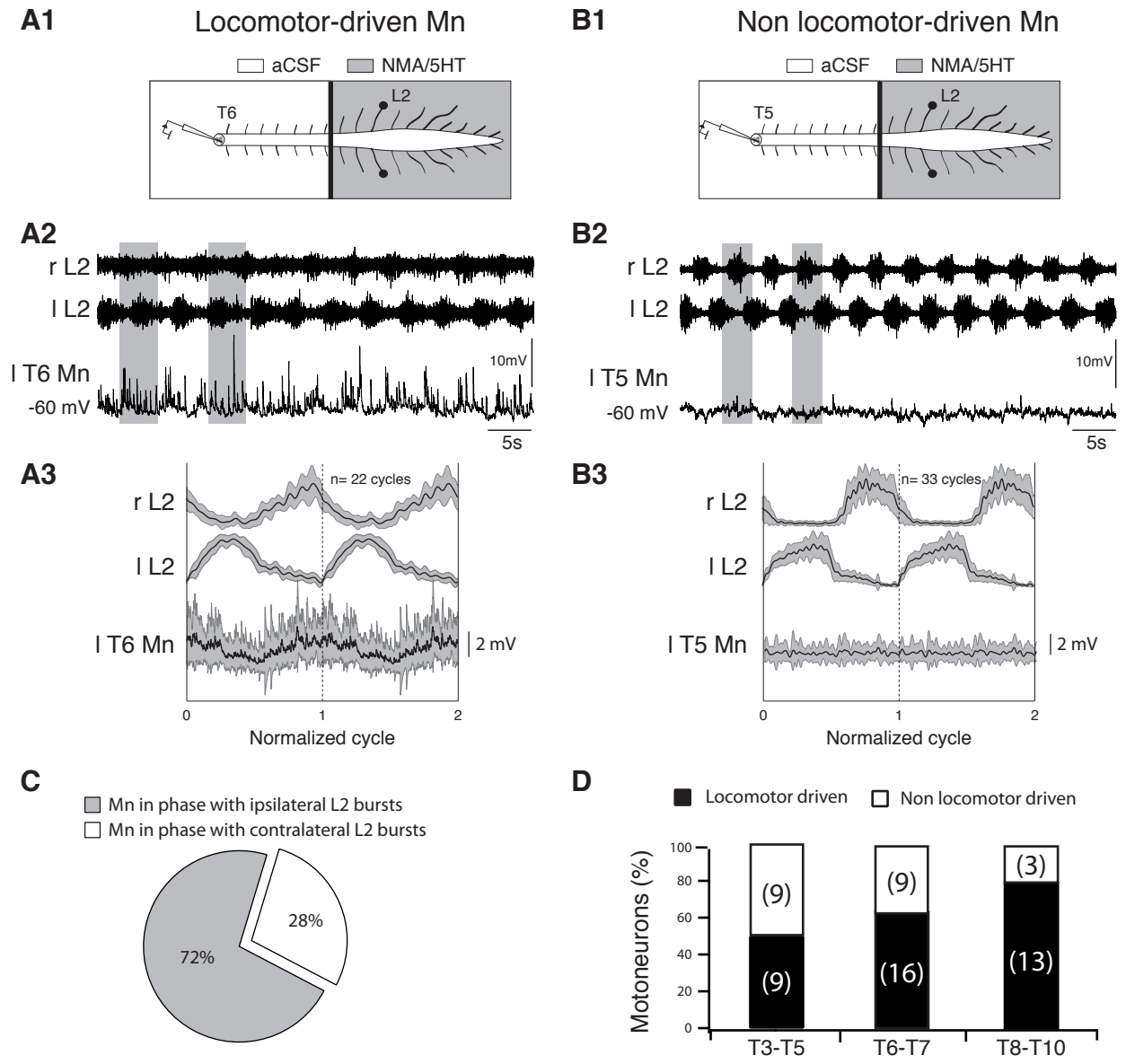


Figure 5

