



Physiopathologie de la sclérose latérale amyotrophique : implication des systèmes neuromodulateurs dans les réseaux moteurs spinaux

Lea Milan

► To cite this version:

Lea Milan. Physiopathologie de la sclérose latérale amyotrophique : implication des systèmes neuromodulateurs dans les réseaux moteurs spinaux. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2014. Français. [⟨NNT : 2014BORD0294⟩](#). [⟨tel-01144256⟩](#)

HAL Id: tel-01144256

<https://theses.hal.science/tel-01144256v1>

Submitted on 21 Apr 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

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Et soutenue publiquement par:

Léa Milan

le 10 décembre 2014

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Mention Sciences, Technologies et Santé

Spécialité: ***Neurosciences***

<p>PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SCLEROSE LATERALE</p> <p>AMYOTROPHIQUE :</p> <p>IMPLICATION DES SYSTEMES NEUROMODULATEURS DANS LES</p> <p>RESEAUX MOTEURS SPINAUX</p>

Devant la commission d'examen formée de:

M. Pascal Branchereau	Pr, Université de Bordeaux	Président
Mme Florence Perrin	Pr, Université Montpellier 2	Rapportrice
M. Jacques Durand	CR, CNRS, Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Gillian Butler-Browne	DR, INSERM, Paris	Examinatrice
M. Frederic Brocard	CR, CNRS, Aix-Marseille	Examineur
Mme Sandrine Bertrand	CR, CNRS, Bordeaux	Directrice de thèse

A mes parents,
et à ma famille,

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont été présentes au cours de ces trois années et qui m'ont permis de présenter aujourd'hui ce travail de doctorat.

*En premier lieu, j'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir permis de rendre la discussion de ma soutenance intéressante et riche: **Gillian Butler-Browne**, **Frédéric Brocard** et **Pascal Branchereau** ainsi que **Florence Perrin** et **Jacques Durand** qui m'ont fait l'honneur de rapporter ce manuscrit.*

*Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'association **française contre les myopathies (AFM)**, qui, par le financement de ce projet de recherche et de mes deux dernières années de doctorat m'a offert l'opportunité et les moyens de mener à bien cette étude. Je tiens donc tout particulièrement à remercier les membres de l'association pour leur confiance en mon projet de recherche.*

*Évidemment, tout cela n'aurait pas été possible sans toi **Sandrine**, qui m'a permis de réaliser ce travail de doctorat sous ta direction. Je tiens à te remercier pour ta patience, ta présence et tes précieux conseils au quotidien. Tu étais présente chaque fois que j'en ai eu besoin, et tu as su garder un œil attentif sur ce projet tout en me laissant prendre les rênes de temps en temps, pour cela je te remercie car c'est, je pense, l'encadrement dont j'avais besoin. J'espère que tu garderas un bon souvenir de ta toute première étudiante en thèse et que travailler avec moi t'aura donné envie de renouveler l'expérience avec de nouveaux étudiants! Je te souhaite évidemment tout le meilleur pour la suite de ta carrière dont je suis absolument sûre qu'elle sera brillante et pleine de très belles publiés! :)*

Ce projet repose sur de nombreuses techniques expérimentales et il ne m'aurait pas été possible de le réaliser si je n'avais pas pu bénéficier de l'expertise et du soutien de nombreuses personnes. **Gilles**, je tiens à te remercier pour ton aide très précieuse concernant toute la partie imagerie. Tes explications, ton aide et ta réactivité lorsque je t'envoyais des listes de questions par mail ainsi que ta (grande) patience m'ont permis non seulement de réaliser cette étude mais aussi de comprendre ce que je faisais! **Frédérique**, merci pour ton calme, ta patience, ta gentillesse et bien sur merci d'avoir réalisé les western-blot et les cultures et surtout d'avoir pris le temps de m'expliquer tout cela! **Christophe**, encore une fois je te remercie pour avoir non seulement réalisé les programmes qui m'ont fait gagner des jours et des jours d'analyse, mais surtout pour avoir pris le temps (et surtout ton courage à deux mains) pour essayer de m'expliquer les rudiments de la programmation... Enfin **Laura**, sache que si je te cite en dernière c'est 1. Parce que je sais que tu attends les remerciements avec impatience et je voulais profiter de l'occasion pour t'embêter une dernière fois! Et 2. Parce que je dirai que je gardais le meilleur pour la fin... ;) Que dire donc, de nos longues heures passées en salle d'immuno à faire les prélèvements, de nos techniques (imparables) pour maintenir mes excitées de souris avant l'anesthésie, et de nos discussions potins... Juste que malgré tout, je pense que cela va me manquer, et que même si je te souhaite de retrouver cette bonne humeur avec les étudiants futurs que tu croieras tout au long de ta carrière, j'espère secrètement que je resterai ta préférée!! Merci pour tout, pour avoir été là, pour ta bonne humeur quoi qu'il arrive et pour le travail énorme que tu as accompli en réalisant les perfusions, les coupes et les immuno de tout ce projet! Tu restera l'une de mes plus belles rencontres de thèse, et, même si mes enfants ne s'appelleront vraisemblablement pas Laura (et non, désolé, toujours pas!), je n'aurais pas besoin de ça pour me rappeler de toi! (Quoi que... non je rigole! ;))

Je tiens également à remercier tous les membres de **l'équipe CPGs** qui m'ont accueillie et ont partagé mon quotidien durant ces trois années: **Didier**, en plus d'être un excellent chef d'équipe tu as toujours su garder un œil bienveillant sur les étudiants de l'équipe (peut être ton côté prof qui ressort!) et

je t'en remercie car il est toujours agréable de savoir que l'on peut compter sur toi. **Jean René**, merci de m'avoir accueillie dans le labo, d'avoir financé ma première année de thèse et surtout d'avoir toujours eu le mot pour rire! J'ai apprécié ta franchise et à ton côté j'ai pu travailler mon sens de la répartie pour répondre à tes petites piques, je pense avoir atteint un bon niveau maintenant et j'espère que je pourrai continuer à m'exercer dans les années à venir car je dois dire que je trouvais ça plutôt marrant! **Greg**, merci pour tes idées, tes discussions et conseils (scientifiques mais aussi musicaux et youtubesques!) ainsi que pour la réalisation du programme d'analyse et le temps fou que tu as dû passer pour analyser mes tracés en wavelet! Je retiendrai de toi une énergie à toute épreuve et de bons moments de rigolade! **Laurent**, tu as toujours été là pour moi depuis mon arrivée au labo, et tu as su parfaitement t'intégrer (nous intégrer) au bureau étudiant (même si, je le rappelle, ton statut t'empêche de te servir de notre frigo!). Je garderai un très bon souvenir de tes discussions, et de nos (vos) repas sushis! **Maurice**, merci pour tes conseils et ton expertise en immunohisto! Cela m'aura été d'un grand secours... Tu as su garder un œil attentif sur le projet tout en nous laissant, Sandrine et moi, expérimenter nos méthodes d'électrophysiologistes de manière plus ou moins concluante sur toute l'étude des boutons en C! Je tiens également à remercier les membres de la branche "homme" de l'équipe" pour leur aide régulière, les discussions du midi qui permettaient souvent de faire une pause, et bien sur pour leur bonne humeur: **Etienne**, **Emilie** et tout particulièrement **Emma** qui a géré le projet de tracking vidéo.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes journées au cours de ces années, et des discussions, plus ou moins scientifiques à la cafet': les membres de l'équipe OASM, **Didier**, **Muriel**, **Denis**, **John**, **Romuald**, **François**, les "anciens", **Morgane**, **Géraldine**, **Du**, et tous les autres: **Aymar**, **Marie-Christine**, **Jérôme**, **Angelo**... Avec une mention spéciale à **Geneviève** que je tiens particulièrement à remercier pour sa bienveillance, sa gentillesse, sa disponibilité et sa bonne humeur communicative, **Martine** qui va bientôt partir elle aussi et à qui je souhaite une bonne retraite active et pleine de voyages (mais je ne m'en fais pas trop pour toi, je sais que tu saura en profiter!), **Marc**, merci pour tes (précieux) conseils alors que je faisais mes premiers pas dans le

monde des "patcheurs", et **Marie L ne**, **Anne-Emilie** et **Océane**, mes collègues et ex-collègues de poste de manip à qui je souhaite plein de bonnes choses et de réussite (et de beaux neurones!) pour le futur. Enfin, je remercie les animaliers pour leur travail quotidien auprès des animaux, **Jean-Marie**, **Anne** et enfin **Lionel** qui a su prendre la relève auprès de mes souris chaque fois qu'il le fallait tout en agrémentant mes passages à l'animalerie de discussions voyage!

Je tiens à adresser un petit salut à **Philippe de Deurwaerdère**, avec qui j'ai effectué mes stages de master, les manips d'HPLC (ma bonne vieille HPLC...) et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci Philippe d'avoir été une oreille attentive et d'avoir toujours été disponible pour moi. C'est le travail à tes côtés qui m'a donné envie de persévérer jusqu'en thèse et si je peux maintenant me faire appeler docteur Milan j'ai conscience qu'à l'origine, c'est grâce   toi... Merci!

Enfin, je tiens à adresser un énorme merci à toutes les personnes avec qui j'ai partagé les bons comme les mauvais moments, les joies comme les doutes par lesquels la réalisation d'une thèse fait forcément passer:

Mes collègues étudiants dans un premier temps, avec qui j'ai eu le plaisir de créer et de partager le "bureau étudiant"! **Lauriane**, ma collègue, mon binôme du début   la fin! ;) Que dire...? Que sans toi ces quelques années auraient été complètement différentes, et que ta présence, nos discussions, nos partages, nos voyages en congrès, nos rigolades et nos peines ensemble ont fait passer ces trois années bien plus vite que je l'aurais cru! C'est toujours réconfortant d'avoir une personne sur qui on peut compter, et je dois dire que tu as fait bien plus que jouer ce rôle à la perfection! Tu as toujours été là, quoi qu'il arrive et ca va me faire extrêmement bizarre de ne plus te voir tous les jours... Et je vais même oser dire:  a va me manquer!! Je te souhaite évidemment le meilleur pour la suite, mais ça, on aura l'occasion d'en reparler ! **Alexis**, le deuxième "survivor" avec qui j'ai pu partager ces trois années de cohabitation dans le bureau et de quotidien de thésard: je te remercie pour nos discussions presque plus philosophiques que scientifiques... mais également pour ta discrétion et ton infinie patience quand Lauriane et moi on devait surement te casser les oreilles! J'ai entièrement confiance en toi pour la suite de ta carrière

qui s'annonce sans aucun doute brillante, et je te souhaite de la continuer aux USA avec le postdoc de tes rêves pour commencer! :) Viennent ensuite les deux "anciens": **Jean-Patrick** tout d'abord: le "vieux de la vieille", le doyen!! Bien que tu ne liras jamais ce mot puisque tu es parti depuis un an chez les karibous, je tiens à dire que je garderai un excellent souvenir de toi, de notre séjour à Lyon (même si j'ai bien compris que tu n'aime ni marcher, ni les photos!) et surtout de nos (enfin surtout vos, avec Coralie) combats, que dis-je, joutes verbales et physiques! Tu as laissé un petit vide dans le bureau en partant... que Lauriane s'est empressée de combler en prenant ta place à mes côtés dans le bureau!! ;) Enfin, **Coralie**... je ne vais pas m'étaler dans ces remerciements sur tout ce que je pense de toi, mais je ne pouvais pas ne pas te dédier un petit bout de ce manuscrit! Je sais combien tu aurais voulu en avoir un toi aussi, et combien tu t'es investie à mes côtés pour que je persévère et que je finisse (avec panache si possible!), saches que pour moi ce travail c'est un petit peu comme si je l'avais fait avec toi quand même, et que je suis persuadée que tu aurais fait un excellent Docteur!! Pas besoin du titre, tu as tout ce qu'il faut pour être fière de toi et de ton parcours! Je te souhaite évidemment de persévérer dans cette voie qui te plaît et plus que cela: un très très beau mariage et... de beaux enfants!! ;) Au fil des années tu es devenue bien plus qu'une collègue et je suis très heureuse de te compter maintenant parmi mes amis... Et puis viennent les "petits" nouveaux, la relève; **Angelo**, je te souhaite une très belle réussite dans ta thèse comme dans ta carrière car tu es quelqu'un de passionné (et de bavard... mais cela est une autre histoire! ;)) et j'espère que tu gardera cette motivation et cette envie de réussir, c'est cela qui fait de bons chercheurs! **Mélissa**, même si on a finalement eu peu de temps en commun dans le bureau des "thésards", j'ai vraiment apprécié ces moments passés avec toi, nos bonnes rigolades et mes plus ou moins bons conseils "d'ancienne"... même si j'avoue que je reste déçue que l'on ait pas fait cette petite virée à Biscarrosse!! :)

Je voudrai également passer un petit coucou à tous les étudiants qui sont passés par le bureau étudiant au cours de ces trois ans, ou que j'ai pu côtoyer au laboratoire: **Fabien, Magalie, Sabrina, Quentin, Léa, Coralie, Zied**... et tous les autres!

Histoire d'allonger encore un petit peu cette très longue liste de remerciements, je voudrai faire un petit coucou à mes anciens collègues de la rotule, où j'ai effectué mes stages de Master, et dont certains seront devenus au fil du temps de véritables amis! **Philippe**, bien sur, que j'ai déjà cité plus haut, mais aussi: **Hamid, Thomas, Stéphanie, Brice, Nicolas, Camille, Omar**, et tous les autres, anciens et nouveaux! Avec une mention spéciale à **Fredo, Steph** et **Audrey** (même si les deux dernières ne sont pas vraiment de la rotule... je ne sais pas pourquoi je les croisais souvent là bas! ;)), j'aurais passé d'excellents moments avec vous, et **Laura** à parler potins ! Merci pour votre bonne humeur et les rigolades ensemble, notamment lors des imitations mémorables de Fredo! Enfin, **Emilie** et **Mélanie**, je ne vais pas m'étendre ici, mais vous resterez pour moi parmi les plus belles rencontres de la thèse (ou plutôt du master...), et je pense sincèrement que nous pourrons rester amies et continuer nos sessions potins à la terrasse du St Georges!! Les grands récits d'Emilie vont me manquer, je ne sais pas comment je vais tenir sans connaître régulièrement tes aventures! Je vous souhaite à toutes les deux une très belle carrière scientifique, et que vous deveniez de grandes, belles (bon, ces deux points c'est déjà fait !) directrices de recherche en neurosciences... La classe !! :)

Enfin, et pour finir ces remerciements sur une note plus personnelle, je tiens à remercier ma famille pour tout le soutien et l'amour dont ils m'ont toujours couverte, pendant ma thèse mais aussi tout au long de ma vie! **Papa, Maman, Papy, Mamie, Audrey, Hugo, Patricia** et **Jean-Marie** j'espère, et je sais, que vous êtes fiers de moi, et que vous le serez toujours quoi que je fasse... Si j'ai pu réaliser ma thèse aujourd'hui c'est avant tout grâce à vous tous et notamment parce que je sais que vous serez toujours là pour moi. Quand il a été temps de "dédicacer" ma thèse je n'ai pas eu un instant d'hésitation pour vous la dédier, Maman et Papa en premier lieu, et à vous tous puisque, même si je sais que vous ne comprendrez pas tout ce qu'il y a écrit dedans, c'est ma fierté de pouvoir vous montrer enfin que j'ai pu aller au bout de mes envies et de ce projet fou de réaliser une thèse ! C'est pour moi l'aboutissement d'années de travail (plus ou moins passionné suivant les années!) et si je peux être fière

aujourd'hui d'être « le premier Docteur de la famille », c'est grâce à vous qui m'avez porté de mes premières années d'école jusqu'à maintenant...

Hugo, mon doudou, je souhaite te mettre ici un petit mot personnel car je sais que tu voudrais suivre ma voie et réaliser toi aussi une thèse: je te passe le flambeau, et je suis sûre que si tu le souhaites, tu y arriveras, j'ai entièrement confiance en toi, en tes capacités et en le fait que tu sois un réel passionné! Tu ferais un excellent chercheur et même si tu change d'avis d'ici là, sache que je serais toujours fière de mon petit frère!

J'ai gardé un nom de côté dans le paragraphe précédent pour le conserver jusqu'à la fin: **David**, je sais que tu n'es pas fan des grands discours en public, mais je ne pouvais pas finir sans t'écrire un petit mot... Je pense que je n'ai pas besoin d'une thèse, ni même d'un bout de papier pour te dire combien tu es important pour moi et combien ta présence à mes côtés m'est indispensable. On ne dirait peut être pas comme ça mais tu as joué un grand rôle dans ce travail car tu es celui qui m'a soutenu et supporté au quotidien tout au long de ma thèse... et même depuis la licence!! Je sais que nos aventures ensemble ne sont pas finies et vont même continuer en beauté avec notre voyage au bout du monde... et puis maintenant que je n'ai plus de thèse à écrire j'aurais, en plus, tout le temps de t'embêter comme je veux! :)

Enfin, je souhaite finir sur un petit mot pour les lecteurs de cette thèse, et donc qui auront (forcément!) lu en premier lieu ces pages de remerciements!! (On fait tous la même chose...). Sachez que si ces remerciements sont aussi longs c'est que, tout comme pour la thèse, j'ai pris plaisir à les écrire (bien qu'attention, cela ne veuille pas dire que ça se soit fait sans douleur!). Je pense que la rédaction d'une thèse c'est un peu l'aboutissement de quelque chose, une conclusion, sur ses travaux, sur son sujet de recherche mais également sur soi et sur ses capacités à raisonner et à lier les choses entre elles, personnellement j'ai trouvé cet exercice enrichissant et je souhaite à tout le monde de ressentir la même chose dans ses projets professionnels et personnels, que ce soit l'écriture d'une thèse (puisque je sais, et j'espère, que les petits étudiants futurs liront ma thèse et s'en inspireront!) ou bien tout autre chose...

Résumé

Les systèmes neuromodulateurs jouent un rôle essentiel dans la mise en place et dans la régulation des réseaux moteurs spinaux afin d'adapter finement le rythme et le patron locomoteur aux contraintes internes et externes de l'organisme. Il a été montré que des altérations du fonctionnement de ces systèmes étaient impliquées dans de nombreuses pathologies neurologiques. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones moteurs corticaux et spinaux. Bien que les symptômes de la SLA n'apparaissent qu'à l'âge adulte, de plus en plus d'éléments amènent à penser que des modifications précoces des réseaux locomoteurs spinaux ont lieu dès les stades précoces du développement chez un modèle animal de la SLA, la souris SOD1. C'est dans ce cadre général que nous avons émis l'hypothèse que des altérations précoces des systèmes neuromodulateurs pourraient intervenir dans la physiopathologie de la SLA. Dans un premier temps, nous avons comparé la modulation monoaminergique des réseaux moteurs spinaux en réalisant des enregistrements extracellulaires de l'activité locomotrice générée par la préparation de moelle épinière isolée chez la souris nouveau-née sauvage et SOD1. Nous nous sommes ensuite attachés en combinant des enregistrements électrophysiologiques extra- et intracellulaires avec des techniques d'immunohistochimie et de biologie cellulaire à décrire la mise en place et l'évolution avec l'âge des synapses cholinergiques reçues par les motoneurones en provenance d'interneurones de la lamina X : les boutons en C. Enfin, nous avons initié une approche (1) comportementale sur le long terme de l'activité motrice des souris SOD1 et (2) des capacités plastiques des synapses glutamatergiques reçues par les motoneurones en culture. L'ensemble de ces travaux, nous a permis de mettre en évidence des altérations précoces et évolutives des principaux systèmes neuromodulateurs spinaux : cholinergique, dopaminergique et noradrénergique chez les animaux SOD1. Nos résultats montrent pour la première fois (1) qu'une dynamique complexe des récepteurs M2 sous les boutons en C existe et que celle-ci est perturbée chez les souris SOD1 et (2) que les motoneurones ne sont pas les seuls neurones à dégénérer dans la moelle de ces animaux mais que les neurones cholinergiques de la lamina X situés dans les segments lombaires L2 sont aussi la cible de processus neurodégénératifs.

Mots clés : *SLA, neuromodulation, moelle épinière, souris transgéniques, réseaux locomoteurs*

Abstract

Neuromodulatory systems play a crucial role in the establishment and regulation of spinal motor networks to finely adjust the locomotor rhythm and pattern to the internal and external constraints. It is now well admitted that alterations in neuromodulatory functions are involved in diverse neurologic disorders. Amyotrophic lateral sclerosis is a neurodegenerative disease characterized by the specific loss of cortical and spinal motor neurons. A growing body of evidence now suggests that although ALS syndromes occur in adulthood, alterations can be detected as early as at the embryonic stages in the spinal cord of the rodent model of ALS, the SOD1 mouse. In this context, we hypothesized that early alterations in the spinal neuromodulatory systems may be involved in the pathophysiology of ALS. To answer this question, in a first step, we compared the monoaminergic modulation of spinal network by recording extracellularly the fictive locomotion produced in the *in vitro* spinal cord preparation from newborn wild-type and SOD1 mice. By combining extra- intracellular recordings with immunohistochemical and cellular biology technics, we aimed, in a second step, to investigate the cholinergic synapses arising onto motoneurons and their neuronal source, the lamina X interneurons as a function of the mouse age. Finally, we initiated (1) an innovative behavioural study of mouse motor habits and (2) an analysis of the synaptic plasticity of glutamatergic synapses imping on motoneurons in culture. Altogether, our data demonstrated early and progressive changes of the major spinal neuromodulatory systems: cholinergic, dopaminergic and noradrenergic. Our data show for the first time that: (1) M2 receptors undergo a complex dynamic under C-bouton that is completely disturbed in SOD1 motoneurons and (2) motoneurons are not the only cellular subtype to degenerate in SOD1 mice. Indeed, we found evidence that neurodegenerative processes also target lamina X cholinergic interneurons in the SOD1 spinal cord.

Keywords : *SLA, neuromodulation, spinal cord, transgenic mice, locomotor networks*

Sommaire

Sommaire des figures	6
Publications et communications affichées	8
• <i>Publications en lien avec le manuscrit</i>	8
• <i>Autres apparitions dans des publications</i>	9
Abréviations	10
Problématique et présentation du mémoire	11
Introduction générale	14
I. La locomotion et l'organisation des réseaux spinaux	15
1. Caractérisation de la locomotion	15
a. <i>Description du cycle locomoteur</i>	15
b. <i>Allures locomotrices et coordinations</i>	16
2. Organisation des structures nerveuses à l'origine de l'activité locomotrice	17
a. <i>Les structures supraspinales</i>	18
b. <i>La moelle épinière</i>	20
b1. <i>Anatomie de la moelle épinière</i>	20
b2. <i>Intégration et genèse du rythme locomoteur par les réseaux de neurones spinaux.</i>	21
c. <i>L'étage périphérique : sorties motrices et retours sensoriels</i>	26
3. Les populations cellulaires spinales impliquées dans la locomotion.	27
a. <i>Les interneurons ventraux et leur implication dans les CPGs moteurs</i>	27
a1. <i>V0</i>	28
a2. <i>V1</i>	29
a3. <i>V2</i>	29
a4. <i>V3</i>	30
a5. <i>dI6</i>	31
a6. <i>Hb9</i>	32
b. <i>Les motoneurones : sorties motrices de la moelle</i>	33
b1. <i>Les motoneurones α, β et γ</i>	35
b2. <i>Le principe de taille</i>	36
4. Neuromodulation et adaptabilité de la locomotion	37
a. <i>Le système cholinergique</i>	38
b. <i>Les monoamines</i>	40
b1. <i>La sérotonine</i>	41
b2. <i>Les catécholamines</i>	43
II. La sclérose latérale amyotrophique :	47
1. Définition	47
2. Description clinique et épidémiologie	47
3. Diagnostic clinique et thérapeutique	49
4. La génétique dans la SLA	51
a. <i>Formes familiales et identification de mutations génétiques</i>	51
b. <i>Le gène SOD1 : description et mutations impliquées dans la fSLA</i>	52
c. <i>Les mutations de TARDBP et FUS/TLS</i>	54
d. <i>La découverte récente du gène C9ORF72 et les espoirs suscités</i>	55
5. Les modèles animaux	56
a. <i>Les souris transgéniques SOD1</i>	57
b. <i>Les autres modèles murins de la SLA</i>	59

b1. Les souris TDP43	59
b2. Les souris FUS/TLS	60
b3. Développement de modèles C9ORF72	61
c. Autres modèles animaux de la SLA	61
6. Dégénérescence sélective des motoneurones dans la SLA	62
7. Mécanismes physiopathologiques de la dégénérescence neuronale	62
a. Altérations mitochondriales	63
b. Le stress oxydatif	64
c. Altérations du transport axonal	65
d. Agrégats protéiques	66
e. Activation des cellules gliales et neuroinflammation	68
f. Le muscle : acteur ou suiveur?	69
g. Excitotoxicité liée au glutamate	70
h. Modifications de l'excitabilité neuronale	71
i. Conclusion	74
8. Les altérations physiologiques dans la SLA : atteintes précoces et impact sur la locomotion	74
III. Objectifs de la thèse :	77
Le modèle d'étude : la souris SOD1^{G93A} « high expressor line »	79
Animaux :	79
A) Souris transgéniques SOD1 ^{G93A} "high expressor line":	79
B) Génotypage	79
Résultats	81
CHAPITRE 1: Contrôle monoaminergique des réseaux spinaux chez la souris SOD1^{G93A} nouveau né	82
A. Introduction	83
B. Matériel et Méthodes	85
1. Analyse tissulaire post-mortem	85
a. Prélèvement et préparation des tissus pour l'analyse post-mortem	85
b. Mesures par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP, ou HPLC en anglais)	85
2. Modulation pharmacologique de la locomotion induite <i>in vitro</i>	86
a. Préparation de moelle entière isolée <i>in vitro</i>	86
b. Pharmacologie	87
c. Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires et analyse	87
C. Résultats	89
1. Contenu monoaminergique de la moelle de souris nouveau-nés WT et SOD1	89
2. Capacités rythmogènes des réseaux moteurs spinaux de souris SOD1 ^{G93A} et modulation sérotoninergique.	90
3. Modulation noradrénergique	91
4. Modulation dopaminergique	92
D. Discussion	93
CHAPITRE 2: Maturation et évolution du système cholinergique spinal chez la souris sauvage et SOD1^{G93A}, modèle de la sclérose latérale amyotrophique.	97
A. Introduction	98
B. Matériel et Méthodes	100
1. Prélèvement et préparation des moelles pour l'analyse histologique	100
2. Immunohistochimie	100
3. Acquisitions au microscope confocal et analyse.	102
4. Acquisitions au scanner de lame, comptage et analyse	104

5. Western Blot	105
6. Préparations de moelle épinière isolée et des tranches de moelle.	106
7. Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires et intracellulaires. ...	106
8. Pharmacologie.	107
9. Statistiques.	108
C. Résultats	108
1. Analyse longitudinale des paramètres morphologiques des boutons en C présents sur les motoneurons lombaires des souris WT et SOD1 ^{G93A}	108
2. Impact fonctionnel des altérations morphologiques des boutons en C dans la deuxième semaine postnatale : analyse extra- et intracellulaire.	110
3. Analyse longitudinale de l'expression des récepteurs M2 dans la moelle lombaire des souris WT et SOD1.	112
4. Les interneurons cholinergiques à l'origine des boutons en C dégénèrent dans la moelle des souris SOD1.	114
D. Discussion	115
<i>CHAPITRE 3: Suivi optocinétique de longue durée des capacités et habitudes motrices</i>	123
<i>des souris SOD1 modèles de la SLA.</i>	123
A. Introduction	124
B. Matériel et méthodes	127
1. Implantation chirurgicale des marqueurs	127
2. Système de capture, entretien des souris et analyse comportementale	127
C. Résultats	129
D. Discussion et perspectives	130
<i>CHAPITRE 4: Capacités plastiques des synapses glutamatergiques connectant les</i> <i>motoneurons</i>	132
<i>en culture : étude préliminaire en conditions physiologiques.</i>	132
A. Introduction	133
B. Matériel et méthodes	136
1. Animaux	136
2. Cultures de cellules spinales de souris Hb9-GFP.	136
3. Enregistrements électrophysiologiques intracellulaires des motoneurons en culture.	138
4. Protocole d'enregistrement et d'induction de la plasticité synaptique.	138
5. Pharmacologie.	139
6. Analyses.	139
C. Résultats	139
D. Discussion et perspectives	139
Discussion générale et perspectives	141
<i>Discussion générale</i>	142
<i>Perspectives</i>	146
<i>Conclusion</i>	148
Bibliographie	149
Annexes	196

Sommaire des figures

Figure 1 Les différentes allures du cycle locomoteur chez le chat.....	16
Figure 2 Exemple d'allures locomotrices chez le cheval: marche, trot, galop.	17
Figure 3 Organisation des structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la locomotion.	18
Figure 4 Anatomie de la moelle épinière chez l'homme.	20
Figure 5 La locomotion fictive enregistrée sur la préparation de moelle épinière isolée <i>in vitro</i>	24
Figure 6 Représentation schématique de l'organisation d'une unité motrice.....	26
Figure 7 Les précurseurs génétiques à l'origine des spinaux.....	27
Figure 8 Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des motoneurons alpha de type rapide ("fast") et lent ("slow") et des motoneurons gamma.	35
Figure 9 Les neurones cholinergiques dans la moelle épinière lombaire de souris.	39
Figure 10 Modulation cholinergique de la locomotion	40
Figure 11 Techniques de diagnostic de la sclérose latérale amyotrophique (SLA).	50
Figure 12 Mécanismes dégénératifs impliqués dans la sclérose latérale amyotrophique (ALS).	63
Figure 13 Mécanismes cellulaires de reconnaissance d'une protéine mal configurée afin de la dégrader par autophagie.	66
Figure 14 Schéma simplifié de l'organisation de la Chromatographie Liquide à Haute Performance	85
Figure 15 Schéma d'organisation du dispositif expérimental d'enregistrement d'électrophysiologie extracellulaire.....	86
Figure 16 Contenu monoaminergique de la moelle épinière de souris nouveau-né.....	89
Figure 17 Modulation sérotoninergique des réseaux locomoteurs spinaux de souris SOD1G93A.	90
Figure 18 Influence neuromodulatrice de la noradrénaline sur la locomotion fictive induite pharmacologiquement chez des souris WT et SOD1	91
Figure 19 Influence neuromodulatrice de la dopamine sur la locomotion fictive induite pharmacologiquement chez des souris WT et SOD1	92
Figure 20 Détournement d'un motoneurone pour l'analyse des boutons en C.	102
Figure 21 Electrophysiologie <i>in vitro</i> sur tranche de moelle épinière.	107
Figure 22 Marquages des boutons en C et des récepteurs M2 dans la moelle lombaire de souris WT et SOD1 à différents stades.	108
Figure 23 Analyse longitudinale des paramètres morphologiques des boutons en C au contact des motoneurons lombaires.	109
Figure 24 Neuromodulation cholinergique de la locomotion fictive induite pharmacologiquement sur des préparations de moelle épinières isolées de souris WT et SOD1 nouveau-nés.....	110
Figure 25 Etude intracellulaire de l'effet de l'oxotremorine sur les motoneurons de souris WT et SOD1.....	111
Figure 26 Quantification des récepteurs M2 dans la moelle lombaire ventrale de souris WT et SOD1 en fonction de l'âge.	112
Figure 27 Evolution de l'expression et du positionnement des récepteurs M2 post-synaptiques en face des boutons en C chez les animaux WT et SOD1 au cours du développement.....	113
Figure 28 Comptage des interneurons cholinergiques autour du canal central chez des animaux WT et SOD1.	114

Figure 29 Expression de facteurs apoptotiques par les neurones cholinergiques de souris WT et SOD1	115
Figure 30. Tableau récapitulatif de l'évolution des différents paramètres analysés chez les souris SOD1 comparé aux WT à différents âges postnataux.	117
Figure 31 Procédure chirurgicale de mise en place des marqueurs.....	127
Figure 32 Dispositif d'enregistrement par suivi optocinétique	128
Figure 33 Evolution de la distance totale parcourue par les souris WT et SOD1 durant leur phase active (la nuit) en fonction de l'âge.....	129
Figure 34 Evolution de la distance totale parcourue par les souris WT et SOD1 durant leur phase de repos (le jour) en fonction de l'âge.	130
Figure 35 Effet de l'application de forskoline et de rolipram sur les courants miniatures spontanés enregistrés sur les motoneurones WT en culture.....	139
 Table 1 Mesures par HPLC des contenus en DOPAC et 5-HIAA de la partie lombaire entière ou ventrale de moelles épinières de souris WT et SOD1 à P1 et P10.....	88
Table 2 Statistiques circulaires des relations de phase entre les racines lombaires L2 droit et gauche en présence de différentes concentrations de monoamines.	93
Table 3. Nombre d'animaux utilisés et de motoneurones analysés pour chaque âge et génotype.	100

Publications et communications affichées

• *Publications en lien avec le manuscrit*

Le travail effectué durant ce projet de doctorat a permis la réalisation des communications suivantes:

Publications dans des revues à comité de lecture

- **Léa Milan**; Grégory Barrière; Philippe De Deurwaerdère; Jean-René Cazalets and Sandrine S. Bertrand (2014) Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1^{G93A} newborn mice. *Frontiers in Neural circuits*.
- **Léa Milan**, Gilles Courtand, Laura Cardoit, Frédérique Masméjean, Grégory Barrière, Jean-René Cazalets, Maurice Garret and Sandrine S Bertrand. Age-related changes in pre- and postsynaptic partners of the cholinergic C-boutons apposed to wild-type and SOD1^{G93A} lumbar motoneurons. (*soumis*).

Communications affichées

- **L Milan**, G Courtand, L Cardoit, M Garret, J-R Cazalets et S.S Bertrand (2013) Analyse longitudinale des synapses cholinergiques en C et des récepteurs muscariniques de type 2 chez un modèle murin de la SLA: la souris SOD1 G93A. *13^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale*, Arcachon, France.
- **L Milan**, G Courtand, L Cardoit, M Garret, J-R Cazalets and S.S Bertrand (2013) Longitudinal analysis of cholinergic C-boutons and associated type 2 muscarinic receptors in SOD1 G93A mutant mice. *11^{ème} colloque de la société des neurosciences*, Lyon, France.
- **L Milan**, G Courtand, L Cardoit, M Garret, J-R Cazalets and S.S Bertrand. Longitudinal analysis of cholinergic C-boutons and associated type 2 muscarinic receptors in SOD1 G93A mutant mice. *Colloque des jeunes chercheurs AFM 2013*. Paris, France.
- **L Milan**, G Courtand, L Cardoit, F Masméjean, M Garret and S.S Bertrand (2013) Longitudinal analysis of cholinergic neuromodulatory system in the spinal lumbar enlargement of SOD1 mutant mice. *43rd annual meeting of the society for neurosciences*, San Diego, USA.
- **Léa Milan**; Grégory Barrière; Philippe De Deurwaerdère; Jean-René Cazalets and Sandrine S. Bertrand (2014) Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1^{G93A} newborn mice. *14^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale*, Arcachon, France.
- **Léa Milan**; Grégory Barrière; Philippe De Deurwaerdère; Jean-René Cazalets and Sandrine S. Bertrand (2014) Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1^{G93A} newborn mice. *Neuropathology and Neuropharmacology of monoaminergic systems, COST annual conference*, Bordeaux, France.

- ***Autres apparitions dans des publications***

Publications dans des revues à comité de lecture

- Catecholamine/Serotonin Interactions : Systems Thinking for Brain Function and disease. Julie G. Hensler, Francesc Artigas, Analia Bortolozzi, Lynette C. Daws, Philippe De Deurwaerdère, **Léa Milan**, Sylvia Navailles and Wouter Koek. 2013 (2013) *Advances in Pharmacology*.
- Sylvia Navailles, **Léa Milan**, Hanane Khalki, Giuseppe Di Giovanni, Mélanie Lagièrre, Philippe De Deurwaerdère. Noradrenergic fibers model L-DOPA-derived extracellular dopamine in a region-dependent manner in parkinsonian rats (2014) *CNS Neurosciences & Therapeutics*.

Communications affichées

- Philippe De Deurwaerdère, Sylvia Navailles, **Léa Milan** (2012) L-DOPA and the brain pattern of dopamine extracellular levels: a new deal imposed by serotonergic and noradrenergic fibres. The Tenth International Catecholamine Symposium, september 9-13 2012, Pacific Grove, CA
- Philippe De Deurwaerdère, **Lea Milan**, Sylvia Navailles (2012) Region-dependent modulation of L-DOPA-induced dopamine release by noradrenergic terminals in the hemiparkinsonian brain. 4th conference of the Mediterranean neuroscience society, September 29 - October 3, Istanbul, Turkey.
- Sandrine S. Bertrand; Constanze Lenschow; **Léa Milan**, Frédérique Masméjean; Isabel Laplante; Myriam Antri; Jean-Claude Lacaille and Jean-René Cazalets "Developmental shift of activity-dependent plasticity at VLF-motoneuron synapses: role of mGluRs and postsynaptic cell types.". 42nd Society For Neurosciences congress. 2012. New Orleans, USA.

Communications orales

- Philippe De Deurwaerdère, Sylvia Navailles, **Léa Milan** (2012) L-DOPA and the brain pattern of dopamine extracellular levels: a new deal imposed by serotonergic and noradrenergic fibres. The Tenth International Catecholamine Symposium, september 9-13 2012, Pacific Grove, CA

Ebook du congrès:

- Philippe De Deurwaerdère, Sylvia Navailles, **Léa Milan** (2012) L-DOPA and the brain pattern of dopamine extracellular levels: a new deal imposed by serotonergic and noradrenergic fibres. Catecholamine research in the 21st century. The Tenth International Catecholamine Symposium, september 9-13 2012, Pacific Grove, CA
- Philippe De Deurwaerdère, Sylvia Navailles, **Léa Milan** (2012) Serotonergic and noradrenergic neurons shape the pattern of extracellular dopamine induced by L-DOPA in the parkinsonian brain. XIV Conference "Biogenic Amines and Related Biologically Active Compounds". 25-27 October 2012, Lodz, Poland

Abréviations

AMPA Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique acide (récepteurs glutamatergiques)	NA Noradrénaline
AHP "After HyperPolarisation"	Na+ Sodium
BSA Serum Albumine Bovine	NMDA N-Methyl-D-aspartique acide (récepteurs glutamatergiques)
Ca²⁺ Calcium	NMA N-Methyl-D,L-aspartique acide
ChAT Choline AcétylTransferase	oxo Oxotremorine
COMT Catechol-O-methyltransferase	PA Potentiel d'Action
CPG Générateur central de Patron	PAF ParaFormaldéhyde
DA Dopamine	PBS "Phosphate Buffered Saline"
DLF Funiculi Dorso-Latéraux	PCR "Polymerase Chain Reaction"
DOPAC 3,4-Dihydroxyphenylacétique acide	PICS "Persistent inward currents" en anglais: courants entrants persistants
EMG ElectroMyographie	ROI Région d'intérêt
ENMG ElectroNeuroMyographie	ROS Espèce Reactive Oxygénée
fSLA SLA familiale	RS Cellules Réticulo-Spinales
FUS/TLS "Fused in Sarcoma/Translocated in Sarcoma"	SLA Sclérose Latérale Amyotrophique
GABA Gamma-Aminobutyrique acide	SLR Region Locomotrice Sous-thalamique
GFP "Green Fluorescent Protein"	SNC Système Nerveux Central
Hb9 basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9. Utilisé dans ce manuscrit pour parler des Interneurones Hb9	SOD1 SuperOxyde Dismutase de type 1
HPLC Chromatographie Liquide à Haute Performance	SOD1^{G93A} Souris SOD1 avec la mutation G93A
IML neurones Intermédio latéraux	SOD1^{G85R} Souris SOD1 avec la mutation G85R
In Interneurone	SOD1^{G37R} Souris SOD1 avec la mutation G37R
IRM Imagerie par Résonance Magnétique	SOD1^{G86R} Souris SOD1 avec la mutation G86R
K+ Potassium	TARDBP Gène codant pour la TDP43
KO "Knock Out"	TDP43 TAR DNA-binding protein 43
LTD dépression à long terme	TTX Tetrodotoxine
LTP potentialisation à long terme	VaChT Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
MAO (A et B) Monoamines Oxydases	VLF Funiculi Ventro-Latéraux (VLF)
MLR Region locomotrice mésencéphalique	WB Western Blot
Mn Motoneurone	5-HIAA 5-Hydroxyindoleacétique acide
	5-HT sérotonine

Problématique et présentation du mémoire

La sclérose latérale amyotrophique, maladie affectant les neurones moteurs et conduisant à une atrophie musculaire et motrice sévère, occupe le 3^{ème} rang des pathologies neurodégénératives diagnostiquées de par le monde. Pourtant, malgré les progrès permanents à la fois dans la prise en charge et le diagnostic des patients, les mécanismes conduisant à la dégénérescence des neurones moteurs restent aujourd'hui encore mal connus. Le développement de modèles animaux tels que la souris mutante SOD1, basés sur des mutations génétiques observées chez les cas familiaux de SLA, a permis de mettre en évidence des modifications physiologiques précoces conduisant à une dégénérescence des motoneurones bien avant que les symptômes moteurs n'apparaissent. Ces désordres cellulaires affectent le fonctionnement des réseaux moteurs spinaux jusqu'à induire les déficits moteurs assignés à la SLA. Les réseaux neuronaux composant la moelle épinière ont fait l'objet de nombreuses études visant à décrire leur organisation et leur fonctionnement, de la réception d'un signal d'initiation de la locomotion en provenance des centres supraspinaux, jusqu'à l'élaboration d'un patron locomoteur rythmique, robuste et adapté par des réseaux de neurones appelés générateurs de rythme. Les cellules composant ces réseaux communiquent entre elles et sont sous le contrôle permanent de systèmes neuromodulateurs en provenance des cellules qui les entourent, des muscles qu'elles activent, ou bien de structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la motricité. Un désordre affectant l'un de ces systèmes modulateurs induit alors inéluctablement des altérations plus ou moins sévères des réseaux moteurs, et donc de la fonction locomotrice qu'ils sous-tendent, comme c'est le cas dans certaines pathologies neurologiques.

Cette étude se place dans le cadre de l'étude des mécanismes neurodégénératifs et des modifications physiologiques affectant les réseaux moteurs spinaux avant même que les premiers symptômes moteurs de la SLA ne soient détectables. Nous avons utilisé le modèle murin SOD1 afin d'établir un état des lieux des systèmes neuromodulateurs impliqués dans la régulation de la locomotion et dans la transmission de l'information motrice des neurones aux fibres musculaires. Afin de compléter les connaissances actuelles des mécanismes mis en jeu dans la dégénérescence neuronale, et dans sa progression nous avons réalisé une étude longitudinale, tout au long de la vie des animaux mutants : de la naissance jusqu'à l'apparition des symptômes. Enfin, cette étude s'intéresse non seulement aux motoneurones spinaux,

cellules ciblées par la dégénérescence dans la SLA, mais aussi à l'état physiologique des neurones à l'origine des contacts synaptiques modulant leur activité.

Dans ce contexte physiopathologique, mes travaux de recherche ont été orientés vers l'étude de l'état physiologique des neurones et des systèmes neuromodulateurs spinaux dans la SLA, avant que ses symptômes moteurs ne soient détectables. Mon travail au cours de ces trois années de doctorat, a été subdivisé en plusieurs parties, qui seront chacune présentée indépendamment dans ce manuscrit et articulées autour d'une introduction et d'une discussion générale communes.

La première partie, sous la forme d'une introduction générale, permettra de poser les bases de cette étude et de définir l'état actuel de la recherche et des connaissances. Ainsi, nous détaillerons dans un premier temps l'organisation des structures à l'origine de la genèse des mouvements locomoteurs : de l'échelle de l'organisme à l'échelle cellulaire, en nous attachant particulièrement aux réseaux neuronaux de la moelle épinière à l'origine de la création d'un patron et d'un rythme locomoteur adapté. Nous aborderons également les systèmes neuromodulateurs essentiels à la bonne mise en place et à la communication au sein de ces réseaux spinaux. L'importance de ces systèmes au sein des réseaux moteurs est telle que leur implication dans certaines pathologies neurologiques est aujourd'hui clairement démontrée. Cette conclusion nous amènera dans un second temps à introduire la SLA, maladie neurodégénérative affectant les neurones des réseaux locomoteurs. Nous développerons dans un premier temps l'aspect clinique de la maladie, puis nous définirons ses caractéristiques génétiques, cellulaires et électrophysiologiques chez l'homme mais aussi chez les différents modèles animaux de la SLA. Enfin, nous aborderons les mécanismes qui, seuls ou associés de manière complexe, sont présagés comme étant à l'origine de la dégénérescence des neurones moteurs. La dernière partie de l'introduction générale sera consacrée à la présentation des objectifs de ce travail doctoral.

À la fin de l'introduction, une partie sera dédiée à la présentation du modèle animal utilisé tout au long de ce travail. Nous présenterons donc les procédures relatives au maintien de la lignée de souris et au génotypage.

La seconde partie de ce manuscrit présentera les résultats obtenus au cours de ces travaux de doctorat. Les données seront organisées en chapitres indépendants qui seront tour à tour introduits, présentés et discutés, reflétant ainsi les articles scientifiques qui ont été ou seront publiés à partir de ces travaux. Nous présenterons également les matériels et méthodes utilisés pour chacun de ces chapitres.

Enfin, la dernière partie sera consacrée à la discussion générale et aux principales perspectives émergentes des travaux de mon doctorat. Ces parties seront suivies des annexes contenant les articles publiés ou en cours de publication.

Introduction générale

I. La locomotion et l'organisation des réseaux spinaux

La locomotion correspond à la faculté de se mouvoir dans son environnement. Cette fonction est essentielle pour la plupart des organismes vivants, que ce soit pour la préservation de leur espèce à des fins de reproduction, ou pour la survie de chaque individu afin de se nourrir ou de fuir un prédateur. L'extrême diversité entre les êtres vivants et les milieux qu'ils occupent nécessite une adaptation de leur capacité locomotrice aux contraintes environnementales. Au cours de l'évolution des activités locomotrices aussi diverses que la nage, la marche, la course, le vol, la propulsion ou la reptation se sont ainsi développées. Malgré cette diversité, la fonction locomotrice obéit à des constantes largement partagées au sein du règne animal. En effet, la locomotion peut être considérée comme un acte volontaire de part son initiation, le mode, la trajectoire et la vitesse choisis, mais la réalisation et la construction du patron locomoteur quant à eux, reposent sur l'activité inconsciente de réseaux neuronaux. L'organisation et le rôle des organes effecteurs de la fonction locomotrice sont, de plus, largement conservés au sein des différents groupes phylogénétiques constituant le règne animal. Ainsi, chez les vertébrés, trois systèmes étroitement associés participent à la genèse de la locomotion : 1) le squelette, élément résistant et articulé caractéristique des vertébrés qui permet de soutenir, de transmettre et de multiplier les forces qui lui sont appliquées; 2) les muscles, qui, lorsqu'ils sont contractés, permettent d'appliquer les forces nécessaires à la mobilisation du squelette; 3) le système nerveux, qui initie, coordonne, contrôle et maintient la contraction musculaire.

Ce chapitre d'introduction va permettre de définir les caractéristiques de la fonction locomotrice, mais aussi les acteurs qui permettent sa genèse, son maintien et son adaptation. Pour cela, nous détaillerons dans un premier temps les mouvements cycliques qui caractérisent la locomotion, puis nous nous intéresserons à l'organisation des structures nerveuses et des réseaux neuronaux impliqués dans la genèse du patron locomoteur.

1. Caractérisation de la locomotion

a. Description du cycle locomoteur

La locomotion, à l'état naturel, pour être efficace et précise requiert une coordination très étroite entre les différents membres de l'animal et fait intervenir un nombre important de muscles synergistes et antagonistes qui alternent leurs actions de façon complexe. Cependant,

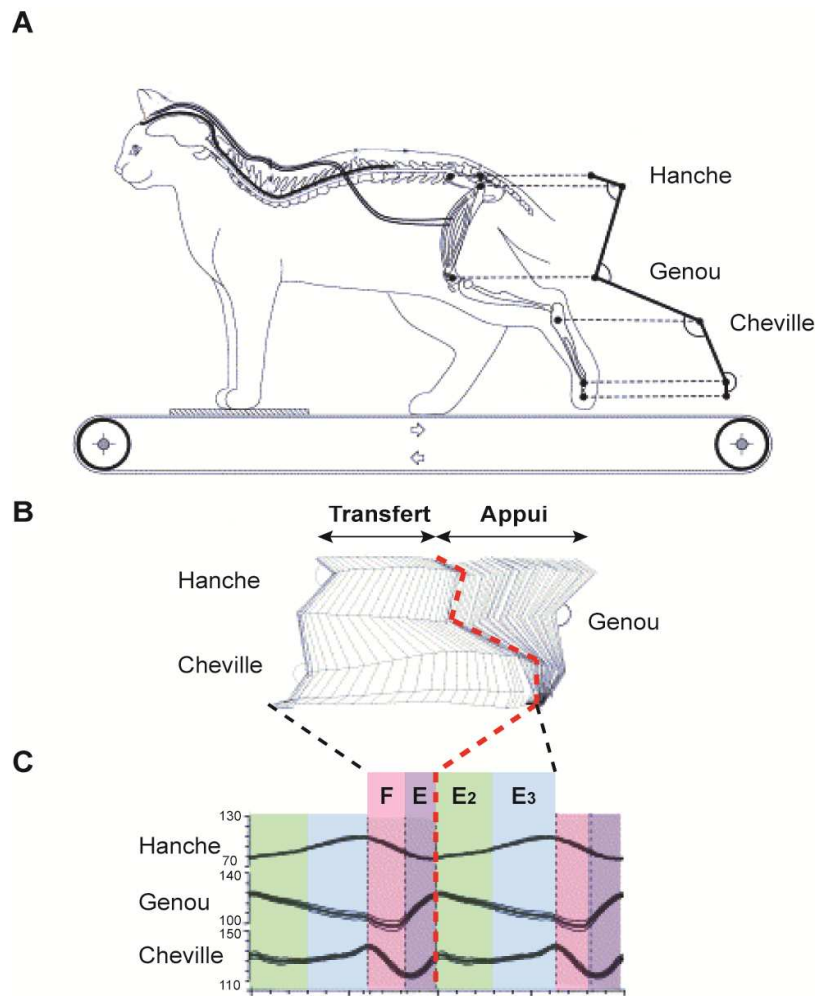


Figure 1 Les différentes allures du cycle locomoteur chez le chat. **A.** Le chat est utilisé en tant que modèle expérimental et placé sur un tapis roulant afin d'observer et d'enregistrer les mouvements effectués au niveau de chaque articulation. **B.** Les variations d'angle des articulations de la hanche, du genou et de la cheville peuvent ainsi être mesurées au cours d'une phase d'appui et d'une phase de transfert, lors d'un épisode locomoteur. **C.** La moyenne des variations angulaires observées sur les différents articulations du membre postérieur lors de 10 cycles locomoteurs permet de rendre compte de la reproductibilité et de la robustesse des mouvements locomoteurs. Les différentes phases du cycle locomoteur sont représentées par des couleurs: en rose et violet la phase de transfert (respectivement composée de F et E) et en vert et bleu la phase d'appui (E2 et E3).

(Figure modifiée d'après Rossignol et al., 2004).

afin de bien comprendre les différentes phases qui composent le mouvement, nous allons décrire ici de manière simplifiée le cycle locomoteur qui intervient lors du mouvement d'un membre donné. Ces données devant être considérées comme une partie du mouvement locomoteur, et amenant à être intégrées à l'échelle de l'organisme dans un schéma moteur beaucoup plus complexe et mettant en jeu de nombreux acteurs (musculaires et articulaires).

Les nombreuses études portant sur la fonction locomotrice, notamment sur les modèles animaux, ont permis de montrer que les principales caractéristiques du cycle locomoteur sont communes à l'ensemble des espèces. La locomotion est caractérisée par une succession de cycles de flexion et d'extension des membres permettant une alternance entre les phases d'appui et de transfert, assurant ainsi la propulsion de l'animal. L'alternance entre ces différents mouvements caractérisant la locomotion a notamment été décrite chez le chat, modèle animal de référence pour l'étude de la motricité, comme présenté sur la figure 1 (Philippon, 1905; Rossignol *et al.*, 2004).

La phase de transfert, appelée "swing phase" en anglais, correspond à la réalisation d'un pas. Elle est caractérisée par le fait que le membre est en mouvement en l'air : elle débute lorsque celui-ci quitte le sol et se termine quand il reprend appui sur le sol (Figure 1). Cette phase de transfert est subdivisée en deux périodes successives nommées F (pour Flexion) et E (pour Extension), au cours desquelles on observe respectivement une flexion de toutes les articulations, suivie par une extension du genou et de la cheville jusqu'au contact du membre avec le sol.

La phase suivante est la phase d'appui, ou "stance phase", au cours de laquelle, comme son nom l'indique, le membre est posé au sol (Figure 1). Cette phase ne correspond pas pour autant à un repos du membre concerné puisqu'elle met en jeu différents muscles extenseurs antigravitaires. Tout comme la phase de transfert, la phase d'appui est constituée de deux périodes successives E2 et E3 (pour Extension 2 et 3). Au cours de la phase E2 le membre posé au sol supporte tout ou partie du poids du corps, puis une rapide extension de toutes les articulations afin de propulser le corps vers l'avant est exercée et caractérise la phase E3.

b. Allures locomotrices et coordinations

Afin d'assurer l'efficacité du déplacement, une coordination entre les différents membres de l'animal est nécessaire. En fonction de la vitesse du déplacement cette coordination va s'adapter afin d'optimiser le déplacement et de permettre à l'animal d'adopter

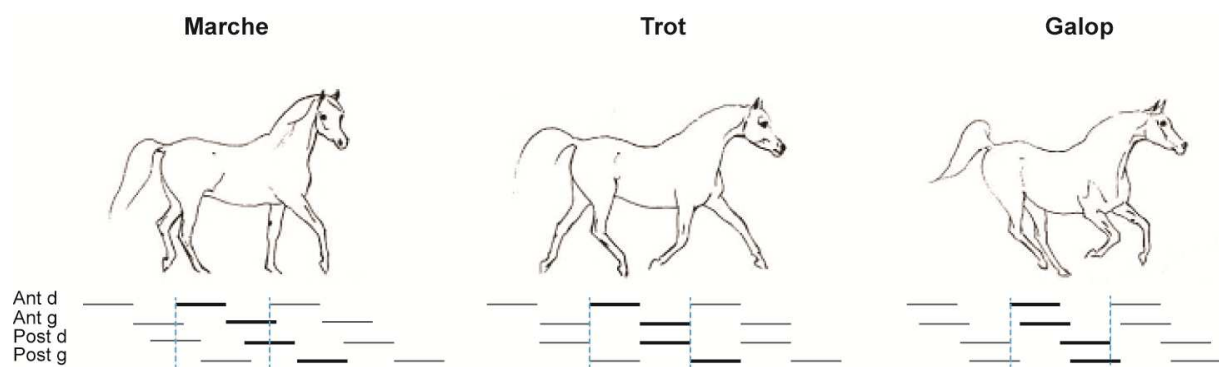


Figure 2 Exemple d'allures locomotrices chez le cheval: marche, trot, galop.

Le temps durant lequel chaque membre est en appui sur le sol est représenté par un trait noir.
 Ant d: membre antérieur droit; Ant g: membre antérieur gauche; Post d: membre postérieur droit; Post g: membre postérieur gauche.

différentes allures. Une allure locomotrice se définit par la séquence des différents temps d'appui sur le sol de chaque membre de l'animal (Abourachid, 2003).

Différentes allures locomotrices ont ainsi pu être déterminées en fonction du patron d'alternance des différents membres : la marche, le trot et le galop sont les exemples les plus connus (Figure 2). Lors d'un épisode de marche chez un quadrupède par exemple, il y a une alternance stricte entre les membres d'une même ceinture (avant ou arrière) tandis que ceux situés en diagonale présentent un déphasage de 25% du cycle. Ce patron d'alternance est modifié selon si l'animal passe à une allure de trot ou de galop (Miller *et al.*, 1975). Le passage de l'une à l'autre de ces allures permet à l'animal de modifier sa vitesse de déplacement, celle-ci pouvant tout de même varier dans une certaine gamme sans que l'allure ne soit modifiée, simplement en jouant sur la longueur des pas ou sur leur fréquence par exemple.

Le terme de locomotion désigne donc un ensemble d'actions qui ont pour but de permettre à celui qui les génère de se déplacer dans son environnement de façon précise et adaptée. La grande variété des espèces amenées à se déplacer et la diversité des milieux dans lesquels elles évoluent ont amené à l'élaboration d'une véritable palette de mouvements moteurs permettant de produire des activités adaptées. Cependant, un certain nombre de caractéristiques telles que l'alternance des phases et la coordination entre les différents membres sont conservées chez des animaux appartenant aux mêmes grandes familles (notamment chez les vertébrés). Ainsi, la marche chez les vertébrés est systématiquement caractérisée par une alternance de type fléchisseur/extenseur et une alternance bilatérale (entre les membres de chaque côté du corps) ainsi que par une coordination entre les différents membres. Ces constatations ont permis de mettre en évidence une organisation des structures nerveuses sous-tendant la locomotion particulièrement bien conservée au sein du règne animal.

2. Organisation des structures nerveuses à l'origine de l'activité locomotrice

L'étude de la locomotion chez différentes espèces animales a permis de mettre en évidence un schéma de fonctionnement tripartite des structures nerveuses impliquées dans la genèse de la locomotion. (Figure 3). Ce schéma général, commun à de très nombreuses espèces peut être découpé suivant trois étages principaux : l'étage supraspinal qui initie et contrôle la locomotion, l'étage spinal qui génère le rythme et le patron locomoteur, et enfin

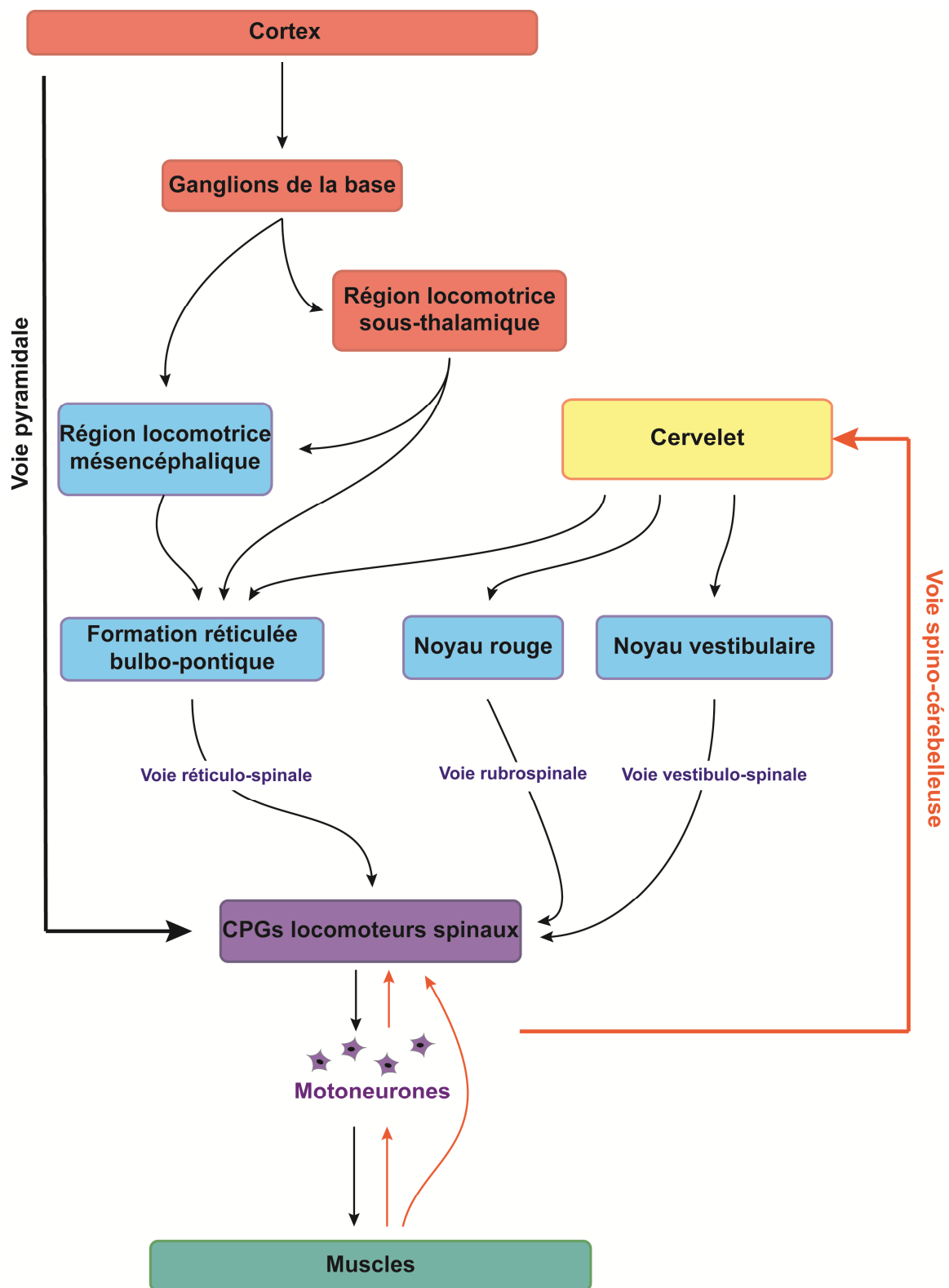


Figure 3 Organisation des structures nerveuses impliquées dans le contrôle de la locomotion.

Les différents niveaux d'organisation sont représentés par des couleurs différentes: en orange l'étage supraspinal, en bleu les régions du tronc cérébral, en violet la région spinale et en vert les muscles. Les principales voies ascendantes (orange) et descendantes (noir) sont représentées par des flèches.

l'étage périphérique qui permet d'adapter rapidement le mouvement aux contraintes environnementales (Figure 3).

a. Les structures supraspinales

Les structures supraspinales, par l'intermédiaire des voies descendantes, permettent d'initier, de programmer, de maintenir, de moduler ou d'arrêter l'activité locomotrice (Armstrong, 1988). De nombreuses structures cérébrales sont impliquées dans la mise en place d'un épisode de locomotion. Ces structures émettent des projections directes ou indirectes qui forment un réseau supraspinal complexe permettant d'aboutir à la convergence d'informations adaptées et complémentaires au niveau spinal via différentes voies descendantes.

Différentes aires corticales sont impliquées dans la genèse de la locomotion: le cortex primaire, le cortex prémoteur et l'aire motrice supplémentaire. Les informations issues du cortex empruntent alors deux voies de projection : la voie pyramidale et la voie extrapyramidale (Figure 3) :

- La voie pyramidale est responsable du contrôle des mouvements volontaires distaux fins. Elle projette directement sur les neurones controlatéraux de la moelle épinière, après avoir décussé (croisé la ligne commissurale) au niveau bulbaire. Une partie des axones de cette voie forme des collatérales qui projettent au niveau des noyaux moteurs diencephaliques et du tronc cérébral.

- La voie extrapyramidale, plus complexe, est responsable du déclenchement et du contrôle de la locomotion. Les neurones du cortex projettent au niveau d'un ensemble de structures appelé ganglions de la base ou noyaux gris. Ces structures mettent en jeu différentes boucles d'activation (voies directe, indirecte et hyperdirecte) qui, par des mécanismes de régulation fins, permettent le contrôle de l'activité motrice (Martin & Hurwitz, 1962; Garcia-Rill *et al.*, 1986; Hikosaka, 1991). Les ganglions de la base ont un rôle prépondérant dans le contrôle moteur, puisqu'un dysfonctionnement de la balance entre les différentes voies qui les composent induit de sévères déficits locomoteurs. La maladie de Parkinson (Parkinson, 1817), maladie neurodégénérative dans laquelle il a été constaté une perte des neurones dopaminergiques dans les ganglions de la base, illustre bien la sévérité des déficits qui peuvent résulter d'un dysfonctionnement de ces noyaux. Après un relais au niveau de ces ganglions, la voie extrapyramidale projette au niveau des régions motrices sous-thalamiques (SLR : "subthalamic locomotor region") et mésencéphalique (MLR : "mesencephalic locomotor region") en exerçant un tonus inhibiteur GABAergique (Garcia-

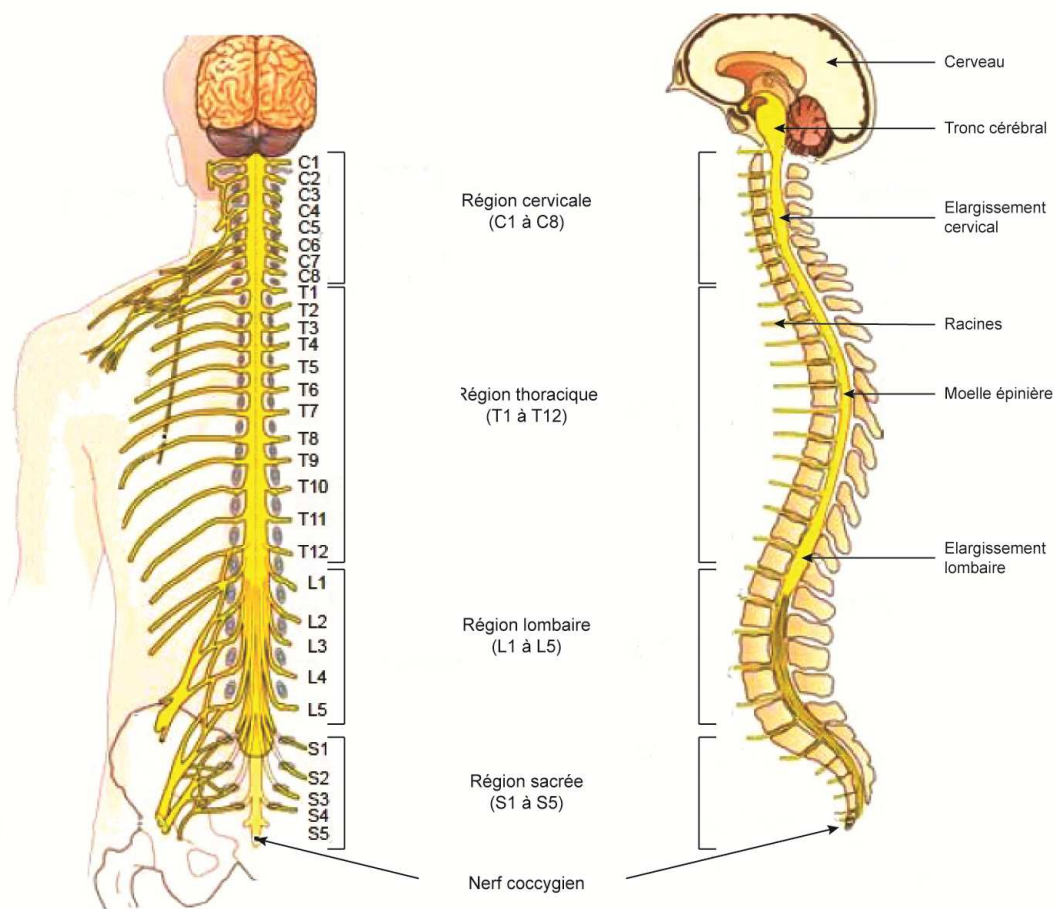
Rill *et al.*, 1986). Lors du déclenchement d'un épisode locomoteur, une levée de cette inhibition permet aux informations d'être transmises aux régions spinales via les funiculi ventro-latéraux (VLF) et dorso-latéraux (DLF) formés par les axones des cellules réticulo-spinales (RS) de la formation réticulée, dans laquelle l'information motrice fait relais au niveau bulbo-pontique (Noga *et al.*, 1988) (Figure 3).

La localisation et le rôle des différents noyaux centraux impliqués dans l'organisation de la fonction locomotrice ont été déterminés en analysant l'effet de sections successives à différents niveaux. Ainsi, des expériences menées sur des chats décortiqués ont permis de montrer que le cortex n'est pas indispensable à l'initiation de la locomotion (Miller, 1975; Bjursten *et al.*, 1976; Rossignol *et al.*, 1999), puisque dans ces conditions, les animaux conservent une locomotion adaptée à leur environnement. Lorsqu'une préparation pré-mamillaire est réalisée (transsection en avant des colliculi supérieurs, préservant la SLR), l'animal est toujours capable de réaliser des séquences de locomotion spontanée, mais celles-ci sont fortement stéréotypées et inadaptées à l'environnement (Mori *et al.*, 1989; Whelan, 1996). Enfin, l'ablation de la SLR dans une préparation post-mamillaire entraîne la perte d'expression d'une activité locomotrice spontanée. La locomotion peut néanmoins être déclenchée artificiellement en stimulant électriquement la MLR (Shik *et al.*, 1966; 1967).

En plus de son rôle dans l'initiation et le contrôle de la locomotion, l'étage supraspinal influence le niveau de tonus postural, permettant ainsi le maintien de l'équilibre de l'animal au cours de la locomotion. Afin de maintenir l'équilibre, un ajustement constant de la balance entre la contraction des muscles fléchisseurs et extenseurs est nécessaire. Les noyaux vestibulaires de Deiters par exemple, sont activés phasiquement au cours de la locomotion, lorsque le membre correspondant est en phase d'appui (Orlovsky & Pavlova, 1972; Udo *et al.*, 1976). L'activation de ces noyaux permet alors de recruter des muscles antigravitaires en projetant directement sur les neurones extenseurs de la moelle épinière (Orlovsky, 1972). Au contraire, lors de la phase de transfert, ce sont les noyaux rouges et la formation réticulée qui sont mis en jeu et qui permettent l'activation des muscles posturaux fléchisseurs (Lai & Siegel, 1990; Rossignol *et al.*, 2006). Au cours de la locomotion, la balance fonctionnelle entre ces deux voies d'ajustement postural permet une bonne adaptation du corps de l'animal aux mouvements locomoteurs, et donc un bon maintien de son équilibre.

Enfin, même si le cervelet ne constitue pas une structure essentielle à la production de mouvements locomoteurs, il contribue à la coordination, la synchronisation des gestes et à la précision des mouvements effectués. En effet, cette structure cérébrale permet d'adapter

A



B

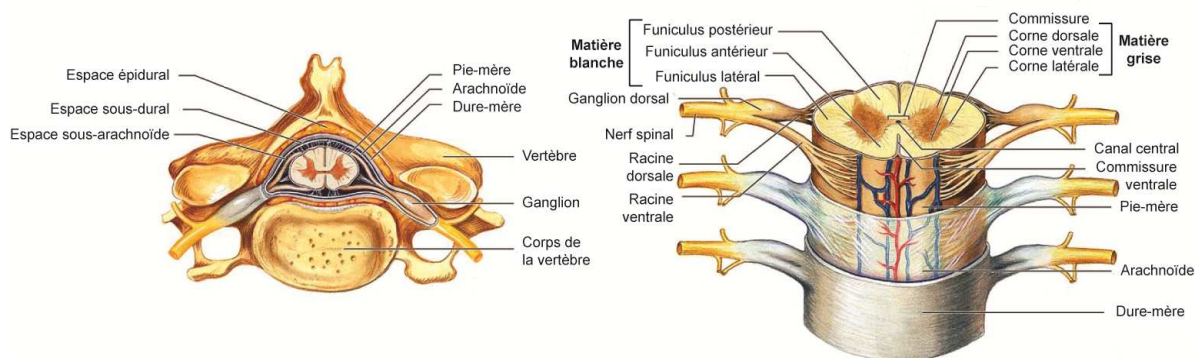


Figure 4 Anatomie de la moelle épinière chez l'homme.

A. La moelle épinière se loge dans la colonne vertébrale et peut-être subdivisée en plusieurs régions: cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et un nerf coccygien. **B.** En coupe transversale l'emplacement de la moelle au sein des vertèbres et son organisation typique sont bien visibles. On distingue notamment la matière grise, composée des corps cellulaires des neurones, la matière blanche, principalement composée de fibres nerveuses. Les nerfs de sortie s'organisent en racines ventrales et dorsales.

(Adapté d'après le "Pearson education", publié par Benjamin Cummings en 2006).

l'information motrice transmise à la moelle épinière, en fonction de l'environnement et des retours sensoriels qu'il reçoit : le cervelet intègre les informations sensorielles afin d'ajuster la commande motrice (Fine *et al.*, 2002; Pisotta & Molinari, 2014). Le cervelet reçoit en effet en permanence des renseignements sur la réalisation effective du mouvement (Arshavsky *et al.*, 1972a; 1972b) et sur la commande motrice générée au niveau spinal (Lundberg, 1971), via respectivement, les faisceaux spinocérébelleux dorsal (FSCD) et ventral (FSCV). En comparant les copies afférentes et efférentes, le cervelet induit un ajustement de la commande motrice en agissant sur les CPGs via les voies descendantes vestibulospinale, rubrospinale et réticulospinale.

b. La moelle épinière

Une fois générée, la commande centrale supraspinale est adressée aux neurones de la moelle épinière via les voies descendantes. C'est au niveau de ces réseaux neuronaux médullaires que l'information descendante va être intégrée et transformée en un signal rythmique coordonné caractéristique de la locomotion.

Afin de bien comprendre comment le rythme locomoteur est mis en place et modulé au niveau de la moelle épinière, il est essentiel d'avoir une bonne connaissance à la fois de son organisation anatomique, mais aussi des réseaux neuronaux qui la composent.

b1. Anatomie de la moelle épinière

La moelle épinière est un cordon de tissu nerveux situé dans le prolongement du tronc cérébral, nichée dans le canal rachidien formé par les vertèbres, dont elle suit les courbures. Comme le cerveau elle appartient au système nerveux central, et est entourée de méninges : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (respectivement de la face externe à la face interne; Figure 4).

Sur toute sa longueur, la moelle épinière a une structure homogène, formée de substance grise, au centre, formant un papillon et contenant l'ensemble des corps cellulaires des populations neuronales composant la moelle et de substance blanche, en périphérie, majoritairement composée d'axones (Figure 4). L'organisation de la moelle épinière est quasiment symétrique entre ses parties droite et gauche, séparées par une ligne passant par le canal central, ou canal de l'épendyme, dans lequel du liquide céphalo-rachidien circule en permanence. La partie dorsale de la moelle intègre et transmet les informations en provenance des afférences sensorielles, tandis que la partie ventrale contient les neurones à l'origine de la

genèse et la transmission de l'information motrice rythmique (pour revue sur les études ayant mené à la description actuelle de la moelle épinière : Naderi *et al.*, 2004).

La moelle épinière est composée de segments médullaires, au nombre de 31 chez l'homme. Au niveau de chaque segment, deux paires de nerfs spinaux (l'une à droite et l'autre à gauche) passant entre les vertèbres, permettent de faire le relais entre la moelle épinière, et le système périphérique qui va innervier les différents organes. Ces nerfs spinaux sont formés par le regroupement de deux racines : ventrale, contenant les informations motrices en provenance des neurones moteurs destinées à activer les muscles, et dorsale, contenant les retours sensoriels produits au niveau des organes périphériques et destinées à informer le système sur l'environnement (Figure 4) (Kölliker & Turner, 1891).

Classiquement, la moelle épinière est subdivisée en 5 parties en suivant l'axe antéro-postérieur : cervicale, thoracique, lombaire, sacrée, coccygienne, avec deux zones de renflement : l'une au niveau cervical et l'autre au niveau lombaire (Figure 4). Cette subdivision de la moelle en différentes régions a permis d'adopter une nomenclature pour différencier les couples de racines de chaque segment. Ainsi, chez l'homme, on dénombre 31 paires de racines pour chaque côté de la moelle : 8 cervicales (notées C1 à C8), 12 dorsales ou thoraciques (T1 à T12), 5 lombaires (L1 à L5), 5 sacrées (S1 à S5) et 1 coccygienne (Figure 4). Il a été montré que chaque racine contacte un ensemble de muscles bien précis, suivant une distribution antéro-postérieure. Ainsi, les neurones moteurs cervicaux sont associés aux mouvements des membres antérieurs, les neurones moteurs lombaires aux membres postérieurs et la partie thoracique de la moelle aux muscles axiaux et respiratoires.

La moelle épinière étant une structure relativement bien conservée au sein du règne animal, on retrouve les mêmes caractéristiques anatomiques chez la plupart des vertébrés. Cependant, quelques distinctions dans le nombre de segments, et leur répartition sont observées. Par exemple, chez la souris, on dénombre 7 segments cervicaux, 13 thoraciques et 6 lombaires. Les souris ne possèdent pas de segment coccygien et le reste de leurs vertèbres composent la partie caudale, correspondant à la queue.

b2 Intégration et genèse du rythme locomoteur par les réseaux de neurones spinaux.

b2.1 Le concept de CPG

Dans la moelle épinière, il existe des réseaux de neurones qui possèdent la faculté de générer, sous l'impulsion d'une commande descendante, une activité rythmique organisée, et ce, en l'absence d'influence sensorielle (Grillner & Zangger, 1984). Ces réseaux neuronaux

sont communément appelés générateurs centraux de patron (de l'anglais « Central Pattern Generator », CPG) et produisent la commande motrice transmise ensuite aux motoneurones. Chez les mammifères, on distingue deux zones de la moelle, regroupant de tels réseaux de neurones : l'une au niveau cervical, et l'autre au niveau lombaire. Ces deux réseaux générateurs de rythme seraient respectivement responsables de la motricité des pattes antérieures et postérieures. Cependant, même si le concept de CPG est aujourd'hui largement admis au sein de la communauté scientifique, et que de nombreuses études visant à les décrire ont été réalisées, aucune description précise de ces réseaux générateurs de rythme n'a encore été établie. Et pour cause, la localisation exacte, la composition en termes de populations neuronales et le rôle relatif de chacune d'elle, ainsi que le fonctionnement global de ces CPGs restent des sujets encore aujourd'hui très discutés. Les récentes avancées de la génétique et de la biologie moléculaire ont cependant permis d'identifier et de localiser différentes populations neuronales impliquées directement ou indirectement dans la genèse de l'activité locomotrice.

Le concept de réseaux spinaux qui seraient capables de générer un patron d'activité locomoteur en l'absence de retour sensoriel et de commande descendante en provenance des structures supraspinales est né au début du 20^{ème} siècle, des travaux de Sherrington (1910) (Sherrington, 1910), puis de Brown (1911) (Brown, 1911; 1914) sur le chat. En considérant les conclusions de ces deux études majeures, Graham Brown propose alors un modèle dans lequel l'alternance observée entre les muscles fléchisseurs et extenseurs durant la marche dépendrait de l'existence de « demi-centres », ou hémigénérateurs, lombaires antagonistes s'inhibant de manière réciproque (via l'intermédiaire d'interneurones commissuraux), et générant ainsi l'alternance et la coordination entre les membres (le « half-center model » en anglais) (Brown, 1911; 1914). Des travaux chez d'autres modèles animaux (chien, cochon d'inde, lapin) sont par la suite venus appuyer cette théorie (Brown & Sherrington, 1912; Engberg & Lundberg, 1969; Viala & Buser, 1971). Cette organisation des centres générateurs de rythme est toujours admise de nos jours mais a, au cours des années, été intégrée dans une organisation beaucoup plus complexe et complétée par d'autres modèles permettant d'expliquer la genèse du patron locomoteur.

Ainsi, le milieu du 20^{ème} siècle a vu naître plusieurs théories plus ou moins complexes concernant le fonctionnement des CPGs locomoteurs : de la simple boucle d'interneurones inhibiteurs capable de produire une activité rythmique (Gurfinkel & Shik, 1974) à l'hypothèse suivant laquelle chaque articulation posséderait son propre générateur d'activité alternée

(Grillner, 1981), ou bien à un modèle dans lequel les CPGs seraient composés de deux centres générateurs, l'un pour le rythme et l'autre pour le patron locomoteur (Perret, 1983).

Finalement, l'organisation des réseaux locomoteurs spinaux repose vraisemblablement sur un mélange de tous ces modèles avec des articulations complexes permettant à des groupes d'interneurones d'intégrer les informations descendantes afin de générer d'une part le rythme et d'autre part le patron locomoteur tout en tenant compte des informations sensorielles qui viennent les moduler en permanence.

Au cours de ces dernières décennies, une multitude d'approches expérimentales (animaux curarisés, rhizotomies, techniques d'électrophysiologie *in vitro*, marquages neuroanatomiques, animaux transgéniques...) menées chez de nombreux vertébrés, tels que le chat, le lapin, le rat, la souris, le poulet, la tortue, le xénope ou encore la lamproie ont permis de mieux caractériser la localisation, le support neuronal et le contrôle des réseaux générateurs de la locomotion (Grillner *et al.*, 1976; Forssberg *et al.*, 1980a; 1980b; Grillner *et al.*, 1981; Rossignol *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2000; Grillner, 2003). Ainsi, une régionalisation des centres regroupant les neurones à l'origine de la genèse de l'activité locomotrice a été mise en évidence chez les animaux utilisant un mode de propulsion appendiculaire (Viala & Vidal, 1978; Grillner & Zangger, 1979; Deliagina *et al.*, 1983; Marcoux & Rossignol, 2000; Magnuson *et al.*, 2005). Le développement des préparations *in vitro* a largement contribué à l'étude de la localisation des CPGs (Whelan, 2003).

b2.2 La préparation de moelle épinière isolée in vitro : technique de choix dans l'étude de la locomotion

Le maintien d'une préparation de moelle épinière de rongeur nouveau-né isolée *in vitro* est rendu possible par la perfusion de liquide céphalo-rachidien oxygéné indispensable à sa survie et qui, grâce à une myélinisation encore incomplète des fibres nerveuses dans les premiers jours postnataux, peut pénétrer et diffuser efficacement dans les tissus spinaux. Historiquement, cette préparation de moelle épinière *in vitro* a été développée pour étudier les réflexes spinaux (Vaughn & Grieshaber, 1973; Saito, 1979; Kudo & Yamada, 1987a). La découverte du NMDA (N-méthyl-D-aspartique), un agoniste glutamatergique, comme neuromodulateur permettant de déclencher des activités rythmiques alternées de type locomoteur (Kudo & Yamada, 1987b; Smith *et al.*, 1988) a permis par la suite d'étudier la fonction locomotrice et les réseaux neuronaux impliqués dans sa genèse (Cazalets *et al.*,

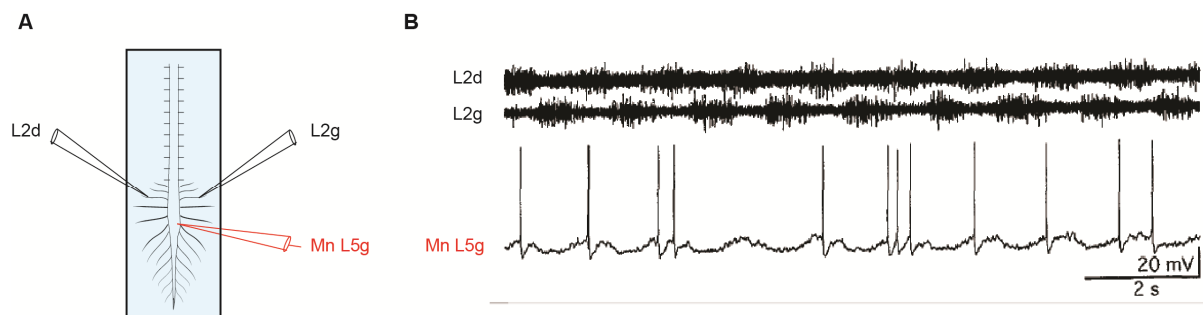


Figure 5 La locomotion fictive enregistrée sur la préparation de moelle épinière isolée *in vitro*.

La moelle épinière d'un rat nouveau-né est isolée par une laminectomie puis placée dans une cuve d'enregistrement contenant du liquide céphalo-rachidien artificiel oxygéné. L'activité locomotrice est enregistrée au niveau des racines ventrales motrices lombaire 2 (L2) droite et gauche (A) afin de visualiser sur les tracés extracellulaires (B) l'alternance droite/gauche caractéristique de la locomotion. L'enregistrement intracellulaire d'un motoneurone situé au niveau L5 gauche a permis de montrer que celui-ci reçoit une commande en provenance des réseaux générateurs de rythme locomoteur: il émet des potentiels d'actions rythmiquement en alternance avec les bouffées locomotrices enregistrées en L2 ipsilatéral (L2g) et en phase avec l'activité L2 controlatérale.

(Modifié d'après Cazalets et al., 1992)

1995), en déclenchant des épisodes d'activité locomotrice enregistrés extracellulairement au niveau des racines ventrales de la moelle.

En effet, le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal de la moelle épinière et il joue un rôle déterminant dans la genèse du rythme locomoteur (Taccola & Nistri, 2006; Hinckley & Ziskind-Conhaim, 2006; Al-Mosawie *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Zagoraiou *et al.*, 2009). On distingue deux grandes familles de récepteurs au glutamate : les récepteurs métabotropiques, mglu1 à mglu8 qui sont des récepteurs couplés à des protéines G, et ionotropiques. Ces derniers comprennent les récepteurs NMDA (N-Metyl-D-Aspartate), AMPA (A-amino-3-hydroxy-5Metyl-4-isoxazolePropionic Acid) et Kainate et sont des récepteurs canaux qui permettent, lors de la fixation du glutamate, de déclencher une entrée de cations (Na^+ , K^+ , ou Ca^{2+}) entraînant une dépolarisation du neurone postsynaptique. Les récepteurs NMDA, jouent notamment un rôle central dans la genèse de plasticité synaptique à long terme : potentialisation (LTP) ou dépression (LTD) (Aroniadou & Teyler, 1991; Bear & Malenka, 1994).

Il existe de nombreux agonistes au glutamate, plus ou moins sélectifs d'un type de récepteur. Leur utilisation chez des modèles animaux, *in vivo* et *in vitro* a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant du système glutamatergique dans la locomotion (Houssaini *et al.*, 1993; Rossignol *et al.*, 1998; Taccola & Nistri, 2006). C'est le cas dans la préparation de moelle épinière de rongeur isolée *in vitro* ou l'application d'agonistes glutamatergiques, et plus spécifiquement des récepteurs NMDA, permet de déclencher et de moduler des activités motrices alternées *in vitro* (Houssaini *et al.*, 1993). Chez les mammifères, l'initiation de la locomotion est glutamate-dépendante, ce qui suggère très fortement que ce neurotransmetteur est impliqué non seulement dans la genèse du patron et du rythme, mais aussi dans les voies descendantes initiant la commande motrice (Cazalets *et al.*, 1992a; Houssaini *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 2008)

L'activité locomotrice déclenchée pharmacologiquement ou électriquement (par stimulation des racines sensorielles par exemple) sur une préparation *in vitro* est qualifiée de locomotion fictive, puisque qu'en l'absence des muscles effecteurs du mouvement, c'est l'activité nerveuse qui est directement enregistrée. Cette activité s'organise en bouffées de potentiels d'action, correspondant à la décharge simultanée de groupes de motoneurones à l'origine de la contraction d'un muscle donné. Ainsi, en enregistrant par exemple les racines ventrales L2 et L5 des côtés droit et gauche, les bouffées d'activité enregistrées correspondront à l'activation fictive des muscles fléchisseurs et extenseurs, droits et gauches

respectivement (Figure 5). On parle de la « drive », ou commande synaptique pour définir le phénomène par lequel l'activité d'un neurone est commandée, influencée par l'activité d'autres neurones situés en amont dans le réseau (Cazalets *et al.*, 1995; 1996). Ainsi, des enregistrements intracellulaires durant des épisodes de locomotion fictive ont permis de montrer que certains interneurons sont actifs rythmiquement, de façon synchrone ou non avec les bouffées de potentiel d'action enregistrées au niveau des nerfs moteurs, mettant en lumière un rôle potentiel de ces neurones dans la « drive » des motoneurons lors de la locomotion.

b2.3 Localisation et organisation cellulaire des CPGs

Les nombreux travaux utilisant cette préparation de moelle épinière *in vitro* ont permis de délimiter la zone minimale de tissu nécessaire pour induire une activité rythmique alternée bilatéralement au niveau des segments lombaires L1 et L2 chez le rat (Cazalets *et al.*, 1995; Kjaerulff & Kiehn, 1996; Bracci *et al.*, 1996; Cowley & Schmidt, 1997; Kremer & Lev-Tov, 1997). De manière similaire, les régions les plus rythmogènes des CPGs antérieurs ont été localisées entre les segments C7 et T1 chez le rat, même si une zone plus large comprenant un plus grand nombre de segments cervicaux (depuis C5) est nécessaire pour l'obtention d'un patron locomoteur (Ballion *et al.*, 2001).

Enfin, chez le mammifère, plusieurs populations d'interneurones ont pu être identifiées, dans les zones connues pour participer à la genèse du rythme locomoteur, sur la base de leurs propriétés membranaires (rebonds post-inhibiteurs, plateaux...), de leur connectivité (afférences sensorielles, efférentes motrices) ainsi que leur patron de décharge lors de la locomotion (extenseur, fléchisseur, tonique). Ces populations d'interneurones excitateurs et inhibiteurs se dégagent toutes plus ou moins comme étant possiblement impliquées dans la genèse du rythme (pour revue : Kiehn, 2006), bien que l'implication de chacune ne soit pas clairement définie aujourd'hui. Les propriétés et le rôle potentiel de chacune d'elles seront détaillés dans un paragraphe ultérieur.

Une fois l'information rythmique locomotrice générée au niveau de ces réseaux d'interneurones, celle-ci est transmise aux motoneurons de la moelle épinière. Les motoneurons sont les neurones de sortie du système nerveux central (Creed & Ruch, 1932) : leurs corps cellulaires sont situés dans la partie ventrale de la substance grise de la moelle épinière dans la lamina IX et chacun d'eux possède un axone qui, en quittant la moelle pour

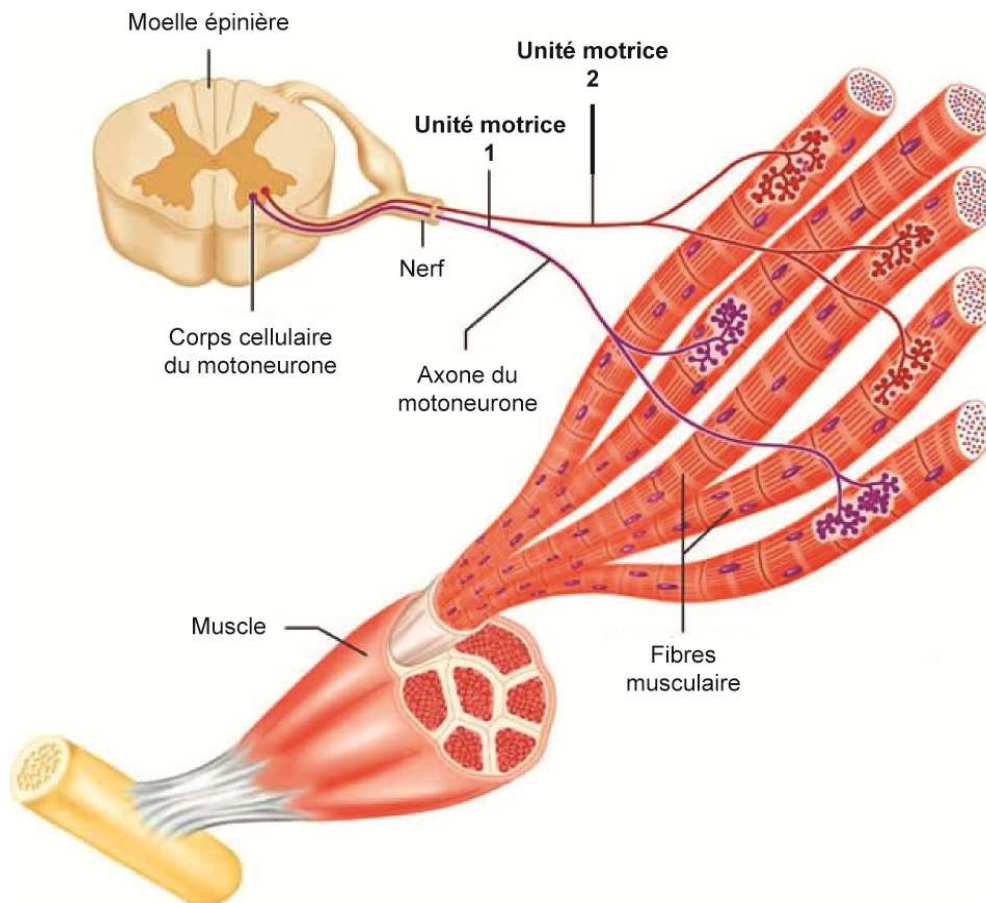


Figure 6 Représentation schématique de l'organisation d'une unité motrice.

Chaque unité motrice mature est composée d'un motoneurone et des fibres musculaires qu'il innerve, via ses prolongations axonales. Il est à noter que dans les stades postnataux il existe une polyinnervation des fibres musculaires par les motoneurones, celle-ci se résorbant rapidement au cours du développement (Navarrete et al., 1993).

(Adapté d'après la 10ème édition du "Holes" chapitre 9: anatomie humaine et physiologie).

rejoindre les muscles qu'il active, forme une racine ventrale motrice en s'accolant avec d'autres axones innervant les mêmes muscles.

c. L'étage périphérique : sorties motrices et retours sensoriels

L'axone d'un motoneurone se dirige à travers le corps, parfois sur de très grandes distances, pour innerver les fibres du muscle qu'il contrôle. L'ensemble constitué par un motoneurone et l'ensemble des fibres musculaires qu'il innerve est appelé une « unité motrice » (Figure 6). Chaque axone, en arrivant à proximité du muscle, se divise en plusieurs branches chacune d'entre elles établissant une jonction neuromusculaire avec l'une des fibres musculaires du muscle. Ainsi, un motoneurone lorsqu'il est activé, peut entraîner la contraction de plusieurs fibres musculaires d'un même muscle. Au contraire, chez l'adulte, une fibre musculaire n'est contactée que par un seul motoneurone, puisqu'au cours du développement postnatal, la polyinnervation des fibres musculaires par les motoneurones est résorbée (Bagust *et al.*, 1973; Navarrete & Vrbová, 1993).

L'activation simultanée des motoneurones innervant les mêmes muscles permet à l'organisme de contracter tout ou partie des fibres musculaires de ce muscle, et donc d'induire sa contraction avec plus ou moins d'intensité, tout en respectant le patron rythmique transmis par les CPGs via les motoneurones.

Durant la réalisation d'un mouvement, les afférences sensorielles proprioceptives et cutanées renseignent le système nerveux central sur l'exécution de la commande motrice. En effet, bien qu'un patron moteur rythmique puisse être produit en l'absence de tout retour sensoriel (Grillner *et al.*, 1981), celui-ci est influencé en permanence par des signaux phasiques en provenance de la périphérie (Dubuc *et al.*, 1988). Ces informations proviennent de récepteurs sensoriels localisés dans les muscles, mais aussi les tendons, les articulations et la peau (Dietz *et al.*, 2002).

Les contrôles sensoriels sont multiples, et permettent une adaptation quasi instantanée de l'activité locomotrice à la fois à l'environnement, mais aussi aux contraintes de l'organisme lui-même par la convergence d'informations visuelles (Serk et Fowler, 2001), cutanées (Zehr *et al.*, 1998 ; Rossignol *et al.*, 2006 ; Varejão et Filipe, 2007), proprioceptives (Pearson, 1995) et vestibulaires (Kennedy *et al.*, 2003).

Les afférences cutanées, en provenance des mécanorécepteurs présents à la surface de la peau (complexe de Merkel et corpuscules de Ruffini et de Meissner), codent les

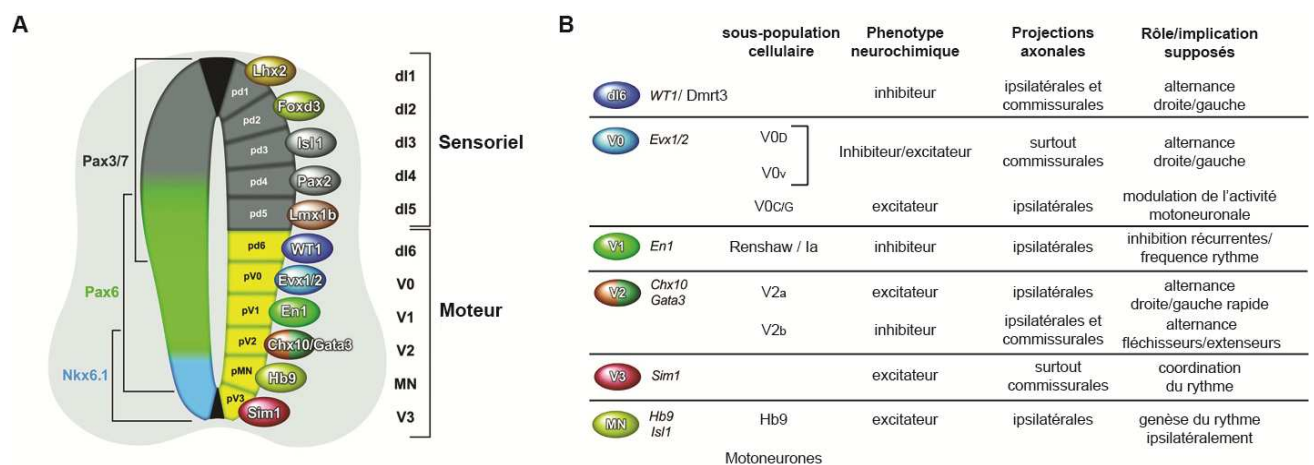


Figure 7 Les précurseurs génétiques à l'origine des interneurones spinaux.

A. Différents progéniteurs génétiques sont à l'origine des différentes populations d'interneurones des réseaux spinaux. Ces facteurs permettent de différencier ces populations et d'identifier des sous-populations, ainsi que de générer des animaux dont l'expression d'une population spécifique est modifiée. **B.** L'identification de ces progéniteurs a permis de déterminer un certain nombre de caractéristiques neurochimiques, anatomiques ou fonctionnelles des différentes classes d'interneurones spinaux.

(Modifié d'après Gosgnach, 2011 et Goulding, 2009)

informations relatives au toucher discriminatif (fibres des groupes II et III). Des données obtenues sur le chat montrent que ces afférences joueraient également un rôle dans le placement des membres lors de la locomotion (Bouyer & Rossignol, 2003a; 2003b; Varejao & Filipe, 2007) et qu'elles permettraient de renforcer l'activité des neurones composant les CPGs (Viala & Buser, 1969; Viala & Vidal, 1978; Fleshman *et al.*, 1984; 1988), particulièrement lors d'un franchissement d'obstacle ou d'une perturbation motrice (Wutzke *et al.*, 2013). Ces données appuient les observations faites chez des patients présentant une altération de la transmission des informations cutanées chez qui le patron moteur est altéré (Lin & Yang, 2011). L'activation des corpuscules de Pacini et de terminaisons libres présents dans la peau va permettre la détection de dépressions phasiques de la surface cutanée et de transmettre les informations nociceptives via les fibres III et IV (pour revue : Panek *et al.*, 2014).

Les afférences proprioceptives, quant à elles, ont été classées en différents groupes suivant leur origine. On distingue ainsi : les afférences provenant des fuseaux neuromusculaires (fibres Ia et II), des organes tendineux de Golgi (fibres Ib), et des mécanorécepteurs de la capsule articulaire (fibres I et II). Les afférences proprioceptives sont impliquées dans les réflexes myotatique (fibres Ia) et myotatique inverse (fibres Ib), ainsi que dans le contrôle de l'initiation du pas lors d'un épisode de locomotion. La mise en jeu naturelle de ces afférences par, par exemple, un mouvement des articulations ou leur stimulation électrique est capable d'activer directement les CPGs afin d'initier une séquence locomotrice (Sherrington, 1910; Grillner & Rossignol, 1978; Smith *et al.*, 1988; Marchetti *et al.*, 2001; Juvin *et al.*, 2012).

3. Les populations cellulaires spinales impliquées dans la locomotion.

a. Les interneurones ventraux et leur implication dans les CPGs moteurs

Les circuits moteurs de modèles animaux non-mammaliens, tels que la lamproie (Grillner, 2003) et le xénope (Roberts *et al.*, 1998), sont de nos jours très bien caractérisés. Concernant les réseaux moteurs spinaux des mammifères, de nombreuses populations d'interneurones participeraient à l'élaboration du rythme locomoteur. Le développement de nouvelles approches basées sur des techniques de génétique moléculaire combinées à l'électrophysiologie et à l'imagerie fonctionnelle a permis d'identifier six populations d'interneurones : V0, V1, V2, V3, DI6 et Hb9 susceptibles d'appartenir aux réseaux générateurs de rythme locomoteur (Ericson *et al.*, 1997; Matisse & Joyner, 1997; Burrill *et al.*, 1997; Pierani *et al.*, 1999; Briscoe *et al.*, 2000; Garcia-Campmany *et al.*, 2010; pour revue :

Jessell, 2000) (Figure 7). Ces interneurons ont été identifiés sur la base des facteurs de transcription qu'ils expriment au cours du développement (Tanabe & Jessell, 1996). Les facteurs progéniteurs étant directement responsables de la destinée de chaque neurone (Bang & Goulding, 1996; Goulding & Lamar, 2000; Goulding & Pfaff, 2005), ainsi que de ses projections axonales (Betley *et al.*, 2009) et de son phénotype électrochimique (Cheng *et al.*, 2005; Mizuguchi *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2007), il est fortement probable que les neurones exprimant les mêmes facteurs de transcription présentent des propriétés et une fonction commune. Grâce aux outils génétiques il est possible de générer des souris 1) n'exprimant plus un facteur de transcription donné (souris "knock-out", KO), 2) le surexprimant (souris "knock-in", KI), ou 3) exprimant un facteur de transcription donné associé à une protéine fluorescente permettant la visualisation directe de la population d'interneurones concernés (Chalfie *et al.*, 1994; Zacharias *et al.*, 2000; Kiehn, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

a1. V0

Les interneurons V0 sont parmi les premiers à avoir été pressentis comme faisant partie du CPGs locomoteur. Ces interneurons dérivent de l'expression d'un gène homeobox spécifique, *Dbx1* (gène codant pour la protéine *Evx1* et notamment responsable de la localisation et de la différenciation des V0), entre les stades embryonnaires 10 et 13 (E10 à E13) Les V0 sont situés, une fois le tube neural formé, au niveau ventro-médian de l'ensemble des segments de la moelle épinière (Pierani *et al.*, 1999) et sont essentiellement commissuraux (Pierani *et al.*, 2001). Cette population d'interneurones est composée d'environ deux tiers de neurones à phénotype inhibiteur et d'un tiers de neurones à phénotype exciteur (Lanuza *et al.*, 2004).

Initialement, il a été distingué deux types de V0 suivant leur localisation : dans la région plutôt dorsale se trouvent les V0D, tandis que les V0V occupent une zone plus ventrale. Ces deux populations appartenant aux V0, elles expriment le facteur *Dbx1*, cependant, un facteur spécifique de la sous-population V0V a pu être identifié, permettant ainsi l'étude du rôle respectif de chacune de ces sous populations dans la genèse du rythme locomoteur (Moran-Rivard *et al.*, 2001). En effet, il a été montré, à l'aide de souris mutées pour *Dbx1*, que les V0 dans leur ensemble sont responsables de l'alternance gauche/droite lors d'un épisode de locomotion (Lanuza *et al.*, 2004), mais ne joueraient pas de rôle dans l'initiation de l'acte moteur. Lorsque seuls les V0V sont supprimés, on n'observe cependant pas de modification du patron locomoteur, ce qui a conduit les auteurs à conclure que les V0V

ne jouent pas un rôle déterminant dans l'alternance gauche/droite, et que les populations V0D et V0V auraient probablement des effets similaires et additionnels (Lanuza *et al.*, 2004).

Beaucoup plus récemment, un troisième sous-type d'interneurones V0 a été mis en évidence : les V0C/G. Ces interneurones, exprimant spécifiquement le facteur Pitx2, dérivent de la population V0V, et ont la particularité de contacter majoritairement les motoneurones ipsilatéraux par des synapses soit glutamatergiques (V0G) soit cholinergiques (V0C) (Zagoraïou *et al.*, 2009) afin de moduler leur activité.

a2. V1

Les interneurones appartenant à la population V1 sont caractérisés par l'expression du facteur « Engrailed 1 » (En1). Ces interneurones sont tous de type inhibiteur et projettent ipsilatéralement sur les motoneurones et les segments proches (Saueressig *et al.*, 1999; Sapir *et al.*, 2004; Betley *et al.*, 2009). Les V1 sont composés de deux sous-types de neurones, largement décrits dans la littérature : les cellules de Renshaw et les interneurones de type Ia (Sapir *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2005). Globalement, ces neurones sont respectivement responsables d'inhibitions récurrentes des motoneurones lorsque ceux-ci sont activés (Eccles *et al.*, 1954; Schneider & Fyffe, 1992; Geiman *et al.*, 2002; Lamotte d'Incamps & Ascher, 2008) et d'inhibitions réciproques des motoneurones contralatéraux (Eccles & Lundberg, 1958; Hultborn *et al.*, 1976a; 1976b; 1976c).

Chez les souris KO pour les V1 une diminution de la vitesse de locomotion a été observée (Gosgnach *et al.*, 2006). Cependant, lors d'un épisode locomoteur, les motoneurones de ces animaux KO présentent toujours des inhibitions rythmiques suggérant que les V1 (cellules de Renshaw et Ia) ne sont pas les seuls neurones inhibiteurs à l'origine de la commande inhibitrice locomotrice (Gosgnach *et al.*, 2006; Brownstone & Bui, 2010).

a3. V2

Les interneurones V2 dérivent d'un progéniteur commun Lhx3 (gène à homéodomaine LIM de type 3) (Sharma *et al.*, 1998; Bretzner & Brownstone, 2013). Leur corps cellulaire est localisé dans la lamina VII où ils s'étendent du canal central jusqu'au bord de la matière grise (Dougherty & Kiehn, 2010a). Les axones des interneurones V2 projettent à distance sur les différents segments spinaux. Deux sous-types de V2 ont été identifiés : les V2a et V2b.