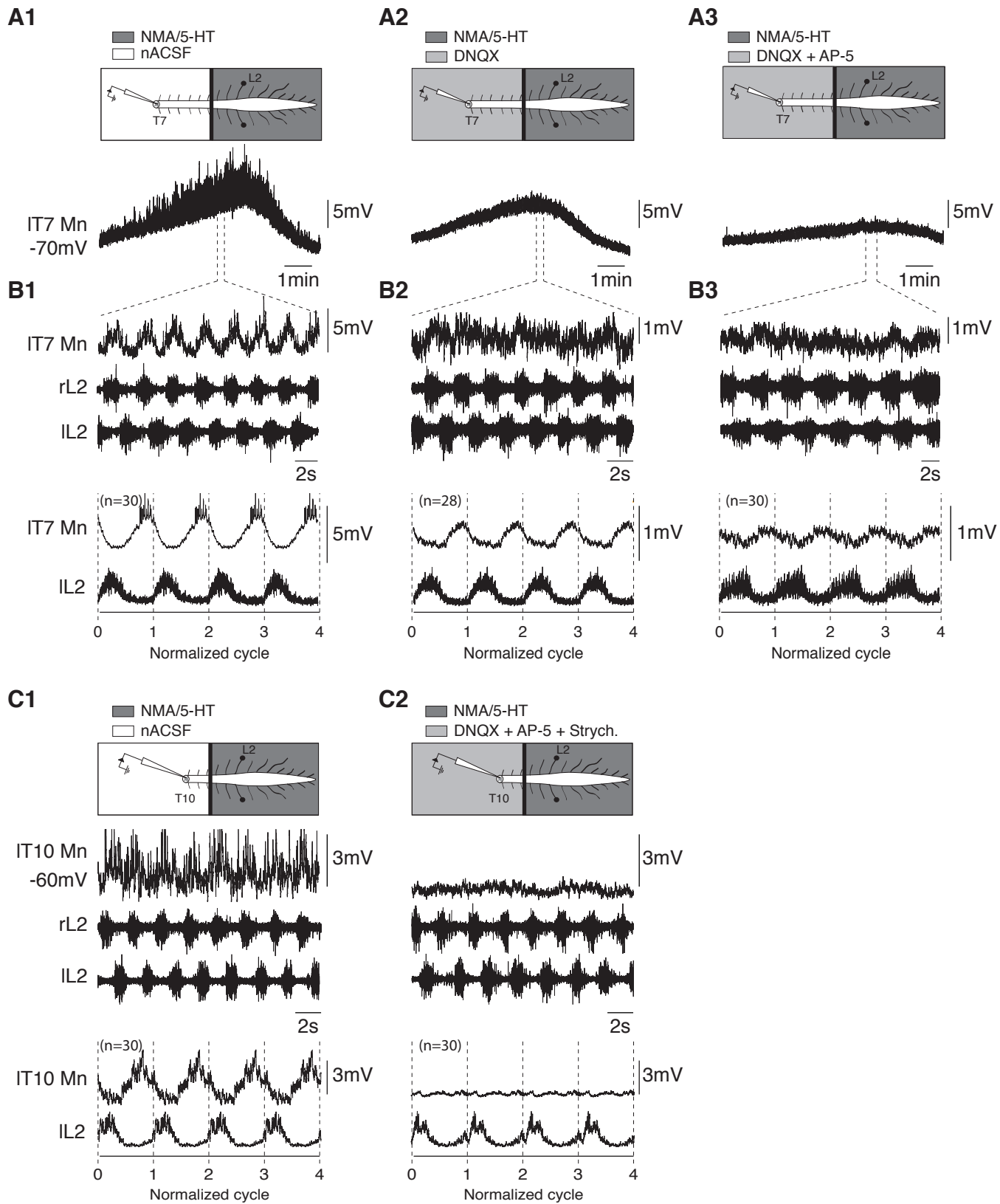


Figure 6

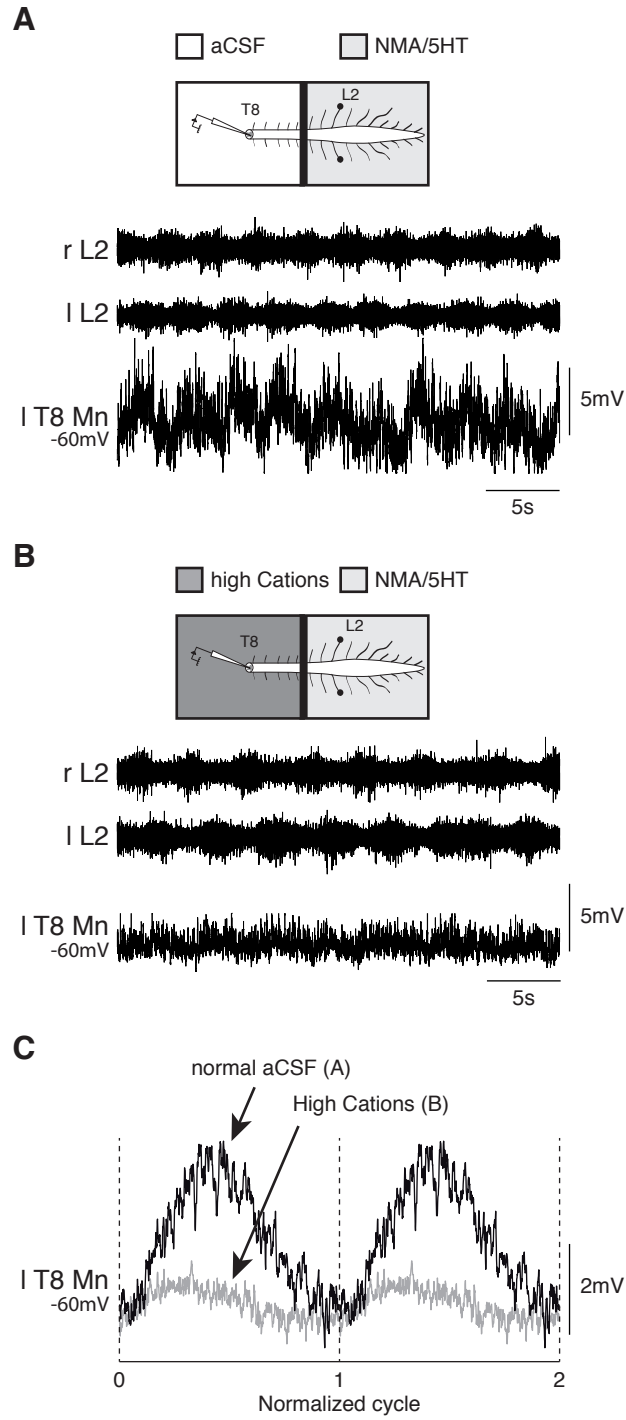