Les interneurones V2a, qui expriment le facteur de transcription Chx10 (gène à homéodomaine ceh10) (Peng *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1994; Bretzner & Brownstone, 2013), projettent uniquement vers les cellules ipsilatérales, ont un phénotype très majoritairement

(95 %) excitateur glutamatergique (Al-Mosawie *et al.*, 2007; Lundfald *et al.*, 2007) et présentent des propriétés membranaires de neurones oscillants. (Kiehn *et al.*, 2008; Dougherty & Kiehn, 2010b; Zhong *et al.*, 2010). La délétion de cette population chez la souris (KO V2) induit des altérations de l'alternance gauche/droite lors d'épisodes locomoteurs induits *in vitro*, comme c'est le cas lors de la suppression des V0 (Crone *et al.*, 2008), et ce, plus particulièrement lors d'activités rapides (Crone *et al.*, 2009; Dougherty & Kiehn, 2010b; Zhong *et al.*, 2010). Des études anatomiques ont mis en évidence un lien entre V2a et V0v. Les interneurones V2a projettent sur les V0v ipsilatéraux qui, à leur tour, traverseraient la commissure afin d'inhiber les motoneurones contralatéraux, favorisant ainsi l'alternance bilatérale (Crone *et al.*, 2008). Encore une fois, ces travaux restent à compléter afin de déterminer précisément l'implication des V2a dans la genèse du rythme et du patron locomoteur. Cependant, au vu de ces résultats, il apparaît que ces interneurones, bien qu'ils ne suffisent pas à eux seuls à générer la locomotion, joueraient un rôle important dans l'élaboration de l'alternance bilatérale principalement lorsqu'une locomotion rapide est nécessaire (Crone *et al.*, 2009; Dougherty & Kiehn, 2010b; Zhong *et al.*, 2010).

Les interneurones V2b, quant à eux, se différencient du reste des V2 par l'expression des facteurs Gata 2 et 3 (Zhou *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Karunaratne *et al.*, 2002). Au contraire des V2a, les V2b émettent des projections inhibitrices GABAergiques ou glycinergiques (Al-Mosawie *et al.*, 2007; Lundfald *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2009) vers les motoneurones, ipsilatéraux et, pour une petite partie, contralatéraux (Lundfald *et al.*, 2007). Très peu d'études se sont jusqu'à aujourd'hui intéressées au rôle joué par les V2b durant la locomotion. Une étude récente a, cependant, montré que des souris n'exprimant ni les V2b ni les V1 (KO V2b-V1), présentent de graves altérations motrices. *In vitro*, l'alternance fléchisseur/extenseur est absente chez ces animaux. Ce résultat suggère que ces deux classes d'interneurones inhibiteurs sous-tendent l'alternance fléchisseur/extenseur au sein des CPGs locomoteurs (Zhang *et al.*, 2014a).

a4. V3

Les V3 forment une population d'interneurones commissuraux excitateurs glutamatergiques qui projettent sur les motoneurones (Zhang *et al.*, 2008). Ces interneurones V3 expriment tous le facteur Sim1 (facteur de transcription « single-minded » de type 1 impliqué dans le développement du système moteur) (Michaud *et al.*, 1998; Briscoe & Ericson, 1999; Goulding *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008) et leurs corps cellulaires sont localisés dans les régions dorso et ventro médianes de la moelle épinière. Comme pour les

autres classes d'interneurones, des études *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées sur des souris KO V3. Chez ces animaux, la locomotion est altérée et se présente sous une forme irrégulière et asymétrique entre les deux côtés d'un même segment (Zhang *et al.*, 2008). Ces travaux ont amené les auteurs à conclure que les interneurones V3 ne sont donc pas impliqués dans la genèse du rythme mais plutôt dans son patron en réglant les coordinations entre les parties droite et gauche des réseaux médullaires (Zhang *et al.*, 2008). Il faut tout de même noter que dans cette étude l'expression de *Sim1* a été inhibée uniquement dans la partie ventro-médiane de la moelle. Bien que les V3 aient été jusqu'alors considérés comme une population homogène, il a été récemment montré que les V3 dorsaux et ventraux possèdent des caractéristiques différentes en termes de propriétés intrinsèques et de distribution (Borowska *et al.*, 2013). En effet, les V3 ventraux possèdent une arborisation dendritique moins importante et sont capables de décharger de façon tonique et soutenue, contrairement aux V3 dorsaux qui possèdent une morphologie plus complexe et déchargent avec une fréquence plus faible. Il semblerait que ces deux sous populations soient actives de manière différentielle durant la marche et la nage, l'une agissant probablement comme neurones pré moteurs (V3 ventraux) et l'autre comme relais de l'information sensorielle (V3 dorsaux) (Borowska *et al.*, 2013).

a5. dI6

Les interneurones dI6 sont issus de progéniteurs dorsaux qui migrent au niveau ventral de la moelle durant la genèse du tube neural de la souris, et s'expriment au niveau des lamina VII et VIII en postnatal (Gross *et al.*, 2002). Ce sont des neurones inhibiteurs projetant ipsilatéralement et contralatéralement. Tout comme les autres populations d'interneurones issus de progéniteurs dorsaux (dI0 à 6), ces neurones expriment le facteur *Lbx1*. Cependant, l'absence d'identification d'un facteur génétique spécifique au dI6 a très longtemps retardé leur caractérisation. Des études ont tenté de contourner cette absence de facteur ciblant les dI6 (Dyck *et al.*, 2012) en utilisant une approche utilisant d'autres facteurs, tel que *Dbx1* couplé à une protéine fluorescente afin de cibler les dI6 exprimant ce facteur tout en évitant les V0. Ces travaux ont permis de montrer que les dI6 seraient composés de deux sous-types distincts d'interneurones : l'un actif rythmiquement durant la locomotion et possédant des propriétés de neurones oscillants, et l'autre, n'exprimant pas ces propriétés et ayant une activité bien moins corrélée au rythme locomoteur (Dyck *et al.*, 2012). Très récemment, l'identification d'une mutation sur le gène *Dmrt3* (facteur de transcription de la famille des DMRT possédant un domaine de liaison à l'ADN de type DM-3), entraînant une suppression sélective de

l'expression des dI6 de type rythmiques, a ouvert la voie aux études sur ces interneurones (Andersson *et al.*, 2012). Il a été montré que les animaux Dmrt3 KO présentaient des altérations importantes du patron locomoteur, laissant présager un rôle des dI6 dans l'alternance droite/gauche, probablement complémentaire aux V0 (Lanuza *et al.*, 2004; Goulding, 2009; Andersson *et al.*, 2012). Cependant, même s'il semble aujourd'hui évident qu'une partie au moins des dI6 joue un rôle dans la mise en place du patron locomoteur, l'implication et la fonction de cette population reste à préciser (pour revue : Vallstedt & Kullander, 2013).

a6. Hb9

Le gène homeobox Hb9 (pour « basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9 ») est un facteur de transcription exprimé à la fois par les motoneurones en période embryonnaire (Arber *et al.*, 1999) et par une population spécifique d'interneurones, appelés Hb9, en postnatal (Wilson *et al.*, 2005; Hinckley *et al.*, 2005). Ces interneurones sont localisés dans la partie ventro-médiane de la moelle épinière (lamina VII et VIII) de la région cervicale à la région lombaire (Wilson *et al.*, 2005; Hinckley *et al.*, 2005; Ziskind-Conhaim *et al.*, 2010).

Les interneurones Hb9 présentent un ensemble de caractéristiques qui laisse à penser que ces neurones font partie du CPG locomoteur (Brownstone & Wilson, 2008; Ziskind-Conhaim *et al.*, 2010). En effet, ces interneurones excitateurs glutamatergiques forment 1) un réseau ipsilatéral interconnecté (Hinckley *et al.*, 2005), 2) sont actifs de façon rythmique et synchrone avec les motoneurones durant des épisodes de locomotion (Wilson *et al.*, 2005; Hinckley *et al.*, 2005) et 3) possèdent des propriétés de membrane leur permettant de générer des oscillations membranaires (Ziskind-Conhaim *et al.*, 2008). Ce dernier point a fait l'objet de nombreuses études au cours de ces dernières années, afin de caractériser les propriétés membranaires qui pourraient faire de ces neurones des oscillateurs responsables de la mise en place du rythme locomoteur. Les interneurones Hb9 sont en effet les seuls neurones des réseaux moteurs spinaux ayant été montré comme capables d'osciller de manière rythmique, indépendamment de processus impliquant les récepteurs au glutamate ou les canaux calciques (Tazerart *et al.*, 2008). L'oscillation membranaire des interneurones Hb9 repose sur la modulation de courants sodiques persistants (INAP) (Tazerart *et al.*, 2008). Les courants INAP à inactivation lente sont depuis longtemps considérés comme jouant un rôle prépondérant dans la genèse de comportements moteurs rythmiques (Butera *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 2006; Rybak *et al.*, 2006; McCrea & Rybak, 2007; Tazerart *et al.*, 2007; Pace *et*

al., 2007; Tazerart *et al.*, 2008; Ryczko *et al.*, 2010; Brocard *et al.*, 2010) et les propriétés oscillantes des neurones présentant des courants INAP en font d'excellents candidats pour composer les réseaux neuronaux des CPGs (Thoby-Brisson & Ramirez, 2001; Brocard *et al.*, 2006; Rybak *et al.*, 2006; Ziskind-Conhaim *et al.*, 2008; Tazerart *et al.*, 2008). Il a été montré que les oscillations membranaires des Hb9 liées aux INAP surviendraient à la suite de modifications des taux extracellulaires en Ca^{2+} et K^{+} causées par l'activation de certains neurones du SNC lors du déclenchement d'un épisode locomoteur (Kríz *et al.*, 1974; Lothman & Somjen, 1975; Heinemann & Lux, 1977; Nicholson *et al.*, 1978; Walton & Chesler, 1988; Heinemann *et al.*, 1990; Amzica, 2002; Tazerart *et al.*, 2008), faisant ainsi basculer l'activité des Hb9 vers un mode de décharge oscillatoire (Brocard *et al.*, 2013). Bien que la contribution des interneurons Hb9 à la genèse du rythme locomoteur soit encore débattue à l'heure actuelle (Kwan *et al.*, 2009), et qu'il soit malheureusement techniquement impossible de supprimer cette population sur la base d'un ciblage du facteur Hb9 puisque ce facteur est aussi exprimé par les motoneurons, il semble aujourd'hui hautement probable qu'une partie des interneurons Hb9 puisse contribuer à l'élaboration du rythme locomoteur au sein des réseaux moteurs spinaux en acquérant des propriétés de neurone oscillant (Butera *et al.*, 1999).

L'ensemble des données accumulées sur les interneurons moteurs met en évidence l'existence d'un réseau complexe (pour revue voir Kiehn & Dougherty, 2013). Bien que ce réseau fasse l'objet de nombreuses études utilisant des techniques toujours plus poussées et précises, l'identification des neurones à l'origine du rythme locomoteur reste aujourd'hui encore une énigme. L'apparition de nouvelles techniques, génétiques, moléculaires et optogénétiques permettra certainement de dynamiser et de pousser plus avant les recherches dans ce domaine (Hägglund *et al.*, 2010; 2013).

b. Les motoneurons : sorties motrices de la moelle

Les motoneurons constituent à eux seuls «La» voie de sortie de l'information motrice. En effet, c'est par ces neurones que le signal moteur initié et contrôlé par les structures supraspinales, puis élaboré par les CPGs spinaux, va activer les muscles appropriés et permettre la réalisation des mouvements (pour revue : Kanning *et al.*, 2010; Marin & Zytnicki, 2011).

Les motoneurons ont fait l'objet de très nombreuses études, depuis leur mise en évidence chez le xénope et les mammifères (Koelliker, 1862; Kühne, 1863), jusqu'à aujourd'hui. Les très nombreux travaux visant à les étudier permettent aujourd'hui de disposer

d'une véritable palette de connaissances de ces neurones, de leurs propriétés, et des différents sous-types qui les composent.

Les motoneurones des vertébrés sont des neurones cholinergiques qui expriment le facteur de transcription Hb9, commun avec les interneurones Hb9 (Arber *et al.*, 1999). La spécificité des motoneurones par rapport aux autres types neuronaux du SNC est que leur axone projette à l'extérieur de celui-ci, parfois sur de très longues distances. De plus, les motoneurones, émettent des collatérales d'axone sur les cellules de Renshaw, cellules inhibitrices qui contactent à leur tour les motoneurones. Ce circuit court permet un contrôle permanent de l'activité motoneuronale.

Les motoneurones, eu égard à leurs propriétés membranaires et aux nombreuses synapses qu'ils reçoivent, ne font pas que simplement transmettre la commande locomotrice au muscle mais constituent un dernier relais majeur d'intégration de la sortie motrice. En effet, les motoneurones spinaux possèdent la capacité de décharger et d'émettre des potentiels d'action (PA) de manière soutenue (Perrier & Hounsgaard, 2000; Brownstone, 2006; Heckman *et al.*, 2008). Cette capacité est sous-tendue par des courants entrants persistants, ou PICS de l'anglais « Persistent inward currents » (Granit *et al.*, 1963; Kernell, 1965). Ces courants dépolarisants entrants sont activés aussi longtemps que la membrane du motoneurone est dépolarisée (ElBasiouny *et al.*, 2010), ce qui permet aux motoneurones de produire des potentiels d'action de manière soutenue en réponse à une brève stimulation synaptique (Schwindt & Crill, 1980a; 1980b; Hounsgaard & Mintz, 1988; Hounsgaard *et al.*, 1988). Une hyperpolarisation brève du potentiel de membrane suffit alors à stopper ces courants dépolarisants (Hounsgaard & Mintz, 1988; Hounsgaard *et al.*, 1988; Kuo *et al.*, 2003; Bui *et al.*, 2008). Cette faculté à émettre des « potentiels de plateaux », lors d'une brève excitation du motoneurone (Hultborn *et al.*, 1975; Schwindt & Crill, 1980a; Hounsgaard *et al.*, 1984; Crone *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 1998) est dépendante du contrôle neuromodulateur monoaminergique des réseaux spinaux par les voies supraspinales (Hounsgaard & Mintz, 1988; Conway *et al.*, 1988; Hounsgaard & Kiehn, 1989; Perrier & Delgado-Lezama, 2005; ElBasiouny *et al.*, 2010). On peut notamment distinguer deux types de courants sous-tendant les PICS : les courants calciques persistants et les courants les courants sodiques persistants (Hounsgaard *et al.*, 1988; Hounsgaard & Kiehn, 1993; Booth & Rinzel, 1995; Carlin *et al.*, 2000; Lee & Heckman, 2001; Li & Bennett, 2003; Heckman *et al.*, 2003; Bui *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Carlin *et al.*, 2009; Perrier *et al.*, 2013).

Caractéristiques	Motoneurones			
	«Fast»	«Slow»	Alpha	Gamma
Fibres cibles	rapides (IIa/b)	lentes (I)	Extrafusales	Intrafusales
Branchements dendritiques	plus important	moindre	plus important	moindre
densité synaptique	moindre	plus importante	plus importante	moindre
boutons en C	plus présents	moins présents	présents	absents
résistance membranaire	plus petite	plus grande	plus grande	plus petite
ordre de recrutement	plus tard	premier	taille dépendant	
Vitesse de transport axonal	rapide	lent	rapide	lent
Taille des unités motrices	plus larges	plus petites	plus larges	plus petites
Altérations dans la SLA	plus précoces	plus tardives	oui	pas clair

Figure 8 Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des motoneurones alpha de type rapide ("fast") et lent ("slow") et des motoneurones gamma.
(Modifié d'après Kanning et al., 2010).

b1. Les motoneurones α , β et γ

Historiquement, les travaux d'Erlanger et Leksell (Erlanger & Bishop, 1926; Leksell, 1945), chez le xénope et le chat respectivement, ont permis de mettre en évidence l'existence de deux sous types de motoneurones, sur la base de la taille de leur axone et de leur rôle dans les différentes composantes de la réponse motrice (en termes de délai et d'intensité notamment) : les motoneurones alpha (α) et gamma (γ). Ces deux sous-types de motoneurones se sont révélés exprimer des caractéristiques totalement différentes, ce qui a permis d'adopter définitivement cette subdivision comme nomenclature courante (Figure 8). Enfin, un troisième sous-type de motoneurone a été identifié plus tardivement : les motoneurones bêta (β), qui présentent des caractéristiques intermédiaires, entre les motoneurones α et γ .

Les motoneurones α sont les plus nombreux. Ils sont caractérisés par un plus gros corps cellulaire, ainsi qu'un axone de plus large diamètre que les autres types de motoneurones. L'activation des motoneurones α permet la contraction des fibres musculaires squelettiques extrafusales qu'ils innervent, avec assez de force pour mettre le squelette en mouvement, ce sont eux qui sont responsables de la contraction musculaire et de la mise en mouvement. L'étude des propriétés contractiles des fibres musculaires qu'ils connectent a permis de les subdiviser en trois types (Burke *et al.*, 1971; 1973):

- Les motoneurones qui connectent des fibres à contraction rapide (type IIb), fatigables, de l'anglais « fast-twitch, Fatigable » (FF) possèdent, parmi les motoneurones α , les plus gros corps cellulaires, une arborisation dendritique très importante et les axones les plus larges et myélinisés, leur permettant de conduire le signal très rapidement. Ces motoneurones α FF contactent les fibres musculaires de type IIb afin de réaliser une contraction musculaire forte et rapide mais de courte durée. En effet, ces neurones regroupent des caractéristiques (Figure 8) leur permettant d'induire des mouvements répondant à des stimuli environnementaux qui nécessitent d'activer un muscle très rapidement et avec beaucoup de force, de façon transitoire cependant.

- Les motoneurones qui connectent les fibres de type IIa à contraction rapide résistant à la fatigue, ou « Fast-twitch, Fatigue-Resistant » (FR) sont légèrement plus petits que les FF. L'activation de ces neurones permet, comme pour les FF, d'induire une contraction puissante et rapide des muscles, mais qui peut être maintenue dans le temps. Cette caractéristique permet notamment à ces neurones d'activer des muscles posturaux, qui nécessitent souvent une contraction durable.

- Les motoneurones qui connectent les fibres de type I à contraction lente résistant à la fatigue, ou « Slow-twitch, Fatigue-resistant » (S) sont les plus petits des motoneurones α et permettent une contraction moins puissante, mais durable, des muscles squelettiques (Figure 8).

Les motoneurones γ innervent les fibres musculaires intrafusales, et sont de plus petit diamètre que les motoneurones α . Il a été mis en évidence deux sous-types de motoneurones γ suivant le type de fibre qu'ils innervent : Ia ou II (Hunt, 1954). Globalement, il est considéré que les motoneurones γ permettent d'adapter la réponse musculaire en fonction de l'étirement des fibres musculaires (Hunt & Kuffler, 1951; Kuffler *et al.*, 1951). En effet, lorsque l'animal veut effectuer un mouvement, les motoneurones α vont permettre d'activer les fibres extrafusales, induisant le raccourcissement du muscle et donc sa contraction. L'activation des motoneurones γ permet alors d'empêcher le relâchement des fuseaux neuromusculaires en activant les fibres intrafusales en mettant en jeu une boucle sensorielle (Kanning *et al.*, 2010). De plus, les motoneurones γ joueraient un rôle dans les proprioceptions statiques et dynamiques.

Les motoneurones β , quant à eux, innervent à la fois des fibres extra et intrafusales. Ce sous-type de motoneurone a été mis en évidence chez les amphibiens (Smith *et al.*, 1973) puis leur présence chez les mammifères a pu être confirmée chez le chat, le rat et la souris (Bessou *et al.*, 1963a; 1963b; Kidd, 1964; Brown *et al.*, 1965). Bien que leur rôle soit encore mal défini, on peut supposer que ces motoneurones agissent en complément à la fois des motoneurones α et γ (Kanning *et al.*, 2010; Marin & Zytnicki, 2011).

b2. Le principe de taille

Les fibres musculaires constituant les muscles exprimant des propriétés contractiles variées, l'ordre dans lequel celles-ci vont être recrutées par les motoneurones est important à la fois pour générer une graduation de la contraction, et pour une meilleure efficacité métabolique.

Le recrutement des motoneurones eux-mêmes dépend de nombreux facteurs avec, en premier lieu, les capacités de leur membrane plasmique. En effet, la résistance de la membrane d'un neurone à un stimulus électrique permet de déterminer un seuil à partir duquel le neurone pourra être activé et produire un potentiel d'action. Cette résistance est elle-même déterminée par différents paramètres, parmi lesquels la morphologie et la taille du neurone. C'est justement sur cette dernière caractéristique, qu'est basé le principe d'ordre de

recrutement décrit par Henneman (Henneman, 1957), appelé « principe de taille ». Selon lui, la mise en jeu des motoneurones dans l'action motrice est à la fois fonction de leur diamètre et de leur excitabilité : lors d'une activité motrice nécessitant le recrutement d'un nombre de fibres musculaires de plus en plus important, les motoneurones les plus excitables seront activés les premiers. Ainsi, les petits motoneurones (type S) seraient mis en jeu les premiers lors d'une action motrice, suivraient les motoneurones FR et enfin, lorsque l'action nécessiterait plus de puissance, les FF.

4. Neuromodulation et adaptabilité de la locomotion

Les réseaux spinaux que nous avons décrits permettent donc, par la mise en jeu des différents acteurs cellulaires, de générer une commande motrice fine et contrôlée. Cependant, les contraintes internes et externes, en provenance de l'organisme lui-même ou de son environnement, nécessitent une adaptation permanente de la locomotion à court, moyen et long terme. Ces mécanismes adaptatifs reposent en grande partie sur la mise en jeu des différents systèmes sensoriels, ou bien de processus de maturation et de réorganisation lorsqu'une adaptation à plus long terme est nécessaire, mécanismes que nous n'aborderons pas dans ce mémoire, mais aussi sur les différentes influences neuromodulatrices reçues par les réseaux spinaux.

Les réseaux neuronaux locomoteurs sont en effet soumis en permanence à l'influence de nombreux systèmes de neurochimiques, qui modulent leur activité et permettent de configurer la dynamique des assemblages neuronaux afin de produire des réponses motrices diverses et adaptées (Marder & Thirumalai, 2002), on parle alors de systèmes neuromodulateurs. Il est aujourd'hui bien connu que ces systèmes neuromodulateurs jouent un rôle essentiel dans l'adaptation de l'action motrice aux différentes contraintes exercées sur l'organisme (pour revue voir Sillar & Miles, 2011). Ce rôle essentiel a été synthétisé par Harris-Warrick et Marder en 1991, qui vont jusqu'à affirmer que « les réseaux anatomiques dans le système nerveux sont un squelette qui ne prend vie que lorsque les influences modulatrices viennent agir dessus » (Harris-Warrick & Marder, 1991). Les neuromodulateurs agissent à la fois sur les propriétés membranaires des neurones et les connexions synaptiques qu'ils établissent entre eux afin de modifier leur efficacité et de moduler plus ou moins fortement l'activité qu'ils produisent pour rendre la fonction locomotrice produite adaptée. Les différents systèmes neuromodulateurs apportent un degré de flexibilité supplémentaire au fonctionnement du système locomoteur spinal. Ce mode de modulation d'activité motrice est

aussi varié que le nombre de systèmes neuromodulateurs existants et que la diversité de leurs sites d'actions sont importants.

La différence entre un neurotransmetteur et un neuromodulateur est ténue. En effet, selon wikipedia : « La neuromodulation est le processus par lequel plusieurs classes de neurotransmetteurs régulent différentes populations de neurones. Contrairement à la transmission synaptique rapide, dans lequel un neurone présynaptique influence directement un partenaire postsynaptique, les neuromodulateurs sécrétés par un petit groupe de neurones diffusent à travers de vastes zones du système nerveux et vont affecter plusieurs neurones. » Nous basant sur cette définition, nous avons considéré dans le cadre de ce mémoire que le glutamate, le GABA et la glycine, neurotransmetteurs responsables de la transmission synaptique rapide ne pouvaient être déterminés comme des neuromodulateurs. Il est cependant à noter que le spillover de glutamate observé lors de décharges massives des neurones présynaptiques va induire une action à distance du glutamate sur les synapses environnantes (Nie & Weng, 2009; Shen *et al.*, 2014). Il est de même pour le GABA via l'activation de ses récepteurs GABA_B (Destexhe & Sejnowski, 1995).

a. Le système cholinergique

Le système cholinergique a été l'un des premiers décrit dans le SNC (Eccles, 1969; Hiley & Burgen, 1974; Shute & Lewis, 1975). L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur formé à partir de l'acétylation de la choline, réaction catalysée par une enzyme appelée choline acétyl-transferase (ChAT). L'ACh est impliquée dans de nombreux processus tels que la mémoire, la douleur et la motricité (Taylor *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1988; Gillberg *et al.*, 1989; Hartvig *et al.*, 1989; Kurihara *et al.*, 1993; Cowley & Schmidt, 1994). Le système cholinergique tient une place très importante au sein des réseaux locomoteurs puisque les motoneurones, et certains interneurones spinaux sont cholinergiques.

Caractéristiques du système cholinergique

L'ACh joue un rôle clef dans les réseaux moteurs spinaux (Huang *et al.*, 2000; Miles *et al.*, 2007; pour revue : Miles & Sillar, 2011). Elle est libérée par les motoneurones au niveau de la jonction neuromusculaire afin d'induire la contraction musculaire, ainsi que sur les cellules de Renshaw via les collatérales. En plus des motoneurones, quatre autres populations de neurones cholinergiques spinaux ont été mis en évidence : les interneurones intermedio-latéraux (IML), les cellules de partition, des neurones situés autour du canal

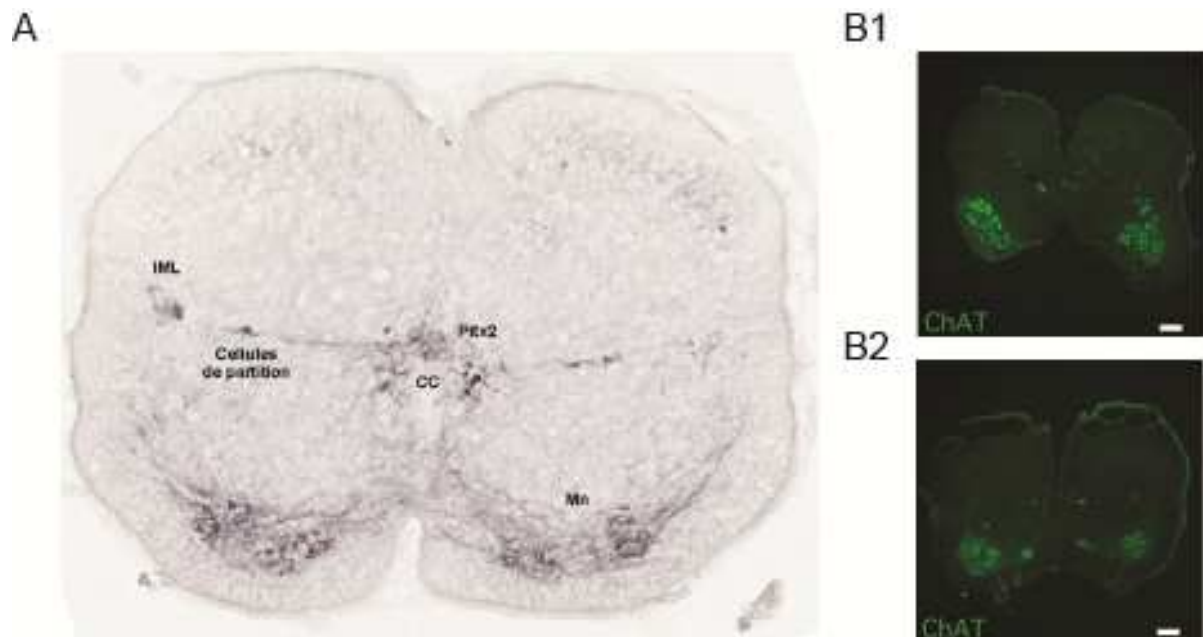


Figure 9 Les neurones cholinergiques dans la moelle épinière lombaire de souris.

Les différentes populations neuronales cholinergiques sont révélées par un immunomarquage DAB (A) ou fluorescent de la choline-acétyl-transferase (ChAT) sur des coupes de moelle épinière lombaire de souris adulte (A) ou nouveau-né (B1 et B2). Les motoneurones (Mn) se situent dans la partie la plus ventrale de la moelle dans la lamina IX. Les autres populations cholinergiques de la moelle sont constituées par les interneurones autour du canal central (CC) caractérisés par le facteur de transcription Pitx2 (lamina X), les cellules de partition (lamina VII), et les intermedio-latéraux (IML) dans la partie périphérique de la lamina VII. On peut également distinguer quelques neurones cholinergiques dans les couches dorsales superficielles (A et B2).

(B1 et B2 d'après Bertrand et al., 2011).

central (lamina X) et quelques neurones des couches dorsales superficielles (Huang *et al.*, 2000; Zagoraïou *et al.*, 2009). Ces populations ont notamment été localisées par immunohistochimie sur des tranches de moelles épinières en ciblant des composants du système cholinergique (enzymes de synthèse, transporteurs vésiculaire...) (Barber *et al.*, 1984) (Figure 9). Il a récemment été mis en évidence que les interneurones cholinergiques situés autour du canal central expriment le facteur de transcription Pitx2 et connectent en passant, essentiellement de manière ipsilatérale, le corps cellulaire et les dendrites proximales des motoneurones α via de grosses synapses nommées « synapses en C », ou plus communément boutons en C (Li *et al.*, 1995 ; Zagoraïou *et al.*, 2009). À l'inverse, certains des interneurones de la lamina X ainsi que certaines cellules de partition sont des neurones commissuraux. Il a été montré que leur activation induisait une potentialisation à court terme de la transmission commissurale glutamatergique (Bertrand & Cazalets, 2011).

Au niveau post-synaptique, la réponse induite par la libération d'acétylcholine diffère suivant le type de récepteur exprimé. En effet, il existe deux types principaux de récepteurs cholinergiques, tous deux regroupant plusieurs sous-types de récepteurs :

- les récepteurs nicotiniques : ce sont des récepteurs de type ionotropique. Lors de la fixation de l'acétylcholine, le récepteur change de conformation pour créer un canal et laisser passer des cations. On en distingue deux types : N1 exprimé dans les structures cérébrales et N2 exprimé au niveau des jonctions neuromusculaires. L'entrée de sodium (Na^+) au niveau des fibres musculaires suite à la libération d'acétylcholine par les motoneurones induit une cascade d'événements intracellulaires conduisant à la contraction musculaire.

- les récepteurs muscariniques : de type métabotropique, couplés aux protéines G, leur action est plus lente que celle induite par les récepteurs ionotropiques. Il existe 5 sortes de récepteurs muscariniques : M1, M2, M3, M4 et M5 exprimés de manière hétérogène dans le SNC (Wei *et al.*, 1994) et qui peuvent induire soit une excitation soit une inhibition du neurone cible en fonction du type de protéine G à laquelle ils sont liés (Alaburda *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2007). Ainsi, les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés à une protéine G excitatrice (Gq), induisant la stimulation de la phospholipase C (PLC), tandis que les récepteurs M2 et M4 sont couplés à une protéine G inhibitrice (Gi/o) induisant une inactivation de l'adénylate cyclase et le blocage des canaux calciques (Hulme *et al.*, 1990; Caulfield, 1993; Haga, 2013; Kruse *et al.*, 2014).

L'application d'Ach exogène ou d'un inhibiteur de son enzyme de dégradation sur la préparation *in vitro* de moelle isolée de rongeur nouveau-né induit l'expression d'une activité

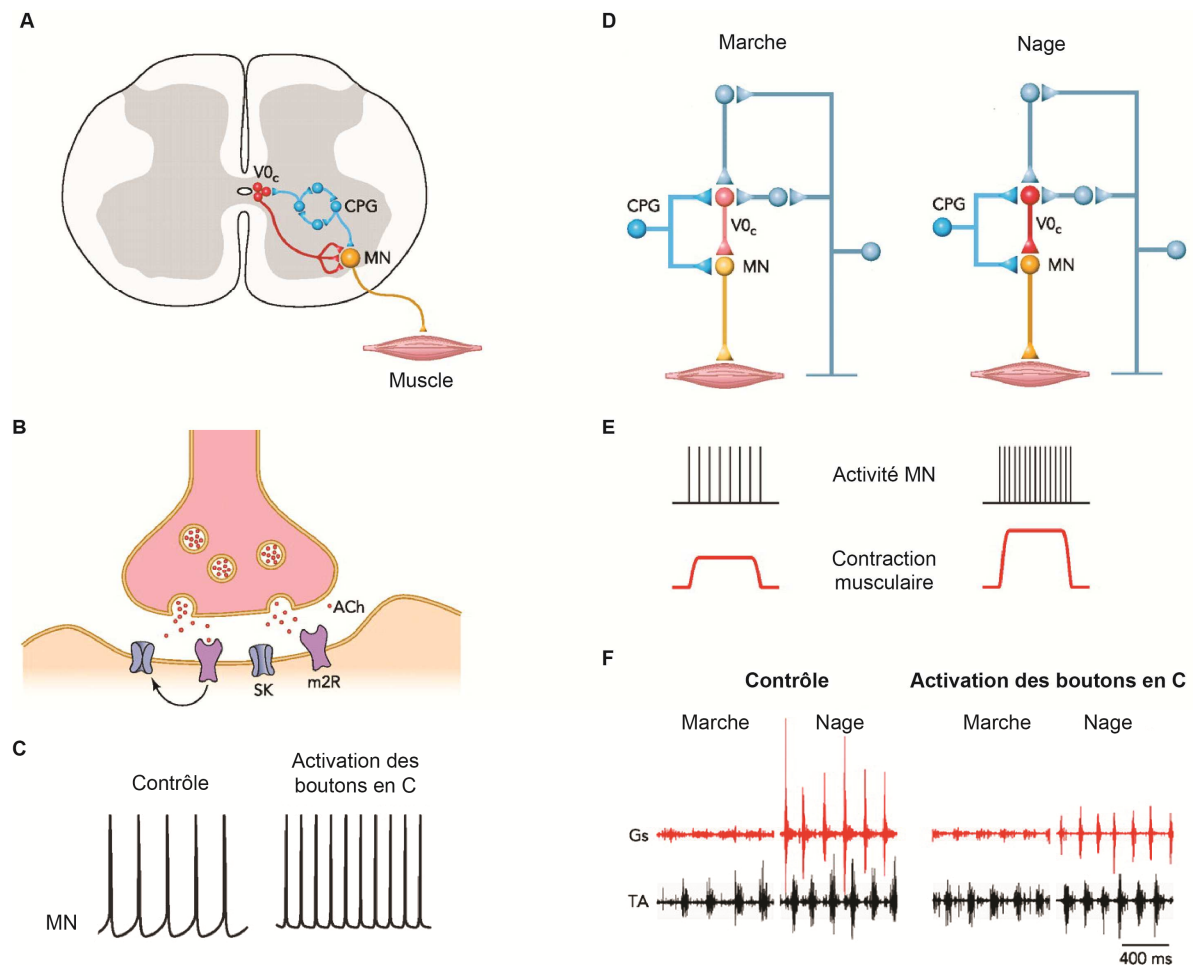


Figure 10 Modulation cholinergique de la locomotion

A. Les interneurones $V0_c$ à l'origine des boutons en C qui connectent le corps cellulaire et les dendrites proximales des motoneurones sont situés autour du canal central. **B.** L'acétylcholine libérée au niveau de ces synapses active des récepteurs muscariniques de type 2 (m2R) au niveau de la membrane postsynaptique du motoneurone et entraîne un blocage des courants potassiques dépendants du calcium (SK). **C.** L'activation des m2R induit ainsi une augmentation de la fréquence de décharge des motoneurones, notamment en diminuant l'hyperpolarisation suivant l'émission d'un potentiel d'action (AHP). **D.** Lors d'épisodes locomoteurs tels que la marche ou la nage, les interneurones $V0_c$ modulent l'activité des motoneurones, permettant ainsi un contrôle de la contraction musculaire, très probablement en mettant en jeu une boucle de régulation sensorielle. **E.** Ce système de retour sensoriel permet alors d'adapter la modulation motoneuronale passant par les boutons en C, au type de locomotion qu'il est nécessaire d'adopter (marche ou nage). **F.** L'activation du système cholinergique, permet de moduler l'activité enregistrée par EMG au niveau des muscles (Gastrocnemius, Gs et tibialis antérieur, TA), durant la marche ou la nage. Lorsque les boutons en C sont mis au silence (contrôle), le patron moteur est radicalement différent de celui que l'on obtient lors de la mise en jeu de ces synapses. (Adapté d'après Miles et Sillar, 2011).

motrice alternée droite et gauche mais présentant des défauts d'alternance de type fléchisseur/extenseur (Smith & Feldman, 1987; Smith *et al.*, 1988; Cowley & Schmidt, 1994; Cowley & Schmidt, 1994; Anglister *et al.*, 2008).

Les interneurons V0c, à l'origine des boutons en C, sont actifs rythmiquement en phase avec l'activité des motoneurons lors d'un épisode de locomotion, ce qui suggère une implication de ces interneurons dans la modulation de l'excitabilité motoneuronale (Zagoraïou *et al.*, 2009) (Figure 10). Les synapses en C ont été montrées comme systématiquement associées à l'expression du récepteur muscarinique de type 2 (M2) sur les motoneurons (Hellström *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2004). Il a été montré que l'activation de ces récepteurs induit une augmentation de l'excitabilité des motoneurons (Figure 10) en bloquant les canaux potassiques dépendants du calcium (K^+Ca) (Miles *et al.*, 2007) et donc en diminuant l'AHP (d'« after hyperpolarisation » en anglais). L'AHP est une propriété des motoneurons de choix s'agissant de moduler le rythme locomoteur : sa réduction permet d'amplifier la capacité des motoneurons à être excités et permet par exemple de contrebalancer l'absence de signal supraspinal chez le chat décérébré (Brownstone *et al.*, 1992) ou sur la préparation de moelle épinière de rongeur isolée (Schmidt, 1994). L'utilisation d'agonistes (oxotrémorine) ou d'antagonistes (methoctramine) de la transmission muscarinique médiée par les M2 a permis de montrer que la modulation de l'activité des motoneurons peut être respectivement reproduite ou bloquée par ces composés (Miles *et al.*, 2007). Les boutons en C jouent donc un rôle prépondérant dans la neuromodulation des réseaux moteurs : plus précisément ils constituent le point effecteur permettant l'amplification de l'excitabilité motoneuronale par les interneurons cholinergiques lors d'épisodes locomoteurs, via l'activation des récepteurs M2 (Figure 10).

b. Les monoamines

Les monoamines sont une famille de neuromodulateurs dérivés d'acides aminés ayant pour point commun l'expression d'un groupe éthylamine lié à un noyau aromatique et un système de dégradation commun mettant en jeu des enzymes monoamines oxydases (MAO-A et MAO-B). La famille des monoamines est vaste et comprend de nombreuses substances neuromodulatrices telles que l'histamine, la dopamine (DA), la noradrénaline (NA), l'adrénaline, la sérotonine (5-HT) ou encore la mélatonine.

Ces neuromodulateurs jouent un rôle central dans le SNC où ils sont impliqués dans la modulation de nombreux circuits neuronaux tels que les systèmes de vigilance, de l'humeur, de récompense, de plaisir, mais aussi de la douleur et de la motricité (Viala & Buser, 1969;

Yaksh & Tyce, 1980; Hensler *et al.*, 2013; Pearlstein, 2013; Hamon & Blier, 2013). Des altérations de ces systèmes monoaminergiques sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que la dépression, les troubles psychiatriques, mais aussi dans la maladie de Parkinson. En plus de leur implication dans la régulation de l'activité motrice au niveau des circuits supraspinaux des ganglions de la base, les monoamines contrôlent et modulent les circuits moteurs spinaux via les voies descendantes (Barbeau & Rossignol, 1991; Gerin *et al.*, 1995; Gerin & Privat, 1998; Jordan *et al.*, 2008). L'application exogène de monoamines est depuis longtemps utilisée sur différents modèles animaux afin d'initier une activité locomotrice (Viala & Buser, 1969; Barbeau *et al.*, 1987; Barbeau & Rossignol, 1991; Cazalets *et al.*, 1992a; Kiehn & Kjaerulff, 1996; Chau *et al.*, 1998; Marcoux & Rossignol, 2000; Musienko *et al.*, 2011). Différentes études ont, de plus, pu mettre en évidence le rôle central joué par les monoamines dans la mise en place et la maturation des réseaux spinaux au cours du développement (Schmidt & Jordan, 2000; Vinay *et al.*, 2002; Pearlstein, 2013). Ces travaux ont permis d'identifier deux sous-familles de monoamines particulièrement impliquées dans les circuits moteurs et que nous nous sommes donc attachés à étudier plus spécifiquement : les tryptamines, et principalement la 5-HT, et les catécholamines regroupant la DA et ses dérivés.

b1 La sérotonine

La sérotonine est une hormone, agissant comme neuromodulateur au sein du SNC. Elle est formée à partir de l'hydroxylation puis de la décarboxylation d'un acide aminé : le tryptophane. La 5-HT agit sur des récepteurs nommés 5-HT1 à 5-HT7, pour la plupart couplés à des protéines G, qui permettent de moduler l'activité des neurones post-synaptiques. Comme toutes les monoamines, la 5-HT est dégradée par les enzymes MAO en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) qui est ensuite éliminé par l'organisme.

Chez les mammifères, la majorité des neurones sérotoninergiques projetant sur la moelle épinière ont leurs corps cellulaires localisés au niveau du raphé et de la formation réticulée médiane dans le tronc cérébral (Dahlström & Fuxe, 1964; Carlsson *et al.*, 1964; Dahlström & Fuxe, 1965; Halaris *et al.*, 1976; Levitt & Moore, 1978). Ces neurones émettent des axones qui vont projeter jusqu'aux neurones de la moelle épinière via différentes voies descendantes afin de moduler leur activité. Ces fibres descendantes sont mises en place au cours du développement embryonnaire et dans la première semaine postnatale (Ballion *et al.*, 2002). Au niveau spinal, différents types de récepteurs sérotoninergiques sont exprimés : les récepteurs 5-HT1, majoritairement, qui sont particulièrement impliqués dans la modulation

des neurones dorsaux (Monroe & Smith, 1983) ; les récepteurs 5-HT₂ qui sont au contraire plutôt exprimés dans la moelle ventrale (Huang & Peroutka, 1987; Marlier *et al.*, 1991; Fone *et al.*, 1991; Pompeiano *et al.*, 1994) ; les récepteurs 5-HT₃ dont le rôle reste encore à préciser mais qui seraient plutôt exprimés au niveau dorsal et des afférences (Laporte *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 1998) ; et enfin les 5-HT₇ qui ont été proposés comme récepteurs impliqués dans l'activation des CPGs locomoteurs (Cina & Hochman, 1998; Honda & Ono, 1999; pour revue : Schmidt & Jordan, 2000).

Chez les mammifères, l'application de sérotonine sur la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* induit la genèse d'une activité rythmique alternée lente présentant les mêmes coordinations que la locomotion (Harris-Warrick & Cohen, 1985; Cazalets *et al.*, 1990; 1992a; Kiehn & Kjaerulff, 1996; Madriaga *et al.*, 2004; Liu & Jordan, 2005). La période de ce rythme locomoteur varie en fonction de la concentration de sérotonine qui est appliquée (Cazalets *et al.*, 1992a). De par ses capacités à induire un rythme locomoteur robuste, la 5-HT est aujourd'hui très largement utilisée en association avec des agonistes des récepteurs glutamatergiques (NDMA), avec ou sans DA, sur la préparation de moelle isolée de rongeur nouveau-né afin de déclencher pharmacologiquement des épisodes d'activité locomotrice (Kudo & Yamada, 1987b; Smith *et al.*, 1988; Cazalets *et al.*, 1995).

De façon intéressante, il a été montré qu'au sein des réseaux spinaux, les monoamines, et notamment la sérotonine, ont des effets modulateurs différents suivant qu'ils agissent sur la moelle ventrale ou la moelle dorsale (Hammar *et al.*, 2004; 2007; Barrière *et al.*, 2008; Heckman *et al.*, 2009; ElBasiouny *et al.*, 2010), probablement lié au fait que les récepteurs, et donc les protéines G exprimées varient entre ces deux régions de la moelle. Il a de plus été montré que la modulation sérotoninergique était dépendante de l'état neuromodulateur des connexions neuronales ciblées, et notamment de la transmission GABAergique (Hammar *et al.*, 2004; Barrière *et al.*, 2008). Au niveau de la moelle dorsale, il a été montré que les monoamines, et notamment la sérotonine, ont un effet inhibiteur sur les signaux sensoriels transmis aux motoneurones en diminuant la transmission synaptique (Cleland & Rymer, 1990; Jankowska, 1992; Miller *et al.*, 1995; Jacobs & Fornal, 1997; Clarke & Harris, 2002). Au niveau ventral, la sérotonine a un effet excitateur sur les motoneurones, mais aussi sur les interneurones (Hammar & Jankowska, 2003) en agissant sur différentes propriétés intrinsèques des motoneurones : elle facilite les PICS (Lee & Heckman, 1999), dépolarise la membrane neuronale, diminue l'amplitude de l'AHP (Berger *et al.*, 1992) et augmente le courant I_h (Hsiao *et al.*, 1997), un courant rectifiant entrant (Na^+ et K^+) activé par l'hyperpolarisation de la membrane des neurones (Kiehn & Harris-Warrick, 1992; Larkman &

Kelly, 1997). La sérotonine permet donc d'augmenter l'excitabilité neuronale en augmentant le gain du ratio fréquence/courant (ElBasiouny *et al.*, 2010) et donc de recruter, ou d'augmenter la dépolarisation des motoneurones afin d'activer les fibres musculaires (Schwindt & Crill, 1980a; Berger *et al.*, 1992; Lindsay & Feldman, 1993; Hultborn, 1999; Heckmann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Heckman *et al.*, 2008; ElBasiouny *et al.*, 2010; Perrier *et al.*, 2013). L'application exogène de 5-HT sur les préparations de moelle épinière isolée *in vitro* va donc permettre « d'imiter » l'action des voies descendantes sur les réseaux spinaux ventraux et d'augmenter l'excitabilité des motoneurones.

b2. Les catécholamines

Les catécholamines, comme les tryptamines, sont des hormones agissant comme des neuromodulateurs dans le SNC. Elles sont issues de l'hydroxylation d'un acide aminé : la tyrosine, en DOPA puis de la décarboxylation de celui-ci en DA. La DA est le précurseur de la noradrénaline et de l'adrénaline qui sont obtenues respectivement par hydroxylation (NA) puis ajout d'un groupement méthyl (Adrénaline). Comme les autres monoamines, le mécanisme de dégradation des catécholamines fait intervenir des MAO, mais elles possèdent aussi une enzyme de dégradation qui leur est spécifique : la catéchol-O-méthyltransferase (COMT).

Tout comme la sérotonine, les catécholamines, et plus particulièrement la dopamine et la noradrénaline, jouent un rôle prépondérant dans la modulation des circuits neuronaux spinaux via les voies descendantes (Fung *et al.*, 1991; White *et al.*, 1991; Gerin *et al.*, 1995; Gerin & Privat, 1998; Jordan *et al.*, 2008; Sharples *et al.*, 2014). Ces deux neuromodulateurs sont capables d'induire des épisodes d'activité locomotrice lorsqu'ils sont appliqués de façon exogène chez un animal intact ou spinalisé (Barbeau & Rossignol, 1991; 1994; Rossignol *et al.*, 1998; Barbeau & Rossignol, 1991; Marcoux & Rossignol, 2000).

b21. La dopamine

Les voies dopaminergiques impliquées dans la modulation des réseaux moteurs spinaux sont issues de neurones situés dans les régions notées A10 à A13, au niveau de l'hypothalamus (Björklund & Skagerberg, 1979; Lindvall *et al.*, 1983; Skagerberg & Lindvall, 1985; Qu *et al.*, 2006; Pappas *et al.*, 2008). Les récepteurs à la DA sont au nombre de 5 (D1 à D5), et sont généralement classés en deux familles : les « D1-like » (comprenant les D1 et D5) couplés à une protéine Gs qui induit une dépolarisation des neurones et les « D2-like » (D2, D3 et D4), couplés à une protéine Gi, qui, à l'inverse hyperpolarisent les

neurones post-synaptiques (Missale *et al.*, 1998). Ces 5 types de récepteurs sont exprimés dans la moelle épinière, préférentiellement dans la corne ventrale, avec une distribution antero-postérieure hétérogène mais qui reste à définir plus précisément (Karoum *et al.*, 1981; Levant & McCarson, 2001; Zhu *et al.*, 2007).

La plupart des études visant à étudier le rôle joué par le système dopaminergique dans la locomotion ont été réalisées *in vitro* (Whelan *et al.*, 2000; Barriere *et al.*, 2004; Christie & Whelan, 2005; Gordon & Whelan, 2006; Humphreys & Whelan, 2012). L'application de DA sur la préparation de moelle épinière *in vitro* induit l'expression d'activités motrices rythmiques (Kiehn & Kjaerulff, 1996; Barriere *et al.*, 2004) assimilables à des patrons moteurs mais avec un rythme très lent (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000). Il a été proposé que cette lenteur puisse être due à la stimulation simultanée des récepteurs D1 et des D2 dont les effets sont opposés (Sharples *et al.*, 2014). L'application conjointe de DA avec des agonistes glutamatergiques, et/ou de la 5-HT constitue aujourd'hui le cocktail pharmacologique le plus utilisé afin d'induire un rythme locomoteur, mimant celui observé *in vivo*, sur la préparation de moelle épinière isolé *in vitro* de rongeur nouveau-né. (Kiehn & Kjaerulff, 1996; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000; Whelan *et al.*, 2000; Barriere *et al.*, 2004; Gordon & Whelan, 2006; Humphreys & Whelan, 2012). L'utilisation simultanée de ces différents composés neuroactifs est soutenue par le fait qu'*in vivo*, ces neuromodulateurs agissent de manière combinée lors du déclenchement de la locomotion (Marder, 2012).

La dopamine, comme la sérotonine, est un neuromodulateur essentiel à la genèse et à l'adaptation du patron locomoteur. Cependant, bien que son action sur les récepteurs de type D1 semble directement impliquée dans l'initiation de la locomotion (Barriere *et al.*, 2004; Lapointe & Guertin, 2008; Lapointe *et al.*, 2009), le rôle joué par les récepteurs de type D2 dans la moelle épinière reste aujourd'hui encore à élucider davantage.

b22. La noradrénaline

Les neurones noradrénergiques projetant sur la moelle épinière trouvent leur origine au niveau du locus coeruleus, et des aires A5, A6 et A7 (Blessing & Chalmers, 1979; Fritschy & Grzanna, 1990; Proudfit & Clark, 1991). L'organisation des projections de ces différentes aires laisse supposer que les neurones issus de A7 seraient préférentiellement impliqués dans la régulation de la fonction motrice (Sharples *et al.*, 2014).

Au niveau spinal la noradrénaline agit sur deux types de récepteurs (alpha et bêta) afin de moduler l'activité des neurones moteurs. Contrairement aux autres monoamines abordées, la NA appliquée seule, *in vitro*, ne permet pas d'induire un patron moteur stable sur la moelle

épineière de rat nouveau-né (Kiehn *et al.*, 1999; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000). Cependant, les récepteurs alpha et bêta semblent impliqués dans l'adaptation du rythme locomoteur induit par d'autres composés pharmacologiques : les premiers ont été montrés comme accélérateurs du rythme et les seconds comme ralentisseurs (Kiehn *et al.*, 1999; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000). La présence en abondance de fibres noradrénergiques autour des motoneurones laisse supposer que celles-ci agiraient comme modulateur directement au niveau des neurones de sorties motrices, et non pas sur les CPGs locomoteurs (Fung *et al.*, 1991; White *et al.*, 1991; Rajaofetra *et al.*, 1992*b*). Des études ont permis de montrer que l'application de NA exogène aurait un effet neuromodulateur proche de celui de la sérotonine sur les propriétés membranaires des motoneurones (Barrière *et al.*, 2008; ElBasiouny *et al.*, 2010), ce rôle restant tout de même à explorer plus finement concernant le rôle physiologique de la NA endogène.

La locomotion, faculté essentielle à la survie de toute espèce animale, repose donc sur la mise en jeu de nombreux acteurs cellulaires, organisés en réseaux complexes qui génèrent une action précise, adaptée et régulée finement en permanence. Ces réseaux neuronaux, bien qu'étudiés extensivement depuis de nombreuses décennies, gardent aujourd'hui encore une part de mystère. Sans cesse sollicités par l'organisme, leur incroyable capacité d'adaptation leur permet de supporter les changements morphologiques, environnementaux, d'habitude ou d'apprentissage afin de procurer à l'individu, tout au long de sa vie, un moyen de se mouvoir. Il arrive cependant parfois que des dysfonctionnements viennent entacher cette inépuisable machinerie motrice. Souvent sévères, et à l'issue fatale, plusieurs pathologies affectant préférentiellement les réseaux moteurs spinaux ont été décrites chez l'homme et l'animal. C'est le cas de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie neurodégénérative qui atteint le système locomoteur à différents niveaux : les structures supraspinales (le cortex moteur), la moelle épinière (les motoneurones) et les muscles effecteurs. Cette pathologie sévère du motoneurone affecte des milliers de nouveaux patients chaque année de par le monde, réduisant leur espérance de vie à quelques années sans que l'on puisse encore ni la maîtriser, ni en comprendre parfaitement les mécanismes sous jacents.

Mon travail de thèse s'est donc articulé autour de l'étude de cette pathologie, et plus précisément des mécanismes dégénératifs et des modifications physiopathologiques des réseaux neuronaux qu'elle induit. Ce projet a vu le jour au sein d'une équipe spécialisée dans l'étude et la caractérisation des réseaux neuronaux spinaux ce qui m'a permis d'appuyer mes recherches sur de solides bases de connaissances à la fois des réseaux impliqués dans la genèse de la fonction locomotrice, mais aussi de bénéficier de l'expertise technique du laboratoire. C'est dans ce cadre de connaissances globales de la locomotion, des réseaux neuronaux qui la sous-tendent et des techniques permettant son étude que nous nous sommes intéressés aux processus physiopathologiques mis en jeu dans la SLA. Bien que beaucoup reste à faire, cette maladie complexe a été largement étudiée et caractérisée au cours des dernières décennies et le chapitre suivant sera consacré à la présentation des connaissances accumulées et des pistes de recherches concernant la SLA et les processus neurodégénératifs qu'elle met en jeu.

II. La sclérose latérale amyotrophique :

1. Définition

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale caractérisée par une dégénérescence progressive et sélective des neurones moteurs du cortex, et des motoneurones (Mns) du tronc cérébral et de la moelle épinière (ME). Aussi appelée "maladie de Charcot", du nom du clinicien et neurologue Jean-Martin Charcot à l'origine de sa description à la fin du 19ème siècle (Charcot & Joffroy, 1869), cette pathologie suit une évolution rapide, liée à la perte progressive des neurones : elle débute par des déficits moteurs suivis d'une atrophie musculaire, menant à une paralysie totale en fin de vie (Charcot & Joffroy, 1869; Gordon, 2013). Les premiers symptômes moteurs, apparaissent le plus souvent autour de 50-55 ans chez l'homme et le décès du patient intervient dans un délai de 1 à 5 ans suivant le diagnostic, le plus souvent par insuffisance respiratoire (pour revue : Robberecht & Philips, 2013).

2. Description clinique et épidémiologie

Dépendamment du type de neurones moteurs touchés, deux grands types de symptômes peuvent être observés chez les patients SLA : ceux qui sont liés à la dégénérescence des motoneurones spinaux tels que des faiblesses musculaires progressives, une atrophie des muscles, des fasciculations et des raideurs musculaires au niveau des membres et ceux attribués à la perte des neurones moteurs du cortex comme le développement d'une spasticité ainsi que la mise en place de réflexes tendineux exagérés.

On distingue classiquement deux formes principales de SLA suivant le niveau d'atteinte des neurones : 1) une forme spinale qui débute par la dégénérescence des Mns de la ME et se caractérisant par une atteinte des membres; et 2) une forme bulbaire touchant les Mns du tronc cérébral (Tan *et al.*, 1986; Hillel & Miller, 1989; Pradat & Bruneteau, 2006a; 2006b; McDermott & Shaw, 2008). Ainsi, dépendamment de son site d'initiation, la maladie va se manifester par des difficultés à marcher ou à saisir des objets pour la forme spinale, ou des troubles de la déglutition, de la parole associés ou non à une hypersialorhée pour la forme bulbaire. Cependant, l'apparition de ces symptômes varie d'un patient à l'autre. Chez approximativement 2/3 des patients présentant une SLA à départ spinal, celle-ci va se propager au niveau bulbaire au cours de l'évolution de la maladie.

La SLA n'est pas clairement associée à des troubles cognitifs, bien que 50 % des patients soient identifiés comme souffrant de troubles mineurs (difficultés à planifier, anticiper, organiser... (Abe *et al.*, 1997; Lomen-Hoerth *et al.*, 2003; Ringholz *et al.*, 2005; Viader *et al.*, 2014). Les taux de patients SLA anxieux ou dépressifs sont considérés comme relativement bas étant donné le choc que peut entraîner le diagnostic de la maladie (Kim, 1989; Brocq *et al.*, 2006). À ce jour, aucune corrélation entre l'état dépressif des patients et l'évolution/l'apparition de la maladie n'a été mise en évidence (Kurt *et al.*, 2007).

La dégénérescence neuronale observée dans la SLA semble restreinte aux neurones contrôlant les muscles squelettiques. En effet, les patients SLA ne présentent pas de défaut de contrôle de leurs différents sphincters, ni de modification de leurs capacités sensorielles. De manière très intéressante, il a été montré que parmi les différentes populations de neurones moteurs, 4 résistent systématiquement à la dégénérescence induite lors du développement d'une SLA :

- Dans le tronc cérébral : les noyaux oculomoteur, trochléaire et abducens sont préservés, permettant notamment aux patients de conserver la fonction de mouvement des yeux et des paupières (Leveille *et al.*, 1982; Reiner *et al.*, 1995; Haenggeli & Kato, 2002).
- Dans la moelle épinière, le noyau d'Onufrowicz qui contrôle les muscles périnéaux, des sphincters et de l'érection est lui aussi conservé (Mannen *et al.*, 1977; 1981).

La raison de la préservation de ces neurones reste à ce jour inconnue, de même que les causes de l'apparition de la SLA. Les nombreux travaux portant sur la SLA ont permis de distinguer la forme familiale (fSLA), environ 10 % des cas (Camu *et al.*, 1999) de la forme dite sporadique (sSLA), concernant 90 % des patients et pour laquelle aucun antécédent familial n'a été identifié (Byrne *et al.*, 2011). En effet, bien que certains facteurs environnementaux semblent favoriser le développement de la SLA, aucun lien causal direct n'a à ce jour été identifié pour expliquer l'occurrence de la sSLA. Ces constatations reposent sur des études scientifiques ayant mis en évidence une corrélation entre différents facteurs de risque et l'apparition d'une sSLA (Chio *et al.*, 2005; Armon, 2007; Harwood *et al.*, 2009; Beghi *et al.*, 2010). Le sport de haut niveau et les traumatismes physiques importants sont par exemple régulièrement mis en avant, et notamment dans la presse grand public, comme facteurs de risque. On peut citer en exemple le célèbre joueur de baseball Lou Gherig qui a donné son nom à la maladie aux Etats-Unis (maladie de Lou-Gherig) ou plus récemment l'ancien tennisman professionnel français Jérôme Golmard. Pourtant, ce point est très discuté au sein de la communauté scientifique, certains attribuant cet "effet" au fait que les sportifs de

haut niveau sont souvent plus médiatisés que la plupart des malades, donnant ainsi l'impression que la prévalence de la maladie est plus élevée dans la communauté sportive. De plus, quelques études ont mis en évidence des facteurs de risque augmentant la prédisposition à développer une sSLA, tels que l'exposition aux pesticides, aux métaux lourds, le tabac, l'alimentation, sans toutefois permettre d'en déterminer la causalité (Gallo *et al.*, 2009; Bonvicini *et al.*, 2010; Ahmed & Wicklund, 2011; Vinceti *et al.*, 2012; Malek *et al.*, 2012).

Bien que la SLA soit considérée comme une maladie rare, elle n'en reste pas moins la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Dans le monde, l'incidence de la SLA est de 2 nouveaux cas diagnostiqués par an pour 100 000 habitants (120 000 nouveaux cas par an; Boillee *et al.*, 2006), la prévalence (nombre de personnes atteintes) est de 5 à 7 pour 100 000 personnes, ce qui est plutôt faible du fait de l'extrême rapidité d'évolution de la maladie (McDermott & Shaw, 2008). En France, on dénombre 3 à 4 nouveaux cas par jour, soit un toutes les 7 heures environ. On constate une légère prédominance masculine mais cette tendance tend à s'égaliser, d'autant que la prédominance diffère suivant le type de SLA développée. Une augmentation globale de l'incidence de 200 % ces 50 dernières années a été constatée (Swash & Desai, 2000). Cette observation peut s'expliquer d'une part par l'augmentation de l'espérance de vie des populations, et d'autre part à l'élaboration de meilleurs critères de diagnostic. Cependant, au même titre que la condition physique et l'exposition à des particules toxiques, une participation environnementale n'est pas exclue. En effet, l'incidence de la SLA est hétérogène à travers le monde et certaines localités, principalement des îles, se distinguent par des taux records de diagnostics de nouveaux malades chaque année. On peut notamment citer l'île américaine de Guam dans l'océan Pacifique, ou la péninsule de Kii au Japon (Gajdusek & Salazar, 1982; Garruto *et al.*, 1985) où certaines études ont montré une surincidence de la SLA, et un risque accru de la développer, même après un court séjour dans ces îles (Majoor-Krakauer *et al.*, 2005).

3. Diagnostic clinique et thérapeutique

Aucun signe pathognomonique de la SLA n'ayant été décrit à ce jour, le diagnostic repose sur des arguments cliniques, complétés par des examens neurologiques et des études généalogiques pour les cas familiaux (Gordon, 2011). Ainsi, des tests sanguins, génétiques, des électromyogrammes (EMG) ou électroneuromyogrammes (ENMG), et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont nécessaires pour obtenir suffisamment de données sur le

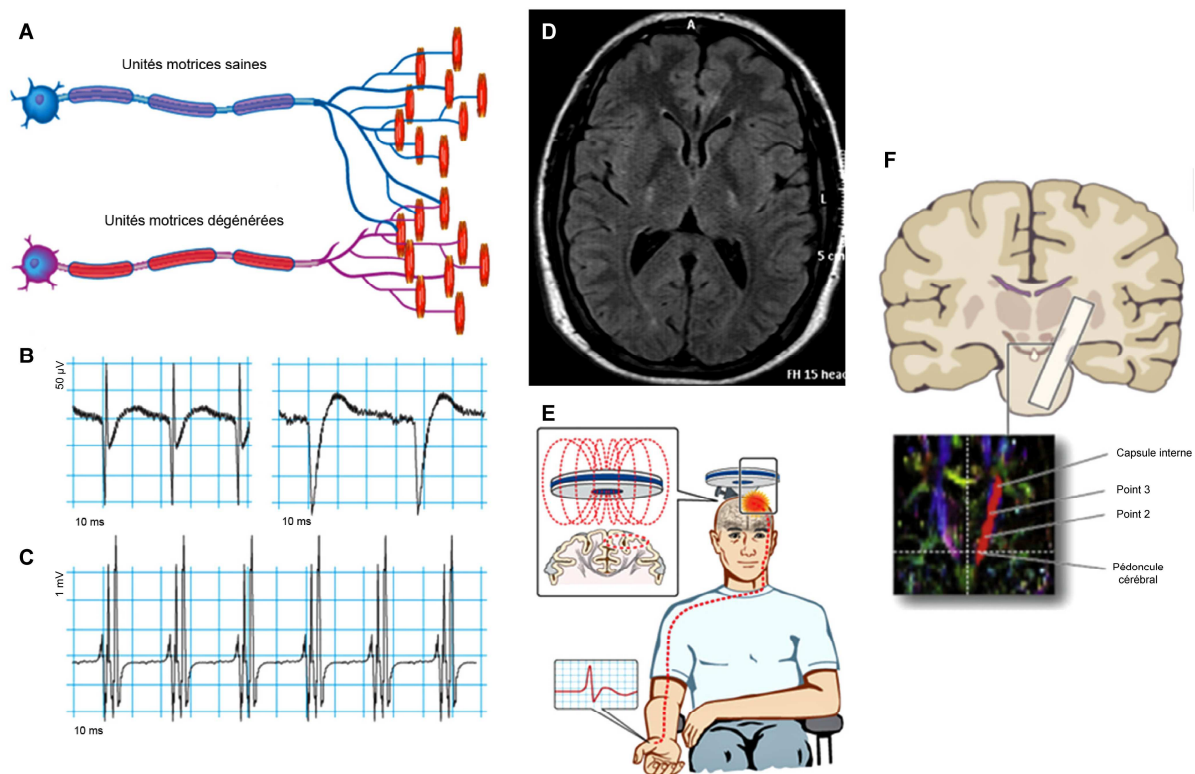


Figure 11 Techniques de diagnostic de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). **A.** La dégénérescence des neurones moteurs est accompagnée d'une réinnervation des fibres musculaires par les neurones moteurs survivants. Ces phénomènes peuvent être observés par électromyographie (EMG) sur les patients avec suspicion de SLA. On constate alors **B.** Une déinnervation progressive (avec des ondes positives) et **C.** des changements neurogéniques chroniques (amplitude large, durée longue, potentiels d'actions induisant un recrutement faible des muscles). Bien que les altérations enregistrées par l'EMG ne sont pas spécifiques de la SLA lorsqu'ils sont observés de façon isolée, la sensibilité et la spécificité des résultats ainsi que leur conformité à certains critères permettent d'établir un diagnostic. De plus, des techniques permettent également d'estimer la perte de fonction des neurones moteurs cérébraux ou spinaux: **D.** l'imagerie par résonnance magnétique (IRM), **E.** la stimulation magnétique transcranienne, et **F.** l'imagerie par diffusion de tension. (Figure adaptée de Vucic et al., 2014)

patient qui, entrecoupées avec les observations cliniques, permettent d'établir un diagnostic fiable (Daube, 2000; de Carvalho *et al.*, 2008) (Figure 11). En effet, lors de l'initiation de la dégénérescence des neurones moteurs, il a été constaté que les neurones moteurs survivants et adjacents sont à l'origine d'une réinnervation des fibres musculaires qui ne sont plus activées. L'utilisation d'EMG et d'ENMG sur les patients à suspicion de SLA permet de soutenir le diagnostic en mettant en évidence à la fois la déinnervation et les changements neurogéniques liés à ces phénomènes dégénératifs (Figure 11). La stimulation magnétique et l'IRM sont quant à elles utilisées pour estimer la perte de fonction des neurones moteurs, cérébraux ou spinaux.

De façon générale, le diagnostic de la SLA ne peut être évoqué que devant la combinaison d'une atteinte des neurones moteurs, à la fois du cortex moteur et des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral. Afin de vérifier ces deux possibilités, des observations cliniques sont généralement utilisées : réflexe ostéo-tendineux (très vif chez les patients SLA), présence ou non de déficit moteur avec fasciculations, tout en respectant l'oculomotricité, la sensibilité objective et les fonctions sphinctériennes.

La Fédération Mondiale des Neurologues a établi un test d'évaluation (EI Escorial) permettant de trier les patients atteints d'une SLA suivant des critères d'inclusion ou d'exclusion, dans le cadre de recherches cliniques (Brooks *et al.*, 2000; Bresch *et al.*, 2014). Ce test a pour but de cibler les patients chez qui une dégénérescence des neurones moteurs inférieurs et supérieurs a été mise en avant par électrophysiologie couplée à des examens cliniques, et qui présentent une progression rapide avérée de ces symptômes. Il exclut bien entendu les patients qui présentent des données électrophysiologiques, neuropathologiques ou d'imagerie pouvant être attribuées à d'autres maladies dégénératives. Enfin, les critères du EI Escorial permettent de déterminer la probabilité du patient d'être atteint de la SLA suivant une classification en fonction des résultats obtenus aux différents tests diagnostiques (Appel *et al.*, 1987).

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la SLA. Les médecins peuvent alors proposer deux types de soins aux patients, qui sont très généralement combinés :

- des soins palliatifs qui prennent souvent la forme de relais de certaines fonctions vitales (nutrition, respiration), mais aussi d'un soutien psychologique, de rééducation et d'amélioration des conditions de vie au quotidien, qui sont rendues très difficiles par les lourdes conséquences de cette maladie (Bourke *et al.*, 2006).

- un traitement médicamenteux : le riluzole. Cette molécule est aujourd'hui le seul traitement disponible et son effet se limite à une augmentation de l'espérance de vie de quelques mois (environ 8 mois; Bensimon *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2007). Les raisons pour lesquelles le riluzole a un effet protecteur dans le cadre de la SLA sont encore mal comprises. Il est cependant admis que le riluzole inhibe les courants sodiques (Na^+) voltages dépendants et diminue la transmission glutamatergique en agissant tant au niveau présynaptique (Jehle *et al.*, 2000) qu'au niveau postsynaptique en inhibant les récepteurs glutamatergiques de type NMDA (rNMDA) (Doble, 1996). Le riluzole protégerait ainsi les neurones contre la toxicité de certaines protéines mutées et contre l'excitotoxicité glutamatergique observée dans la SLA, permettant ainsi de retarder l'évolution de la maladie (Wagner & Landis, 1997; Lamanauskas & Nistri, 2008; Cheah *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2012).

Bien que ces traitements soulagent les patients durant quelques mois et permettent de les accompagner de mieux en mieux, il est difficilement acceptable dans nos sociétés actuelles de disposer de si peu d'outils thérapeutiques pour une maladie qui affecte des milliers de personnes de par le monde. C'est pourquoi la communauté scientifique n'a de cesse de développer de nouveaux procédés, outils génétiques et technologiques afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la dégénérescence des neurones moteurs et donc d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

4. La génétique dans la SLA

a. Formes familiales et identification de mutations génétiques

La reconnaissance du concept de forme familiale de la SLA, par opposition à la forme sporadique qui définit les cas isolés au sein d'une famille, a fait l'objet d'une longue controverse avant d'être universellement acceptée. En effet, il aura fallu attendre presque 100 ans après la première description de la maladie par J-M Charcot pour que le concept de SLA familiale devienne indiscutable, grâce aux travaux de Kurland et Mulder en 1955 (Kurland & Mulder, 1955a; 1955b; Kurland *et al.*, 1955). Les fSLA englobent par définition les cas pour lesquels au moins un autre membre de la famille est atteint. Plus récemment, la génétique a permis d'identifier certaines des mutations à l'origine de différents cas de fSLA (Pramatarova *et al.*, 1995; Sapp *et al.*, 1995; Robberecht, 2000; Sapp *et al.*, 2003; Valdmanis & Rouleau, 2008; Del Bo *et al.*, 2009).

Dans le cadre de la SLA il faut bien différencier deux sortes de facteurs génétiques : (1) les facteurs génétiques de susceptibilité : ces facteurs augmentent le risque de développer une SLA, sans pour autant être suffisants pour que la maladie apparaisse. Ils constituent ce

que l'on appelle un terrain génétique favorable au développement d'une SLA et les patients peuvent donc être définis comme "à risque"; et (2) les facteurs génétiques pathogènes : dans ce cas là les gènes impliqués sont responsables de l'apparition de la SLA et de la dégénérescence des Mns. Ce sont ces gènes qui sont analysés en cas de SLA afin de rechercher un facteur génétique responsable de la maladie chez le patient.

Depuis ces 20 dernières années, une vingtaine de gènes et loci ont été associés à la physiopathologie, voire même au déclenchement de la fSLA (voir Da Cruz & Cleveland, 2011; Rademakers & van Blitterswijk, 2013; Leblond *et al.*, 2014 pour revue). Parmi ces gènes mutés, 4 occupent une place prédominante puisqu'ils concernent à eux seuls presque 50 % des cas de fSLA (Andersen & Al-Chalabi, 2011) :

- SOD1 (superoxyde dismutase de type 1) : De nombreuses mutations de ce gène, codant pour l'enzyme SOD1 ont été identifiées à ce jour. Ces mutations de SOD1, retrouvées chez 20 % des cas de fSLA (Rosen *et al.*, 1993), jouent un rôle prépondérant dans cette maladie et seront développées dans un paragraphe ultérieur.

- TARDBP (= « TAR DNA-binding protein 43 », TAR protéine de liaison ADN type 43) : les mutations de ce gène entraînent des dysfonctionnements de la protéine de liaison à l'ADN pour laquelle il code (TDP43), ce qui entraîne la formation d'agrégats protéiques dans le cytoplasme cellulaire. Ces mutations sont plutôt associées à des SLA avec une atteinte des membres supérieurs.

- FUS/TSL (« FUsed in Sarcoma/Translocated in LipoSarcoma ») : Les mutations FUS/TSL entraînent une altération de la liaison de la protéine à l'ARN. Les mutations FUS sont très souvent constatées dans des cas précoces de SLA avec atteinte en premier lieu des muscles extenseurs du cou et des muscles de la ceinture scapulaire (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Yamamoto-Watanabe *et al.*, 2010; Corcia *et al.*, 2012).

- C9ORF72 : Un motif répété en un très grand nombre de copies a récemment été identifié sur le gène codant pour la protéine C9ORF72 chez des patients SLA (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011). Cette découverte est considérée par la communauté scientifique comme l'une des plus importantes de ces 20 dernières années concernant la SLA. En effet, bien que le rôle de cette protéine et l'effet de cette mutation restent à élucider, ce motif répété est en voie de devenir le marqueur de référence des fSLA.

b. Le gène SOD1 : description et mutations impliquées dans la fSLA

Les premières descriptions de mutations génétiques impliquées dans la SLA concernent le gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase de type 1 (SOD1). Depuis son

identification en 1993 (Rosen *et al.*, 1993; Gurney *et al.*, 1994), plus de 150 mutations ponctuelles ont été décrites sur le gène codant pour SOD1, chacune étant responsable d'une forme particulière de SLA (Sapp *et al.*, 1995; Luche *et al.*, 1997; Boukaftane *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2004; pour revue : Julien, 2001; Cleveland & Rothstein, 2001; Bruijn *et al.*, 2004; une liste actualisée est disponible sur internet : <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>). En effet, bien que l'on considère habituellement deux types de SLA (spinale et bulbaire), la SLA regroupe en fait une grande variété de manifestations cliniques avec des modulations du type de symptômes prédominants, de l'évolution, de la localisation et de l'étendue de l'atteinte. Ainsi, la majorité des patients ayant une SLA liée à une mutation SOD1 présente préférentiellement une atteinte au niveau des membres inférieurs et une espérance de vie après diagnostic légèrement plus longue que celle des patients atteints de formes sporadiques. Toutefois, il est à noter que suivant la localisation de la mutation SOD1 sur le gène, la physiopathologie de la SLA diffère, tant chez l'humain que chez les modèles animaux de la SLA (voir plus loin). Les mutations spontanées se transmettant de manière héréditaire, on observe une répartition géographique de ces dernières. Ainsi, en Amérique du Nord la mutation ponctuelle la plus répandue, A4V (50 % des mutations de SOD1) est connue pour induire des évolutions fulgurantes de la maladie (Juneja *et al.*, 1997; Saeed *et al.*, 2009), alors qu'en Scandinavie, la mutation D90A est responsable d'une forme de SLA "ralentie" où les symptômes progressent beaucoup plus lentement, sur plus de 10 ans (Andersen & Al-Chalabi, 2011). Au Japon c'est la mutation H46R qui est la plus souvent observée (Aoki *et al.*, 1994; Abe *et al.*, 1996; Aoki *et al.*, 1998) Il n'est cependant malheureusement pas possible à l'heure actuelle de définir le tableau clinique précis de toutes les SLA induites par des mutations du gène SOD1.

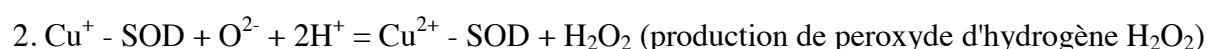
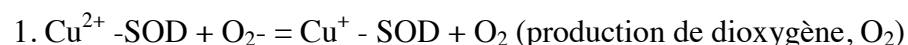
Pour comprendre les mécanismes qui conduisent des mutations SOD1 à l'induction d'une fSLA, il faut avoir une idée précise du rôle de cette protéine dans la physiologie neuronale. Tout d'abord, il faut bien différencier la protéine SOD1 des deux autres formes de SOD : SOD2 et SOD3. En effet, ces trois protéines apparentées sont présentes chez l'homme, mais ont des capacités fonctionnelles et une répartition cellulaire différentes.

Le gène codant pour la protéine SOD1 est situé sur le chromosome 21, au niveau du locus q22.1. La transmission des mutations se fait de manière autosomique dominante dans la plupart des cas (Siddique *et al.*, 1991; Rosen *et al.*, 1993; Bowling *et al.*, 1993). La protéine SOD1 est une métalloprotéine présente sous forme homo-dimérique qui possède une activité enzymatique : elle catalyse la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde

d'hydrogène. Les radicaux libres oxygénés, produits par le métabolisme aérobie des mitochondries, sont toxiques pour les cellules, la SOD1 a donc un rôle de détoxification. Cette capacité à supprimer les radicaux libres, fait de la SOD1 une protéine importante du système de défense cellulaire.

Les protéines superoxydes dismutases sont caractérisées par la présence de particules de métal au niveau de leur site actif : les SOD1 sont donc aussi appelées CuZn-SOD1 en raison de leur liaison avec des atomes de Cuivre (Cu) et Zinc (Zn).

On peut représenter la dismutation du superoxyde, réaction catalysée par les SOD1, par les deux formules suivantes :



Dans cette réaction le cuivre sert de catalyseur en influant sur le potentiel d'oxydoréduction, et le zinc assure la stabilité de la structure protéique.

Chez l'homme, la protéine SOD1 est ubiquitaire : elle est exprimée dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire mitochondrial de toutes les cellules de l'organisme. Chez l'animal, et notamment chez la souris, il n'existe que deux formes de protéine SOD : une CuZn-SOD, apparentée à la SOD1 humaine et exprimée dans le cytosol de toutes les cellules, et une Mn-SOD (où les particules métalliques sont du Manganèse, Mn).

Les mutations SOD1 observées chez les patients SLA n'induisent pas de perte de fonction de la protéine SOD1, mais au contraire, se traduisent par un gain de fonction toxique de l'enzyme, qui serait létal pour la cellule (Reaume *et al.*, 1996; Bruijn *et al.*, 1998; Andrus *et al.*, 1998; Bruijn *et al.*, 2004). En effet, ces mutations favoriseraient la formation d'agrégats protéiques toxiques pour les cellules. Cependant, le rôle de cette protéine mutante dans la dégénérescence des neurones moteurs reste à ce jour largement ignoré (pour revue : Pasinelli *et al.*, 2004).

c. Les mutations de TARDBP et FUS/TLS

Ces 10 dernières années, les progrès constants de la génétique ainsi que l'intérêt scientifique grandissant pour les terrains génétiques associés à la SLA ont permis d'identifier les gènes TARDBP et FUS/TLS chez des patients présentant une fSLA. 50 mutations, souvent associées, affectant les gènes TARDBP et FUS/TLS, codant respectivement pour des protéines de liaison à l'ADN et à l'ARN ont été décrites. Ces mutations sont la plupart du temps dominantes et sont retrouvées dans environ 5 % des fSLA (Sreedharan *et al.*, 2008;

Kwiatkowski *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010). Bien que ces mutations ne soient présentes que chez un nombre restreint de patients, leur découverte a permis d'élargir le champ de recherche de la SLA à l'implication des processus de liaison à l'ARN et à l'ADN dans les mécanismes de dégénérescence neuronale (Lagier-Tourenne *et al.*, 2010).

Le gène TARDBP code pour une protéine appelée TDP43. Comme pour la protéine SOD1, il a été montré la présence d'agrégats protéiques TDP43 chez les patients fSLA (Neumann *et al.*, 2006), ce qui a conduit à l'identification des mutations affectant le gène TARDBP en 2008 (Sreedharan *et al.*, 2008; Kabashi *et al.*, 2008). La protéine TDP43 non mutée est une protéine de liaison à l'ADN, dont le rôle exact n'est pas clairement défini, mais qui serait impliquée dans les processus de transport et de stabilisation de l'ARN (Buratti & Baralle, 2009; Geser *et al.*, 2010).

Il a été montré sans une cohorte de patients SLA du Cap Vert, des USA, d'Australie et du Royaume Uni que des mutations du gène FUS/TLS étaient à l'origine de l'apparition de la maladie (Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009). Ce gène est situé sur le chromosome 16 et les mutations l'affectant ont été observées chez environ 4 à 5 % des cas de fSLA à travers le monde. Dans la plupart des cas les mutations sont dominantes, sauf pour les patients du Cap Vert chez qui elles sont récessives (Kwiatkowski *et al.*, 2009). À l'état physiologique, le gène FUS/TLS code pour une protéine du même nom, impliquée dans le métabolisme de l'ARN et la régulation de la transcription.

d. La découverte récente du gène C9ORF72 et les espoirs suscités

Il a récemment été montré qu'un hexanucléotide (GGGGCC) était répété dans des proportions anormales (plusieurs centaines de fois contre une trentaine chez un individu normal) chez les patients fSLA (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011). Le gène codant pour cet hexanucléotide est situé sur le chromosome 9 : "chromosome 9 open reading frame 72" (C9ORF72) et code pour une protéine du même nom, retrouvée dans la plupart des neurones. Le rôle de la protéine C9ORF72 n'est pas encore clairement défini. Il semblerait que cette protéine possède un domaine DENN ("Differentially Expressed in Normal and Neoplastic Cells") impliqué dans la régulation de l'activité des GTPases cellulaires. Elle interviendrait notamment dans le trafic endosomal et la régulation de la fonction autophagique des neurones (Marat *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Farg *et al.*, 2014).

Cette mutation constitue aujourd'hui le meilleur facteur génétique, au sens qu'elle est la plus fréquemment identifiée chez patients atteints de fSLA (Vucic *et al.*, 2014; Vatovec *et al.*, 2014). On la retrouve en effet chez plus de 30 % des patients atteints de fSLA (jusqu'à 44 % en Europe) ainsi que chez 5 % des cas sporadiques de SLA (Majounie *et al.*, 2012; Rademakers & van Blitterswijk, 2013). Ces données suscitent donc de grands espoirs pour les malades et ouvrent pour la communauté scientifique de nouvelles pistes pour espérer un jour traiter les patients atteints de cette pathologie.

La découverte de cette mutation C9ORF72 procure, de plus, aux scientifiques un corrélat génétique entre la SLA et les démences frontotemporales (DFT), qui, bien qu'ayant été évoqué par le passé, n'avait jusqu'alors pas été clairement identifié (Vance *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2006; Talbot & Ansorge, 2006). En effet, la mutation C9ORF72 est retrouvée chez les patients souffrant de ces deux maladies neurodégénératives (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011). Des études menées chez des familles de patients ont montré que ces deux maladies semblent étroitement liées : il n'est pas rare en effet de constater des cas de DFT dans la famille de patients SLA et inversement (Gros-Louis *et al.*, 2006). La mutation C9ORF72 induirait donc une dégénérescence neuronale de populations bien spécifiques et différentes d'une maladie à l'autre. L'une des hypothèses pour expliquer cette atteinte différente entre SLA et DFT serait une variation du nombre de copies de l'hexanucleotide ainsi qu'une expression spatio-temporelle différente de celui-ci : en se manifestant en premier dans les lobes frontal et temporal (DFT), ou bien dans les neurones moteurs (SLA) (Gómez-Tortosa *et al.*, 2013; van Blitterswijk PhD *et al.*, 2013).

5. Les modèles animaux

L'identification des gènes impliqués dans la fSLA a permis la genèse de modèles animaux permettant l'étude de la SLA. Ces modèles animaux, bien que comme tout modèle expérimental présentent des avantages et des limites, constituent un support indispensable à l'étude des mécanismes impliqués dans la dégénérescence neuronale observée lors de la SLA et permettent de sélectionner, de générer et de valider des molécules d'intérêt en vue d'essais cliniques chez l'homme.

Ces modèles ont été obtenus soit à partir de mutations spontanées soit, et c'est le cas pour la majorité d'entre eux, à partir de modifications génétiques induites par des procédés de génie génétique. Un très grand nombre de modèles animaux de la SLA existe à l'heure actuelle, et qui, suivant le type de mutation exprimée, présente des symptômes moteurs et des processus de dégénérescence sensiblement différents. De nombreuses espèces animales sont

utilisées comme modèle d'étude de la SLA : drosophile, nématode, poisson zèbre, souris, rat... mais les modèles murins restent les plus communément utilisés. En effet, un grand nombre de souris transgéniques a été généré en se basant sur des mutations observées chez des patients atteints de fSLA.

a. Les souris transgéniques SOD1

Bien que souvent détracté, le modèle animal le plus utilisé à ce jour demeure la souris SOD1, en effet, de nombreuses lignées de souris transgéniques surexprimant le gène codant pour la protéine SOD1 humaine ont été générées. Ces souris mutantes développent un phénotype et des symptômes moteurs proches de ceux observés chez les patients SLA (Gurney *et al.*, 1994; Cleveland & Rothstein, 2001). Il a été montré que ces atteintes motrices sont directement liées à la présence de la protéine SOD1 mutée. En effet, la surexpression de la protéine humaine non mutée n'induit, quant à elle, aucun dommage neuronal (Gurney *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995). Parmi les nombreuses lignées de souris SOD1 développées, trois mutations ont particulièrement été étudiées ces dernières décennies : SOD1^{G93A} (Gurney *et al.*, 1994; Mancuso *et al.*, 2011b; Vinsant *et al.*, 2013a; 2013b), SOD1^{G85R} (Bruijn *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2008) et SOD1^{G37R} (Wong *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 2002). Pour chacune d'elle, un acide aminé : la Glycine (G) a été remplacée par de l'alanine (A) ou de l'arginine (R) à une position donnée (93, 85 ou 37). Les souris transgéniques porteuses de ces mutations développent toutes des symptômes moteurs liés à une dégénérescence des neurones moteurs comparables à ceux de la SLA, avec cependant des variations phénotypiques notamment de l'espérance de vie et de la manifestation des atteintes motrices. De plus, des différences au niveau de la réaction cellulaire à la mutation de la protéine SOD1 ont été notées : les motoneurones des souris SOD1^{G85R} ne présentant par exemple aucune vacuole (Bruijn *et al.*, 1998), à l'inverse de ceux des SOD1^{G93A} et SOD1^{G37R} (Gurney *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995). Enfin, l'expression du gène SOD1 humain muté chez la souris, sur fond de l'enzyme endogène, induit un gain de fonction toxique de la protéine, quelle que soit la nature de la mutation (Gurney *et al.*, 1994; Turner & Talbot, 2008).

Il est également à noter que des modèles de souris chez lesquelles l'expression de la SOD a été supprimée ont été développés : les souris SOD1 KO (Turner & Talbot, 2008). Bien que subissant des altérations physiologiques telles que des altérations de la fertilité (Ho *et al.*, 1998; Matzuk *et al.*, 1998), des ischémies (Kondo *et al.*, 1997) ou des cataractes (Behndig *et al.*, 2001) entre autres, ainsi que des symptômes moteurs liés à une déinnervation lente et progressive des membres postérieurs (Fischer & Glass, 2007), ces souris ne développent pas

de phénotype physiopathologique pouvant évoquer clairement celui observés dans la SLA (Reaume *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998). C'est pourquoi nous ne développerons pas plus les connaissances de ce modèle, et nous nous sommes focalisés sur les souris SOD1 transgéniques.

Les souris transgéniques SOD1^{G93A}, générées par Gurney en 1994 (Gurney *et al.*, 1994) constituent le premier modèle animal de la SLA à avoir été étudié. Il existe différentes variantes de souris G93A :

- les souris SOD1^{G93A} « low expressor line » : ces souris transgéniques expriment un nombre réduit de copies du transgène (<15 copies). (Dal Canto & Gurney, 1997; Gurney, 1997; Deitch *et al.*, 2014), induisant un développement lent de la pathologie et une espérance de vie des animaux d'environ 400 jours (Dal Canto & Gurney, 1997).

- Les souris SOD1^{G93A} « high expressor line » : chez lesquelles un grand nombre de copies du transgène est exprimé (environ 20 à 25) (Chiu *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 2004). Ce nombre de copies influence notamment l'âge d'apparition des symptômes et leur vitesse d'évolution (Dal Canto & Gurney, 1994; Radunović & Leigh, 1996; Dal Canto & Gurney, 1997). Chez les SOD1^{G93A} « high expressor line », un léger affaiblissement des pattes postérieures et une diminution de l'activité motrice ont été mis en évidence dès 40 à 50 jours (P40-P50) (Kanning *et al.*, 2010; Veldink *et al.*, 2003; Wooley *et al.*, 2005). Ces animaux vont alors montrer des signes de déclin de leur force musculaire globale (changement de démarche, perte de vitesse d'exécution). Ce n'est qu'autour de P90 à P100 (entre 3 et 4 mois) que l'on observe clairement une paralysie des membres postérieurs et une détérioration très rapide de l'état global des animaux (Gurney *et al.*, 1994). Le décès de ces souris survient généralement dans les deux semaines qui suivent la paralysie, ce qui leur confère une espérance de vie très limitée (50 % de survie à $128,9 \pm 9,1$ jours ; Gurney *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2008). En l'absence d'euthanasie préalable de l'animal, la mort survient très généralement par asphyxie liée à des défaillances respiratoires graves, les neurones moteurs innervant les muscles du diaphragme ayant dégénéré.

Kanning et ses collaborateurs ont répertorié en 2010 les différents aspects pathologiques développés par ces souris et leur évolution dans le temps (Kanning *et al.*, 2010). En effet, le phénotype pathologique développé suite à l'insertion du transgène muté est complexe. De nombreuses études ont mis en avant une apparition des symptômes autour de P50, donc avant que la paralysie ne soit clairement visible (Mancuso *et al.*, 2011b; 2011a; Mead *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 2012a; Veldink *et al.*, 2003; Wooley *et al.*, 2005). Ces

troubles moteurs seraient dus à l'enclenchement du déclin rapide de la force musculaire suite à l'atteinte et à la dégénérescence des fibres de type FF (Pun *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2009a; 2013). Cependant, ce n'est qu'à P90, moment où la paralysie motrice devient apparente, qu'a lieu la perte neuronale, et musculaire la plus dramatique (Hegedus *et al.*, 2007). D'autres travaux ont permis d'aller plus loin encore et ont montré de nombreuses modifications physiologiques, bien avant que la force musculaire ne soit réduite, dès les stades juvéniles (Mourelatos *et al.*, 1996; Bendotti *et al.*, 2001; Amendola *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2006; Bories *et al.*, 2007; Amendola & Durand, 2008; van Zundert *et al.*, 2012), voire même embryonnaires (Martin *et al.*, 2013). Ces modifications précoces sont retrouvées à différents niveaux : changements systémiques, comportementaux, altérations électrophysiologiques et modifications intracellulaires (vacuolisation, modification mitochondriales, fragmentation de l'appareil de Golgi...).

L'ensemble des études menées sur les souris SOD1, et notamment celles sur les SOD1^{G93A} a donc permis de caractériser à la fois le phénotype de ces animaux, très proche de celui retrouvé chez les patients SLA, mais aussi une partie des mécanismes cellulaires aboutissant à la dégénérescence motoneuronale. L'ensemble de ces travaux permet aujourd'hui de disposer d'un véritable portefeuille de données comportementales, électrophysiologiques, et moléculaires concernant ces animaux. Il est évident que le modèle SOD1^{G93A} présente des limites, notamment l'absence d'atteinte motrice des membres antérieurs et pour le moment une reproductibilité clinique peu importante entre ces souris et les patients (Le riluzole étant la seule molécule pour laquelle les effets thérapeutiques sont retrouvés chez l'homme) (Benatar, 2007). Cependant, si ce modèle, créé en 1994, est encore actuellement le plus utilisé par les scientifiques de par le monde c'est qu'il reste le meilleur modèle animal disponible. Les nombreuses données accumulées chez ces animaux permettent aujourd'hui d'aller un peu plus loin dans l'étude et l'interprétation des modifications entraînées par la mutation de la protéine SOD1, retrouvée chez 20 % des patients fSLA à l'origine de la dégénérescence neuronale.

b. Les autres modèles murins de la SLA

b1. Les souris TDP43

De nombreuses équipes travaillent à l'élaboration de modèles murins à partir de mutations de TDP43 sans toutefois permettre de générer un modèle convenable et stable pour le moment. En effet, les souris mutantes TDP43 sont la plupart du temps basées sur la surexpression de la protéine humaine mutée (pour revue : Van Den Bosch, 2011) sous le

contrôle d'un promoteur de type prion, permettant une expression dans le cerveau, la moelle épinière, le cœur et les muscles squelettiques (Borchelt *et al.*, 1996). Ces souris ne montrent aucune différence comportementale ou physiologique avec les souris sauvages jusqu'à l'âge de 3 mois (Wegorzewska *et al.*, 2009), âge à partir duquel une perte de poids et des altérations motrices lors de la nage sont observées. Bien que la durée de vie (environ 5 mois) et la dégénérescence des neurones moteurs du cortex observées chez ces animaux puissent en faire de bons candidats, les données actuelles ne permettent pas de pouvoir considérer ces animaux comme des modèles expérimentaux de choix pour la SLA. Il a en effet été montré que des souris surexprimant la TDP43 humaine non mutée développent des symptômes comparables à la SLA, et aux symptômes observés chez les souris TDP43 mutées (Wils *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). Ainsi, les effets observés chez ces animaux pourraient être dus non pas à la mutation de TDP43 mais à un effet toxique de la TDP43 humaine non mutée chez les souris, remettant en cause les études effectuées sur ce modèle (Wegorzewska *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011).

D'autres groupes de chercheurs ont généré des souris exprimant la TDP43 humaine sous le contrôle d'un promoteur murin spécifique des neurones excitateurs : Thy1 (Vidal *et al.*, 1990; Caroni, 1997; Wils *et al.*, 2010; Shan *et al.*, 2010). Ces lignées de souris ont développé des symptômes moteurs en relation avec une dégénérescence des neurones du cortex moteur et des motoneurones de la moelle épinière. Cependant, encore une fois, le phénotype observé chez les souris exprimant le gène humain muté est le même que celui des souris exprimant le gène humain non muté (Tsao *et al.*, 2012), révélant un effet toxique de la TDP43 humaine sur les souris.

b2. Les souris FUS/TLS

A ce jour, seuls des animaux « knock out » (KO) pour le gène FUS/TLS ont été décrits (Kuroda *et al.*, 1999; Hicks *et al.*, 2000). Les souris KO FUS/TLS étant rarement viables après la naissance, il a fallu réaliser des souches consanguines afin de pouvoir étudier l'effet de la délétion de ce gène sur des animaux en postnatal. Ces lignées sont malheureusement très difficiles à conserver du fait d'une altération de la fertilité des animaux. Les phénotypes rapportés chez les souris KO FUS/TLS n'ont pas de rapport évident avec la SLA. En effet, ces animaux présentent une altération de la densité dendritique des motoneurones à génotype KO FUS/TLS, sans dégénérescence ni symptôme moteur (Fujii *et al.*, 2005; Fujii & Takumi, 2005). Ces données tendent donc à montrer que les mutations de ce gène chez l'homme, déclencheraient la SLA par un gain de fonction, cependant, aucun modèle murin surexprimant

le gène FUS/TLS muté n'a pour le moment été développé. Une étude récente de surexpression du gène humain FUS/TLS non muté chez des souris a montré que ces animaux développaient une dégénérescence âge et dose-dépendante (Mitchell *et al.*, 2013). Ces résultats, non sans rappeler ceux observés dans les modèles TDP43, laissent présager que la protéine FUS/TLS humaine aurait une action toxique pour les neurones murins, limitant donc le développement de ce modèle.

b3. Développement de modèles C9ORF72

La découverte très récente de ce motif répété de façon exagérée dans le chromosome 9 a donné lieu à de nombreuses recherches afin de développer un modèle murin C9ORF72 (Suzuki *et al.*, 2013). Cependant, à l'heure actuelle, aucune souris de ce genre n'a encore été décrite et seuls des travaux portant sur les cultures cellulaires ont été réalisés (Xu *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2013; Stepto *et al.*, 2014).

c. Autres modèles animaux de la SLA

Afin d'améliorer les données disponibles sur les mécanismes cellulaires à l'origine de la SLA, de nombreux modèles animaux, autres que les souris, ont été générés. En effet, l'étude d'organismes plus « simples », et dont les caractéristiques physiologiques et les réseaux neuronaux sont mieux connus que ceux des souris permet d'effectuer une analyse complémentaire des mécanismes intracellulaires induits par les mutations génétiques par exemple. Ainsi, des modèles de la SLA ont été générés chez le poisson zèbre, la drosophile ou le nématode (*Caenorhabditis elegans*) notamment (Joyce *et al.*, 2011; Sasayama *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Babin *et al.*, 2014; Stepto *et al.*, 2014). Chacun de ces modèles présente des avantages qui lui sont propres (séquençage de leur génome, accessibilité des cellules, visualisation simplifiée des phénotypes mutés). C'est d'ailleurs chez ces animaux que les premiers modèles basés sur la mutation C9ORF72 ont été générés, et ont permis d'accroître les connaissances sur cette protéine et l'effet cellulaire de sa mutation (Xu *et al.*, 2013; Stepto *et al.*, 2014).

Enfin, bien que la souris soit le rongeur le plus communément utilisé lors de la création de modèles mammaliens génétiquement modifiés, certaines études portant sur des rats (SOD1, FUS ou TDP43) ont montré leur intérêt dans l'étude de la SLA. En effet, il a été montré que contrairement aux souris, et sans que l'on en connaisse les raisons, la surexpression du gène humain FUS/TLS non muté chez des rats n'entraîne pas de dégénérescence neuronale, alors que c'est le cas pour le gène humain muté (Huang *et al.*,

2011). Chez le rat, il n'y aurait donc pas d'effet neurotoxique de l'expression de ce gène humain, ce qui ouvre la voie pour de nouvelles études sur l'effet de cette mutation impliquée dans les fSLA.

En conclusion, bien que les modèles non murins de la SLA se développent de plus en plus, les travaux portant sur des souris transgéniques restent aujourd'hui majoritaires et constituent des modèles animaux de qualité, de part leur ressemblance avec les observations effectuées chez les patients, et l'accessibilité des manipulations de leur génome. Parmi ces modèles murins, la référence historique de la souris SOD1^{G93A} s'impose toujours actuellement comme le modèle de choix pour étudier cette pathologie, en attendant peut être un nouveau modèle animal basé sur la mutation C9ORF72. La diversité et la complémentarité des différents modèles animaux de la SLA (murins et non murins) nous apparaissent comme une richesse et une nécessité si nous voulons un jour connaître et soigner la SLA.

6. Dégénérescence sélective des motoneurones dans la SLA

De manière très intéressante, il a été observé que tous les motoneurones ne présentaient pas la même susceptibilité dans la SLA. En effet, en dehors des motoneurones résistants évoqués plus haut, il apparaît tant chez les patients, que dans les modèles animaux de la SLA, que la dégénérescence neuronale touche en premier les motoneurones α les plus gros (FF) puis s'étend progressivement aux motoneurones α de plus petite taille (Conradi & Ronnevi, 1993). Progressivement, ce sont tous les motoneurones α qui dégénèrent, par ordre de taille décroissant, jusqu'à la perte des types FR et S dans les stades les plus avancés de la maladie (Conradi & Ronnevi, 1993). Les facteurs à l'origine de cette dégénérescence sélective progressive et ordonnée ne sont encore inconnus à l'heure actuelle. Il a été proposé que cet effet serait dû à une capacité différente de ces neurones à gérer l'accumulation de protéines mal configurées (Saxena *et al.*, 2009a), les FR et S résistants plus longtemps que les FF. La consommation énergétique importante des motoneurones de type F comparativement aux autres motoneurones a également été évoquée (Kanning *et al.*, 2010).

7. Mécanismes physiopathologiques de la dégénérescence neuronale

Bien que les raisons de la susceptibilité accrue de certains motoneurones à dégénérer lors d'une SLA n'aient pu être élucidées à l'heure actuelle, l'utilisation des modèles animaux que nous venons de décrire, et notamment des souris SOD1, a permis d'identifier un certain

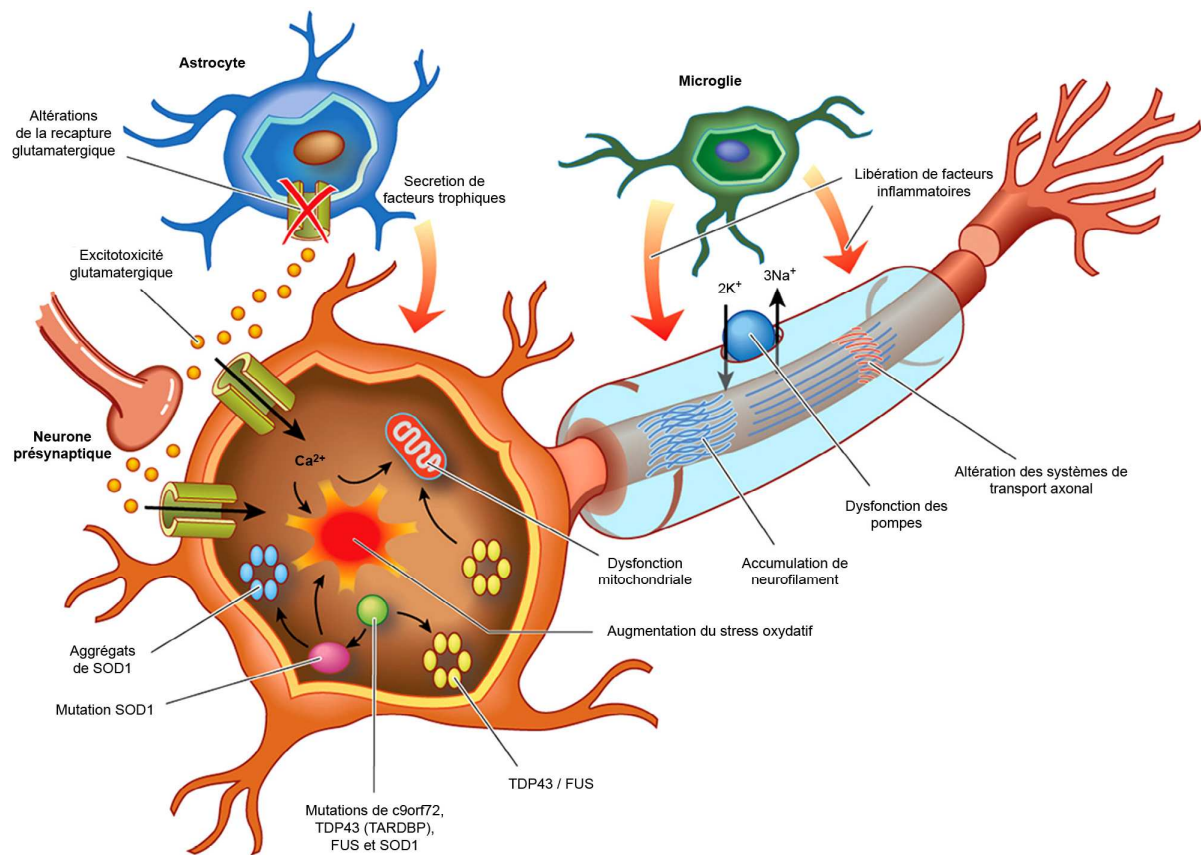


Figure 12 Mécanismes dégénératifs impliqués dans la sclérose latérale amyotrophique (ALS). La physiopathologie de la SLA est multifactorielle, impliquant des facteurs moléculaires et génétiques. Des dysfonctionnements astrocytaires peuvent notamment aboutir à une diminution de la recapture du glutamate extracellulaire et ainsi contribuer à une augmentation de l'excitotoxicité glutamatergique. Cette excitotoxicité du glutamate est liée à une augmentation d'entrée des ions Na^+ et Ca^{2+} activant des voies enzymatiques dépendantes du Ca^{2+} impliquées dans la dégénérescence neuronale. De plus, une augmentation de la genèse de radicaux libres, contribuant à la dégénérescence, a été constatée chez les sujets SLA. Les mutations des gènes c9orf72, TARDBP (TDP43) et FUS, constatées chez des patients atteints de fSLA, induisent des dysfonctionnements du métabolisme de l'ARN et conduisent à la formation d'agrégats protéiques intracellulaires. Les mutations du gène SOD1, quant à elles, augmentent le stress oxydatif, induisent des dysfonctionnements mitochondriaux, forment des agrégats protéiques et affectent le transport axonal. L'activation de la microglie chez les sujets SLA provoque la libération de facteurs proinflammatoires, ajoutant à la toxicité cellulaire.
(Figure adaptée de Vucic et al., 2014)

nombre de facteurs qui, seuls ou associés, joueraient un rôle déterminant dans les processus dégénératifs dans la SLA (Figure 12). Parmi ces facteurs, on peut citer entre autres : des dysfonctionnements mitochondriaux, un stress oxydatif, la formation d'agrégats protéiques, des altérations du transport axonal, une activation microgliale et des phénomènes d'excitotoxicité liés glutamate. Il est aujourd'hui fortement vraisemblable que la combinaison de plusieurs de ces facteurs, et non un seul facteur isolé, soit à l'origine de la mort neuronale observée lors de la SLA, celle-ci n'étant alors que la finalité d'une cascade multifactorielle (pour revue : Vucic *et al.*, 2014).

a. Altérations mitochondriales

Les mitochondries, organites cellulaires essentiels, jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que le métabolisme énergétique, l'homéostasie calcique, la régulation apoptotique et la production de radicaux libres oxygénés. Il est couramment admis que le fonctionnement mitochondrial est lié à certaines maladies neurodégénératives (Schapira *et al.*, 1989; Balazs & Leon, 1994; pour revue : Beal, 1998; Dupuis *et al.*, 2004; Lezi & Swerdlow, 2012). Dans les motoneurones, le rôle des mitochondries est d'autant plus essentiel qu'ils ne possèdent pas, comme la plupart des autres neurones, de protéines fixatrices du calcium telles que la parvalbumine, la calmoduline ou la calbindine. La régulation des taux de calcium intracellulaire dans les motoneurones passe donc entièrement par le métabolisme mitochondrial. L'activité motoneuronale nécessitant, de plus, la consommation de grandes quantités d'énergie (sous forme d'ATP) afin notamment de maintenir leur potentiel membranaire de repos, d'assurer le transport axonal, la libération synaptique de neurotransmetteurs ou de maintenir l'homéostasie des gradients ioniques (Harris *et al.*, 2012; Rangaraju *et al.*, 2014; Le Masson *et al.*, 2014), l'hypothèse d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la SLA est apparue comme une piste de recherche non négligeable.