Figure 7

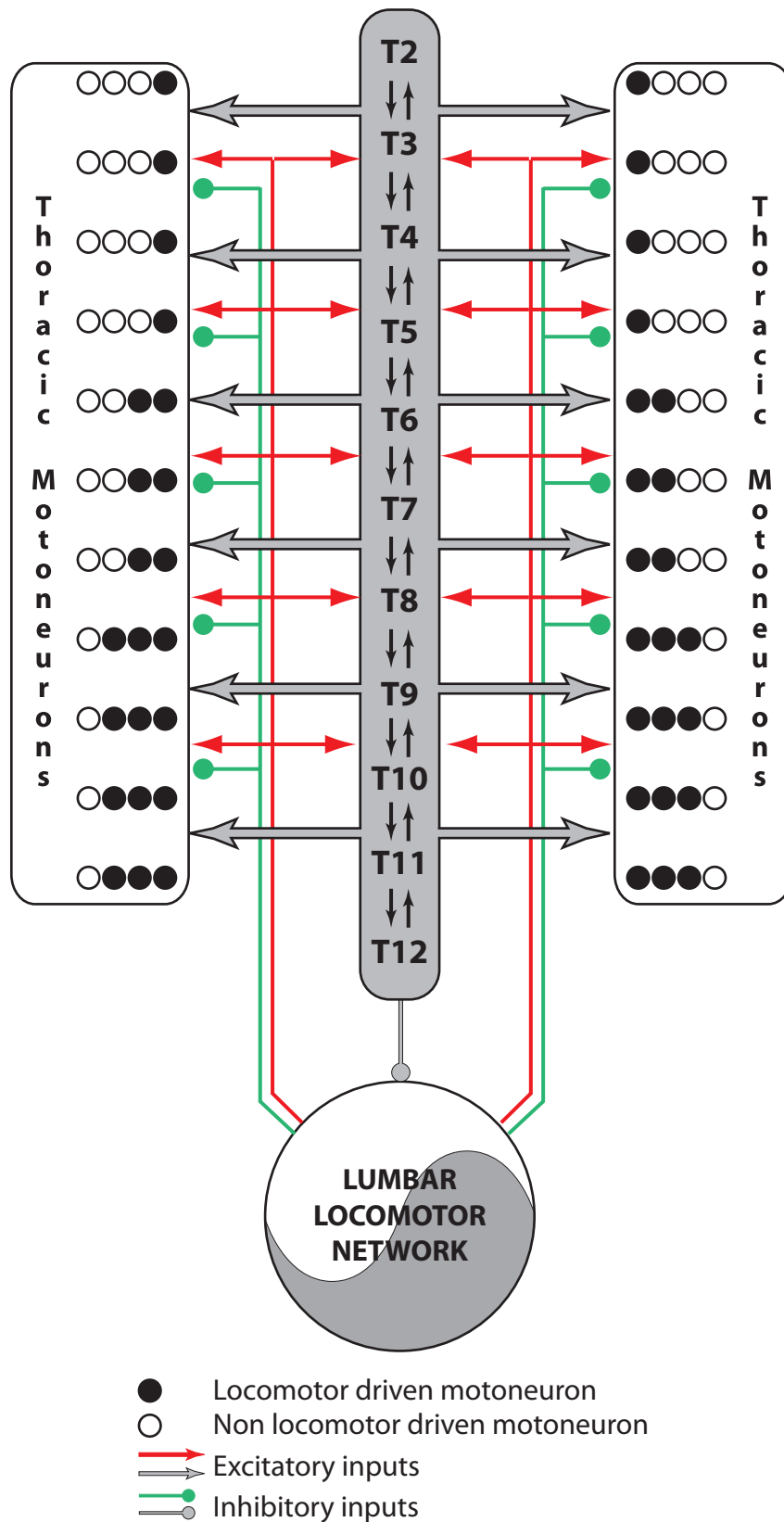


Figure 8