L'observation par microscopie de tissus de patients SLA a permis de mettre en évidence des altérations morphologiques et structurelles des mitochondries (Hirano *et al.*, 1984a; 1984b; Swerdlow *et al.*, 1998; Sasaki & Iwata, 2007). Ces altérations mitochondriales ont pu être observées et décrites chez des modèles animaux de la SLA : les souris SOD1, qui présentent des altérations de l'homéostasie calcique mitochondriale dans les phases présymptomatiques (Kong & Xu, 1998; Mattiazzi *et al.*, 2002; Kawamata & Manfredi, 2010), et chez les souris FUS et TDP43 qui possèdent des mitochondries non fonctionnelles (Shan *et*

al., 2010; Xu *et al.*, 2011; Magrane *et al.*, 2014). Il a de plus été montré chez les souris SOD1^{G93A} que leurs mitochondries présentent une vacuolisation importante suivie d'une dégénérescence mitochondriale (Dal Canto & Gurney, 1994; Wong *et al.*, 1995; Jaarsma *et al.*, 2000; 2001; Higgins *et al.*, 2003). Enfin, il semblerait que chez ces souris SOD1, le repliement anormal de la protéine SOD1 altère la chaîne respiratoire mitochondriale (Bowling *et al.*, 1993; Dupuis *et al.*, 2004) uniquement dans les neurones de la moelle épinière (Liu *et al.*, 2004).

Sur la base de ces observations, et en considérant les grands besoins énergétiques des motoneurones, Le Masson et ses collaborateurs ont développé un modèle computationnel afin d'étudier la susceptibilité des motoneurones à dégénérer lorsque les niveaux d'ATP produits par les mitochondries sont insuffisants (Le Masson *et al.*, 2014). Ce modèle a permis de mettre en évidence qu'une restriction des taux d'ATP disponibles suffisait à entraîner des altérations physiologiques des motoneurones telles qu'une entrée massive d'ions calciques et une dépolarisation prolongée de leur membrane, conduisant alors ces motoneurones à subir des processus de mort cellulaire. Ces travaux de modélisation ont permis d'asseoir l'hypothèse de mécanismes pathologiques impliquant les mitochondries, organe producteur de l'énergie indispensable au fonctionnement motoneuronal, dans le cadre de la SLA.

Les mitochondries ayant un rôle essentiel au bon fonctionnement et au maintien homéostatique et énergétique des cellules, une altération de ces organites pourrait donc mener à de graves altérations cellulaires, voire à leur dégénérescence, comme dans le cas de la SLA (Figure 12).

b. Le stress oxydatif

À l'état physiologique, les organismes aérobies utilisant l'oxygène produisent en permanence des radicaux libres ou espèces réactives oxygénées (ROS, de "reactive oxygen species"), via la respiration mitochondriale. Ces radicaux (tels que le peroxyde d'hydrogène ou le radical superoxyde; pour revue des ROS : Dröge, 2002) ont un effet toxique sur les cellules de l'organisme puisqu'ils vont peroxyder les lipides insaturés des membranes plasmiques et conduire à la mort de la cellule s'ils ne sont pas éliminés : c'est la situation de stress oxydatif. En conditions physiologiques, la production de ces radicaux est donc régulée en permanence par un système complexe de détoxification cellulaire composé d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD1), qui va dismuter les radicaux présents dans le cytosol et les espaces intermembranaires afin de former des substances non toxiques pour les

cellules, comme précédemment décrit (partie I, 4, b) (O'Brien *et al.*, 2004; Aquilano *et al.*, 2006; Kloppel *et al.*, 2010).

Le stress oxydatif a été proposé comme un des mécanismes potentiellement impliqué dans la dégénérescence cellulaire dans la SLA (Lin & Beal, 2006). En effet, les mutations du gène SOD1 retrouvées chez 20 % des patients fSLA induisent la genèse de protéines SOD1 mal conformées qui pourraient être directement à l'origine de dérégulations du système de détoxification cellulaire. La protéine SOD1 ne pouvant plus jouer son rôle, il y aurait une accumulation de radicaux libres dans le cytosol des cellules (Figure 12). Cette hypothèse est soutenue par le fait que des dommages cellulaires liés aux ROS et au stress oxydatif ont été observés sur des tissus issus de patients SLA (Abe *et al.*, 1995; Beal *et al.*, 1997; Ferrante *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2000; Beal, 2002). Cependant, il a été montré que la suppression de l'enzyme SOD1 endogène n'a pas d'effet sur l'évolution et l'issue de la dégénérescence dans un modèle animal de la SLA (Bruijn *et al.*, 1998). De même, la surexpression du gène SOD1 humain non muté ne permet pas de protéger les motoneurones exprimant également la SOD1 mutée de la dégénérescence (Bruijn *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 1998) et accentue même le décours de la maladie chez certaines lignées de souris exprimant la SOD1 mutée (Wang *et al.*, 2009), ce qui relativise le rôle joué par le stress oxydatif dans la dégénérescence des neurones SLA.

c. Altérations du transport axonal

L'architecture du cytosquelette des neurones, et notamment de leur axone, permet le transport axonal le long des microtubules qui les composent. Les neurofilaments, protéines présentes dans les axones, ont un rôle de régulateurs de ce transport axonal.

Il est aujourd'hui largement admis que des déficits dans le transport axonal sont impliqués dans diverses maladies neurodégénératives (pour revue : De Vos *et al.*, 2008; Morfini *et al.*, 2009; Sau *et al.*, 2011). C'est le cas pour la SLA où des accumulations anormales de neurofilaments sont observées dans les neurones moteurs de patients. Ces accumulations constituent un marqueur anatomopathologique de la maladie chez l'homme (Kawamura *et al.*, 1981; Hirano *et al.*, 1984a; 1984b; Mizusawa *et al.*, 1989; Rouleau *et al.*, 1996; Mendonça *et al.*, 2005), ainsi que chez les souris SOD1 (Dal Canto & Gurney, 1994; Wong *et al.*, 1995; Bruijn *et al.*, 1997; Kong & Xu, 1998; Bruijn *et al.*, 1998). Les modèles animaux de la SLA ont permis de déterminer que les transports axonaux rapide et lent (Zhang *et al.*, 1997; Warita *et al.*, 1999; Kieran *et al.*, 2005; De Vos *et al.*, 2008), qu'ils soient rétrogrades ou antérogrades (Williamson & Cleveland, 1999; Bilsland *et al.*, 2010) sont

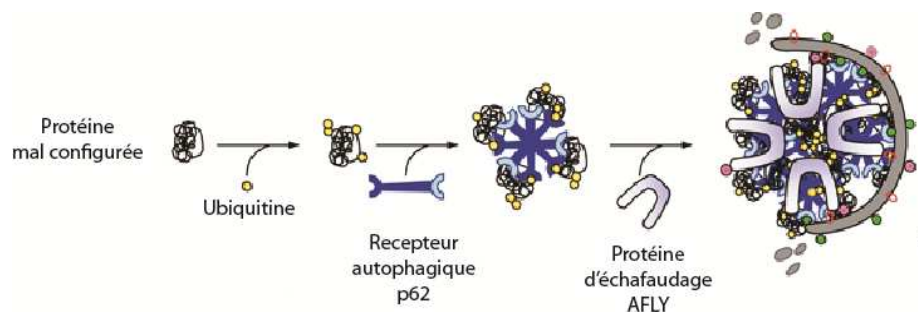


Figure 13 Mécanismes cellulaires de reconnaissance d'une protéine mal configurée afin de la dégrader par autophagie.

Une protéine mal configurée est reconnue et ubiquitinée dans le milieu intracellulaire. Le récepteur autophagique p62 permet alors de reconnaître et de lier ces complexes protéines-ubiquitine pour former des agrégats protéiques plus complexes. Des protéines d'échafaudage (AFLY) entrent alors en contact avec ces complexes afin de regrouper les protéines mal configurées en de larges agrégats exprimant à leur surface des sites de reconnaissance autophagiques qui permettent l'élimination par autophagie de ces groupements de protéines. (Adaptée d'après Isakson et al., 2013)

altérés dans le cadre de la SLA. L'altération et l'accumulation des neurofilaments seraient donc responsables de défauts dans le transport axonal des neurones des patients SLA, sans que l'on puisse pour le moment déterminer précisément s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la dégénérescence des motoneurones (Julien & Beaulieu, 2000) (Figure 12).

d. Agrégats protéiques

La mutation de certains gènes, comme SOD1 ou bien TDP43 chez les patients SLA comme dans les modèles animaux, entraîne une mauvaise conformation des protéines pour lesquelles ils codent et la formation d'agrégats (Bruijn *et al.*, 1997; 1998; Watanabe *et al.*, 2001). Ces agrégats protéiques cytoplasmiques peuvent avoir de lourdes conséquences pour la cellule. En effet, en plus d'empêcher la protéine de jouer son rôle physiologique, ces agrégats ont la capacité de se lier à d'autres protéines, désorganisant ainsi complètement la cellule et ses organites (Shaw & Valentine, 2007), ce qui se traduit par un effet toxique sur la cellule (Figure 12).

Il a été montré que les souris exprimant les taux de protéine SOD1 mutée les plus importants sont celles qui développent la maladie le plus précocement (Wong *et al.*, 1995). Cependant, on ne connaît pas précisément les mécanismes cellulaires par lesquels les agrégats protéiques SOD1 entraînent la dégénérescence neuronale.

L'une des hypothèses avancées repose sur une dérégulation de la fonction d'autophagie des cellules. En effet, à l'état physiologique, les protéines mal configurées sont dégradées par autophagie dans les lysosomes (Yang & Klionsky, 2010). Cette fonction, essentielle aux cellules, permet également de renouveler les organites et de réguler le stress oxydatif. La fonction d'autophagie permet l'élimination sélective de structures cellulaires bien spécifiques. Les systèmes d'autophagie doivent donc en permanence distinguer les structures altérées de celles qui sont fonctionnelles. La machinerie cellulaire permettant cette reconnaissance est encore peu connue mais il est aujourd'hui bien admis que des récepteurs ainsi que des adaptateurs autophagiques (des protéines d'ancrage) sont impliqués dans cette fonction de ciblage (Figure 13). En effet, récepteurs et adaptateurs permettraient d'initier la mise en contact entre l'élément à éliminer et la machinerie autophagique. Il a été montré que le système ubiquitine-protéasome joue un rôle majeur dans l'élimination des protéines présentant des altérations de conformation (Figure 13) (Isakson *et al.*, 2013), notamment dans la SLA, chez des patients (Dangond *et al.*, 2004) et chez les souris SOD1 (Kabashi *et al.*, 2004). Dans certaines familles de patients fSLA il a été constaté une mutation du gène codant pour l'ubiquitine (Deng *et al.*, 2011; Millecamps *et al.*, 2012; van Doormaal *et al.*, 2012). Ces

données suggèrent que les patients SLA présenteraient des altérations des mécanismes d'autophagie, mécanisme clé du catabolisme cellulaire, ce qui pourrait expliquer l'accumulation d'agrégats protéiques intracellulaires toxiques dans les motoneurones, entraînant leur dégénérescence.

Il a de plus été mis en évidence, chez les souris SOD1^{G93A}, la dérégulation de l'expression de filaments intermédiaires formant la structure du cytosquelette : la vimentine. L'utilisation de la technique de microdissection laser a permis de mettre en évidence des mutations dans le gène codant pour la vimentine dès les stades présymptomatiques de ces souris (P60), et qui s'accroissent avec le temps, jusqu'à P90 et P120, uniquement dans les motoneurones (Perrin *et al.*, 2005). La surexpression de ces filaments entraîne alors la formation d'inclusions dans le cytoplasme des motoneurones, structures pouvant être impliquées dans la dégénérescence des motoneurones (Soto, 2003; Taylor *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2005). Enfin, la vimentine ayant un rôle essentiel dans le transport axonal rétrograde et dans la mise en place et la repousse des axones des motoneurones au cours du développement ou après une lésion (Tapscott *et al.*, 1981; Cochard & Paulin, 1984; Fliegner *et al.*, 1994; Boyne *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 2004), sa dérégulation chez les souris SOD1 entraînerait une altération de ces fonctions (Perrin *et al.*, 2005). Bien que le rôle de ces agrégats dans la dégénérescence soit débattu (Caughey & Lansbury, 2003; Soto, 2003; Bruijn *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006), il semble évident que la formation des inclusions cytosoliques de vimentine participe au phénotype physiopathologique des motoneurones, avant l'initiation de leur dégénérescence (Perrin *et al.*, 2006). Enfin, la surexpression de la vimentine dans les motoneurones participerait à la formation des « cages » formant les gros agrégats protéiques retrouvés dans le cytosol des motoneurones des souris SOD1 (Johnston *et al.*, 1998; 2000; Ardley *et al.*, 2005; Perrin *et al.*, 2005; 2006).

La formation d'agrégats, que se soit de la protéine SOD1 mutée, ou bien d'inclusions de filaments de soutien du cytosquelette tels que la vimentine pourrait donc participer à l'excitotoxicité ainsi qu'à la dérégulation complète de la machinerie interne des motoneurones dans la SLA. L'altération de l'expression de la vimentine pouvant notamment conduire à des altérations graves du transport axonal (Perlson *et al.*, 2005), montrant ainsi la complexité et l'interdépendance des mécanismes dégénératifs impliqués dans la SLA.

e. Activation des cellules gliales et neuroinflammation

Les cellules gliales constituent l'environnement des neurones. Bien qu'elles n'aient pas un rôle direct dans la genèse de l'activité locomotrice ou dans sa transmission aux muscles, ces cellules jouent un rôle de support, de protection et de soutien de l'activité des neurones acteurs de la locomotion. (Hewett, 2009; Ji *et al.*, 2013). Il faut noter que le terme cellules gliales regroupe plusieurs types cellulaires dont la morphologie, la localisation et la fonction varient très largement d'un type à l'autre : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et la microglie (pour revue : García-Marín *et al.*, 2007; Hewett, 2009).

L'un des marqueurs constants de la SLA, retrouvé à la fois dans les formes familiales et sporadiques humaines ainsi que chez les modèles animaux, est la présence d'une neuroinflammation (Alexianu *et al.*, 2001). Cette neuroinflammation se caractérise par l'activation des cellules gliales (microglie et astrocytes), et une libération de facteurs inflammatoires associés ou non au recrutement de cellules immunitaires au niveau des sites de dégénérescence (Kawamata *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1998; Mantovani *et al.*, 2009) (Figure 12).

Lorsqu'elle passe de sa forme inactive à sa forme active, la microglie libère des substances inflammatoires et cytotoxiques tels que des radicaux libres, de l'azote (NO), du glutamate... afin de stimuler les neurones et les astrocytes avoisinants (Kreutzberg, 1996; Hanisch, 2002). L'activation de ces cellules gliales a été mise en évidence dans le cadre de plusieurs maladies neurodégénératives, dont la SLA (Engelhardt & Appel, 1990; McGeer *et al.*, 1991; Schiffer *et al.*, 1996; Henkel *et al.*, 2004; Gerber *et al.*, 2012b).

Chez les souris SOD1, les astrocytes et la microglie présentent une activation intense (Hall *et al.*, 1998; Henkel *et al.*, 2004), associée à une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires (Philips & Robberecht, 2011). L'élimination de ces gènes inflammatoires chez la souris par des techniques génétiques n'a cependant pas permis d'augmenter l'espérance de vie de ces animaux (Nguyen *et al.*, 2001; Son *et al.*, 2001; Lerman *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que des altérations microgliales sont présentes chez les souris SOD1 dès les stades présymptomatiques de la maladie (Gerber *et al.*, 2012b), mettant en lumière une affection du système glial bien avant que les motoneurones ne dégèrent. Une étude anatomique a en effet permis de montrer un déficit dans le nombre de cellules microgliales chez les souris SOD1 jeunes, à P30 (Gerber *et al.*, 2012b). L'activation microgliale observée sur les modèles murins SOD1 apparaît quant à elle autour de P80 et augmente avec la

progression et la propagation des symptômes jusqu'à la mort de l'animal (Hall *et al.*, 1998; Alexianu *et al.*, 2001; Barbeito *et al.*, 2010).

L'un des mécanismes possibles concernant la dégénérescence des neurones moteurs dans la SLA impliquerait donc l'action de cellules non neuronales (Clement *et al.*, 2003; King *et al.*, 2011). Cette hypothèse est soutenue par plusieurs études réalisées sur des cultures cellulaires : des neurones issus de souris SOD1, placés *in vitro* en culture primaire, ne présentent pas de dégénérescence (Nagai *et al.*, 2007). Cependant, lorsque des neurones sains sont cultivés en présence de cellules gliales exprimant la SOD1 mutée ou d'astrocytes humains prélevés chez des patients fSLA, les neurones commencent à dégénérer (Di Giorgio *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2007; Di Giorgio *et al.*, 2008; Marchetto *et al.*, 2008).

f. Le muscle : acteur ou suiveur?

L'une des questions qui fait toujours débat dans le domaine de la SLA est de déterminer si le site d'initiation de la maladie se situe dans la moelle épinière ou dans le muscle au niveau des jonctions neuromusculaires. Plusieurs études ont montré des altérations au niveau des jonctions neuromusculaires, à des stades précoces de la maladie, chez les patients SLA et les modèles animaux (Frey *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2004; Wishart *et al.*, 2006; Conforti *et al.*, 2007; Blijham *et al.*, 2007; Krakora *et al.*, 2012; Vinsant *et al.*, 2013a). Ces données ont conduit à émettre l'hypothèse d'une dégénérescence rétrograde de l'axone des motoneurones, nommée « dying-back » en anglais, aboutissant à la mort de celui-ci. En effet, les altérations de la jonction neuromusculaire ne feraient pas que précéder la mort des motoneurones mais seraient à l'origine même de leur dégénérescence (Krakora *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs cellulaires pourraient être à l'origine de cette dégénérescence axonale : des modifications du transport axonal (Zhang *et al.*, 1997; Williamson & Cleveland, 1999), de l'expression de protéines de guidance axonale (LaMonte *et al.*, 2002; Dupuis *et al.*, 2002; Jokic *et al.*, 2005; Pradat *et al.*, 2007; Dadon-Nachum *et al.*, 2011), de la balance calcique et/ou de la fonction mitochondriale au sein des jonctions neuromusculaires. De nombreux travaux sont actuellement menés afin de tester cette hypothèse d'une implication des jonctions neuromusculaires. Il a notamment été montré que l'injection de facteurs de croissance dans le muscle avait un effet protecteur sur les motoneurones chez les souris SOD1 (Acsadi *et al.*, 2002; Kaspar *et al.*, 2003; Azzouz *et al.*, 2004; Pun *et al.*, 2006; Hedlund *et al.*, 2007; Gould & Oppenheim, 2011).

g. Excitotoxicité liée au glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du SNC : son expression est ubiquitaire et il joue un rôle dans de nombreuses fonctions essentielles à l'organisme telles que la mémoire, l'apprentissage et la motricité (Orrego & Villanueva, 1993). Au niveau de la moelle épinière, le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal, il joue notamment un rôle déterminant dans les réseaux générateurs de rythme (interneurones V0G, V2a, V3, Hb9) (Taccola & Nistri, 2006; Hinckley & Ziskind-Conhaim, 2006; Al-Mosawie *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Zagoraïou *et al.*, 2009).

Le glutamate a un rôle à la fois de déclencheur et de modulateur de l'activité locomotrice au niveau de la moelle épinière, le rendant indispensable pour l'organisme. La fixation du glutamate sur ses récepteurs, notamment de type NMDA, induit une dépolarisation membranaire du neurone postsynaptique associé à une entrée de calcium (Ca^{2+}) ce qui va lui permettre d'augmenter son excitabilité afin de générer, si la dépolarisation est suffisamment importante, des potentiels d'action. Cependant, bien que la transmission glutamatergique soit nécessaire dans de nombreuses fonctions, celle-ci doit rester dans des gammes de concentrations physiologiques. En effet, dans le cas d'une stimulation excessive des récepteurs ionotropiques du glutamate, l'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone entraîne une cascade intracellulaire pouvant conduire à la genèse de stress oxydatif et à l'altération des organites cellulaires (Ankarcrona *et al.*, 1995; Danbolt, 2001). L'ensemble de ces phénomènes va fragiliser les neurones et aboutir dans certains cas à leur mort suite à l'activation de mécanismes apoptotiques (pour revue : Ferraiuolo *et al.*, 2011) (Figure 12). Ces mécanismes, qualifiés d'excitotoxicité liée au glutamate seraient impliqués dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Olney, 1969).

Cette hypothèse d'une excitotoxicité liée au glutamate comme mécanisme impliqué dans la dégénérescence neuronale est soutenue par le fait que chez les patients SLA, les taux de glutamate mesurés dans le liquide céphalo-rachidien sont supérieurs à la normale (Rothstein, 1995). Il a de plus été montré que l'efficacité de différents acteurs de la transmission glutamatergique était modifiée, il a notamment été suggéré que les souris SOD1, comme les patients SLA, présenteraient des variations de l'affinité des transporteurs glutamatergiques, ainsi que de l'expression des récepteurs et des protéines impliquées dans la recapture et la synthèse du glutamate (Rothstein *et al.*, 1992; Plaitakis & Constantakakis, 1993; Lin *et al.*, 1998; Trotti *et al.*, 1999; Van Damme *et al.*, 2005a; Bos *et al.*, 2006; Spalloni *et al.*, 2013). Ces modifications de la machinerie glutamatergique, favorisent une accumulation de glutamate dans l'espace extracellulaire (Figure 12). Enfin, il faut rappeler

que le seul traitement médicamenteux utilisé à l'heure actuelle pour "traiter" la SLA est le riluzole. Ce médicament, comme précédemment décrit, agit sur le système glutamatergique et, même si son efficacité est limitée, il permet de prolonger la vie des patients de quelques mois.

L'ensemble de ces données suggère un lien fort entre SLA et excitotoxicité glutamatergique, sans que l'on puisse totalement imputer la dégénérescence neuronale à ce seul facteur neurotoxique. Malgré cela, de nombreuses études se sont intéressées aux modifications de ce système afin de développer des molécules ciblant spécifiquement cet excès de glutamate en agissant à différents niveaux (blocage des récepteurs, augmentation des mécanismes de recapture). Cependant, la communauté scientifique doit composer avec les limites de l'application de ces composés, en raison de leurs nombreux effets secondaires, *in vivo* et entravant parfois le développement de stratégies thérapeutiques visant le système glutamatergique.

h. Modifications de l'excitabilité neuronale

L'utilisation des modèles animaux, tels que les souris SOD1, a permis de mettre en évidence des modifications de l'excitabilité des neurones moteurs de la moelle épinière avant leur dégénérescence ainsi que des altérations des réponses réflexes sensorimotrices (Amendola *et al.*, 2004). Une altération des propriétés fonctionnelles intrinsèques des motoneurones chez ces animaux serait à l'origine de ces modifications de l'excitabilité (pour revue : van Zundert *et al.*, 2012). Il a en effet, été montré chez les souris SOD1, des modifications de la résistance d'entrée, des courants de rhéobase, de l'AHP et de la capacitance membranaire des motoneurones (Bories *et al.*, 2007; Meehan *et al.*, 2010; Quinlan *et al.*, 2011) ainsi qu'une augmentation des courants sodiques persistants (Na^+ PIC) (Kuo *et al.*, 2005; van Zundert *et al.*, 2008; Meehan *et al.*, 2010; Quinlan *et al.*, 2011) qui est également observée à l'âge adulte (Meehan *et al.*, 2010). Cette hyperexcitabilité est sous-tendue par une large augmentation des Na^+ PIC et une diminution de l'adaptation à la décharge des motoneurones SOD1 (Meehan *et al.*, 2010). De façon très intéressante, il a été décrit des phénomènes comparables chez la souris jeune, entre P10 et P12 (Quinlan *et al.*, 2011) et dès les premiers jours postnataux (Bories *et al.*, 2007). Ces études ont permis de montrer que les motoneurones des souris SOD1 semblent se développer en exprimant une augmentation progressive des courants PICS et de la conductance de façon exagérée et accélérée par rapport aux animaux sains, conduisant à l'expression de courants deux fois plus importants qu'en conditions saines et physiologiques (Quinlan *et al.*, 2011). Enfin, des études

récentes ont mis en avant une modification de l'excitabilité des motoneurones dès les stades embryonnaires, suggérant que le fonctionnement des motoneurones serait aberrant dès la vie embryonnaire et la mise en place des réseaux locomoteurs, chez les souris SOD1 (Kuo *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2013). Il semblerait cependant qu'à ces stades, l'hyperexcitabilité motoneuronale observée serait davantage due à des altérations de l'arborisation dendritique (restreinte chez les SOD1) qu'à des modifications des propriétés membranaires et des courants exprimés par les motoneurones, bien qu'on ne puisse exclure totalement l'implication de changements mineurs des courants Na⁺ persistants (Martin *et al.*, 2013).

De nombreuses études portant sur le modèle SOD1 ont donc permis de montrer que les motoneurones spinaux sont hyperexcitables chez ces souris, dès les stades embryonnaires où ces modifications seraient plutôt dues à des altérations morphologiques des motoneurones, et jusqu'à l'âge adulte où, dès les stades postnataux, l'extrême excitabilité des motoneurones est liée à des modifications profondes et à une exagération des propriétés intrinsèques des motoneurones.

Il est cependant à noter que, bien que la majorité des travaux disponibles à l'heure actuelle penchent en faveur d'une augmentation de l'excitabilité des motoneurones dans la SLA, ce n'est pas le cas de tous. En effet, il existe deux courants d'études rapportant des modifications de l'excitabilité motoneuronale : l'un décrivant une hypoexcitabilité motoneuronale (Bories *et al.*, 2007; Pambo-Pambo *et al.*, 2009), avec une diminution des courants persistants et une maturation tardive des motoneurones ; et l'autre une hyperexcitabilité (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; 2005; van Zundert *et al.*, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2013) telle que nous l'avons décrite précédemment. Ces différences peuvent notamment être expliquées par le fait que les travaux penchant en faveur d'une hypoexcitabilité ont très majoritairement été réalisés sur le modèle SOD1^{G85R} ou SOD1^{G93A} « low expressor » et ceux penchant pour une hyperexcitabilité sur le modèle SOD1^{G93A} « high expressor ». Bien que ces deux lignées de souris soient de bons modèles de la SLA, elles expriment des symptômes, des altérations physiologiques et une évolution temporelle de la pathologie quelque peu différents (van Zundert *et al.*, 2012). Il a d'ailleurs été suggéré que la diminution de la résistance d'entrée des motoneurones de souris SOD1^{G85R}, et donc l'hypoexcitabilité de ces neurones, serait directement liée à l'augmentation de la surface dendritique observée chez ces souris (Amendola & Durand, 2008; Elbasiouny *et al.*, 2010). Les motoneurones de souris nouveau-né SOD1^{G93A} expriment quant à eux de très faibles altérations de leur résistance d'entrée (van Zundert *et al.*, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Quinlan *et al.*, 2011), ce qui pourrait suggérer que la réponse augmentée observée lors

de l'injection d'un courant dans ces neurones (ie l'hyperexcitabilité) est largement dominée par l'augmentation des Na^+ PICS (van Zundert *et al.*, 2008; 2012). De plus, les enregistrements, les préparations, l'âge des animaux et bien sûr leur profil génétique sont autant de facteurs variant d'une étude à l'autre et pouvant expliquer les différences observées.

La mise en évidence d'altérations de l'excitabilité motoneuronale chez les souris SOD1 a été corroborée par des observations similaires chez les patients atteints de SLA. Ainsi, il a été montré que l'excitabilité axonale de patients SLA était beaucoup plus instable, voire amplifiée dans certains cas, que celle des sujets sains dans une expérience de détermination du seuil de réponse à une stimulation (Shibuta *et al.*, 2013). De même, l'augmentation des courants sodiques Na^+ PIC observée chez les modèles animaux a pu être confirmée chez des patients SLA (Shimatani *et al.*, 2011; Kanai *et al.*, 2012). Ces observations ont non seulement permis d'appuyer l'utilisation des souris SOD1 comme modèle animal de référence dans la SLA, mais aussi de montrer que les modifications de l'excitabilité motoneuronale semblent jouer un rôle prépondérant dans la physiopathologie de cette maladie.

Bien que l'hypothèse d'une hyperexcitabilité motoneuronale comme mécanisme possible de la dégénérescence soit soutenue par le fait qu'elle induit des mécanismes pathologiques pour la cellule (Cleveland & Rothstein, 2001) tels que le stress oxydatif (Lancelot *et al.*, 1998), une augmentation des taux calciques intracellulaires (Fritz *et al.*, 2013) ou des modifications mitochondriales (Roy *et al.*, 1996); il est encore bien difficile à l'heure actuelle de déterminer si ces altérations de l'excitabilité sont une cause ou une conséquence des processus pathologiques induits suite à l'expression de la protéine SOD1 mutée. De plus, à contre courant de ce qui avait été envisagé jusqu'alors, des travaux récents ont montré que l'hyperexcitabilité pourrait avoir un rôle protecteur de la dégénérescence des motoneurones chez un modèle SOD1 (Saxena *et al.*, 2013), mettant en avant l'implication probable de cette augmentation de l'excitabilité non pas dans les processus dégénératifs, mais dans les mécanismes compensatoires mis en jeu par les réseaux neuronaux des souris SOD1. La diversité des résultats observés suivant les modèles et les techniques utilisés amène à rester prudent sur les conclusions à tirer de ces observations et à étudier davantage ces résultats afin de déterminer la nature, l'implication exacte et le rôle de ces modifications de l'excitabilité dans la SLA.

Enfin, il ne faut pas oublier que le riluzole est à l'heure actuelle le seul traitement disponible pour la SLA. Or, le riluzole agit sur l'excitabilité neuronale notamment en diminuant les PICS (Van Damme *et al.*, 2005b; Harvey *et al.*, 2006; Van Den Bosch *et al.*, 2006; Bellingham, 2011; Schuster *et al.*, 2011). Il a été montré que l'efficacité limitée dans le temps du riluzole ne serait pas due à une habitude des neurones au traitement, en tout cas que les courants PICS ne s'adaptent pas à long terme et continuent d'être diminués par la prise de ce traitement (Schuster *et al.*, 2011).

i. Conclusion

Les mécanismes potentiellement impliqués dans la mise en place de la SLA, et particulièrement dans la dégénérescence des neurones moteurs sont donc nombreux. De plus, on peut supposer que l'implication de chacun de ces facteurs est dépendante du type de SLA dont est atteint le patient et de son origine familiale ou non. Les données actuelles laissent penser que ces mécanismes dégénératifs impliqueraient à la fois des facteurs non neuronaux et des modifications neuronales intracellulaires. Bien que les hypothèses soient nombreuses et que la balance entre le poids de chacune dans les processus de dégénérescence soit sans cesse discutée, les scientifiques s'accordent pour le fait que la dégénérescence observée dans la SLA aurait une origine multifactorielle complexe.

Les recherches menées à l'heure actuelle visent à comprendre les mécanismes à l'origine de la dégénérescence neuronale et particulièrement, à déterminer les liens de causalités entre eux. En effet, le but final de l'ensemble de tous ces travaux est d'aboutir à l'identification des mécanismes qui initient la cascade d'événements cellulaires menant à la mort neuronale afin de les cibler lors du développement de techniques thérapeutiques. Pour cela, une compréhension parfaite de tous les mécanismes interdépendants impliqués dans cette pathologie est nécessaire.

8. Les altérations physiologiques dans la SLA : atteintes précoces et impact sur la locomotion

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'utilisation de modèles animaux a ouvert la voie aux études portant sur les modifications précoces déclenchées par les mutations impliquées dans la SLA. Ainsi, les chercheurs peuvent étudier les altérations physiologiques exprimées par les animaux bien avant l'apparition des symptômes, et donc, possiblement à l'origine des mécanismes neurodégénératifs décrits précédemment. En effet, il est impossible d'accéder à ce genre d'informations chez les patients 1) du fait que le

diagnostic intervient systématiquement une fois que la dégénérescence motoneuronale a atteint un stade avancé (au déclenchement des symptômes) et 2) pour des raisons évidentes d'éthique et des techniques trop invasives qu'il est nécessaire d'employer.

La majorité des études portant sur les modifications physiopathologiques précoces dans le cadre de la SLA ayant été observées sur le modèle murin SOD1, nous développerons dans ce paragraphe uniquement les résultats concernant ces lignées.

Au niveau comportemental, il a été montré une baisse de la vitesse locomotrice (Veldink *et al.*, 2003; Wooley *et al.*, 2005) autour de P60 chez les souris SOD1^{G93A}, soit plus d'un mois avant que la paralysie ne soit clairement visible (Mancuso *et al.*, 2011a; Mead *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 2012a). Cependant, des déficits moteurs bien plus précoces ont pu être décrits chez ces souris. En effet, dès les stades juvéniles (Kanning *et al.*, 2010), à P10 par exemple, les souris SOD1 présentent un défaut de placement de leurs pattes lors de la marche (van Zundert *et al.*, 2008; Kanning *et al.*, 2010). De plus, *in vitro*, il est très difficile d'induire une activité locomotrice sur la préparation de moelle épinière isolée de souris SOD1 âgées d'une semaine (Amendola *et al.*, 2004), suggérant la présence d'altérations profondes des réseaux, très tôt dans le développement de l'animal.

Au niveau morphologique, il a été montré que les motoneurones des souris SOD1 présentent une arborisation dendritique restreinte comparativement aux animaux témoins dans les stades embryonnaires (Martin *et al.*, 2013). À l'inverse, dans les premières semaines postnatales, cette tendance s'inverse et il a été décrit une augmentation du nombre de ramifications dendritiques et une augmentation de la longueur des dendrites distales corrélées à une augmentation globale de l'arborisation dendritique (Amendola & Durand, 2008; Filipchuk & Durand, 2012). Ces modifications morphologiques des motoneurones sont accompagnées de changements de leurs propriétés membranaires et donc de leur excitabilité aux mêmes âges (Kuo *et al.*, 2004; Bories *et al.*, 2007; van Zundert *et al.*, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2013). En effet, comme décrit précédemment, de nombreuses études ont montré des modifications de l'excitabilité des motoneurones, dès les stades embryonnaires (Kuo *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2013), en faveur : soit d'une hypoexcitabilité (Bories *et al.*, 2007; Pambo-Pambo *et al.*, 2009) sous-tendue par des modifications de la résistance d'entrée et de la capacitance membranaire des motoneurones, soit d'une hyperexcitabilité (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; 2005; van Zundert *et al.*, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2013) sous-tendue notamment par une augmentation des courants persistants (PICS). Ces résultats, bien que parfois contradictoires,

se rejoignent sur le fait que des altérations morphologiques et fonctionnelles des motoneurones sont exprimées chez les souris SOD1, bien avant la dégénérescence et que tout symptôme moteur ne puisse être visible à l'œil nu.

Enfin, il a également été décrit des altérations fonctionnelles intracellulaires des neurones de souris SOD1, dès les stades postnataux, conduisant à des déficits du transport axonal, une fragmentation de l'appareil de Golgi, une vacuolisation des mitochondries ou encore au stress du réticulum endoplasmique (Mourelatos *et al.*, 1996; Stieber *et al.*, 1998; Bendotti *et al.*, 2001; Kieran *et al.*, 2005; Gonatas *et al.*, 2006; De Vos *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2009b; Vinsant *et al.*, 2013a).

L'ensemble de ces données met donc clairement en évidence la présence d'altérations très précoces des réseaux spinaux chez les souris SOD1, modèles de la SLA. Ces modifications observées aux stades embryonnaires et postnataux, suggèrent que la mise en place et la maturation des réseaux moteurs se font de manière totalement différente de ce que l'on observe chez les animaux sains. Les modifications de la physiologie des motoneurones observées dans les stades précoces du développement du modèle SOD1 peuvent être le signe d'une atteinte du système moteur ou bien de la mise en place par l'organisme de mécanismes de compensation visant à maintenir la fonctionnalité des réseaux spinaux. On peut alors supposer que la dégénérescence motoneuronale ayant lieu dans des stades bien plus tardifs ne soit que la conséquence d'une mauvaise mise en place des réseaux moteurs et/ou corresponde à l'épuisement des mécanismes de compensation mis en jeu face aux facteurs pathologiques devenus trop importants.

III. Objectifs de la thèse :

Mon projet de thèse s'est inscrit dans le cadre général de l'étude des modifications du réseau moteur spinal précédant la dégénérescence des motoneurones observée dans la SLA.

Nous avons vu précédemment que les systèmes neuromodulateurs jouent un rôle clé dans la mise en place, la maturation et la modulation des réseaux neuronaux générateurs de la locomotion. Il a été montré récemment que les réseaux spinaux des souris SOD1 présentent des altérations physiologiques précoces. Les objectifs de ce travail doctoral ont donc été centrés autour de l'étude des influences neuromodulatrices reçues par le réseau locomoteur spinal, et plus particulièrement par les motoneurones, depuis la naissance jusqu'aux stades présymptomatiques de la SLA. Dans ce but, nous avons utilisé différentes techniques d'électrophysiologie, d'anatomie et de quantification, qui, combinées, nous ont permis d'établir une description précise de l'état de chaque système neuromodulateur. La majeure partie de mon travail au cours de ces trois dernières années s'est attachée à apporter des réponses aux deux points suivants :

- Il a été montré que le réseau moteur spinal des souris SOD1 serait modifié dès les stades embryonnaires. Or, les monoamines jouent un rôle déterminant dans la mise en place et la maturation de ces réseaux ainsi que dans le contrôle de leur activité au cours de la locomotion. **Nous avons donc voulu savoir si les systèmes monoaminergiques, modulateurs essentiels des réseaux spinaux et principalement des motoneurones, sont affectés dans la SLA?**

- Des travaux récents montrent que des synapses cholinergiques, les boutons en C, qui contactent les motoneurones présentent des altérations morphologiques chez les souris SOD1 (Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013). Le système cholinergique étant indispensable au bon fonctionnement des motoneurones, nous avons voulu pousser plus avant ces investigations et regarder **comment mature et évolue le système cholinergique spinal chez les souris sauvages et SOD1**. Une attention toute particulière a été portée sur les interneurones cholinergiques qui sont à l'origine des boutons en C afin d'étudier si les motoneurones sont les seuls neurones cholinergiques touchés par la dégénérescence chez les souris SOD1.

- Parallèlement à ces deux études, nous avons réalisé une étude comportementale originale visant à déterminer si l'activité motrice globale de des souris SOD1 est affectée, avant même

que les symptômes n'apparaissent. Cette étude aux résultats prometteurs, bien qu'encore aux stades préliminaires, fera l'objet du chapitre 3 de ce mémoire de thèse.

- Enfin, dans un 4^{ème} et dernier chapitre, je présenterai les résultats préliminaires obtenus au cours d'une étude des capacités plastiques des réseaux spinaux. Sur des cultures de neurones spinaux, nous avons testé l'effet de substances neuroactives connues pour induire de la plasticité synaptique dans d'autres réseaux neuronaux. Le but de cette étude est de comparer et déterminer les types de plasticité produits par les réseaux de neurones en culture issues d'animaux sauvages et SOD1.

Cette étude a été réalisée sur le modèle SOD1^{G93A} « high expressor line » pour lequel une importante littérature est disponible et qui a largement prouvé ses similitudes en termes de dégénérescence neuronale et de symptômes moteurs associés avec la SLA. Nous avons choisi, afin de faciliter la lecture de ce mémoire de présenter le matériel et les méthodes employés pour chacune des études composant à ce travail de doctorat dans les chapitres de résultats correspondants. Nous détaillerons donc dans un premier temps uniquement les aspects relatifs au maintien, aux croisements et au génotypage de la lignée de souris transgénique SOD1^{G93A}, utilisée tout au long de ce travail doctoral.

Le modèle d'étude : la souris SOD1^{G93A} « high expressor line »

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées en accord avec le comité local de l'université de Bordeaux et les directives du Conseil du comité européen.

Les lignées de souris utilisées dans ce travail ont été entretenues dans l'animalerie de l'INCLIA en cycle diurne-nocturne (12h/12h) avec un accès ad libitum à l'eau et la nourriture.

Animaux :

A) Souris transgéniques SOD1^{G93A} "high expressor line":

Dans cette thèse nous avons utilisé des souris transgéniques SOD1^{G93A} (B6SJL-TgN (SOD1^{G93A})/1Gur/J "high expressor line"; Laboratoires Jackson : Bar Harbor, Maine USA) exprimant le gène humain muté codant pour la SOD1 (Superoxyde Dismutase 1) de façon hémizygote. Comme décrit précédemment, une glycine est remplacée par une alanine en position 93 sur ce gène humain muté et le transgène est exprimé en un grand nombre de copies (Gurney *et al.*, 1994).

Les souris mâles hémizygotes (SOD1^{G93A} "high expressor line") ont été accouplés avec des femelles sauvages B6SJLF1/J afin d'obtenir une descendance à 50% hémizygote pour le transgène SOD1^{G93A} et 50% non transgénique. Les animaux exprimant le transgène mutant SOD1^{G93A} et leurs contrôles issus des mêmes portées ont été utilisés tout au long de ce travail. L'acquisition et l'analyse des données ont été faites en aveugle par rapport au génotype des animaux. Afin de s'affranchir de possibles effets liés au sexe des animaux, toutes les expériences ont été réalisées sur des mâles SOD1^{G93A}, et contrôles.

B) Génotypage

Afin de vérifier le génotype des animaux utilisés, un bout de queue de quelques millimètres est prélevé sur chaque animal. Celui-ci est ensuite congelé et stocké à -20°C, puis lysé et digéré avec une protéinase K ("Proteinase K from Tritirachium album" P6556, Sigma-Aldrich®) diluée dans une solution dite de direct-PCR (Viagen DirectPCR, Tail, cat #102-T, Viagen Biotech inc.). L'amplification par PCR a été réalisée à la plateforme de génotypage (Plateforme de génotypage du Neurocentre Magendie). Les échantillons ont tout d'abord été centrifugés à 13200 rpm durant 10 minutes, puis les surnageants ont été purifiés dans des colonnes de silicium (Macherey nagel kit). Les PCR ont été réalisées en utilisant un cycleur thermique biorad 1000 en utilisant 1,25 unités d'ADN polymérase « Gotaq-flexi » (Promega),

2,5 mM de Mg^{2+} , 0,2 mM de dNTPs et 0,3 μM de chaque amorce, dans un volume de 50 μL .

Les conditions de la PCR étaient les suivantes : 1 cycle de 5 min à 95°C, 37 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 72°C, puis un cycle de 5 min à 72°C. Le résultat des PCR a été analysé à l'aide d'un système d'électrophorèse microfluide (Caliper, Labchip GX) en utilisant un kit « DNA5k ». Le transgène SOD1 obtenu avait un poids de 250 paires de bases (pb).

Les amorces utilisées sont les suivantes :

5' CATCAGCCCTAATCCATCTGA 3'

et 5' CGCGACTAACAATCAAAGTGA 3' (inverse).

Résultats

CHAPITRE 1:

Contrôle monoaminergique des réseaux spinaux chez la souris $SOD1^{G93A}$ nouveau né.

A. Introduction

La SLA, maladie neurodégénérative caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones moteurs du cortex, du tronc cérébral et de la moelle épinière est aujourd'hui encore une maladie fatale pour laquelle aucun traitement réellement efficace n'est disponible.

Nous avons vu précédemment que bien que les symptômes de la SLA apparaissent à l'âge adulte, il semble de plus en plus évident que les réseaux spinaux locomoteurs présentent des altérations fonctionnelles dès les stades précoces chez les souris SOD1. En effet, de façon intéressante, des altérations locomotrices ont été mises en évidence bien plus précocement que l'apparition des symptômes moteurs chez les souris SOD1 (Tang *et al.*, 2009; Hayworth & Gonzalez-Lima, 2009; Mandillo *et al.*, 2014). De plus, des tests comportementaux effectués dès la première semaine postnatale ont révélé, chez ces mêmes souris, un délai dans la maturation des processus sensorimoteurs mis en jeu notamment lors de tests d'agrippement des pattes postérieures (Amendola *et al.*, 2004). Au niveau cellulaire, les motoneurones de souris SOD1^{G85R} et SOD1^{G93A} en développement présentent des altérations de leur arborisation dendritique, de leur excitabilité et des informations synaptiques qu'ils reçoivent comparativement à des motoneurones sains aux mêmes stades (Bories *et al.*, 2007; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Chang & Martin, 2011a; Filipchuk & Durand, 2012; Martin *et al.*, 2013). Enfin, des différences de sensibilité neurochimique ont également été rapportées en comparant des souris nouveau-nées SOD1 à des souris témoins (WT). En effet, le cocktail pharmacologique classique (composé d'un agoniste glutamatergique, NMA et de sérotonine) décrit précédemment comme l'outil pharmacologique de choix pour déclencher une activité rythmique de locomotion fictive sur des préparations de moelles épinières isolées *in vitro* a été montré comme étant inefficace sur des souris SOD1^{G85R} (Amendola *et al.*, 2004). De telles altérations précoces, dès les stades postnataux, et même embryonnaires, peuvent affecter la mise en place des circuits neuronaux et les rendre plus permissifs à des changements pathologiques plus tard dans la vie de l'animal. Il apparaît donc important de mieux déchiffrer les changements subis par les réseaux moteurs spinaux dans les stades développementaux précoces des souris SOD1.

Les motoneurones sont contactés par de nombreux systèmes neuromodulateurs intra et extra-spinaux qui contrôlent à la fois leurs propriétés membranaires intrinsèques et les informations synaptiques qu'ils reçoivent (pour revue : Miles & Sillar, 2011). En plus de leur rôle dans le contrôle de l'excitabilité, les influences neuromodulatrices contribuent

significativement au développement embryonnaire et postnatal des réseaux moteurs spinaux (pour revue : Vinay *et al.*, 2002; Miles & Sillar, 2011).

Parmi les multiples systèmes neuromodulateurs qui contrôlent les réseaux moteurs spinaux, les voies monoaminergiques (dopaminergiques, sérotoninergiques, et noradrénergiques) sont impliquées dans l'initiation et la facilitation de l'expression des signaux moteurs, le contrôle des réflexes segmentaires et la maturation des réseaux locomoteurs spinaux (Barbeau & Rossignol, 1991; Crick & Wallis, 1991; Cazalets *et al.*, 1992a; Sqalli-Houssaini *et al.*, 1993; Kiehn & Kjaerulff, 1996; Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000; Whelan *et al.*, 2000; Vinay *et al.*, 2002; Barriere *et al.*, 2004; Barrière *et al.*, 2008; Han & Whelan, 2009; Tartas *et al.*, 2010; Miles & Sillar, 2011; Humphreys & Whelan, 2012; Pearlstein, 2013). Les monoamines jouent donc un rôle essentiel dans l'activation, la maturation et la modulation des réseaux locomoteurs spinaux. Leur implication forte dans la régulation de la fonction locomotrice peut laisser présager que ces systèmes neuromodulateurs pourraient être affectés dans le cadre de pathologies motrices neurodégénératives telles que la SLA. Des altérations du contrôle monoaminergique durant le développement pourraient conduire à des réorganisations significatives des circuits locomoteurs spinaux. De façon intéressante, des prélèvements de liquide céphalo-rachidien de patients atteints de SLA ont mis en évidence des modifications des taux de sérotonine (Sofic *et al.*, 1991; Bertel *et al.*, 1991; Forrest *et al.*, 1996; Dupuis *et al.*, 2010; Dentel *et al.*, 2013). Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est pour le moment intéressée aux possibles modifications de ces systèmes monoaminergiques spinaux chez les souris SOD1.

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si les taux de neuromodulateurs présents et la sensibilité spinale vis-à-vis des monoamines sont modifiés chez les souris SOD1 à des stades juvéniles. Pour cela, nous avons réalisé une analyse par chromatographie liquide à haute performance du contenu en monoamines de la moelle, puis nous avons comparé les effets de l'application de sérotonine, de dopamine et de noradrénaline sur une activité locomotrice enregistrée sur des préparations de moelles épinières de souris nouveau-nés WT et SOD1 isolées *in vitro*. Cette étude a permis de montrer qu'une activité rythmique de locomotion fictive peut être générée aussi bien chez les souris WT et SOD1, suite à l'application de NMA-5-HT. De plus, nous avons montré que le contenu spinal en dopamine est augmenté dans la seconde semaine postnatale des souris SOD1 et que la locomotion fictive induite chez ces souris est plus sensible à la noradrénaline que chez les souris témoins.

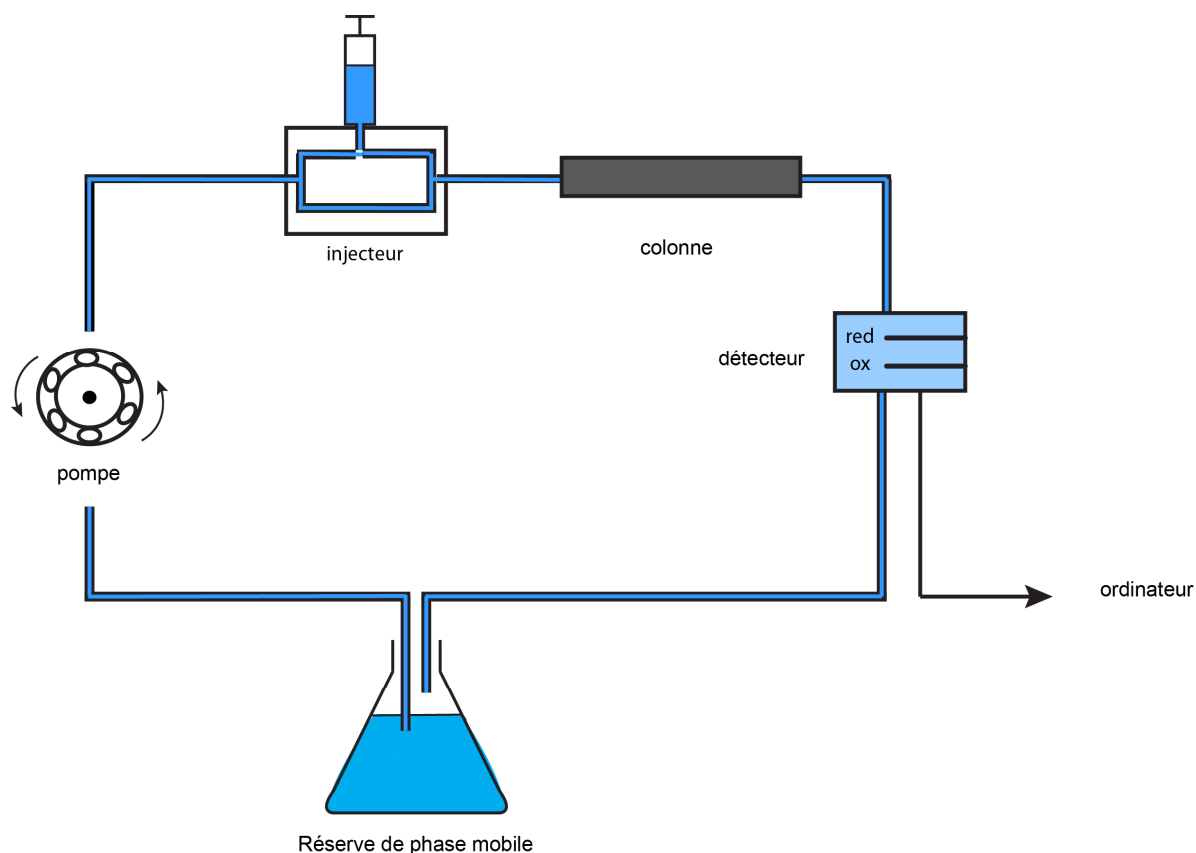


Figure 14 Schéma simplifié de l'organisation de la Chromatographie Liquide à Haute Performance

Le dispositif expérimental est perfusé en permanence par un liquide appelé phase mobile, qui circule à flux régulier grâce à une pompe. L'échantillon est injecté à l'aide d'une seringue au niveau de l'injecteur. Celui-ci possède un système de dérivation qui permet de placer l'échantillon liquide dans la phase mobile en évitant de réaliser une rupture du flux. L'échantillon est alors dirigé dans une colonne à atome de carbones qui va permettre de séparer temporellement les différentes molécules suivant la puissance de leur hydrophobicité, puis dans la cellule de détection au sein de laquelle les composés vont être oxydés (électrode d'oxydation: ox) et réduits (électrode de réduction: red). La phase mobile est alors rejetée dans la réserve tandis que le détecteur transmet au niveau de l'ordinateur les valeurs d'oxydation et de réduction de chaque échantillon en fonction du temps d'arrivée à la cellule. L'utilisation d'échantillons "standards" dont la concentration en un composé donné est connue permet d'identifier les temps de sortie et de calculer les concentrations de chaque molécule d'intérêt de l'échantillon.

B. Matériel et Méthodes

Cette étude a été menée sur des animaux SOD1^{G93A} et des témoins issus de même portée de 1 à 10 jours postnataux (P1 à P10). Nous avons combiné l'utilisation d'une approche quantitative : la chromatographie liquide à haute performance et d'une technique d'électrophysiologie extracellulaire afin d'analyser l'état des systèmes monoaminergiques au niveau spinal.

1. Analyse tissulaire post-mortem

Une méthode d'analyse biochimique a été utilisée afin de quantifier les taux tissulaires de monoamines et de leurs métabolites chez des animaux SOD1 et contrôles à P1 et P10. Pour cela nous avons effectué des prélèvements de la partie lombaire de la moelle épinière afin de réaliser un dosage tissulaire en se basant sur les propriétés électrochimiques des molécules d'intérêt, après les avoir séparées par chromatographie.

a. Prélèvement et préparation des tissus pour l'analyse post-mortem

Après décapitation, la partie lombaire de la moelle épinière de souris nouveau-nés (P1 et P10) a été rapidement prélevée par laminectomie, puis placée dans de la carboglace et stockée à -80°C jusqu'au jour de l'expérience. Quand cela était nécessaire, la moelle lombaire était placée sur le côté et coupée en séparant les parties dorsale et ventrale avec un scalpel à microdissection.

b. Mesures par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP, ou HPLC en anglais)

Le jour de l'analyse biochimique les échantillons de tissu ont été pesés, homogénéisés dans 0,1 N d'acide perchlorique (HClO₄), soniqués et centrifugés à 13000 rpm durant 30 min à 4°C. Le contenu tissulaire en monoamines (DA, NA, 5-HT) et leurs métabolites (5-hydroxyindole-3-acétique: 5-HIAA un métabolite de la 5-HT et l'acide 3,4-dihydroxyphenylacétique: DOPAC un métabolite DA) a été mesuré par HPLC, un système de détection électrochimique (ECD). Les aliquots contenant le surnageant ont été placés dans un injecteur automatique (Shimadzu, SIL-20A, Paris, France) à 4°C pour être injectés dans la colonne d'HPLC (Hypersyl C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm; C.I.L.-Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) protégée par une pré-colonne Brownlee-Newguard (RP-8, 15 x 3,2 mm, 7 µm; C.I.L.-Cluzeau). La phase mobile, délivrée à un flux constant de 1,3 ml/min grâce à une

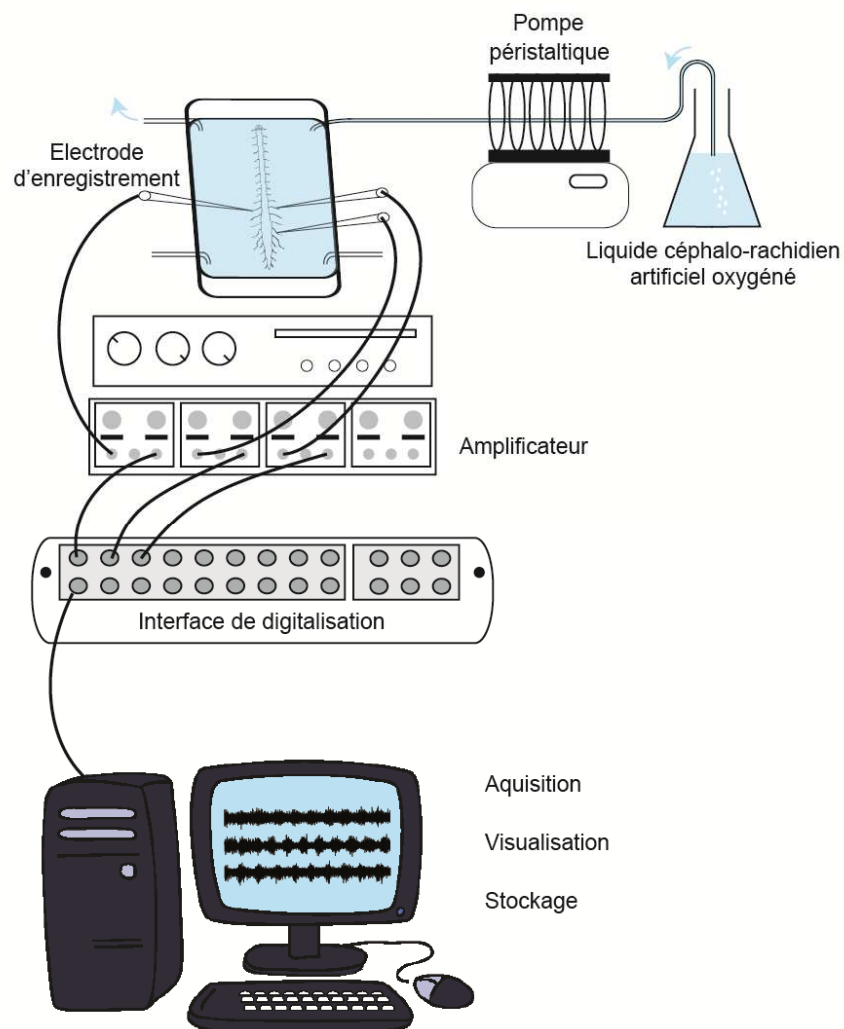


Figure 15 Schéma d'organisation du dispositif expérimental d'enregistrement d'électrophysiologie extracellulaire.

La préparation de moelle épinière est isolée et maintenue en survie durant plusieurs heures dans du liquide céphalo-rachidien artificiel oxygéné en permanence. Les activités motrices produites par les motoneurones sont enregistrées directement au niveau des racines ventrales à l'aide d'électrodes de succion. Le signal électrique obtenu est ensuite amplifié, digitalisé et enfin enregistré sur un ordinateur.

(modifiée d'après la thèse de Jean Patrick Le Gal).

pompe (LC20-AD, Shimadzu, France), était composée comme suit (en millimoles) : 60 NaH_2PO_4 , 0,1 disodium EDTA et 2 octane acide sulfonique plus 7% méthanol, ajusté à un pH de 3,9 avec de l'acide orthophosphorique et filtré au travers d'un filtre millipore de 0,22 mm. Les monoamines et leurs métabolites ont été détecté à l'aide d'une cellule coulométrique (Cellule analytique 5011, Coulochem) couplée à un détecteur programmable (Coulochem II, ESA, Paris, France) puis visualisés et enregistrés sur un ordinateur (Beckman, system GOLD) (Figure 14). Le potentiel des électrodes était fixé à +350 mV pour l'oxydation et -270 mV pour la réduction. Dans ces conditions, la sensibilité pour la NA, DA, 5-HT, DOPAC, et 5-HIAA était de 3, 1, 8, 6 et 5 pg/10 μl respectivement, avec un rapport signal/bruit de 3:1. Le contenu tissulaire en monoamines est exprimé en pg/mg de tissu et correspond à la moyenne \pm SEM pour chaque groupe. Les différences de contenu monoaminergique entre les souris P1 et P10 SOD1 et contrôles ont été analysées en utilisant une analyse de variance à deux voies en mesure répétée (ANOVA) avec un test de comparaison multiple de Sidak (Logiciel Prism Graph Pad). Une différence significative a été considérée si $p < 0,05$.

2. Modulation pharmacologique de la locomotion induite *in vitro*

Cette étude a été menée sur des préparations de moelle épinière isolée *in vitro* de souris nouveau-nées âgées de P1 à P3. Cette préparation est maintenue en vie par la perfusion d'un liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF). La stimulation des CPGs locomoteurs spinaux par l'application de composés neuroactifs appropriés sur cette préparation induit une activité dite de locomotion fictive enregistrable en extracellulaire au niveau des racines ventrales. Cette activité est caractérisée par une alternance de potentiels d'action entre les racines droites et gauches et fléchisseurs extenseurs de la moelle (Cazalets et al., 1992; Kiehn et Kjaerulff, 1996) (Figure 15). Ce modèle d'étude permet de nombreuses approches expérimentales telles que l'électrophysiologie et la pharmacologie.

a. Préparation de moelle entière isolée *in vitro*

Les souris nouveau-nées (P1 à P3) SOD1 et contrôles ont tout d'abord été profondément anesthésiés jusqu'à la perte des réflexes nociceptifs dans une boîte d'induction hermétique avec un mélange air-isoflurane 4 % puis décapités et éviscérés. Une laminectomie effectuée sous contrôle binoculaire a ensuite permis de retirer et d'isoler la moelle épinière tout en prenant garde de préserver les racines ventrales et dorsales. L'ensemble de la

dissection et les enregistrements ont été réalisés en présence d'un liquide céphalo-rachidien artificiel (aCSF) contenant (en millimoles) : NaCl 130, KCl 3, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,3, NaH₂PO₄ 0,58, NaHCO₃ 25 et glucose 10, à un pH de 7,4 lorsqu'il est oxygéné par un mélange de 95 % O₂ + 5 % CO₂ à température ambiante (entre 24 et 26°C) (Figure 15).

b. Pharmacologie

Toutes les drogues (N-méthyl-D, L-aspartate : NMA; 5-HT, DA et NA) ont été achetées chez Sigma (St. Louis, MO, USA). Pour le NMA et la 5-HT, des solutions stock à 0,1 mM diluées dans de l'eau distillée ont été préparées et stockées à -20°C. Les solutions de DA et de NA étaient préparées chaque jour, protégées de l'exposition à la lumière puis stockées à 4°C.

Les différents composés pharmacologiques ont été appliqués directement dans le bain de perfusion en utilisant une pompe péristaltique (flux fixé à 7 ml/min).

c. Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires et analyse

Les activités motrices produites par le réseau locomoteur spinal suite à l'application de différents composés neuroactifs ont été enregistrées en extracellulaire au niveau des racines ventrales spinales. Pour cela, des électrodes de succion en verre ont été réalisées à partir de capillaires en verre (1,5mm de diamètre, borosilicate, Havarv Apparatus) sur une étireuse verticale Narishige. Après ajustement de leur pointe au diamètre de la racine enregistrée, les électrodes étaient fixées à des micromanipulateurs (Narishige), puis remplies de milieu de perfusion et placées à proximité de la racine ventrale afin de l'aspirer délicatement et hermétiquement (afin d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit).

Dans notre étude, et afin de caractériser précisément la locomotion fictive, nous avons enregistré sur chaque préparation trois racines ventrales au niveau lombaire : les racines lombaires 2 droite et gauche (L2d et L2g respectivement) qui innervent majoritairement des muscles fléchisseurs et une racine lombaire 5 (L5d ou L5g suivant les préparations), innervant principalement des muscles de type extenseur. L'enregistrement simultané de ces trois racines ventrales nous a permis de visualiser et d'étudier à la fois l'alternance bilatérale et fléchisseur/extenseur caractérisant l'activité locomotrice (Cazalets *et al.*, 1992b; Kiehn & Kjaerulff, 1996).

Les neurogrammes enregistrés sur ces racines ont été amplifiés (x10000) en utilisant des amplificateurs AC à haute impédance (200-3000Hz) fabriqués au laboratoire, puis le signal a été digitalisé à 5kHz (Axograph, Sydney, NSW, Australie) pour une analyse future

		Wild Type		SOD1	
		P1	P10	P1	P10
DOPAC	lombaire entier	14.3±4 (14)	27.8±3 (18)	33.4±10 (17)	26.9±4 (17)
	lombaire ventral	8.8±1 (13)	28.2±8 (7)*	11.5±3 (6)	34.8±9 (7)*
5-HIAA	lombaire entier	148.9±14	174.4±18	154.7±11	176.1±17
	lombaire ventral	99.4±11	122.8±15	100.9±22	128.7±19

Table 1 Mesures par HPLC des contenus en DOPAC et 5-HIAA de la partie lombaire entière ou ventrale de moelles épinières de souris WT et SOD1 à P1 et P10.

Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre d'échantillons testés. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les stades de développement P1 et P10.

(figure 15). Les rythmes locomoteurs induits pharmacologiquement ont été analysés à l'aide d'une technique d'analyse en ondelette (« wavelet analysis ») adaptée aux signaux non stationnaires, via un programme développé sous MatLab (MatWorks®) au laboratoire. Ce programme, similaire au logiciel SpinalCore développé par le groupe de Lev-Tov (Mor & Lev-Tov, 2007), est basé sur le pack MatLab mis à disposition par Aslak Grinsted (<http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>; Torrence & Compo, 1998; Grinsted *et al.*, 2004). Les neurogrammes ont été segmentés en épisodes de 2 min puis le signal a été prétraité (1- filtre passe-haut à 50Hz, 2- rectification et 3- filtre passe-bas à 5-10Hz) avant de réaliser l'analyse en appliquant pour chaque neurogramme une méthode de transformée en ondelette continue (« continuous wavelet transform »). Cette méthode permet d'extraire le contenu fréquentiel du signal au cours du temps (méthode d'analyse temps-fréquence). Par ailleurs, la corrélation, la significativité de la corrélation entre deux signaux, ainsi que le déphasage de leurs composantes fréquentielles ont été extraits en appliquant les méthodes de calcul de corrélation croisées en ondelette (« cross wavelet ») et de cohérence en ondelette (« wavelet coherence »). Par commodité, les spectres de corrélation croisée et de cohérence ont été combinés en une seule carte afin de mettre en avant les régions significatives à la fois en termes de puissance et en termes de cohérence. Sur ces cartes est représentée l'évolution des composantes fréquentielles des signaux extracellulaires (axe Y, échelle logarithmique) au cours du temps (axe X). La puissance des fréquences est codée en couleur (la puissance augmentant des couleurs froides aux couleurs chaudes). Les lignes asymptotiques sur la carte représentent le cône d'influence en dehors duquel l'effet de bord devient trop important et dont les valeurs n'ont pas été incluses dans l'analyse statistique (Torrence & Compo, 1998; Mor & Lev-Tov, 2007). La sélection de régions d'intérêt à partir des cartes mixtes de corrélation croisée/cohérence autour de bandes de fréquences significatives permet de calculer la fréquence moyenne des activités motrices, leur cohérence et leurs relations de phase. Le niveau de significativité statistique des valeurs de cohérence en ondelette a été calculé à l'aide de simulations Monte-Carlo (Mor & Lev-Tov, 2007).

Le logiciel Igor Pro (Wavemetrics) a permis d'effectuer des tests de distribution angulaire. Le test circulaire U2 non paramétrique de Watson a été utilisé pour comparer les données circulaires entre animaux contrôles et SOD1 dans les différentes conditions pharmacologiques testées.

L'amplitude des bouffées d'activité motrices a été calculée à l'aide d'un logiciel basé sur MatLab et développé au laboratoire. Pour chaque préparation, les valeurs des amplitudes des bouffées ont été normalisées par rapport à l'amplitude mesurée en présence de 10 μ M 5-

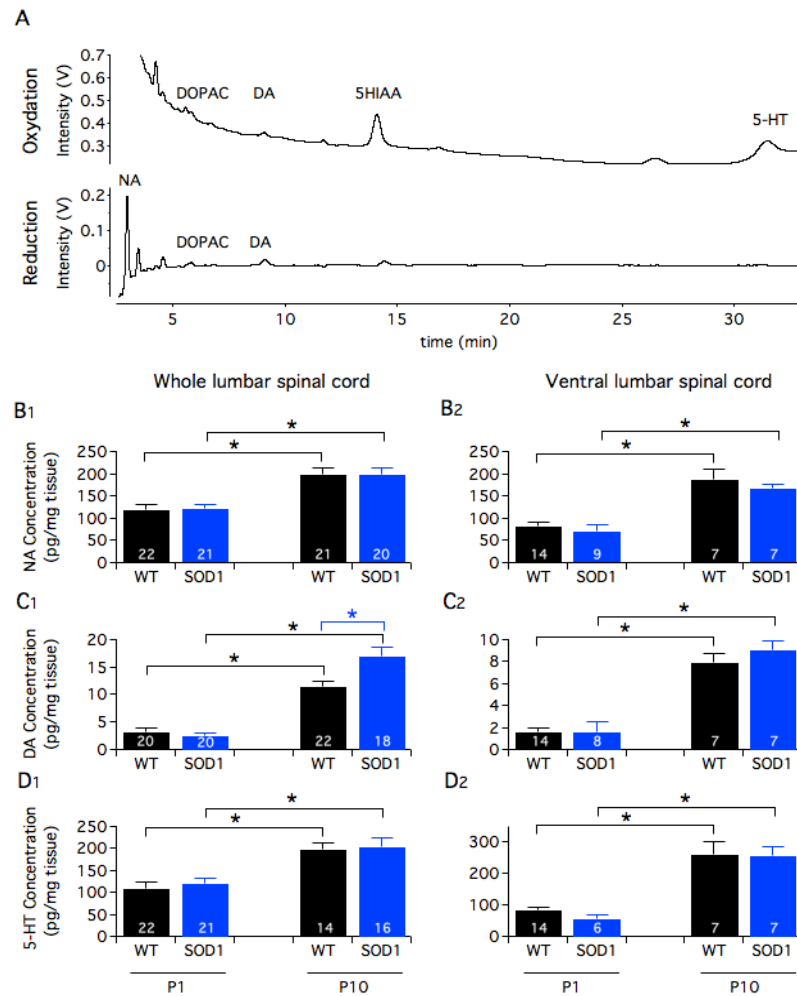


Figure 16 Contenu monoaminergique de la moelle épinière de souris nouveau-né.

A. Exemple de chromatogrammes obtenus pour la partie lombaire d'une moelle épinière de souris SOD1 à P10. Les chromatogrammes représentent les signaux de sortie coulométriques (en nanoampère convertis en ± 1 V par l'enregistreur) produits après séparation des différents composés au niveau de l'électrode d'oxydation (trace supérieure; +350 mV) et/ou de l'électrode de réduction (trace inférieure; -270 mV) de la cellule de détection coulométrique. La plupart des analyses quantitatives ont été réalisées en utilisant le canal d'oxydation (tous les composés d'intérêt excepté la NA qui est souvent fondue dans le front de solvant en oxydation). Le canal réduction permet d'observer les quantités de NA, DOPAC et DA en plus du canal oxydation. **B-D.** Les contenus en NA (**B1,B2**), DA (**C1,C2**), et 5-HT (**D1, D2**) ont été mesurés par HPLC sur la partie lombaire complète (**B1-D1**) ou sur la partie lombaire ventrale (**B2-D2**) de souris témoins (WT, barres noires) et SOD1 (barres bleues) à P1 et P10. On note ici une augmentation des concentrations lombaires en monoamines avec l'âge ainsi que des taux de DA significativement différents entre les souris WT et SOD1 à P10. Les astérisques représentent une significativité positive et les chiffres dans les barres d'histogrammes réfèrent au nombre d'échantillons utilisés pour chaque groupe.

HT pour les expériences avec des doses croissantes de 5-HT ou en présence de NMA-5-HT (16 μ M chacun) (Sqalli-Houssaini *et al.*, 1993) avant d'ajouter soit la NA soit la DA. Une analyse de variance à deux voies en mesure répétées (ANOVA deux voies) associée à des tests de comparaison multiple de Sidak a été réalisée afin d'évaluer les effets des monoamines en fonction du génotype des souris (Prism Graph Pad). Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (Erreur Standard à la Moyenne). Les astérisques sur les figures et les tables indiquent un niveau de significativité positif de l'analyse *post-hoc* ($p < 0,05$).

C. Résultats

1. Contenu monoaminergique de la moelle de souris nouveau-nées WT et SOD1

Chez le rat, les premières connexions entre les cellules monoaminergiques du tronc cérébral et les neurones spinaux sont établies durant la dernière semaine de gestation et mûrissent ensuite séquentiellement en suivant les axes rostro-caudal et ventro-dorsal durant les deux premières semaines postnatales (Commissiong, 1983; Bregman, 1987; Rajaofetra *et al.*, 1989; 1992a; Giménez y Ribotta *et al.*, 1998; Clarac *et al.*, 2004). Pour avoir une vision globale de l'innervation de la moelle par les monoamines, nous avons tout d'abord effectué une analyse HPLC du contenu spinal en amines endogènes et de leurs métabolites, ceci chez des souris SOD1 et WT issues de même portées (Figure 16 A). Pour analyser l'impact de la maturation des voies descendantes sur le contenu monoaminergique, nous avons réalisé ces mesures sur la partie lombaire de moelles épinières d'animaux P1 et P10. Cette analyse HPLC révèle que les taux spinaux de NA et 5-HT sont environ 20 fois supérieurs à celui de la DA, et ce, à la fois à P1 et P10. De plus, indépendamment du génotype des animaux, le contenu spinal en NA (Figure 16 B1), DA (Figure 16 C1) et 5-HT (Figure 16 D1) est significativement augmenté entre les animaux P1 et P10. Au contraire, les taux en métabolites, DOPAC et 5-HIAA, ne sont pas significativement différents entre ces deux stades développementaux (Table 1). La comparaison entre les animaux WT et SOD1 par un test *post hoc* deux à deux ne révèle pas de modifications significatives des taux de NA, 5-HT, DOPAC et 5-HIAA chez les souris SOD1. À l'inverse, on observe que les taux tissulaires de DA sont significativement plus importants dans la partie lombaire de la moelle épinière des souris SOD1 à P10 comparativement aux animaux témoins du même âge.

Les voies descendantes monoaminergiques innervent densément à la fois les réseaux spinaux dorsaux et ventraux. Pour visualiser spécifiquement les modifications du contenu

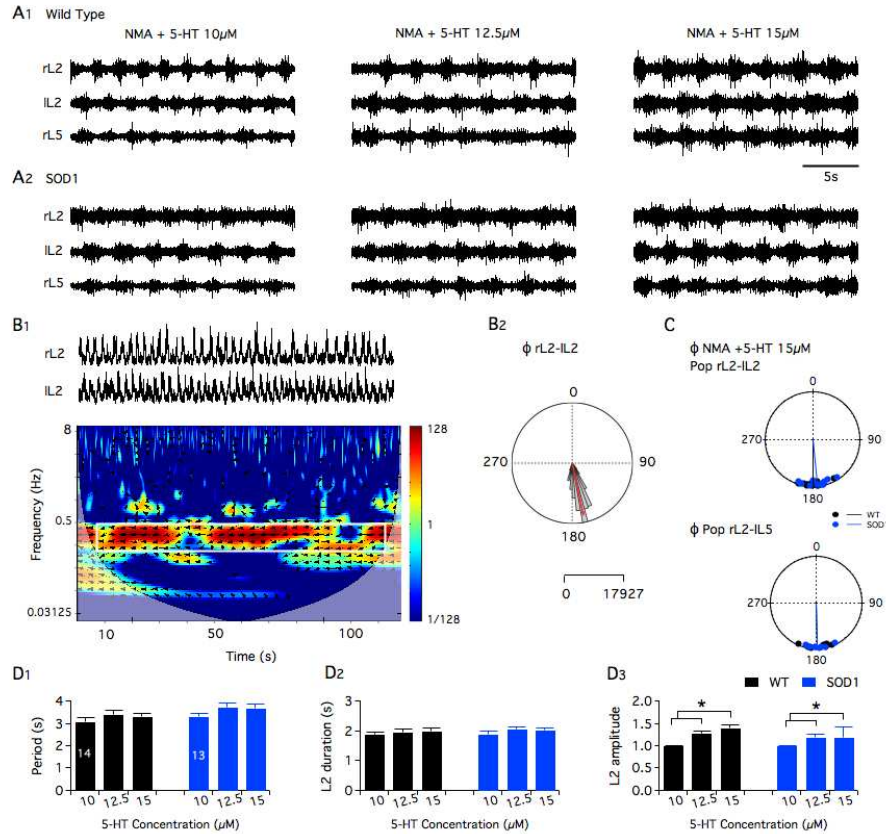


Figure 17 Modulation sérotoninergique des réseaux locomoteurs spinaux de souris SOD1G93A.

A. Traces représentatives de la locomotion fictive enregistrée sur les racines ventrales lombaires 2 droite et gauche (rL2 et iL2) et lombaire 5 droite (rL5) en présence de 16 μ M de NMA et de concentrations croissantes de sérotonine sur des moelles épinières de souris nouveau-nés WT (**A1**) et SOD1 (**A2**). **B.** Carte de cross-cohérence temps fréquence (**B1**) obtenue d'après la trace présentée au dessus filtrée par un passe-haut, rectifiée, puis filtrée passe-bas, en présence de 16 μ M de NMA + 15 μ M de 5-HT. L'encadré blanc sur la carte représente la région d'intérêt sélectionnée pour les analyses. Les flèches noires et blanches indiquent les relations de phase, la direction gauche indiquant une opposition de phase et la droite une relation en phase. Le diagramme circulaire (**B2**) des relations de phase (Φ) entre rL2 et iL2 est extrait de la carte présentée en **B1**. Les barres de calibration indiquent le nombre de valeurs au plus large de l'histogramme de répartition. L'évolution des composants en fréquence des signaux extracellulaires (axe y, échelle logarithmique) est représenté en fonction du temps (axe x). La puissance des fréquences est codée de manière à ce que les couleurs chaudes représentent les régions à forte puissance et les couleurs froides les régions de moindre puissance fréquentielle. **C.** Diagrammes circulaires de la relation de phase moyenne entre les racines rL2 et iL2 (en haut) et rL2 et iL5 (en bas) pour les préparations de moelles épinières isolées *in vitro* d'animaux WT (noir, n=14) et SOD1 (bleu, n=13), en présence de NMA + 5-HT 15 μ M. Pop: population. **D.** histogrammes représentant la période (D1), la durée des bouffées L2 (D2) et l'amplitude des bouffées L2 (D3) en présence de concentrations croissantes de 5-HT sur des moelles épinières de souris WT (noir) et SOD1 (bleu). Cette analyse révèle que les moelles SOD1 présentent une sensibilité sérotoninergique comparable à celle des WT. Les astérisques indiquent un niveau positif de significativité et les nombres dans les barres d'histogramme représentent le nombre de préparations de moelles épinières utilisées.

monoaminergique dans les réseaux moteurs spinaux, nous avons répété cette analyse HPLC post-mortem sur des échantillons de tissu restreints à la partie lombaire ventrale de la moelle épinière (Figures 16 B2, C2, D2). Dans ces conditions expérimentales, on observe que les taux de toutes les monoamines ainsi que ceux de leurs métabolites, excepté le 5-HIAA (Table 1), augmentent significativement au cours du développement à la fois chez les animaux témoins et SOD1 (Figures 16 B2, C2, D2). Contrairement aux résultats obtenus lors de l'analyse de la moelle lombaire au complet, nous n'observons pas de différence significative entre le contenu monoaminergique de la moelle lombaire ventrale de souris WT et SOD1.

2. Capacités rythmogènes des réseaux moteurs spinaux de souris SOD1^{G93A} et modulation sérotoninergique.

Comme mentionné précédemment, Amendola et al., (2004) ont rapporté que l'application de NMA (10-20 μ M) et de sérotonine (5-20 μ M) n'induisait qu'une activité tonique sur la moelle isolée de souris SOD1^{G85R} (Amendola *et al.*, 2004). Suivant le modèle et la mutation SOD1 étudiée, des altérations physiologiques différentes ont été observées au niveau des motoneurones (pour exemple voir: Meehan *et al.*, 2010; Delestrée *et al.*, 2014). La question se pose alors de savoir si les effets du cocktail NMA-5-HT sont comparables entre les lignées de souris SOD1^{G85R} et SOD1^{G93A}. Pour répondre à cette question, nous avons comparé l'effet de la co-application de NMA (16 μ M) avec des concentrations croissantes de 5-HT sur les réseaux moteurs spinaux de souris SOD1^{G93A} et des WT issues de même portées. La figure 17 A montre que, quelle que soit la concentration de 5-HT testée, l'application du cocktail NMA-5-HT déclenche une activité en bouffées alternées rythmiquement entre les racines ventrales droite et gauche (L2d et L2g), et entre les racines innervant des muscles fléchisseurs et extenseurs (L2 et L5) à la fois chez les souris WT (Figure 17 A1) et les souris SOD1 (Figure 17 A2). Ce patron moteur, avec une période moyenne comprise entre 3 et 4 sec (Figure 17 D1), est caractéristique de la locomotion fictive (Cazalets *et al.*, 1992a; Kiehn & Kjaerulff, 1996). Quel que soit le génotype étudié, l'augmentation de la concentration de 5-HT de 10 à 12,5 ou 15 μ M n'a pas d'effet sur les relations de phase des bouffées d'activité rythmique (Figures 2B, C ; Table 1), ni sur la période (Figure 17 D1), ni sur la durée de ces bouffées d'activité (L2 : Figure 17 D2 ; L5 : données non illustrées). À l'inverse, une amplification significative de l'amplitude des bouffées est observée lorsque la concentration de 5-HT a été augmentée de 10 à 12,5 ou à 15 μ M de 5-HT (Figure 17 D3) à la fois chez les WT et les SOD1 sans que cet effet ne soit significativement plus marqué chez l'un ou l'autre des génotypes.

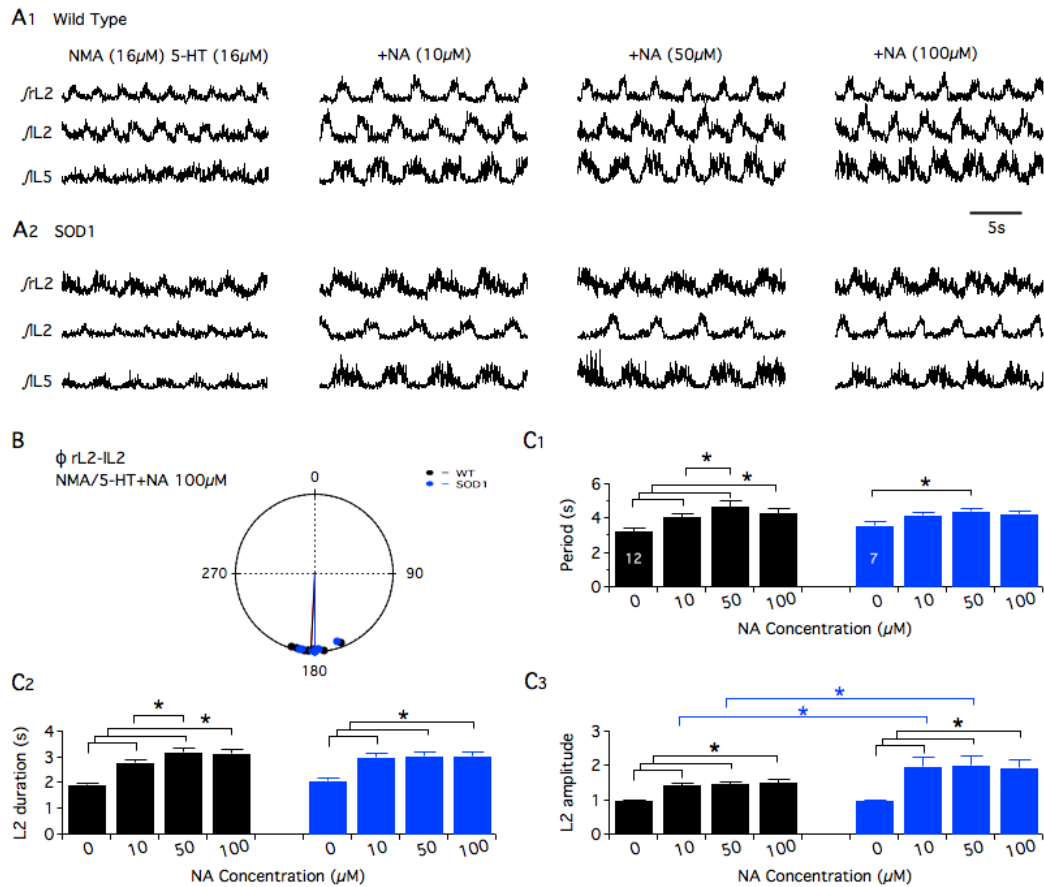


Figure 18 Influence neuromodulatrice de la noradrénaline sur la locomotion fictive induite pharmacologiquement chez des souris WT et SOD1.

A. Enregistrements extracellulaires intégrés (*f*) représentatifs de l'activité des racines ventrales lombaires 2 droite et gauche (rL2 et lL2) et lombaire 5 gauche (lL5), en présence de NMA + 5-HT (16 μ M de chaque) co-appliqués ou non avec la noradrénaline (NA: 10, 50 ou 100 μ M) chez des animaux WT (**A1**) et SOD1 (**A2**). **B.** Diagramme circulaire des relations de phase (Φ) entre rL2 et lL2 des moelles épinières de souris WT (noir, n=12) et SOD1 (bleu, n=7) en présence de 100 μ M de NA. **C.** Histogrammes représentant la période (**C1**), la durée des bouffées L2 (**C2**), et l'amplitude des bouffées L2 (**C3**) en l'absence ou en la présence de concentrations croissantes de NA sur des préparations de moelles épinières d'animaux WT (noir) et SOD1 (bleu). On peut noter une différence significative de modulation noradrénergique des bouffées d'activité locomotrices L2 entre les animaux WT et SOD1. Les astérisques indiquent un niveau positif de significativité et les nombres dans les barres d'histogramme représentent le nombre de préparations de moelles épinières utilisées.

L'ensemble de ces données suggère que 1) la moelle épinière isolée de souris SOD1^{G93A} peuvent générer des patrons locomoteurs correctement organisés lors de l'application dans le bain de perfusion de NMA-5-HT et 2) présente une sensibilité à la sérotonine comparable à celle des animaux témoins.

3. Modulation noradrénergique

Dans un deuxième temps, nous avons voulu tester l'effet de l'application de NA seule ou co-appliquée avec du NMA à différentes concentrations (10 μ M, 50 μ M et 100 μ M) sur les réseaux spinaux WT et SOD1 (Sqalli-Houssaini & Cazalets, 2000). Dans ces deux conditions expérimentales, des activités très irrégulières ou toniques difficilement analysables ont été enregistrées à la fois sur les préparations SOD1 et WT (données non illustrées). Dans ce contexte, nous avons décidé de restreindre l'analyse des effets de la NA à la modulation du rythme locomoteur induit par le cocktail pharmacologique NMA-5-HT.

Après une période de locomotion fictive contrôle induite par l'application de NMA-5-HT (16 μ M chacun) seul, des concentrations croissantes de NA ont été appliquées sur la moelle (Figure 18). Quelle que soit la concentration de NA testée et le génotype de l'animal, les relations de phase entre les bouffées d'activité induites par l'application de NMA-5-HT sont similaires (Table 2 ; Figure 18 B). Cependant, bien que les relations de phase ne soient pas modifiées, l'application de NA induit un ralentissement important du rythme locomoteur (Figure 18 A). Chez les animaux WT (Figure 18 A1), toutes les concentrations de NA testées (10, 50 et 100 μ M) ont induit une augmentation significative des paramètres locomoteurs (période, Figure 18 C1 ; durée des bouffées, Figure 18 C2 ; et amplitude des bouffées, Figure 18 C3) comparativement aux conditions contrôles. De plus, une augmentation significative de la période et de la durée des bouffées L2 est observée entre 10 μ M et 50 μ M de NA chez les souris WT. Chez les animaux SOD1 (Figure 18 A2), nous avons observé que l'amplitude et la durée des bouffées d'activité sont significativement plus importantes en présence de NA (à 10, 50 et 100 μ M) qu'en condition contrôle (Figures 18 C2, C3). Cependant, la période du rythme locomoteur chez ces animaux n'est modifiée que lors de l'application de 50 μ M de NA (Figure 18 C1).

De façon intéressante, l'analyse *post hoc* de ces données révèle que l'action potentialisante de la NA sur l'amplitude des bouffées L2 ou L5 (Figure 18 C3 ; données non montrées) est significativement plus importante chez les animaux SOD1 que chez les animaux témoins. Ces résultats mettent en évidence une différence de sensibilité à la NA entre les réseaux locomoteurs spinaux de souris WT et SOD1.

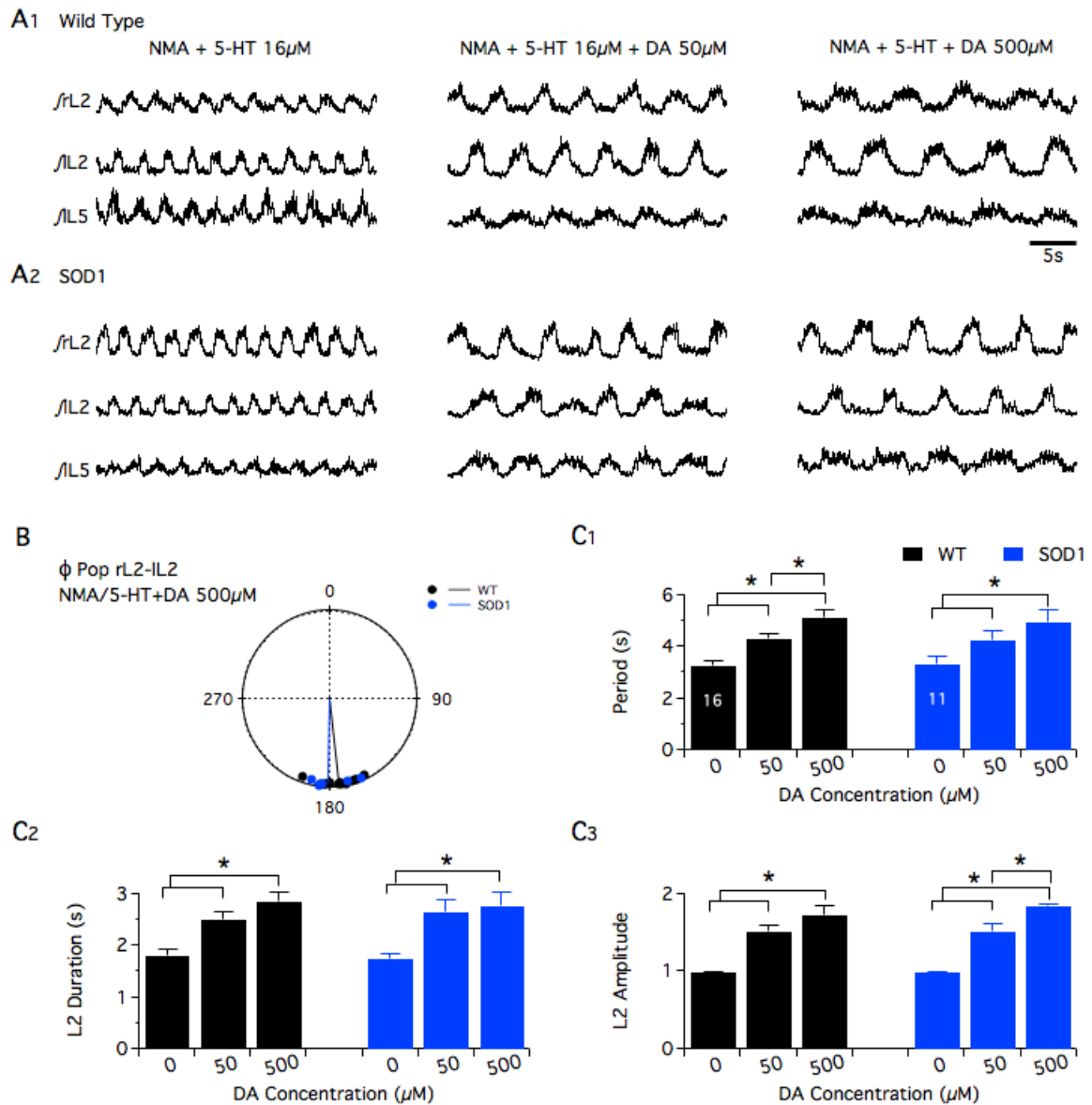


Figure 19 Influence neuromodulatrice de la dopamine sur la locomotion fictive induite pharmacologiquement chez des souris WT et SOD1.

A. Enregistrements extracellulaires intégrés (*f*) représentatifs de l'activité de locomotion fictive induite par l'application de NMA + 5-HT (16 μ M de chaque) enregistrée au niveau des racines ventrales lombaires 2 droite et gauche (rL2 et lL2) et lombaire 5 gauche (lL5), en présence ou non de la dopamine (DA: 50 ou 500 μ M) chez des animaux WT (**A1**) et SOD1 (**A2**). **B.** Diagramme circulaire des relations de phase (Φ) entre rL2 et lL2 des moelles épinières de souris WT (noir, n=16) et SOD1 (bleu, n=11) en présence de 500 μ M de DA. **C.** Histogrammes représentant la période (**C1**), la durée des bouffées L2 (**C2**), et l'amplitude des bouffées L2 (**C3**) en l'absence (NMA + 5-HT seuls) ou en présence de concentrations croissantes de DA sur des préparations de moelles épinières d'animaux WT (noir) et SOD1 (bleu). Ces données montrent que le génotype SOD1 n'a pas d'effet sur la neuromodulation dopaminergique au niveau extracellulaire. Les astérisques indiquent un niveau positif de significativité et les nombres dans les barres d'histogramme représentent le nombre de préparations de moelles épinières utilisées.

4. Modulation dopaminergique

Comme cela a été décrit précédemment pour la NA, l'application de DA seule (100 μM et 500 μM) ou co-appliquée avec du NMA (NMA : 16 μM ; DA : 10, 50 et 100 μM) (Barriere *et al.*, 2004; Spalloni *et al.*, 2011) sur des préparations de moelles épinières isolées *in vitro* ne permet pas d'induire une activité motrice régulière qui puisse être finement analysée, que se soit pour les animaux SOD1 ou témoins (données non montrées, voir aussi Jiang *et al.*, 1999). L'étude comparative de la modulation induite par la DA chez des animaux SOD1 et WT a donc ici aussi été restreinte à son effet sur l'activité de locomotion fictive induite lors de l'application de NMA-5-HT.

Une activité de locomotion fictive a donc tout d'abord été enregistrée, en présence de NMA-5-HT (16 μM chacun; Figure 19 A). Puis, des concentrations croissantes de DA (50 et 500 μM), ont été ajoutées à l'aCSF contenant du NMA et de la 5-HT. Tout comme pour les autres amines testées, l'application de DA n'altère pas les relations de phase entre les différentes bouffées d'activité locomotrice (Table 2 et Figure 19 B) pour les animaux WT, comme pour les SOD1. Nous avons toutefois constaté qu'indépendamment du génotype de l'animal, l'ajout de DA à 50 ou 500 μM augmente significativement toutes les valeurs des paramètres locomoteurs mesurés : la période (Figure 19 C1), la durée (Figure 19 C2) et l'amplitude de ces bouffées (Figure 19 C3) par rapport aux conditions contrôles (NMA-5-HT seuls). De plus, l'augmentation de la concentration de DA de 50 à 500 μM induit une augmentation significative de la période chez les animaux WT (Figure 19 C1) et de l'amplitude des bouffées chez les animaux SOD1 (Figure 19 C3), les autres paramètres bien que tendant à être augmentés ne présentent à l'inverse pas de différence significative (Figure 19 C).

Ces résultats indiquent que la neuromodulation dopaminergique est similaire entre les réseaux locomoteurs spinaux de souris SOD1 et témoins. Ces résultats corréleront bien avec ceux obtenus en HPLC, où aucune différence n'a été constatée concernant les taux de DA à ces stades de développement (autour de P1 à P3) entre les souris SOD1 et leurs contrôles.

NMA 16 μ M						
	+ 5-HT 10 μ M		+ 5-HT 12.5 μ M		+ 5-HT 15 μ M	
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
Mean vector	0.901	0.875	0.893	0.89	0.942 (14)	0.924 (13)
Mean angle	-3.11	3.11	-3.12	2.99	-3.13	3.04

	NMA + 5-HT		+ DA 50 μ M		+ DA 500 μ M	
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
Mean vector	0.893	0.876	0.960	0.954	0.957 (16)	0.910 (11)
Mean angle	-3.09	2.98	3.02	-3.10	3.02	-3.02

	NMA + 5-HT		+ NA 10 μ M		+ NA 50 μ M		+ NA 100 μ M	
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
Mean vector	0.950	0.931	0.971	0.975	0.968	0.964	0.961 (12)	0.954 (7)
Mean angle	-3.09	3.03	3.13	3.08	3.06	3.08	-3.105	3.139

Table 2 Statistiques circulaires des relations de phase entre les racines lombaires L2 droit et gauche en présence de différentes concentrations de monoamines.

16 μ M NMA et 16 μ M 5-HT ont été utilisés pour induire une activité de locomotion fictive contrôle. Le nombre de préparations testées dans chaque condition est indiqué entre parenthèses. Le test d'analyse circulaire à deux échantillons ne révèle aucune différence significative entre les différentes conditions expérimentales testées.

D. Discussion

Capacités rythmogènes des réseaux moteurs spinaux des souris SOD1

Nos données montrent que, contrairement à ce qui avait été précédemment décrit sur le modèle murin SOD1^{G85R} (Amendola *et al.*, 2004), une activité de locomotion fictive correctement coordonnée peut être déclenchée par l'application sur la préparation de moelle épinière isolée de NMA et de 5-HT. Comme nous l'avons déjà mentionné, de nombreux modèles de souris mutantes SOD1 ont été développés afin de fournir aux chercheurs des outils précieux pour l'étude de la physiopathologie de la SLA. Ainsi, à ce jour, 12 lignées de souris transgéniques exprimant différentes mutations du transgène humain codant pour la protéine SOD1 sont disponibles. Les souris SOD1^{G93A} sont les plus étudiées par la communauté scientifique, suivies des SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R} et enfin des SOD1^{G86R}. Tous ces modèles présentent des différences au niveau de la vitesse de progression de la pathologie et des mécanismes neurodégénératifs mis en jeu en fonction du type de mutation, de l'activité enzymatique et du nombre de copies du transgène exprimées par l'animal (Jonsson *et al.*, 2006; Turner & Talbot, 2008; Van Den Bosch, 2011). Les protéines SOD1^{G93A} sont par exemple environ 10 fois plus actives que les protéines SOD1 endogènes, alors que les protéines SOD1^{G85R} sont, quant à elles, quasiment inactives. D'importantes divergences entre les modèles SOD1 ont également été rapportées concernant l'excitabilité des motoneurones (Meehan *et al.*, 2010; Delestrée *et al.*, 2014). De plus, Pambo-Pambo *et al.*, (2009) ont mis en évidence une immaturité des motoneurones chez les souris SOD1^{G93A} « low expressor line » comparativement à ceux des souris SOD1^{G85R}. En effet, chez les souris nouveau-nés SOD1^{G93A} « low expressor line », les motoneurones ont un potentiel de membrane de repos assez dépolarisé et semblent plus facilement excitables que les motoneurones SOD1^{G85R} ou les motoneurones WT. La différence que nous avons observée dans notre étude entre les lignées SOD1^{G93A} et SOD1^{G85R} vis-à-vis de leur réponse à l'application de NMA-5-HT et de leur capacité à produire de la locomotion fictive met un peu plus en évidence l'hétérogénéité des différents modèles de souris SOD1. Cette variabilité inter-modèles est certainement en lien avec l'étiologie complexe de la SLA et rappelle à quel point l'utilisation de modèles complémentaires est importante afin d'explorer tous les aspects de cette pathologie complexe.

Dans notre étude, la capacité du NMA et de la 5-HT à induire un rythme locomoteur n'est ni quantitativement ni qualitativement différente entre les groupes d'animaux témoins et SOD1. Ces résultats suggèrent que bien que certaines études aient montré des altérations développementales précoces des motoneurones SOD1, les neurogrammes enregistrés sur la

préparation de moelle isolée de souris nouveau-née sont identiques entre les animaux WT et SOD1. Dans le modèle SOD1^{G93A}, les motoneurones sont immatures et hyperexcitables à la naissance et présentent également une arborisation dendritique altérée (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; 2005; Pambo-Pambo *et al.*, 2009). Nos résultats posent la question de savoir si ces modifications ont un impact réel sur l'activité produite par les motoneurones ou si l'intégralité du réseau moteur en charge de la locomotion se réorganise afin de compenser ces altérations. Lors d'une lésion par exemple, il est connu que les réseaux locomoteurs subissent une restructuration et sont capables, après entraînement, d'adapter leur fonctionnement afin de produire un patron moteur quasi identique à celui généré avant la lésion (Barbeau & Rossignol, 1987; Rossignol *et al.*, 2008). De tels mécanismes compensatoires pourraient avoir lieu au sein des réseaux moteurs des souris SOD1 afin de leur permettre de générer une locomotion correcte et adaptée.

Neuromodulation monoaminergique des réseaux spinaux

Nos données HPLC sur des échantillons de moelle lombaire entière ou ventrale montrent que les taux de monoamines augmentent entre la naissance et la seconde semaine de vie. Ce résultat est en accord avec de précédentes études développementales qui ont reporté que l'innervation monoaminergique de la moelle se faisait suivant un gradient rostro-caudal (Commissiong, 1983; Rajaofetra *et al.*, 1989; 1992b; Giménez y Ribotta *et al.*, 1998; Pappas *et al.*, 2008; Pearlstein, 2013). De façon intéressante, nous reportons une augmentation des taux de dopamine au niveau lombaire de la moelle d'animaux SOD1 à P10 comparativement aux animaux WT. Le fait que ces résultats ne soient pas reproduits lors de l'analyse de la partie lombaire ventrale laisse présager que cette modification des taux de DA serait plutôt due à des modifications survenant au niveau de la partie dorsale de la moelle lombaire des souris SOD1. La corne dorsale de la moelle épinière est en effet densément innervée et contrôlée par le système dopaminergique (pour revue voir Millan, 2002). Des altérations du système sensoriel (Guo *et al.*, 2009; Filali *et al.*, 2011) ainsi que des atteintes du développement sensorimoteur caractérisées par un retard de maturation (Amendola *et al.*, 2004) ont par ailleurs été décrites dans les stades présymptomatiques chez les animaux SOD1. L'augmentation des taux de DA au niveau lombaire dorsal pourrait contribuer au moins en partie à ces altérations précoces du système sensorimoteur. Il a de plus été montré qu'une modification, que ce soit une réduction ou une amplification, des taux de monoamines spinaux conduisait à un délai de maturation des réseaux spinaux (Nakajima *et al.*, 1998; Cazalets *et al.*, 2000; Vinay *et al.*, 2002), suggérant donc que des taux précis de

neuromodulateurs monoaminergiques sont nécessaires à la bonne mise en place des réseaux spinaux au cours du développement. Dans cette étude, nous avons constaté que quel que soit le génotype de l'animal, les trois monoamines testées potentialisent l'activité locomotrice en agissant sur l'amplitude et la période des bouffées d'activité enregistrées au niveau des racines ventrales. Bien que les taux de DA soient augmentés à P10 chez les souris SOD1, aucune modification de l'action neuromodulatrice de cette monoamine n'a été observée. Cette absence d'effet *in vitro* pourrait être due au fait que les enregistrements électrophysiologiques des racines ventrales ont été réalisés sur des animaux âgés de P1 à P3, âge pour lequel les taux de DA étaient identiques pour les souris SOD1 et témoins. Malheureusement, il est très difficile de déclencher et d'enregistrer de la locomotion fictive stable et analysable sur des préparations *in vitro* chez les souris P10 (voir tout de même Jiang *et al.*, 1999). De ce fait, afin d'étudier l'impact de cette augmentation des taux de DA intrinsèques sur les motoneurones à P10, l'une des solutions serait de réaliser des enregistrements en patch clamp sur des tranches de moelle épinière en observant la réponse et les modifications des propriétés de membrane des motoneurones suite à l'application d'agonistes ou d'antagoniste dopaminergiques. Il serait de même intéressant de réaliser une courbe dose-réponse afin de comparer la sensibilité dopaminergique respective des motoneurones WT et des SOD1.

Il est généralement admis que des changements dans la période ou les relations de phase du rythme locomoteur sont le reflet de modifications affectant le CPG locomoteur, tandis que des modifications de l'amplitude des bouffées d'activité sont plutôt attribuées à un effet modulateur agissant directement au niveau des motoneurones ou des interneurones de dernier ordre (Miles & Sillar, 2011). Chez les souris SOD1, la période et les relations de phase du rythme locomoteur exprimés en présence des trois monoamines testées ne présentent pas de différence avec celles mesurées chez les animaux témoins. Concernant l'amplitude des bouffées locomotrices, celle-ci est modulée de manière équivalente par la 5-HT et la DA que ce soit chez les SOD1 ou les témoins, contrairement à ce que l'on obtient avec la NA, où l'augmentation de l'amplitude des bouffées par ce neuromodulateur est amplifiée chez les SOD1. Ces résultats suggèrent que la neuromodulation monoaminergique des CPG locomoteurs est préservée chez les animaux SOD1^{G93A} modèles de la SLA, mais que les motoneurones de ces animaux présentent une sensibilité accrue à la NA. La taille de la moelle épinière étant équivalente entre les deux génotypes (observation personnelle, non publiée), cet effet ne peut pas être expliqué par une différence de pénétration de la NA au sein des tissus spinaux (Brumley *et al.*, 2007). Les motoneurones lombaires expriment des récepteurs noradrénergiques $\alpha 1$, $\alpha 2a$ et $\beta 1$ à la naissance (Rekling *et al.*, 2000; Tartas *et al.*, 2010). Il a

précédemment été montré que chez les rats nouveau-nés, l'activation de ces récepteurs augmente l'excitabilité neuronale en partie via l'inhibition de courants rectifiants entrants de type potassique, KIR, courants jouant un rôle clé dans la régulation de l'excitabilité neuronale (Tartas *et al.*, 2010). De plus, la NA permet d'améliorer la transmission synaptique entre les segments supérieurs et les motoneurones, via l'activation des récepteurs $\alpha 1$ et β (Tartas *et al.*, 2010). Une altération des canaux potassiques ou des récepteurs noradrénergiques pourrait donc sous-tendre en partie cette sensibilité accrue des motoneurones SOD1 à la NA, notamment en modifiant les propriétés membranaires des neurones et les signaux excitateurs qu'ils reçoivent. Une surexpression des récepteurs noradrénergiques dans les moelles SOD1 pourrait en effet mener à une telle sensibilisation à la NA, comme cela a été décrit pour la DA et ses récepteurs dans d'autres pathologies neuronales (Briand *et al.*, 2008; Seeman, 2013).

Les motoneurones ne possédant pas de protéines chélatrices du calcium intracellulaire comme la parvalbumine, la calretinine, etc... ils présentent une sensibilité accrue à l'excitotoxicité par rapport aux autres neurones. Cette hypersensibilité est suspectée de jouer un rôle dans la dégénérescence des motoneurones dans la SLA (Turner *et al.*, 2013). L'hypersensibilité à la NA que nous rapportons ici pourrait donc jouer un rôle dans cette excitotoxicité. Une entrée trop importante de Ca^{2+} et des dépolarisations exagérées lors de la libération de NA, pourraient en effet conduire à des altérations profondes de la machinerie intracellulaire des motoneurones.

CHAPITRE 2:

Maturation et évolution du système cholinergique spinal chez la souris sauvage et $SOD1^{G93A}$, modèle de la sclérose latérale amyotrophique.

A. Introduction

Les motoneurones spinaux possèdent une arborisation dendritique dense et complexe qui reçoit et intègre les informations transmises par des milliers de synapses issues de neurones intra et extra-spinaux. Les synapses qui contactent les motoneurones peuvent être classées en plusieurs catégories suivant leurs caractéristiques ultra-structurelles : on distingue les synapses de type S, T, M, F ou C (Lagerbäck, 1985; Arvidsson *et al.*, 1987). Les synapses en C, communément appelées boutons en C, sont caractérisées par l'alignement de vésicules synaptiques sphériques le long de la membrane présynaptique et la présence de citernes associées à une accumulation de réticulum endoplasmique rugueux au niveau de la membrane du motoneurone (Yamamoto *et al.*, 1990; 1991; Nagy *et al.*, 1993).

Les boutons en C peuvent être révélés par immunohistochimie par un marquage de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine, la ChAT, ou de son transporteur vésiculaire, VACHT, démontrant bien le phénotype cholinergique de ces synapses (Houser, 1990; Nagy *et al.*, 1993; Schäfer *et al.*, 1994; Hellström *et al.*, 1999). Lorsque des marquages de ce type sont réalisés, les terminaisons en C sont facilement identifiables en microscopie et apparaissent comme de larges varicosités au niveau du soma et des dendrites proximales des motoneurones (Conradi & Skoglund, 1969; Nagy *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Welton *et al.*, 1999). Il a récemment été montré que les neurones à l'origine de ces synapses en C sont les interneurones cholinergiques situés autour du canal central qui expriment le facteur de transcription Dbx1, marqueur spécifique de la population d'interneurones V0. Cette population d'interneurones à l'origine des boutons en C constitue une classe particulière des interneurones V0 et a été appelée V0c (Zagoraïou *et al.*, 2009).

L'acétylcholine (ACh) exerce un puissant contrôle sur les réseaux locomoteurs spinaux notamment en agissant sur les propriétés de membrane des neurones et en renforçant les contacts synaptiques. L'ACh augmente notamment l'excitabilité des motoneurones via l'activation des récepteurs muscariniques motoneuronaux (Miles *et al.*, 2007; Zagoraïou *et al.*, 2009; Witts *et al.*, 2013). Cette augmentation de l'excitabilité motoneuronale passerait en partie par l'inhibition 1) de courants potassiques calcium-dépendants à l'origine de l'hyperpolarisation post-spike (AHP, de l'anglais « spike after hyperpolarization ») (Miles *et al.*, 2007) et 2) de courants potassiques voltages-dépendants lents, appelés courants M, qui induisent des dépolarisations soutenues de la membrane des motoneurones (Bertrand & Cazalets, 2011). Le contrôle cholinergique de la transmission synaptique au sein des réseaux locomoteurs spinaux est complexe et dépendant du type de récepteur muscarinique impliqué.

L'Ach inhibe par exemple la transmission sensorimotrice (Kurihara *et al.*, 1993) mais potentialise la transmission glutamatergique commissurale dans les motoneurons (Bertrand & Cazalets, 2011).

Etant donné l'importance de la neuromodulation cholinergique des réseaux locomoteurs spinaux et la facilité d'accès des boutons en C, de nombreuses études se sont intéressées à l'évolution morphologique de ces synapses en conditions physiologiques et physiopathologiques. Il a été montré que les boutons en C subissent des modifications morphologiques notamment lors d'un conditionnement opérant (Feng-Chen & Wolpaw, 1996) ou suite à une hémisection de la moelle (Pullen & Sears, 1983).

Nous avons mentionné plus haut le fait que les motoneurons fast étaient beaucoup plus vulnérables que les motoneurons slow vis-à-vis des processus neurodégénératifs à l'origine de la SLA. De manière intéressante, les boutons en C sont plus nombreux sur les motoneurons fast comparativement aux motoneurons slow et certains groupes de motoneurons tels que ceux appartenant au noyau oculomoteur, connus pour être préservés de la dégénérescence dans la SLA ne présentent aucun bouton en C. Il apparaissait donc crucial d'analyser l'évolution des boutons en C sur les motoneurons lors de la mise en place de la SLA. Chez les patients SLA, des marquages post-mortem ont montré que l'expression du transporteur de l'Ach était fortement réduite dans les boutons en C (Nagao *et al.*, 1998). Chez la souris SOD1, plusieurs publications récentes se sont attachées à analyser l'évolution des boutons en C avec l'âge (Chang & Martin, 2009; Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013). Bien que ces études montrent toutes des modifications morphologiques des boutons en C connectant les motoneurons à différents stades présymptomatiques de la maladie, les données obtenues diffèrent énormément voire s'opposent suivant les groupes de recherche. Dans ce contexte, nous avons décidé en combinant des approches d'immunohistochimie, de biologie cellulaire et d'électrophysiologie de réaliser une analyse longitudinale (de la naissance aux stades présymptomatiques) du système cholinergique spinal chez la souris WT et SOD1. Plus précisément, nous avons dans un premier temps réexaminé l'évolution morphologique des boutons en C motoneuronaux et tester l'impact fonctionnel de ces modifications dans des stades précoces de la SLA. Dans un deuxième temps, nous avons poussé plus avant nos investigations en analysant l'expression et la localisation des récepteurs muscaniques associés aux boutons en C, les récepteurs M2. Enfin nous avons réalisé un comptage associé à un marquage immunohistochimique des interneurons de la lamina X afin de révéler une éventuelle dégénérescence de ces neurones à l'origine des boutons en C.

	P1		P10		P21		P40		P75		P100	
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
Animal number	4	4	6	6	7	6	8	6	6	7	5	8
Motoneuron Number	100	83	130	133	148	131	130	126	124	145	116	156

Table 3. Nombre d'animaux utilisés et de motoneurones analysés pour chaque âge et génotype.

Nos données montrent de manière très intéressante que le système cholinergique spinal présente une dynamique complexe chez l'animal sauvage au cours du développement des réseaux spinaux et que cette dynamique est altérée chez les souris SOD1. Enfin nous montrons pour la première fois qu'en plus des motoneurones, les interneurones cholinergiques dégénèrent dans la moelle épinière des souris SOD1.

B. Matériel et Méthodes

Cette étude a été menée sur des animaux SOD1^{G93A} et des témoins issus de même portée, de 1 à 100 jours postnataux (P1 à P100). Nous avons combiné l'utilisation de plusieurs techniques : de l'immunohistochimie dans un premier temps, afin de visualiser et analyser l'expression des boutons en C et du récepteur M2 ainsi que pour évaluer l'état des interneurones cholinergiques, puis une quantification des récepteurs M2 par western blot et enfin nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie extra et intracellulaire afin d'apprécier l'état fonctionnel du système cholinergique spinal.

1. Prélèvement et préparation des moelles pour l'analyse histologique

Des souris WT et SOD1 P1, P10, P21, P40, P75 et P100 (Table 3) ont été anesthésiés avec une injection intrapéritoneale (IP) d'uréthane 20 % (1mL/100g), puis fixés par une perfusion intracardiaque de chlorure de sodium (NaCl 0,9 %) suivit de Paraformaldehyde (PAF 4 %). La partie lombaire de la moelle épinière a ensuite été prélevée et placée 2 heures dans un mélange NaCl-PAF (4 %) à 4°C. Après incubation dans une solution cryoprotectrice de sucrose 20 % la moelle a été incluse dans de la colle OCT (tissu tech VWR) et congelée à -43°C dans de l'isopentane avant d'être stockée à -80°C. Des coupes frontales de 30 µm ont ensuite été réalisées au cryostat (Leica CM 3000), puis montées sur lames (sans lamelle ni milieu de montage) afin de réaliser ensuite le marquage immunohistochimique.

2. Immunohistochimie.

Les marquages immunohistochimiques réalisés au cours de ce travail doctoral ont été réalisés par Laura Cardoit (ADT, Université, INCIA).

Le jour du marquage, les lames sont décongelées puis rincées une première fois durant 1h30 avec une solution saline tampon phosphate (PBS 0,1M) avec 0,3 % de triton et 1 % de sérum albumine bovin (BSA) afin de saturer tous les sites non spécifiques. Pour l'immunohistochimie double fluorescence, les anticorps primaires ont été appliqués toute la

nuit à température ambiante dans du PBS + 0,3 % triton + 1 % BSA aux concentrations suivantes : à 1:100 pour l'anticorps anti-cholineacetyltransferase (ChAT: millipore AB144P) obtenu chez la chèvre et 1:400 pour l'anticorps anti-M2 (Millipore MAB367) obtenu chez le rat. Après un rinçage de 3 fois 15 min dans du PBS, les lames ont été incubées avec les anticorps secondaires (âne anti-chèvre couplé à Alexa 568 et âne anti-rat couplé à Alexa 488, In Vitrogen) pendant 1 heure à température ambiante dans du PBS + 0,3 % triton + 1 % BSA à 1:500. Pour finir, les coupes sont rincées 3 fois durant 15 min dans du PBS et montées entre lame et lamelle avec un milieu fabriqué au laboratoire. Concernant le marquage de la caspase 3, le même protocole a été appliqué, à la différence qu'un démasquage des sites antigènes avec une solution de tampon contenant du citrate a été réalisé à chaud, en plaçant les lames 40 minutes dans un bain-marie à 80°C, préalablement à l'incubation avec les anticorps. L'anticorps primaire anti-caspase 3 activée (Millipore AB3623) fabriqué chez le lapin a été dilué au 1:50ème et l'anticorps secondaire (âne anti lapin couplé à Alexa 488, In Vitrogen) au 1:500ème.

Pour la révélation de la ChAT en 3, 3'-diaminobenzidine Horse Raddish Peroxydase (DAB), une solution d'H₂O₂ dilué à 0,3 % dans du PBS a été appliquée sur des lames de souris WT et SOD1 P10, P40 et P100 afin de bloquer les enzymes peroxydases endogènes. Les sites de liaison non spécifiques ont ensuite été saturés par l'application durant 30 min, à température ambiante, de PBS, triton 0,3 %, BSA 1 %. Les anticorps primaires anti-ChAT (obtenu chez la chèvre et dilué au 1:100 dans du PBS Triton 0,3 %, BSA 1 %; millipore AB144P) ont ensuite été mis à incuber toute la nuit à température ambiante en chambre humide. Le lendemain, les lames ont été rincées 5 fois 10 min dans du PBS puis incubées avec un anticorps secondaire biotinylé anti-mouton/chèvre (RPN1025V, Amersham, UK), dilué au 1:500 dans du PBS Triton 0,3 %, BSA 1 %, dans une chambre humide laissée à température ambiante. Enfin, avant la révélation, les lames ont été à nouveau rincées 3 fois 10 min dans du PBS. La révélation a été effectuée grâce à des kits "ABC" puis "DAB" (Biovalley, Vectastain). Une solution enzymatique "ABC" constituée d'un complexe avidine-biotine peroxydase qui se lie spécifiquement aux molécules de biotine présentes sur l'anticorps secondaire a été appliquée sur les lames. L'application d'un chromogène donneur d'électron : la diaminobenzidine (DAB) permet alors de révéler la peroxydase en produisant des chromogènes colorés par un précipité brun. Plus pratiquement, les solutions A et B du kit ABC, diluées au 1:200 ont été appliquées sur les lames, puis une solution contenant la DAB obtenue en diluant les produits du kit DAB dans de l'eau distillée, ajusté à pH 7,5 a été utilisée pour la révélation. Enfin, 3 rinçages de 10 minutes au PBS ont été effectués avant de sécher

P100

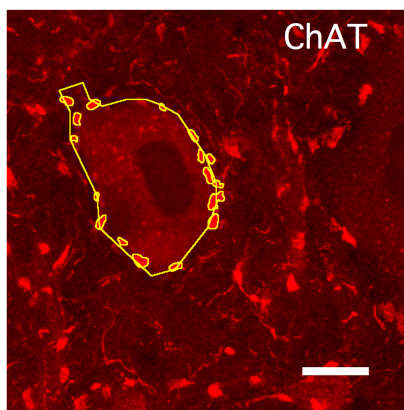


Figure 20 Détourage d'un motoneurone pour l'analyse des boutons en C
Barre d'échelle : 15 μm

les lames et de les déshydrater dans des bains successifs d'alcool : 1 minute dans 95 % d'éthanol puis 2 fois 3 minutes dans 100 % d'éthanol. Enfin, les lames ont été éclaircies au Xylène 2 fois durant 5 minutes et montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage Eukit (baume d'inclusion histologique, H113, Dutscher).

3. Acquisitions au microscope confocal et analyse.

Les images ont été acquises sur un microscope confocal Leica SP5 de la plateforme d'imagerie de Bordeaux (BIC). Une attention particulière a été portée pour ne pas prendre d'image des neurones apoptotiques présentant des vacuoles. Pour chaque animal, trois lames de moelle épinière ont été choisies de manière aléatoire et sur chaque lame, une portion de la lamina IX contenant les motoneurones a été acquise sur trois coupes, elles aussi choisies de manière aléatoire.

Chaque acquisition a été faite en 12 bits sous la forme d'une pile (stack) d'images sur $7\mu\text{m}$ d'épaisseur avec un objectif 63x NA1.4 à immersion à huile. L'intervalle entre deux images successives est de $0.25\mu\text{m}$ ce qui répond aux exigences du critère de Nyquist pour imager les boutons en C avec une résolution suffisante sans générer des fichiers trop "lourds". Chaque pile est composée de 2 canaux (de longueurs d'ondes 488 et 543). Le traitement et l'analyse de ces images ont ensuite été effectués avec le logiciel Fiji (ImageJ) à l'aide d'un plugin développé au laboratoire, spécialement pour l'analyse de ces données, par Gilles Courtand (IE CNRS, INCIA). Ce plugin nous permet de recueillir plusieurs paramètres de ces images tels que le périmètre et le centroïde des motoneurones ainsi que le nombre, la taille, l'aire et la position du centroïde des boutons en C. Plus précisément, le plugin nous permet d'appliquer des procédures proposées par Fiji avec un accès simplifié et plus rapide. L'analyse s'effectue sur la projection en Z de 15 stacks, soit une épaisseur de $3,75\mu\text{m}$, choisie pour inclure au maximum le soma du motoneurone étudié. Pour chaque neurone, une projection en « MAX » (pour chaque emplacement de pixel la valeur maximum d'intensité des 15 stacks a été conservée) et en « SUM » (pour chaque emplacement de pixel le logiciel calcule une intensité correspondant à la somme des 15 pixels de chaque stack et génère une image d'une dynamique de 32 bit) est réalisée. Bien que chaque action soit effectuée à la fois sur les deux canaux (ChAT : rouge et M2 : vert), l'analyse est effectuée en se basant sur le canal rouge qui permet de mieux visualiser les neurones et les boutons en C. Un détournage à la main du soma et des dendrites proximales du motoneurone a été réalisé sur l'image « MAX » (Figure 20), permettant au logiciel d'enregistrer ce détournage comme une première région d'intérêt (=ROI). Ensuite, une seconde ROI a été créée en « supprimant » les dendrites proximales de

la sélection lorsque celles-ci étaient présentes sur l'image. Enfin, en suivant des critères préalablement définis (taille de 0,5 à 10 μm , position autour du soma et des dendrites proximales, circularité 0-1) les boutons en C ont été automatiquement détectés dans une zone contenant la sélection du soma et des dendrites, élargie de 2 μm , et détourés, générant ainsi de nouvelles ROI. Un tableau contenant les valeurs de périmètre, diamètre et d'aire des différentes ROIs a ainsi été obtenu. Le décompte de ces ROI permet de déterminer le nombre de boutons en C analysés pour un neurone donné. Enfin, le centroïde du soma du motoneurone est calculé et défini par des coordonnées X et Y dans l'image. Le même calcul est appliqué pour chaque bouton en C, ce qui permettra par la suite, avec un simple calcul de distance ($= \sqrt{((X_b - X_a)^2 + (Y_b - Y_a)^2)}$) de déterminer la position des boutons en C par rapport au soma du motoneurone.

Afin d'étudier l'accumulation du récepteur M2 postsynaptique en face des boutons en C, nous avons généré des profils d'intensité (plot profile) à partir des valeurs d'intensité mesurées dans une région correspondant à une bande de largeur constante (2,83 μm) s'étendant de part et d'autre du contour du motoneurone (voir figure 23 A). Le marquage des boutons en C avec la ChAT (en rouge) apparaît sur un premier canal et le marquage des M2 tout au long de la membrane neuronale (en vert) sur un second canal (voir figure 23 A). En utilisant un second plugin développé par Gilles Courtand, nous avons détecté automatiquement par seuillage les boutons en C sur le canal ChAT, puis cette sélection (ROI) légèrement élargie (de 1 μm) a été appliquée sur le canal M2. L'aire du marquage M2 sous le masque des boutons en C ainsi que son intensité moyenne ont été calculées. L'intensité du marquage M2 sous les boutons en C a été rationalisée par rapport à l'intensité moyenne calculée sur l'ensemble du canal M2 (vert).

L'analyse statistique de ces données a été effectuée sur SPSS (IBM® SPSS® Statistics), ce qui a permis de gérer un grand nombre de données et de les scinder en groupes distincts suivant leurs différentes caractéristiques (âges, génotype...) à la demande. La création de ces tableaux SPSS regroupant toutes les données issues de Fiji a nécessité la création de programmes informatiques capables de lire, trier et classer ces valeurs. Ces programmes ont été créés par Christophe Halgand (IR CNRS, INCIA) en langage Matlab (MatWorks®) et python.

4. Acquisitions au scanner de lame, comptage et analyse.

Un comptage des interneurons cholinergiques de la lamina X a été effectué sur des lames de souris WT et SOD1 P10, P40 et P100 dans lesquelles la ChAT a été révélée à la DAB. Au vu du nombre de lames à imager nous avons opté pour une acquisition des images à l'aide d'un scanner de lame (Nanozoomer 2.0 HT Hamamatsu C9600-12, Hamamatsu-photonics, France) disponible au BIC (Bordeaux Imaging Center). Ce scanner permet d'effectuer des acquisitions de plusieurs lames à la suite en mode "batch". Pour cela, les lames sont placées dans une cassette de stockage vertical qui est insérée dans le scanner. Le logiciel NDP Scan (NDP scan 2.5.0) permet d'effectuer des réglages notamment de seuil d'intensité et de taille pour détecter ensuite automatiquement les objets d'intérêt (ici les coupes de moelle) sur les lames, puis d'incrémenter le nom de chaque lame qui a préalablement été importé. Les lames ont tout d'abord été pré-scannées avec un objectif 20x couplé à un capteur CCD éclairé par une lampe à vapeur de mercure (200W, Lx2000) puis replacées dans la cassette. Le résultat de ce pré-scannage permet à l'utilisateur de vérifier la bonne sélection des zones d'intérêt suivant les paramètres préalablement définis. Une fois la vérification effectuée, le scannage définitif était lancé durant la nuit. Les images ainsi acquises ont permis de visualiser la lame en entier, avec chaque coupe, correspondant à une zone d'intérêt, acquise en haute résolution avec un objectif x20.

Préalablement à l'étape de comptage des interneurons de la lamina X, un marquage "NeuN" a été effectué sur des coupes de souris aux trois âges étudiés. Ce marquage nous a permis, grâce à la visualisation de l'ensemble des neurones de la coupe, de déterminer de manière précise le contour de la lamina X. Nous avons ainsi déterminé une zone de 80 μm de rayon autour du canal central dans laquelle le comptage des interneurons marqués à la DAB a été réalisé pour tous les âges testés.

Les interneurons de la lamina X ont été comptés à la main sur chaque coupe. Le diamètre de chaque coupe a été mesuré au niveau maximal de sa largeur avec l'outil "règle" du logiciel NDP Viewer (NDP viewer 1.2.1).

Pour homogénéiser nos résultats et effectuer le comptage dans une section de moelle strictement identique d'un animal à l'autre, nous avons utilisé un point de référence anatomique. Les neurones inter-médio-latéraux (IML) sont des neurones cholinergiques situés comme leur nom l'indique dans la partie intermédio-latérale de la moelle. Ces neurones présentent une répartition anatomique bien précise. En effet, ils sont présents dans l'ensemble des segments thoraciques et dans les segments lombaires L1 et L2. La disparition des IML des

coupes nous a donc servis de point de référence. Après avoir mesuré la longueur d'un segment lombaire à P10, P40 et P100 (450, 950 et 1000 μm respectivement), les coupes de moelle réalisées étant de 30 μm , nous avons choisi de garder 15 coupes pour les P10 et 33 coupes pour les P40-P100 en avant de la dernière coupe contenant des IML et de garder 50 coupes après la disparition des IML à P10 et 100 à P40-P100. De cette façon le comptage a été fait pour tous les animaux des segments L2 à L5.

5. Western Blot

La moelle lombaire de souris WT et SOD1 âgées de P1, P10, P21, P40, P75 et P100 anesthésiées à l'isoflurane a été isolée par laminectomie. Après élimination de la partie dorsale de la moelle, les tissus ont été congelés dans de la carboglace et stockés très rapidement à -80°C . Lorsque cela était nécessaire, la partie lombaire était préalablement séparée en deux à l'aide d'un micro-scalpel en la plaçant sur le côté afin de séparer les parties dorsale et ventrale. Le jour de l'analyse en western blot, les échantillons de tissu ont été pesés et décongelés dans une solution tampon RIPA (Sigma, R0278) à laquelle ont été ajoutés des inhibiteurs de protéases (Roche, Proteases inhibitor cocktail Tablets, easypack, n°04693116001) dans un volume de 200 μl afin d'obtenir une concentration protéique suffisante pour réaliser les westerns blots. Les échantillons ont ensuite été soniqués dans de la glace puis laissés à reposer durant 30 minutes à 4°C . Les lysats ainsi obtenus ont été centrifugés à 15000 durant 20 min à 4°C afin d'isoler toutes les protéines du tissu dans le supernageant.

La quantité de protéines a ensuite été mesurée par un dosage « DC Protein assay » (Bradford), dans lequel la sérum albumine bovine (BSA) (Sigma A2153) est utilisée comme standard pour la gamme étalon. Des quantités équivalentes de protéines (30 μg), prélevées dans les surnageants, ont été déposées sur des gels d'acrylamide 10 % (SDS PAGE) après dilution dans du tampon de Laemmli. Des poids moléculaires standards (Pierce, PageRuler Plus prestained protein, 26620) ont été utilisés pour déterminer le poids de la protéine d'intérêt. Une électrophorèse a permis de séparer les protéines présentes dans les homogénats en fonction de leur taille. La migration a été commencée à 70 V puis, dès que toutes les protéines avaient atteint le gel du bas (« lower gel »), le voltage était augmenté à 120 V pendant une heure. Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PDVF (biotran) dans une cuve de tampon de transfert (Tris Glycine 20 % Méthanol) placée à 300 mA à 4°C durant 1h30.

Pour la révélation, un immunoblot a ensuite été réalisé. La membrane sur laquelle les protéines de l'échantillon, séparées par électrophorèse, ont été transférées a tout d'abord été saturée avec un tampon Tris-NaCl « tween 20 » (Sigma) contenant 5 % de lait écrémé (TBST pour « Tris Buffer Saline Tween »), 0,01 % durant 2h. La membrane a ensuite été incubée toute la nuit à 4°C dans une solution contenant l'anticorps primaire rat anti-M2, permettant de cibler les récepteurs M2 (Millipore MAB367). Le lendemain, la membrane a été rincée 3 fois 30 min dans du lait 5 % (TBST) puis incubée à température ambiante durant 1h dans une solution contenant l'anticorps secondaire anti-rat couplé à la peroxydase (HRP pour « Horse Radish Peroxydase »). Enfin, 2 rinçages de 30 minutes dans du TBSTM ont été réalisés, suivis de 2 rinçages dans du TBST et enfin d'un dernier rinçage dans du TBS. Les bandes protéiques immunomarquées ont été visualisées par chemoluminescence avec le réactif ECL (Lumiglo/Eurobio).

La quantification des récepteurs M2 a été réalisée à partir des bandes ainsi révélées sur film photographique. L'image a été analysée par densitométrie afin d'évaluer le taux relatif de marquage de la protéine et de quantifier les résultats en termes de densité optique. Afin de normaliser chaque puits de dépôt des protéines, l'intensité des bandes M2 a été rationalisée par rapport à celles de la β -actine (Synaptic System) révélée sur les mêmes membranes.

6. Préparations de moelle épinière isolée et des tranches de moelle.

Les animaux (P1-P3 pour les enregistrements extracellulaires et P7 et P11 pour les expériences de patch-clamp) ont été profondément anesthésiés avec un mélange air-isoflurane 4 %, puis décapités et éviscérés. La suite de la dissection est identique à celle présentée dans le chapitre sur la modulation monoaminergique.

Pour l'obtention de tranches de moelle lombaire, la moelle a ensuite été débarrassée de ses racines avant d'être incluse dans un bloc d'agar à 3 % afin d'effectuer des coupes transversales (350 μ m) à l'aide d'un vibratome (Leica VTS 300s). Les tranches ont ensuite été laissées au repos pendant 1 heure à 30°C dans de l'aCSF contenant en mM : 130 NaCl, 3 KCl, 3.75 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 0.58 NaHPO₄, 25 NaHCO₃ et 10 glucose, ajusté à pH 7.4 et oxygéné (95 % O₂, 5 % CO₂) avant de commencer les enregistrements.

7. Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires et intracellulaires.

Les enregistrements extracellulaires effectués sur la préparation de moelle épinière isolée ont été réalisés de la même façon que décrit précédemment (voir page 88).

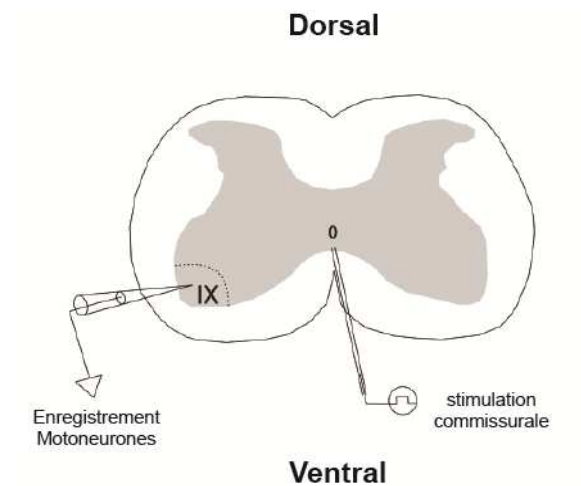


Figure 21 Electrophysiologie *in vitro* sur tranche de moelle épinière.

Un motoneurone est enregistré en patch clamp configuration cellule entière via une électrode en verre étirée. La transmission synaptique commissurale a été induite en stimulant électriquement la commissure ventrale.

(Adaptée d'après Bertrand et al., 2011).

Pour les expériences de patch-clamp, les tranches de moelle lombaire ont été placées dans une chambre d'enregistrement localisée sur la platine d'un microscope vertical (Nikon Eclipse, E600FN) et continuellement perfusées avec de l'aCSF oxygéné à température ambiante (24 à 26°C). Les enregistrements en voltage ou courant imposé des motoneurones, identifiés grâce à leur position dans la lamina IX et leur relative grande taille, ont été effectués en patch-clamp configuration cellule entière. Les microélectrodes de verre (4-7 MΩ) ont été réalisées sur une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instrument company, USA) et remplies avec une solution intracellulaire contenant en mM : 120 K-gluconate, 20 KCl, 0.1 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 0.1 CaCl₂, 0.1 GTP, 0.2 AMPc, 0.1 Leupeptine, 77 D-Manitol et 3 Na²⁺-ATP, ajustée à pH 7.3; de la biocytine (0,02 %) était ajoutée à la solution intracellulaire pour contrôler ultérieurement la localisation et l'identité des cellules enregistrées. Les signaux biologiques ont été amplifiés à l'aide d'un Multiclamp 700B (Molecular devices, CA, USA), filtrés (6kHz), digitalisés (Interface ITC-18, Instrutech) et collectés sur un ordinateur Apple avec le logiciel Axograph (Axon Instrument, CA).

Les axones des neurones commissuraux ont été stimulés électriquement à l'aide d'une électrode bipolaire en tungstène placée au niveau de la commissure ventrale (Figure 21). Cette électrode était connectée à une unité de stimulation (Master 8, AMPI, Jérusalem, Israël) contrôlée par une interface analogique/numérique (ITC 18, Instrutech). Les enregistrements intracellulaires ont été faits dans leur intégralité en présence d'un milieu enrichi en cations (dit "haut calcium, haut magnésium") contenant : 7,5 mM CaCl₂ et 8mM MgSO₄ permettant la diminution de la transmission polysynaptique. De la strychnine (1μm), de la gabazine (1μm) et du DNQX (5μm) ont été ajoutées à ce milieu en permanence afin de bloquer respectivement l'activation des récepteurs glycinergiques, GABA_A et AMPA

8. Pharmacologie.

Les composés utilisés dans cette étude ont été achetés chez Sigma à l'exception du DNQX, de l'AF-DX 116 et de la gabazine (Abcam). Des solutions stocks à 0,1mM de NMA et de 5-HT ont été réalisées. À l'inverse, les solutions contenant l'oxotrémorine ont été préparées fraîches chaque jour et stockées à 4°C pendant la durée de l'expérience

Dans les expériences d'électrophysiologie extracellulaire comme dans celles intracellulaire, les composés pharmacologiques ont été appliqués directement dans le bain de perfusion via une pompe péristaltique (respectivement fixée à des flux de 7 et 5 ml/min).

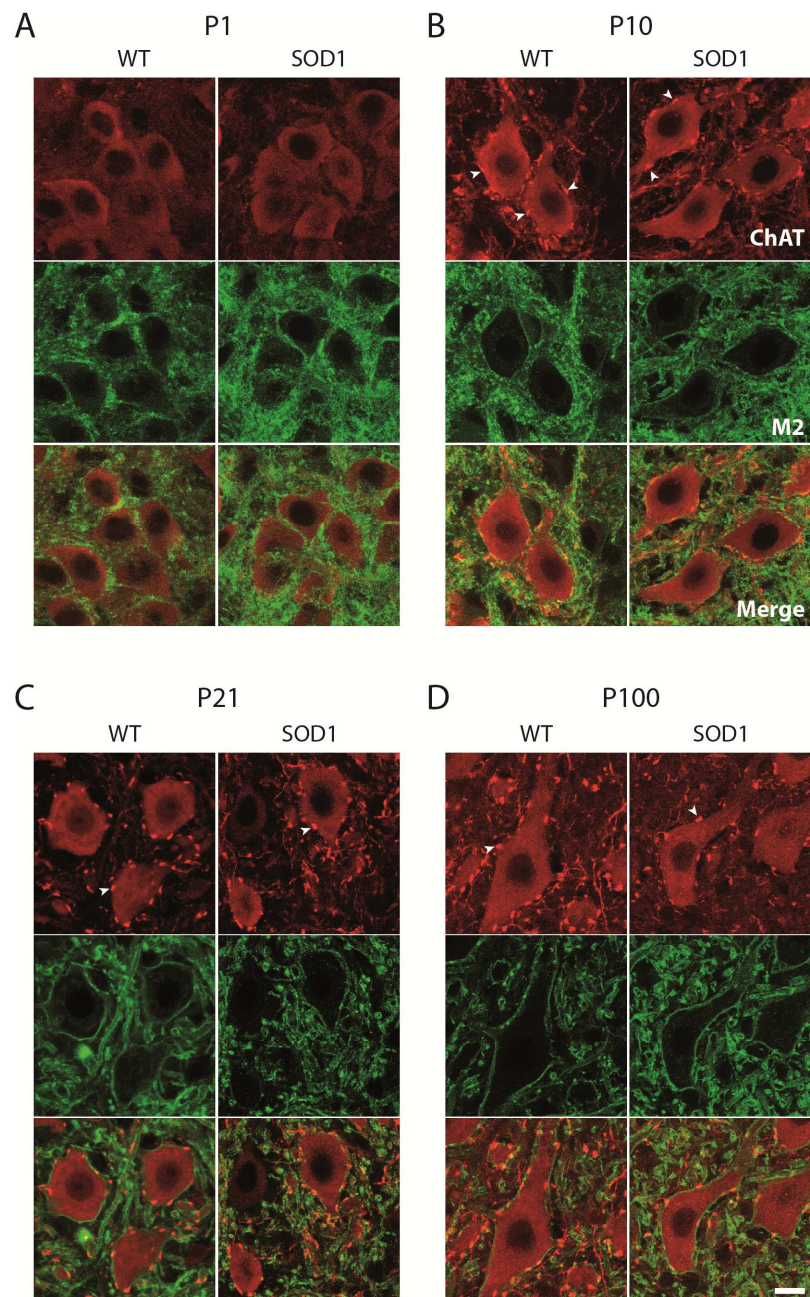


Figure 22 Marquages des boutons en C et des récepteurs M2 dans la moelle lombaire de souris WT et SOD1 à différents stades.

Photographie en microscopie confocale d'un double marquage immunohistochimique en fluorescence de la ChAT (rouge) et des récepteurs M2 (vert) réalisé chez des souris WT et SOD1 à un jour postnatal (P1, **A**), P10 (**B**), P21 (**C**), P40, P75 et P100 (**D**). Les têtes de flèches sur le panneau B indiquent la présence de synapses cholinergiques : les boutons en C. Barre d'échelle : 15 μ m.

9. Statistiques.

Les statistiques concernant les paramètres morphologiques des boutons en C ont été réalisées avec le logiciel SPSS (IBM® SPSS® Statistics) qui permet de gérer des tableaux de données de grande dimension. Les autres analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad prism (GraphPad Prism software). Ces analyses ont été faites sur les données brutes. Des t-tests ont été utilisés pour comparer deux groupes de valeurs et des ANOVA à deux voies associées à des tests de comparaison multiple de Sidak ont été réalisées afin d'évaluer les effets de l'âge ou des différents composés testés en fonction du génotype des souris (Prism Graph Pad). Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (Erreur Standard à la Moyenne). Les astérisques sur les figures et les tables indiquent un niveau de significativité positif de l'analyse *post-hoc* ($p < 0,05$).

C. Résultats

1. Analyse longitudinale des paramètres morphologiques des boutons en C présents sur les motoneurones lombaires des souris WT et SOD1^{G93A}.

Dans la première partie de cette étude, nous avons réexaminé l'évolution des synapses en C qui connectent les motoneurones lombaires dans une fenêtre temporelle allant de la naissance aux stades présymptomatiques de la SLA. Cette analyse a été complétée par un marquage des récepteurs M2, récepteurs connus pour être associés en postsynaptique aux synapses cholinergiques en C. La Figure 22 présente des images représentatives de motoneurones lombaires immunopositifs pour la ChAT (canal rouge) et M2 (canal vert) chez des souris P1 (Fig. 22 A), P10 (Fig. 22 B), P40 (Fig. 22 C) et P100 (Fig. 22 D) WT (panneaux de gauche) et SOD1^{G93A} (panneaux de droite). Les marquages obtenus chez les animaux P40 et P75 n'ont pas été illustrés. La table 3 répertorie le nombre d'animaux utilisés ainsi que le nombre de motoneurones analysés à chaque âge pour chaque génotype.

La Figure 23 présente l'ensemble des paramètres morphologiques analysés chez les animaux WT (barres noires) et SOD1 (barres blanches) aux différents âges testés. Dans un premier temps, on observe que dans les stades juvéniles, à P1 et P10, les motoneurones des souris SOD1 présentent un corps cellulaire significativement plus petit que celui des animaux WT (Figure 23 B), tandis que dans les stades plus tardifs le périmètre des motoneurones SOD1 et WT n'est plus différent. Nous nous sommes ensuite intéressés au comptage des boutons en C sur les motoneurones lombaires. Tout d'abord, notre étude révèle que, comme cela a été

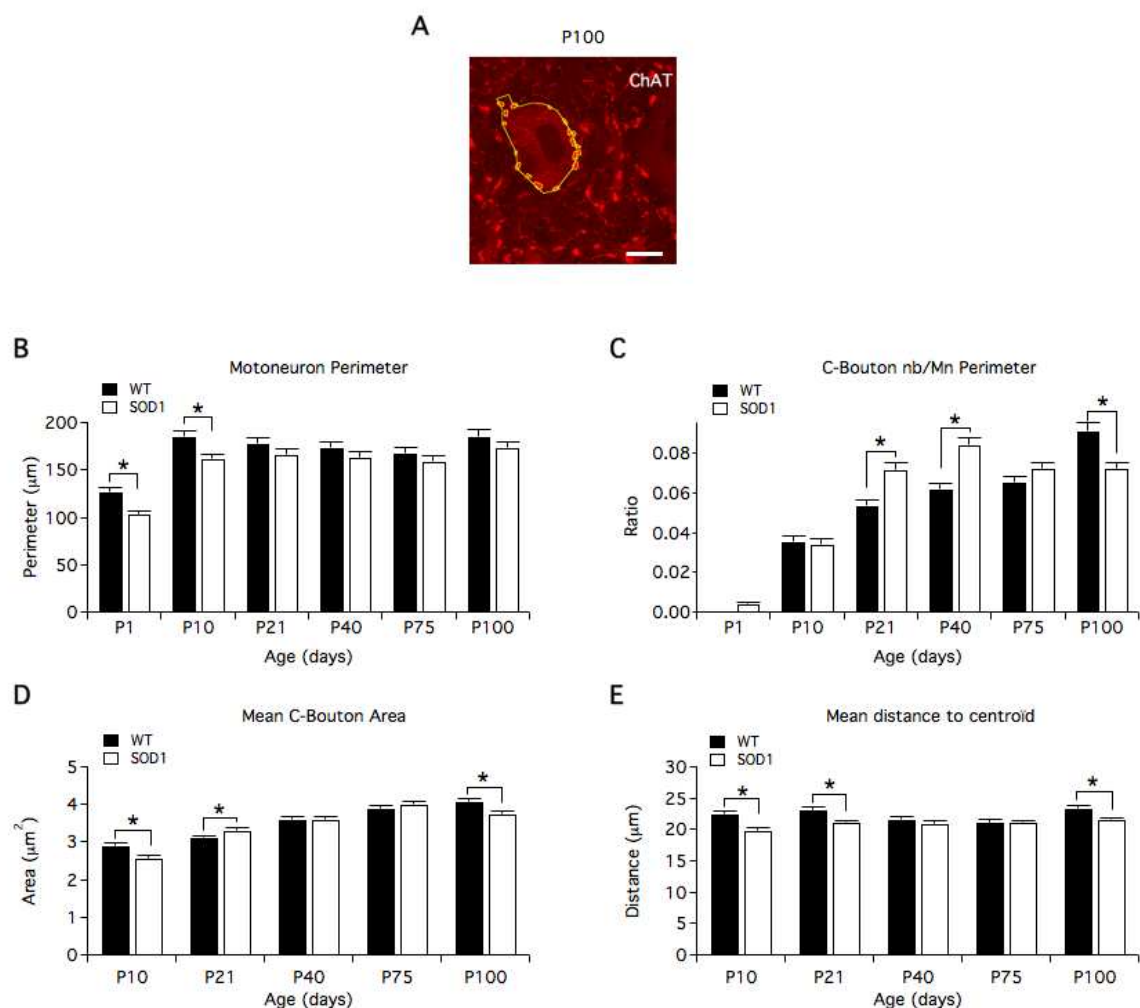


Figure 23 Analyse longitudinale des paramètres morphologiques des boutons en C au contact des motoneurones lombaires.

A. En utilisant le marquage ChAT un détournage manuel du corps cellulaire et des dendrites proximales de chaque motoneurone a été réalisé. Les boutons en C présents au niveau de cette sélection ont alors été automatiquement détectés. Cette analyse nous a permis de mesurer différents paramètres chez les animaux WT (barres noires) et SOD1 (barres blanches) à un jour postnatal (P1), P10, P21, P40, P75 et P100 : **B.** le périmètre des motoneurones, **C.** le nombre de boutons en C relativisé par rapport au périmètre du motoneurone sur lequel ils ont été comptés, **D.** l'aire des boutons en C et enfin **E.** leur position sur le corps cellulaire et les dendrites proximales des motoneurones, exprimé par la distance séparant le centroïde des boutons en C du centroïde du motoneurone (μm). Les astérisques indiquent une significativité positive et les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Barre d'échelle : 15 μm (**A**).

montré dans des études précédentes, aucun bouton en C n'est détectable avec un marquage ChAT chez les animaux P1, quel que soit le génotype des souris (Figure 22 A et 23 C). À l'inverse, à partir de P10, les boutons en C apparaissent comme de larges structures immuno-positives à la ChAT entourant le corps cellulaire et les dendrites proximales des motoneurones (flèches sur la figure 22 B).

Le périmètre des neurones influençant la quantité de boutons en C qui peuvent être présents au niveau présynaptique, nous avons rationalisé le nombre de boutons en C par le périmètre de chaque motoneurone analysé. Le graphique de la figure 23 C montre que chez les souris WT, le ratio boutons en C/périmètre des motoneurones augmente de P10 à P21 puis se stabilise jusqu'à P75 avant d'augmenter à nouveau à P100 (Figure 23 B). L'aire des boutons en C quant à elle, augmente progressivement avec l'âge chez ces animaux WT (Figure 23 D). Cette évolution des boutons en C au cours du développement est différente chez les souris SOD1. En effet, chez ces animaux, la proportion de boutons en C en contact avec les motoneurones lombaires augmente fortement de P10 à P21 pour atteindre une valeur plateau qui ne varie plus au cours du développement alors que l'aire des boutons augmente, quant à elle, progressivement jusqu'à l'âge de 75 jours et diminue ensuite à P100. Les tests de comparaison multiple réalisés sur ces données révèlent de plus que chez les souris SOD1, le nombre de synapses en C est significativement inférieur à celui des WT à P10, puis la proportion de synapses en C augmente chez les souris SOD1 jusqu'à dépasser de façon significative celui obtenu chez les WT à P21 et P40, avant que cette tendance ne s'atténue, et s'inverse même à nouveau à P100 où l'on observe que le nombre de synapses en C est significativement inférieur chez les SOD1 que chez les WT (Figure 23 D). Ces modifications du nombre de synapses en C sur les motoneurones SOD1 s'accompagnent également de changements morphologiques de ces synapses. En effet, l'aire des boutons en C des souris SOD1 est significativement plus faible que celle des WT à P10 et P100, mais plus grande à P21, âge où les boutons en C sont également présents en plus grand nombre chez ces souris (Figure 23 D).

Cette étude immunohistochimique des boutons en C nous a également permis d'évaluer la distribution de ces synapses au niveau du soma et des dendrites proximales des motoneurones. Pour cela, la distance entre le centroïde de chaque bouton en C et le centroïde du motoneurone a été calculée. Nous n'avons observé aucune évolution de ce paramètre avec l'âge que ce soit chez les souris WT ou les souris SOD1 (Figure 23 E), avec des synapses en C situées en moyenne dans un rayon de 20-23µm autour du centroïde du motoneurone, dès P10. Eu égard au fait que les motoneurones SOD1 sont significativement plus petits que les

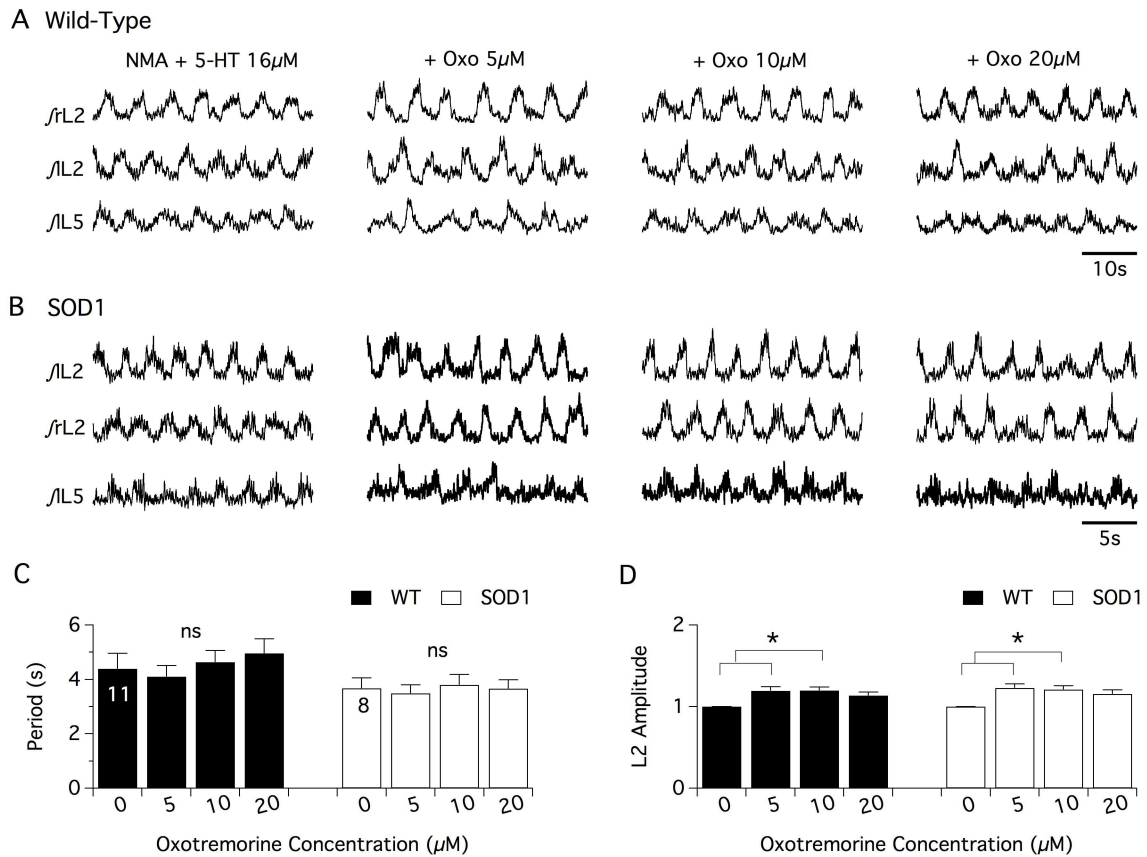


Figure 24 Neuromodulation cholinergique de la locomotion fictive induite pharmacologiquement sur des préparations de moelle épinières isolées de souris WT et SOD1 nouveau-nés.

Enregistrements extracellulaires intégrés (*f*) représentatifs de l'activité des racines ventrales lombaires droite (rL2) et gauche (lL2 et lL5), en présence de NMA + 5-HT (16 μ M de chaque) seuls ou co-appliqués avec de l'oxotremorine (Oxo ; 5, 10, 20 μ M), chez des animaux WT (**A**) et SOD1 (**B**).

Les histogrammes représentent les résultats obtenus concernant la période (**C**) et l'amplitude des bouffées enregistrées sur les racines L2 (**D**) en présence ou en absence d'oxotremorine sur les moelles épinières de souris WT (barres noires) et SOD1 (barres blanches). Les astérisques indiquent une significativité positive et les chiffres dans les barres d'histogrammes réfèrent au nombre d'animaux utilisés pour chaque groupe.

motoneurones WT à P10 (Figure 23 B), la distance séparant les boutons en C du centroïde du motoneurone est logiquement significativement plus faible chez les SOD1 à P10. Par contre, alors que les motoneurones à P21 et P100 présentent des valeurs de périmètre identique, nous avons observé que la distance moyenne du centroïde des boutons en C par rapport au centroïde des motoneurones était significativement plus petite chez les SOD1 à P21 et P100 que chez les WT aux mêmes stades suggérant que les boutons en C sont plus recentrés autour du corps cellulaire des motoneurones SOD1 (Figure 23 E).

L'ensemble de ces données montre des altérations précoces des synapses cholinergiques en C connectant les motoneurones lombaires SOD1 ainsi qu'une perte de boutons en C associée à une réduction de leur aire dans les stades présymptomatiques (P100) de la SLA.

2. Impact fonctionnel des altérations morphologiques des boutons en C dans la deuxième semaine postnatale : analyse extra- et intracellulaire.

Nous avons montré précédemment que la modulation monoaminergique des réseaux spinaux lombaires différait chez des souris nouveau-nées WT et SOD1 (Milan *et al.*, 2014). Ces données, combinées à l'observation que l'aire des boutons en C est significativement plus petite à P10 chez les souris SOD1 comparativement aux souris WT (Figure 23 D) et à celle des travaux antérieurs réalisés par d'autres groupes (Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013), nous ont amené à poser la question de savoir si la modulation cholinergique des réseaux moteurs spinaux WT et SOD1 était identique dans la première semaine postnatale. Pour répondre à cette question nous avons réalisé dans un premier temps des enregistrements extracellulaires sur la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* et dans un second temps des enregistrements intracellulaires en patch-clamp configuration cellule entière des motoneurones lombaires sur tranches de moelle.

La figure 24 montre que l'application de NMA (16 μ M) + 5-HT (16 μ M) induit comme montré précédemment une activité de locomotion fictive coordonnée, tant chez les souris WT que chez les SOD1 (Milan *et al.*, 2014) (Figure 24 A et B). Afin d'analyser la neuromodulation cholinergique des réseaux spinaux lombaires, nous avons testé et comparé l'effet d'un agoniste à large spectre des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, l'oxotrémorine, sur le rythme induit par le NMA et la 5-HT chez les souris WT et SOD1. L'application de concentrations croissantes d'oxotrémorine dans le bain de perfusion (5, 10 et 20 μ M) (Figure 24 A et B) n'a aucun effet significatif sur la période des bouffées d'activité locomotrice, que ce soit chez les souris WT ou SOD1 (Figure 24 C). À l'inverse, l'application

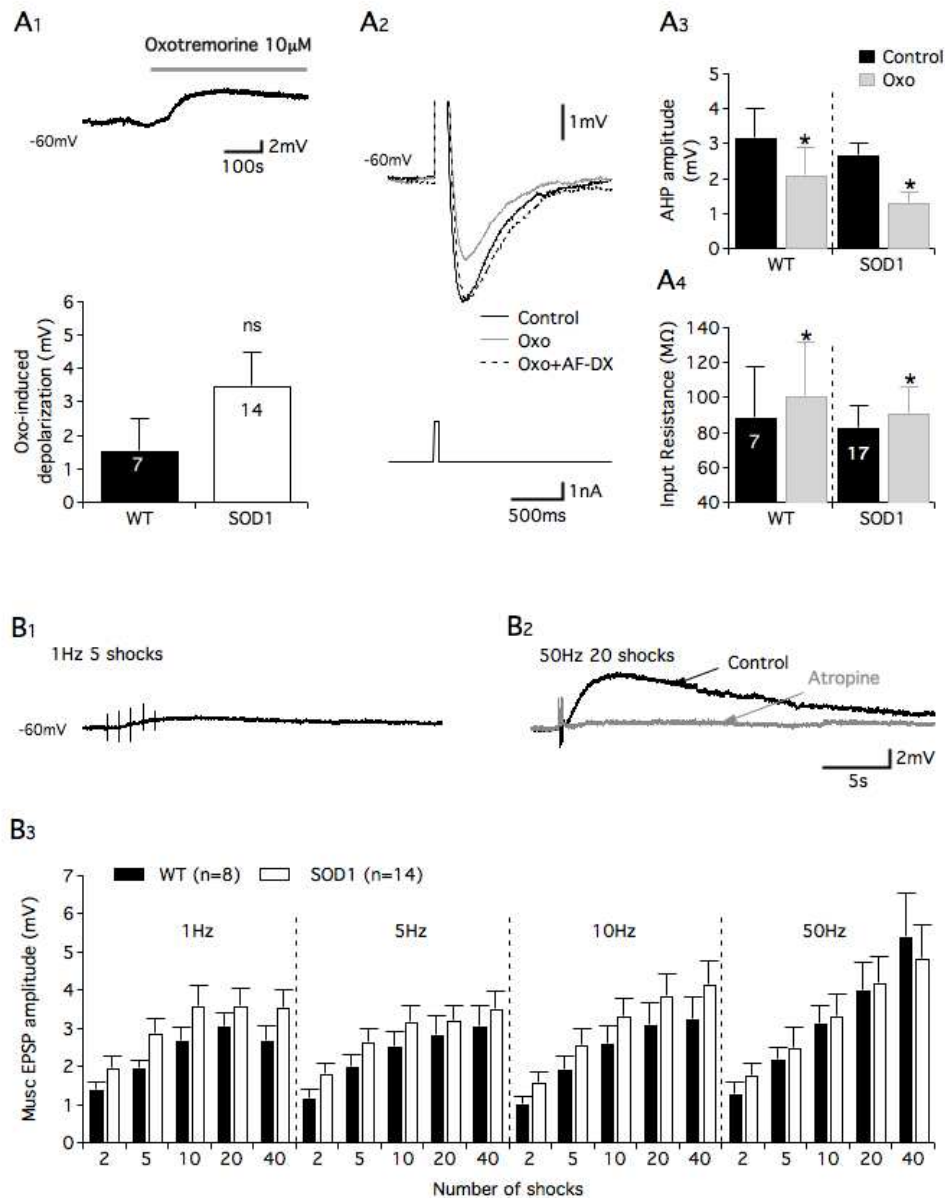


Figure 25 Etude intracellulaire de l'effet de l'oxotremorine sur les motoneurones de souris WT et SOD1.

Enregistrements intracellulaires en patch clamp configuration cellule entière de motoneurones de souris WT et SOD1 âgées de P9 à P12. L'application d'oxotremorine dans le bain (**A**) induit une dépolarisation de la membrane plasmique des motoneurones WT et SOD1 (**A1**), une diminution de l'amplitude de l'hyperpolarisation suivant la genèse d'un potentiel d'action (AHP) (**A2** et **A3**) et réduit la résistance d'entrée des motoneurones (**A4**). La diminution de l'amplitude de l'AHP par l'application d'oxotremorine est reversée par l'application d'un antagoniste des récepteurs M2 (AF- DX116, 10 μ M) (**A2**).

Une stimulation électrique au niveau de la commissure centrale (**B**) induit une dépolarisation de longue durée des motoneurones WT et SOD1 qui est fonction de la fréquence et du nombre de chocs appliqués (**B1**, **B2**). Cette dépolarisation est dépendante de l'activation de récepteurs muscariniques puisque supprimée lors de l'application d'atropine dans le bain (**B2**). Aucune différence significative de cette transmission commissurale n'a été observée entre les animaux WT et SOD1 (**B3**).

d'oxotrémorine à 5 et 10 μM augmente significativement l'amplitude des bouffées enregistrées sur les racines ventrales lombaires L2 (Figure 24 D) et L5 (données non illustrées), quel que soit le génotype des animaux testés. Les tests de comparaison multiple de l'ANOVA à deux voies réalisée sur ces données ont montré que l'effet amplificateur de l'oxotrémorine sur l'amplitude des bouffées n'est pas significativement différent entre les souris WT et SOD1.

L'utilisation de la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* et l'enregistrement extracellulaire de l'activité locomotrice suite à l'application d'un agoniste cholinergique n'ont donc pas permis de révéler un effet fonctionnel des modifications anatomiques des boutons en C observées précédemment chez les souris SOD1 nouveau-nées. On peut supposer que la mise en jeu de mécanismes compensatoires au sein des réseaux spinaux pourrait expliquer l'absence de différence que nous avons obtenue. Nous avons donc complété cette étude par approche « plus fine », en comparant l'effet de l'oxotrémorine directement sur les propriétés intracellulaires des motoneurones lombaires WT et SOD1.

Sur des motoneurones isolés du reste des réseaux spinaux par la perfusion d'un milieu enrichi en calcium et en magnésium contenant de la strychnine, de la gabazine et du DNQX, nous avons tout d'abord comparé la dépolarisation induite par l'application dans le bain de perfusion de 10 μM d'oxotrémorine. La trace de la figure 25 A1 montre que cette application induit une dépolarisation de longue durée des motoneurones lombaires dont l'amplitude n'est pas significativement différente entre les motoneurones WT et SOD1. Les canaux potassiques dépendants du calcium à l'origine de l'AHP constituent une cible majeure du système neuromodulateur cholinergique spinal (voir par exemple Miles *et al.*, 2007). Nous avons donc comparé l'effet de l'oxotrémorine sur l'AHP des motoneurones WT et SOD1. Comme montré précédemment, l'oxotrémorine déprime l'AHP des motoneurones (Figure 25 A2, comparez le tracé noir et gris). Cet effet est lié à l'activation des récepteurs M2. En effet l'ajout dans le bain de perfusion contenant l'oxotrémorine d'un antagoniste des récepteurs M2, l'AF-DX 116 contrecarre l'inhibition d l'AHP induite par l'oxotrémorine (Figure 25 A2, tracé en pointillé). L'histogramme de la figure A3 montre que cet effet inhibiteur est similaire entre les motoneurones WT et SOD1.

Il a été montré récemment qu'une stimulation électrique commissurale induisait des potentiels postsynaptiques excitateurs dépolarisants d'origine muscarinique (muscle-EPSP) de longue durée dans les motoneurones (Bertrand & Cazalets, 2011). Nous avons donc voulu savoir si cette transmission commissurale cholinergique était modifiée dans les motoneurones SOD1 (Figure 25 B1 et B2). Les figures 25 B1 et B2 présentent des traces représentatives de

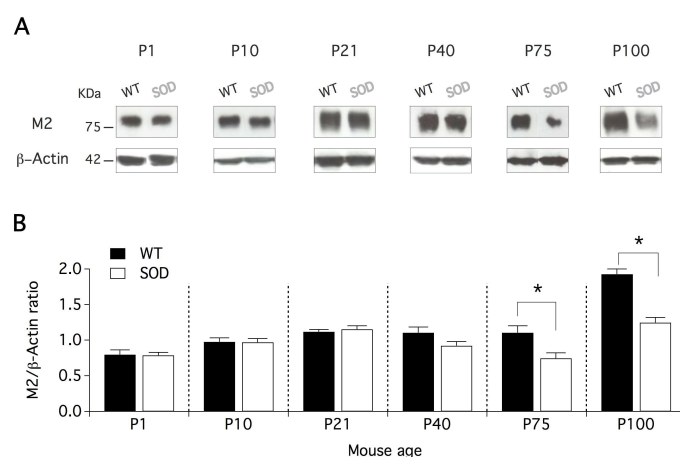


Figure 26 Quantification des récepteurs M2 dans la moelle lombaire ventrale de souris WT et SOD1 en fonction de l'âge.

La quantité de récepteurs M2 présents dans les tissus spinaux lombaires ventraux de souris WT et SOD1 à différents stades de développement : P1, P10, P21, P40, P75 et P100 a été déterminée par western blot. Un exemple représentatif de gels obtenus pour chaque âge et chaque génotype est présenté (**A**). La β -actine est utilisée afin de normaliser les résultats obtenus pour chaque groupe. On représente ainsi la quantité normalisée de récepteurs M2 au niveau lombaire d'animaux WT (barres noires) et SOD1 (barres blanches) au cours du développement (**B**). Les astérisques représentent une significativité positive.

l'effet de chocs électriques commissuraux (1Hz 5 chocs et 50Hz 20 chocs) dans un motoneurone WT. Comme cela a été montré chez le rat, l'augmentation du nombre de chocs et de la fréquence des stimulations appliquées induit une augmentation de l'amplitude des musc-EPSPs tant chez les WT que chez les SOD1. La nature muscarinique de ces EPSPs a été confirmée par l'application d'atropine dans le bain de perfusion (Figure 25 B2). L'histogramme de la figure 25 B3 montre que, bien que les motoneurones SOD1 semblent être légèrement plus dépolarisés lors des stimulations commissurales que les motoneurones WT, aucune différence significative n'a été observée entre les deux génotypes.

Il semblerait donc que les modifications morphologiques des boutons en C observées chez les sujets jeunes, entre P1 et P10 n'aient pas d'impact fonctionnel et que la neuromodulatrice cholinergique des réseaux moteurs spinaux WT et SOD1 soit identique à ces stades développementaux.

3. Analyse longitudinale de l'expression des récepteurs M2 dans la moelle lombaire des souris WT et SOD1.

Plusieurs études anatomiques ont montré que les récepteurs M2 s'accumulent au niveau de la membrane postsynaptique en face des boutons en C (Hellström *et al.*, 2003; Muennich & Fyffe, 2004; Zagoraiou *et al.*, 2009; Herron & Miles, 2012). L'importance fonctionnelle de ces récepteurs dans la modulation cholinergique des réseaux spinaux a, de plus, été confirmée électrophysiologiquement (Miles *et al.*, 2007; Bertrand & Cazalets, 2011). Nous ne disposons néanmoins à notre connaissance d'aucune donnée concernant la mise en place des récepteurs M2 au cours du développement des motoneurones lombaires ainsi que sur leur évolution dans la physiopathologie de la SLA. La deuxième partie de cette étude a donc eu pour but de quantifier l'expression des récepteurs M2 et de caractériser leur distribution en face des boutons en C dans la membrane des motoneurones WT et SOD1 depuis la naissance jusqu'aux stades présymptomatiques.

Afin de comparer l'expression des récepteurs M2 dans la moelle lombaire ventrale des animaux WT et SOD1, nous avons tout d'abord réalisé une analyse en western blot de l'expression de cette protéine chez des souris P1, P10, P21, P40, P75 et P100 (Figure 26 A). L'histogramme de la figure 26 B montre que le ratio M2/ β actine n'est pas différent entre les animaux WT et SOD1 à P1, P10 et P21. À l'inverse à partir de P40, le taux de M2 tend à baisser chez les souris SOD1 comparativement aux WT. Cette différence s'accroît et devient significative à P75 et P100 (Figure 26 A-B). Ces résultats suggèrent donc qu'en parallèle à la perte des boutons en C sur les motoneurones dans les stades présymptomatiques

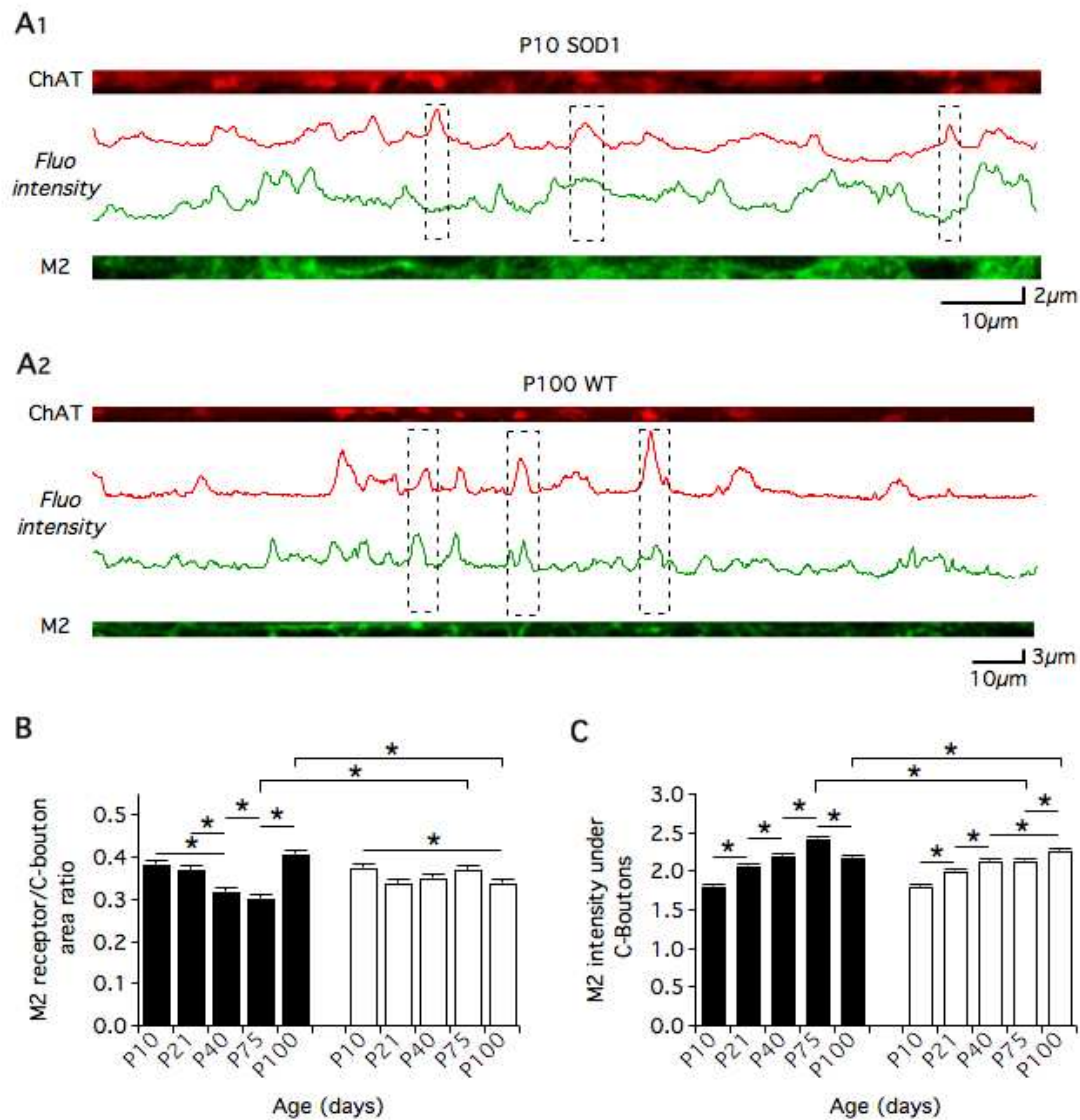


Figure 27 Evolution de l'expression et du positionnement des récepteurs M2 post-synaptiques en face des boutons en C chez les animaux WT et SOD1 au cours du développement.

(A) Courbes d'intensité de fluorescence des marquages ChAT (rouge) et M2 (vert) dans la zone de détournement du corps cellulaire et des dendrites proximales des motoneurones. Les zones hachurées illustrent la coïncidence ou pas d'un pic d'intensité rouge (bouton en C) avec un pic d'intensité vert dans un motoneurone P10 SOD1 (A1) et P100 WT (A2). En reportant la sélection des boutons en C réalisée avec le marquage ChAT sur le canal M2, le ratio de l'aire sous les boutons en C occupée par des récepteurs M2 (B), ainsi que l'intensité du marquage de M2 en face des boutons en C rationalisée par rapport au fond de l'image (C) ont été calculés. Les astérisques représentent une significativité positive..

P75-P100 (voir Figure 23.C), le taux de récepteurs M2 chute dans la moelle épinière lombaire ventrale des animaux SOD1.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse détaillée de l'accumulation des récepteurs M2 postsynaptiques associés aux boutons en C dans les motoneurones lombaires, en fonction de l'âge des animaux WT et SOD1. Pour cela, nous avons utilisé le détournement des motoneurones réalisé pour l'analyse des paramètres morphologiques des boutons en C sur les marquages immunohistochimiques en double fluorescence ChAT et M2. Cette sélection a été élargie afin d'englober à la fois la zone présynaptique (les boutons en C) et la zone postsynaptique (le récepteur M2). Le canal rouge, ChAT, permet donc de visualiser et de sélectionner les boutons en C, tandis que le canal vert correspond à l'expression du récepteur M2 dans la membrane postsynaptique du motoneurone (Figure 27 A1 et A2). La figure 27 A montre les variations d'intensité des marquages ChAT et M2 pour un motoneurone P10 SOD1 (Figure 27 A1) et P100 WT (Figure 27 A2). On notera que la présence d'un bouton en C (pic d'intensité dans le canal rouge) est plus souvent corrélée à une accumulation de M2 (pics d'intensité dans le canal vert) à P100 qu'à P10 (zones hachurées). Afin d'appréhender l'expression des récepteurs M2 associés aux boutons en C, deux paramètres ont été mesurés sur ces marquages : 1) l'aire occupée par les récepteurs M2 sous un bouton en C (Figure 27 B) et 2) l'intensité du marquage M2 sous chaque bouton relativisée par rapport au marquage M2 moyenné sur l'ensemble de la membrane (voir la partie Matériel et Méthodes pour les détails de l'analyse) (Figure 27 C).

Les histogrammes de la figure 27 B et C montrent de manière très intéressante, que chez les WT, alors que les récepteurs M2 ont une répartition assez étendue en début de vie, la portion de membrane postsynaptique en face des boutons en C occupée par les récepteurs M2 tend progressivement à se réduire entre P10 et P75 alors que l'intensité du marquage M2 augmente à mesure, sous ces boutons. À P100 à l'inverse, on observe une ré-augmentation de la répartition des M2 sous les boutons en C associée à une chute de l'intensité du marquage. Ce phénomène concernant les récepteurs M2 est à mettre en parallèle avec la mise en place à cet âge de nouveaux boutons en C (voir Figure 23 C et discussion) chez les animaux WT. Ces résultats suggèrent que chez la souris WT, on observe un rassemblement des récepteurs M2, « une clusterisation » de ce récepteur, sous les boutons en C. Chez les animaux SOD1 au contraire, ce phénomène de clusterisation n'est pas présent au cours du développement (Figure 27 B). En effet, chez ces animaux, la surface de membrane postsynaptique occupée par des récepteurs M2 en face des boutons en C ne varie pas, ou très peu, entre P10 et P75

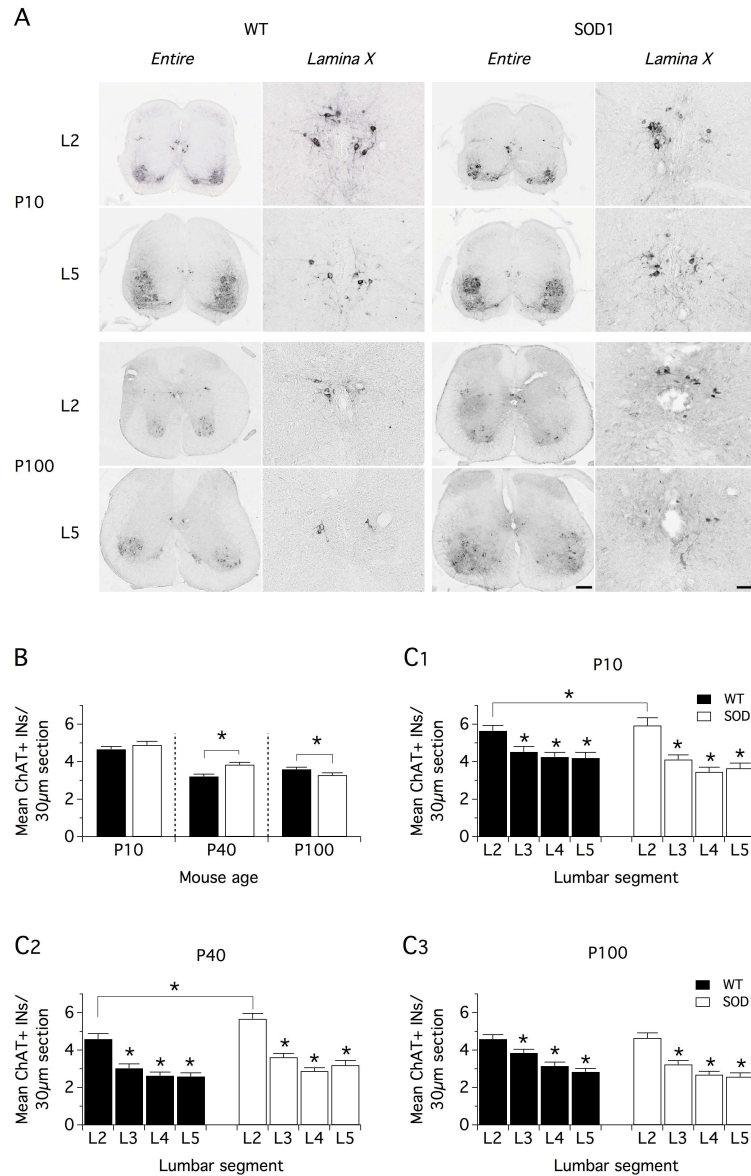


Figure 28 Comptage des interneurones cholinergiques autour du canal central chez des animaux WT et SOD1.

(A). Photographies du marquage ChAT révélé en DAB sur des coupes de moelle entière (entire) ou zoomées sur la lamina X de souris WT et SOD1 âgées de 10 et 100 jours postnataux (P10, P100). Barre d'échelle: 200 µm moelle entière et 50 µm images zoomées. (B). Histogramme du nombre moyen d'interneurones comptés par tranches de 30 µm pour chaque âge testé dans la moelle lombaire totale WT (barres noires) ou SOD1 (barres blanches). (C). Histogrammes du nombre moyen d'interneurones comptés par tranches de 30 µm dans les différents segments lombaires spinaux à P10 (C1), P40 (C2) et P100 (C3) chez les souris WT (barres noires) et SOD1 (barres blanches). Les astérisques représentent une significativité positive et les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

(Figure 27 B) et à l'inverse des animaux WT diminue même à P100 où l'on n'observait pas non plus de recrudescence du nombre de boutons en C. Concernant l'intensité du marquage M2, on constate une augmentation progressive de cette valeur au cours du temps pour les motoneurones SOD1 (Figure 27 C) sans pour autant que ces récepteurs n'adaptent leur répartition en fonction.

4. Les interneurones cholinergiques à l'origine des boutons en C dégénèrent dans la moelle des souris SOD1.

Nos données montrent que le couple bouton en C-récepteurs M2 présente une dynamique altérée dans les motoneurones lombaires des souris SOD1 et ceci depuis la naissance et jusqu'aux stades présymptomatiques. La question se pose alors de savoir si ces altérations sont liées seulement à des altérations concernant la cellule cible de ces synapses, les motoneurones, ou si les neurones à l'origine des boutons en C, les interneurones de la lamina X, sont aussi impliqués. En d'autres termes, est-ce que les motoneurones sont les seuls neurones cholinergiques à dégénérer dans la SLA ?

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un comptage des interneurones cholinergiques de la lamina X, dans toute la partie lombaire de la moelle de souris WT et SOD1 à 3 stades : P10, P40 et P100 (Figure 28 A). Cette analyse a été réalisée sur des groupes de 5 souris pour chaque condition, excepté pour les WT P40 et les SOD1 P100 où 4 souris ont été utilisées. La Figure 28 A montre des photographies représentatives de coupes de moelle P10 et P100 WT (panneau de gauche) et SOD1 (panneau de droite) entières ou zoomées sur la lamina X suite à un marquage de la ChAT révélée en DAB. Nous nous sommes tout d'abord intéressés au nombre moyen d'interneurones comptés par coupe pour l'ensemble de la moelle lombaire. De façon très intéressante, nous avons montré que le nombre moyen d'interneurones comptés par coupe de moelle est modifié chez les SOD1 au cours du développement, par rapport aux WT (Figure 28 B). En effet, l'histogramme de la figure 28 B montre que le nombre moyen d'interneurones cholinergiques par coupe tend à être supérieur chez les animaux SOD1 à P10, est significativement plus grand à P40 et significativement plus petit à P100.

Afin de pousser plus avant ces observations, nous avons représenté le nombre moyen d'interneurones cholinergiques par coupe (30 μ m) en fonction du segment lombaire, de L2 à L5 (Figure 28 C1, C2 et C3). Nos résultats montrent en accord avec des études antérieures (Zagoraïou *et al.*, 2009) qu'indépendamment du génotype des animaux, les interneurones cholinergiques de la lamina X sont localisés préférentiellement dans le segment L2 (Figure 28

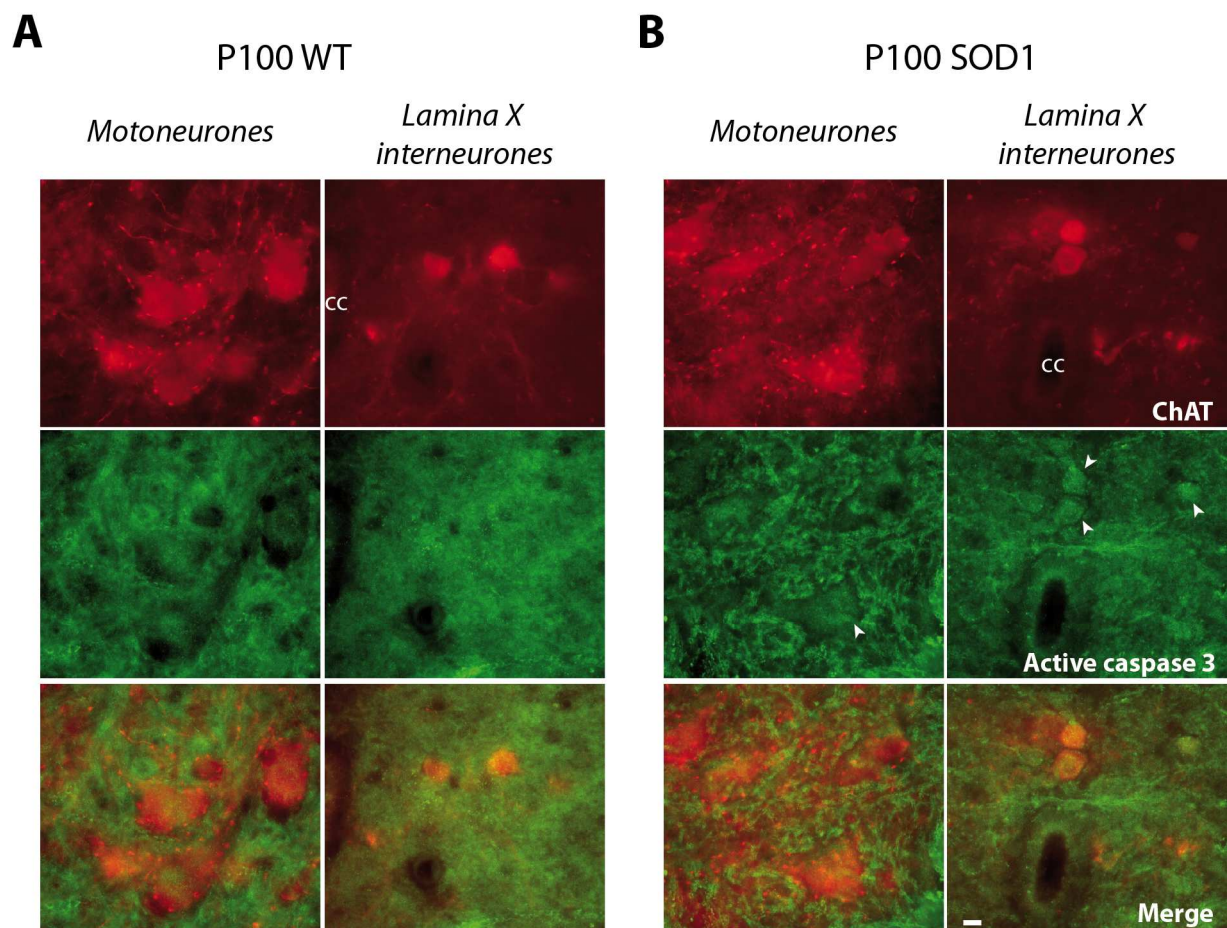


Figure 29 Expression de facteurs apoptotiques par les neurones cholinergiques de souris WT et SOD1.

Photographies en épifluorescence d'un double marquage immunohistochimique dirigé contre la ChAT (rouge) et la forme active de la caspase 3 (vert) dans la zone des motoneurones et de la lamina X de moelle de souris P100 WT (A) et SOD1 (B). Notez la présence de motoneurones et d'interneurones marqués chez les animaux SOD1. Barre d'échelle: 10 μ m.

C1, C2 et C3). En comparant le nombre moyen d'interneurones cholinergiques par coupe dans les différents segments lombaires entre les animaux WT et SOD1, on constate que c'est également au niveau de ce segment L2 que sont exprimées les différences les plus importantes entre les animaux WT et SOD1. En effet, les segments L2 des animaux SOD1 contiennent un nombre d'interneurones cholinergiques significativement plus important que ceux des animaux WT à P10 et P40 (Figure 28 C1 et C2), mais plus à P100 (Figure 28 C3)

Ce résultat extrêmement intéressant suggère donc que dès la deuxième semaine postnatale, les souris SOD1 possèdent plus d'interneurones cholinergiques au niveau L2 que les animaux WT. Le fait que cette différence ne soit pas retrouvée à P100 nous a amenés à émettre l'hypothèse qu'une partie de ces neurones disparaissaient chez les souris SOD1 à P100. Afin de vérifier ce point et de préciser les résultats obtenus lors du comptage des interneurones cholinergiques, nous avons réalisé un double marquage immunohistochimique de la forme activée de la caspase 3, un marqueur de l'apoptose (Mattson *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2002) et de la ChAT chez les animaux P100 WT et SOD1 (Figure 29). Aucun motoneurone, ni aucun interneurone cholinergique de la lamina X n'est apparu immunopositif pour la caspase-3 activée chez les souris WT (Figure 29 A). À l'inverse, des motoneurones mais aussi des interneurones cholinergiques de la lamina X ont été marqués par l'anticorps dirigé contre la caspase 3 activée chez les animaux SOD1 (têtes de flèches sur la Figure 29 B). Ces résultats montrent donc pour la première fois qu'en plus des motoneurones, les interneurones cholinergiques présents autour du canal central expriment des facteurs apoptotiques à P100, et donc dégénèrent chez les souris SOD1.

D. Discussion

Les boutons en C seraient impliqués lors de taches motrices requérant une décharge motoneuronale importante telle que la nage (Zagoraïou *et al.*, 2009). En ce sens, l'activation des récepteurs postsynaptiques M2 a pour effet d'inhiber l'entrée de calcium dans les motoneurones, de bloquer l'activation des courants potassiques à l'origine de l'AHP et ainsi de ne pas limiter la fréquence de décharge des motoneurones. Ces synapses joueraient donc un rôle crucial dans la régulation de l'activité motoneuronale.

Des études précédentes ont montré que les boutons en C qui contactent les motoneurones subissent des changements morphologiques en conditions physiologiques et pathologiques (Pullen & Sears, 1983; Feng-Chen & Wolpaw, 1996; Pullen & Athanasiou,

2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2013). Dans ce travail, nous avons confirmé et étendu cette notion en étudiant l'évolution au cours de l'âge de ces synapses, de l'un de leurs partenaires postsynaptiques, les récepteurs M2 ainsi que de leurs neurones sources, les interneurons cholinergiques de la lamina X, chez des souris WT et SOD1. Cette étude a révélé une dynamique complexe tant au niveau pré- que postsynaptique de ces connexions synaptiques cholinergiques non seulement durant leur mise en place mais aussi durant leur maturation chez l'animal sain. Chez les souris SOD1, il est apparu que les paramètres morphologiques des boutons en C ainsi que la dynamique des récepteurs M2 qui leur sont associés étaient fortement perturbés et ceci dès les premières semaines postnatales. Nos données montrent également que les interneurons cholinergiques en plus d'être plus nombreux dans les segments lombaires L2 des souris SOD1 dégénèrent dans les stades présymptomatiques de la SLA. En cela, notre étude constitue une avancée importante dans la compréhension de la physiologie des réseaux moteurs spinaux et de la physiopathologie de la SLA dans le modèle SOD1.

Le système cholinergique spinal chez les animaux WT.

On considère classiquement qu'un rongeur atteint l'âge adulte à P60-P75 (Andersen, 2003). Il est frappant de constater que chez la souris WT comme chez le rat (Wetts & Vaughn, 2001), les boutons en C présentent une maturation de longue durée avec une aire qui croît de manière progressive jusqu'à P40-P75. La ré-augmentation du nombre de boutons en C à P100 que nous avons décrit dans cette étude suggère, de plus, que ces synapses cholinergiques ne sont pas figées mais présentent à l'inverse un remodelage permanent tout au long de la vie de l'animal.

La densité postsynaptique (postsynaptic density, PSD) adjacente aux boutons en C au niveau de la membrane postsynaptique des motoneurons contient des accumulations (clusters des Anglo-Saxons) de récepteurs M2 (Hellström *et al.*, 2003), de canaux Kv2.1, responsables de la rectification retardée (Muennich & Fyffe, 2004) et de canaux potassium dépendants du calcium, les SK à l'origine de l'AHP (Deardorff *et al.*, 2013; pour revue voir Witts *et al.*, 2013; Deardorff *et al.*, 2014). Afin d'assurer une transmission synaptique efficace, les récepteurs postsynaptiques doivent être confinés/rassemblés dans la PSD grâce à des protéines d'échafaudage qui assurent l'ancrage des récepteurs postsynaptiques et de leurs cibles au cytosquelette (Choquet & Triller, 2013). Un article récent a montré que la PSD des boutons en C est une structure hautement organisée présentant une structure en "mosaïque" des récepteurs M2, des canaux Kv2.1 et SK2/3 (Deardorff *et al.*, 2014). Nous avons montré dans

	P1	P10	P21	P40	P75	P100
Mn perimeter	-	-	=	=	=	=
C-Bouton nb	na	=	+	+	=	-
C-Bouton area	na	-	+	=	=	-
M2 ratio	=	=	=	=	-	-
Nb of Ins in L2 segment	na	+	na	+	na	=

Figure 30. Tableau récapitulatif de l'évolution des différents paramètres analysés chez les souris SOD1 comparé aux WT à différents âges postnataux (P). - inférieur, = équivalent, + supérieur, na: non analysé. Mn: motoneurone, nb: nombre, Ins: Interneurones de la lamina X.

ce travail que le nombre de boutons en C chez la souris WT augmentait progressivement entre P10 et P21 pour se stabiliser ensuite jusqu'à P75. Cette augmentation du nombre de synapses cholinergiques est accompagnée par une diminution de l'aire occupée par les récepteurs M2 postsynaptiques, sous les boutons en C et d'une augmentation de l'intensité du marquage de ces récepteurs. Ces données suggèrent donc que les récepteurs M2 se clustérisent avec l'âge dans la membrane motoneuronale adjacente aux boutons en C. À P100, à l'inverse, on observe une ré-augmentation du nombre des boutons en C, comme cela a déjà été montré préalablement (Wetts & Vaughn, 2001). Cette recrudescence du nombre de boutons en C est associée à une dispersion des récepteurs M2 sous ces synapses avec des valeurs de ratio de l'aire occupées par les récepteurs M2 sous les boutons en C équivalentes à celles mesurées à P10.

L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'en conditions physiologiques, les boutons en C subissent des modifications structurales dynamiques complexes jusqu'à des stades tardifs de développement. Des expériences complémentaires seront cependant nécessaires afin de déterminer si l'augmentation de boutons en C observée à P100 correspond à un ajout de boutons en C supplémentaires ou à un renouvellement complet de ces terminaisons cholinergiques et si ce processus se répète au cours de la vie des animaux.

Le système cholinergique spinal chez les souris SOD1.

Nos résultats viennent confirmer les observations faites dans les études précédentes et qui tendent à décrire une altération du système cholinergique à l'origine de la modulation des motoneurons dans les stades présymptomatiques de la SLA (Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013). Cependant, nos observations permettent d'aller beaucoup plus loin dans la description de ces modifications à la fois en termes d'échelonnement développemental mais également en caractérisant plus avant le type de modification affectant le système cholinergique. La figure 30 résume l'évolution des différents paramètres analysés au cours de l'âge chez les souris SOD1 par rapport aux animaux WT. Il apparaît que dès les stades précoces du développement, le système cholinergique spinal diffère de celui des animaux WT avec une aire des boutons en C plus petite et une lamina X contenant plus d'interneurones cholinergiques dans les segments lombaires L2. Au cours du développement (P21-P40), une hyper-innervation cholinergique des motoneurons SOD1 se met en place avec des boutons en C plus grands et présents en plus grand nombre que dans les motoneurons WT aux mêmes stades. Cette hyperinnervation pourrait être liée au fait que la lamina X des segments lombaires L2 contient plus

d'interneurones cholinergiques chez les SOD1. Il a en effet, été montré que les interneurones cholinergiques présents dans les segments lombaires hauts connectent les motoneurones de segments plus distaux (Stepien *et al.*, 2010). Enfin à partir de P75, stade où les motoneurones ont déjà commencé à dégénérer, on observe une dégradation générale du système cholinergique spinal caractérisée par une baisse du nombre de boutons en C et de leur aire sur les motoneurones survivants, d'une diminution de l'expression des récepteurs M2 dans la moelle ventrale et d'une dégénérescence des interneurones cholinergiques de la lamina X. Nos données sur le modèle animal de la SLA sont donc en corrélation directe avec les observations faites chez les patients SLA. En effet, une perte des synapses cholinergiques a été reportée chez les patients SLA, dans des stades avancés de la maladie (Nagao *et al.*, 1998). Il avait alors été proposé que des dysfonctions synaptiques pourraient précéder les processus dégénératifs induisant la perte synaptique et neuronale dans la SLA (Sasaki & Maruyama, 1994; Matsumoto *et al.*, 1994; Ikemoto *et al.*, 2002), sans qu'aucune étude jusqu'alors ne s'intéresse à décrire de tels phénomènes au niveau du système cholinergique spinal.

Il a été montré dans une étude précédente une baisse de la densité d'expression de la ChAT dans ces interneurones cholinergiques chez les souris SOD1 (Casas *et al.*, 2013). Cette étude a décrit une diminution transitoire du contenu cholinergique des interneurones, et des motoneurones, chez les souris SOD1 âgées d'un mois, sans pour autant mettre en évidence l'existence d'une dégénérescence de ces interneurones. Cependant, l'assertion selon laquelle les motoneurones sont les seules cellules à dégénérer dans la SLA a souvent été remise en cause. Il a par exemple été suggéré que des interneurones spinaux glycinergiques (Chang & Martin, 2011b) subiraient des processus neurodégénératifs chez les souris SOD1. De même, de plus en plus d'auteurs s'intéressent aux altérations synaptiques et des interneurones spinaux s'exprimant avant la dégénérescence motoneuronale liée à la SLA (Morrison *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2007; Pullen & Athanasiou, 2009; Hossaini *et al.*, 2011; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013). En accord avec ces travaux, nos données corroborent le fait que les motoneurones ne sont pas les seuls neurones dégénérant dans la moelle épinière des souris SOD1 mais qu'au moins certains sous-types d'interneurones sont aussi la cible de processus apoptotiques.

De manière très intéressante, l'analyse du marquage M2 sous les boutons en C que nous avons réalisée, a montré que le phénomène de clusterisation et de renouvellement/réorganisation synaptique observé dans les motoneurones WT n'était pas présent dans les motoneurones SOD1. Les valeurs de ratio de l'aire occupée par les récepteurs M2 sous les boutons en C ne présentent, en effet, pas de variation avec l'âge de l'animal, à

l'inverse de celles obtenues chez les WT. Il a été montré que les canaux Kv2.1 postsynaptiques adjacents aux boutons en C présentent des phénomènes de déclusterisation suite à la lésion d'un nerf périphérique (Romer *et al.*, 2014) via un mécanisme de déphosphorylation dépendant du couple Ca^{2+} /Calcineurine (Deardorff *et al.*, 2014). De plus en plus d'études font maintenant le lien entre les protéines d'échafaudage de la PSD (scaffolding) et la physiopathologie de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (voir par exemple : Gardoni *et al.*, 2010; Proctor *et al.*, 2011; Guilmatre *et al.*, 2013). Il est à noter que ces modifications sont la plupart du temps détectées avant tout signe de dégénérescence neuronale. Alors que de telles altérations des protéines d'échafaudage ont été mises en évidence dans l'hippocampe des souris SOD1 (Shin *et al.*, 2005), nous ne disposons, à notre connaissance, d'aucune donnée concernant de possibles modifications de ces protéines dans les motoneurons SOD1. Il nous apparaît donc crucial d'étudier plus avant la structure fine des boutons en C en situation physiologique et physiopathologique. Une analyse en microscopie à haute résolution telle que le dSTORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) pourrait, par exemple, permettre de comparer de manière précise l'ultrastructure post- et présynaptique des boutons en C chez les souris WT et SOD1.

Impact fonctionnel.

Les données obtenues dans cette étude viennent compléter et étoffer les différentes analyses réalisées sur l'évolution des boutons en C chez la souris sauvage et SOD1 (Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2013). Certains de ces travaux présentent des divergences entre eux ainsi qu'avec nos résultats (Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2013) pouvant être inhérentes aux méthodes d'analyse, aux modèles animaux utilisés, ainsi qu'à la méthode utilisée pour marquer les boutons en C. En effet, les boutons en C peuvent être positifs à un marquage ChAT et négatif à un marquage du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VaChT) chez les animaux P100 SOD1 (observation personnelle non publiée). Le marquage de la ChAT apparaît alors comme un moyen fiable pour visualiser les terminaisons cholinergiques chez ces animaux puisqu'il est maintenu tout au long de la progression de la maladie. Malgré ces divergences, l'ensemble de ces études s'accordent sur un point : le système cholinergique est altéré dans la SLA et ceci de façon précoce, avant l'apparition des symptômes. À P1-P10, nous n'avons néanmoins constaté aucune modification fonctionnelle de la neuromodulation cholinergique spinale que celle-ci soit analysée au niveau

extracellulaire ou intracellulaire. Dans une étude récente, nous avons montré que le taux de dopamine spinale différait entre les souris WT et SOD1 mais que la modulation dopaminergique était identique entre les deux génotypes (Milan *et al.*, 2014). Bien que des altérations morphologiques et physiologiques des motoneurones aient été décrites dans ces stades précoces (Amendola *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2006; Borjes *et al.*, 2007; Amendola & Durand, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Filipchuk & Durand, 2012), les capacités rythmogènes des réseaux moteurs spinaux des animaux SOD1 sont comparables aux animaux WT lors de leur stimulation par du NMA-5HT (Milan *et al.*, 2014). De même, notre étude montre que le nombre accru d'interneurones cholinergiques dans les segments L2 ainsi que l'aire réduite des boutons en C connectant les motoneurones à P10 n'a pas d'effet sur la neuromodulation cholinergique des motoneurones SOD1. L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement l'existence de mécanismes compensatoires visant à annuler les modifications structurelles mises en évidence au sein des réseaux moteurs spinaux, dans des stades précoces du développement. Tout du moins, il semblerait qu'à des stades où les modifications des contacts synaptiques cholinergiques sur les motoneurones bien que présentes sont encore ténues, le réseau moteur spinal de ces animaux arrive à compenser afin de produire une activité locomotrice normale (Milan *et al.*, 2014; ces travaux) et à réagir à l'activation de ce système neuromodulateur dans des gammes de réponses physiologiques. Chez les animaux entre P10 et P40, la question se pose alors de savoir si la surabondance d'interneurones cholinergiques de la lamina X que nous observons dans les segments L2 ainsi que l'augmentation du nombre de boutons en C sur les motoneurones SOD1 font partie intégrante de ces mécanismes compensatoires ou si cet état hyper-cholinergique est préjudiciable pour les motoneurones et favorise l'avancée de la pathologie. Les boutons en C sont impliqués dans les tâches motrices nécessitant une décharge importante des motoneurones, telles que la nage par exemple (Zagoraïou *et al.*, 2009). En ce sens, la libération d'acétylcholine au niveau des boutons en C inhibe l'expression de l'AHP et augmente la fréquence de décharge des motoneurones (Miles *et al.*, 2007) favorisant ainsi une augmentation de leur excitabilité. Il a été récemment démontré que l'hyperexcitabilité pouvait avoir un rôle neuroprotecteur sur les motoneurones SOD1 et que l'application d'un antagoniste des récepteurs muscariniques, la methoctramine, favorise l'accumulation de protéines SOD1 mal configurées dans ces neurones (Saxena *et al.*, 2013). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'hyperinnervation cholinergique que nous décrivons dans cette étude pourrait constituer un mécanisme "d'autodéfense" des motoneurones SOD1. Les altérations de la clusterisation du récepteur M2

pourraient cependant constituer une menace de ce potentiel mécanisme protecteur en agissant sur l'efficacité de la libération d'acétylcholine à agir sur son récepteur.

Il est aujourd'hui encore difficile d'enregistrer en intracellulaire des motoneurones sur tranches issues de souris adultes (voir cependant (Mitra & Brownstone, 2012). Il serait néanmoins intéressant de réaliser des expériences complémentaires à cette étude, notamment chez des animaux plus âgés afin d'enregistrer par exemple en patch-clamp *in vivo* l'effet d'un agoniste cholinergique sur des motoneurones entre P40 et P75, stades où ces mécanismes compensatoires deviennent de moins en moins efficaces et où la dégénérescence neuronale s'enclenche.

De plus, la dépolarisation soutenue des motoneurones suite à une stimulation commissurale est un mécanisme sous-tendu par l'activation de plusieurs types de récepteurs muscariniques. En effet, ce phénomène impliquerait les récepteurs muscariniques M1, M2 et M3 (Brown, 2010; Bertrand & Cazalets, 2011). On peut donc supposer que lors d'une stimulation commissurale, l'effet de l'activation des M2 par les boutons en C soit quelque peu atténué par les réponses muscariniques liées à d'autres types de synapses et de récepteurs. Ce phénomène pourrait en partie expliquer le fait qu'aucune conséquence fonctionnelle des modifications du système des boutons en C ne soit observable. On peut de même imaginer que face à ces modifications, les voies modulatrices muscariniques passant par l'activation des récepteurs M1 et M3 engagent des processus compensatoires afin de conserver une réponse muscarinique globale dans une gamme physiologique.

En conclusion nos résultats montrent que des altérations précoces affectant le système cholinergique, dès les premiers jours de la vie des animaux SOD1, pourraient participer à la mise en place d'un réseau modulateur spinal reconfiguré. Ces modifications physiopathologiques précoces participent très probablement à l'activation des mécanismes dégénératifs dans les stades plus tardifs, lorsque le système ne peut plus compenser. De plus, l'atteinte des interneurones cholinergiques, en amont de la modulation motoneuronale, soulève la question de l'origine de la dégénérescence neuronale dans la SLA. Les motoneurones ont longtemps été considérés comme les seuls neurones affectés chez les patients, comme chez les modèles animaux, sans que l'on puisse identifier de facteur à l'origine de leur ciblage par les processus dégénératifs. La mise en évidence d'une perte des interneurones concomitante à celle des motoneurones ouvre la piste d'un ciblage dégénératif des neurones en fonction de leur phénotype neurochimique, plus qu'en fonction de leur rôle au sein du réseau (Tata *et al.*,

2014). Nos résultats suggèrent que le système cholinergique constitue un système modulateur de choix dans le développement de nouvelles cibles thérapeutiques de la SLA.

CHAPITRE 3:

*Suivi optocinétique de longue durée des capacités et habitudes motrices
des souris SOD1 modèles de la SLA.*

A. Introduction

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative se déclenchant à l'âge adulte et entraînant chez les patients une atrophie musculaire et une paralysie progressive aboutissant à la mort dans un délai très court après l'apparition des symptômes.

Bien que tous les muscles squelettiques, exceptés ceux contrôlant les sphincters et les yeux soient affectés dans la SLA, la chronologie de l'atteinte motrice et l'évolution de la maladie peuvent varier d'un patient à l'autre (Tan *et al.*, 1986; Hillel & Miller, 1989; Pradat & Bruneteau, 2006a; 2006b; McDermott & Shaw, 2008). Ainsi, en fonction du site d'initiation de l'atteinte motoneuronale, la maladie va se manifester en premier lieu par des difficultés à marcher ou à saisir des objets, ou bien par des troubles de la déglutition et de la parole, puis se généraliser. Malgré ces divergences, la SLA est caractérisée par un ensemble de symptômes moteurs incluant des faiblesses musculaires progressives, une atrophie des muscles, des fasciculations et des raideurs musculaires au niveau des membres ainsi que le développement d'une spasticité et la mise en place de réflexes tendineux exagérés.

Chez l'homme, le diagnostic de la maladie n'est malheureusement la plupart du temps possible qu'une fois les symptômes moteurs déclenchés, et donc lorsque la dégénérescence des motoneurons est déjà à des stades très avancés. L'utilisation de modèles animaux a permis de montrer que des modifications des capacités motrices seraient présentes, bien avant que les symptômes ne soient clairement détectables (Kanning *et al.*, 2010). De nombreuses études basées sur ces modèles se sont appliquées à étudier l'apparition et l'évolution des déficits moteurs (Kanning *et al.*, 2010). En effet, le phénotype pathologique développé suite à l'insertion du transgène muté est complexe.

Chez les SOD1^{G93A}, c'est à l'âge de 3/4 mois (autour de P90/P100) qu'une paralysie des membres postérieurs apparaît de manière claire et détectable à l'œil. Ce phénomène est clairement lié à la perte neuronale drastique initiée à ces stades et qui sous-tend la perte de stimulation des muscles et leur atrophie (Hegedus *et al.*, 2007). Cette paralysie progressive est rapidement suivie d'un déclin de l'état global de la motricité des souris et d'une paralysie complète des membres dans les semaines qui suivent (Gurney *et al.*, 1994). Le décès des animaux intervient alors dans un délai très court, leur conférant une espérance de vie limitée à environ 120 jours (Gurney *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2008).

Cependant, outre la paralysie musculaire directement liée à la dégénérescence des motoneurons dans les stades tardifs du développement des souris SOD1, des études ont montré la présence d'altérations motrices et posturales dans les stades précoces de la maladie,

bien avant que les motoneurones ne dégénèrent. Ces déficits moteurs précoces seraient donc plus sous-tendus par des modifications profondes des réseaux moteurs que par la mise en jeu de mécanismes dégénératifs. En effet, chez ces souris, un léger affaiblissement des pattes postérieures et une diminution de l'activité motrice ont été mis en évidence dès 40 à 50 jours après la naissance (Veldink *et al.*, 2003; Wooley *et al.*, 2005; Kanning *et al.*, 2010), entraînant alors un déclin de leur force musculaire globale (changement de démarche, perte de vitesse d'exécution). De nombreuses études sont venues confirmer ces observations en décrivant une symptomatologie motrice détectable par des tests comportementaux classiques aux alentours de P50, donc avant que la paralysie ne soit clairement visible (Veldink *et al.*, 2003; Wooley *et al.*, 2005; Mancuso *et al.*, 2011b; 2011a; Mead *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 2012a). Cependant, certaines études sont allées encore plus loin, et des déficits moteurs bien plus précoces ont été rapportés chez ces souris. Dès les premières semaines postnatales, les souris SOD1 semblent en effet présenter un défaut de placement des pattes lors de la marche (Van Zundert *et al.*, 2008 ; Kanning *et al.*, 2010).

Ces données suggèrent que des différences de capacités motrices seraient présentes avant même que les neurones moteurs ne dégénèrent.

Cependant, la grande majorité des études comportementales pratiquées chez les souris SOD1 se sont focalisées sur la description de déficits moteurs précis dans des tests de la motricité ponctuelle en réponse à un stimulus ou à une modification de l'environnement donné. C'est par exemple le cas du test de marche sur tapis roulant, avec mise en place ou pas d'un obstacle à éviter, des tests de nage forcée (Deforges *et al.*, 2009), ou du test de rotarod servant à décrire la capacité physique d'une souris à adapter sa force et son mouvement afin de rester en équilibre sur une roue en mouvement (Gerber *et al.*, 2012a). Bien qu'ayant largement prouvé leur utilité en termes de description de l'état physiologique moteur des animaux, et qu'utilisés en routine afin de décrire les comportements et altérations motrices impliqués dans de nombreuses pathologies (Arendash *et al.*, 2004; Laviola *et al.*, 2009; Schäfer & Hermans, 2011; Brooks *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2012), ces tests se focalisent sur les capacités motrices des animaux à un instant donné et détaillent leur mode de déplacement et d'adaptation, sans permettre de décrire les habitudes motrices des animaux, dans leur environnement quotidien.

À l'heure actuelle en effet, les techniques d'enregistrements du comportement et des capacités motrices de souris sont limitées à une analyse précise et détaillée du comportement moteur à un instant donné de la vie de l'animal. La manipulation des animaux et leur

changement d'environnement peuvent de plus engendrer des conséquences cognitives et comportementales sur les animaux et interférer dans l'interprétation des résultats, bien que de nombreux efforts soient réalisés en ce sens pour minimiser ces effets (Bonney *et al.*, 2005a). La grande majorité des études comportementales sont cependant basées sur une analyse de la motricité ponctuelle, issue de tests moteurs comportementaux tels que le rotarod, l'open-field ou bien encore la marche ou la nage forcée. Ce type d'étude ponctuelle renseigne sur les capacités de mise en jeu du système moteur à un instant donné et en réponse à un stimulus particulier et ne permet donc pas d'accéder à des données concernant les habitudes motrices, la répartition de l'effort locomoteur au cours du temps ou du rythme circadien (Kudo *et al.*, 2011b; 2011a). Des techniques de suivi comportemental à plus long terme impliquent la plupart du temps la mise en place de moyens matériels très importants. Les données générées par ce genre de protocoles sont extrêmement lourdes et nécessitent de puissantes machines pour leur stockage, rendant leur analyse difficile au-delà d'une semaine après l'acquisition.

La mise en place au laboratoire d'un setup de suivi comportemental à long terme à permis à ce projet de voir le jour. En effet, durant mon doctorat, une plateforme d'analyse du mouvement pour rongeur a été développée au laboratoire, sous l'impulsion de Jean-René Cazalets et avec l'aide d'Emma Bestaven (IE CDD CNRS, INCIA). Cette plateforme, fabriquée en grande partie au laboratoire et utilisant un système de suivi de marqueurs par optocinétique nous a permis d'effectuer, à moindres coûts et avec des besoins matériels réduits, des mesures de l'activité globale et du déplacement des souris, en l'absence de toute intervention humaine ou de changements environnementaux récurrents, et ce, sur une longue durée (plusieurs mois).

Cette étude préliminaire vise à réaliser pour la première fois un suivi à long terme des déplacements de souris WT et SOD1 afin de renseigner sur les capacités et les habitudes motrices de ces souris tout au long de leur développement. Ces travaux ont pour but d'observer *in vivo*, lorsque l'animal est laissé libre de ses mouvements et à l'abri de stress expérimentaux, si le comportement des souris SOD1 diffère de celui des WT, avant même que la dégénérescence motoneuronale n'induisse de paralysie musculaire.

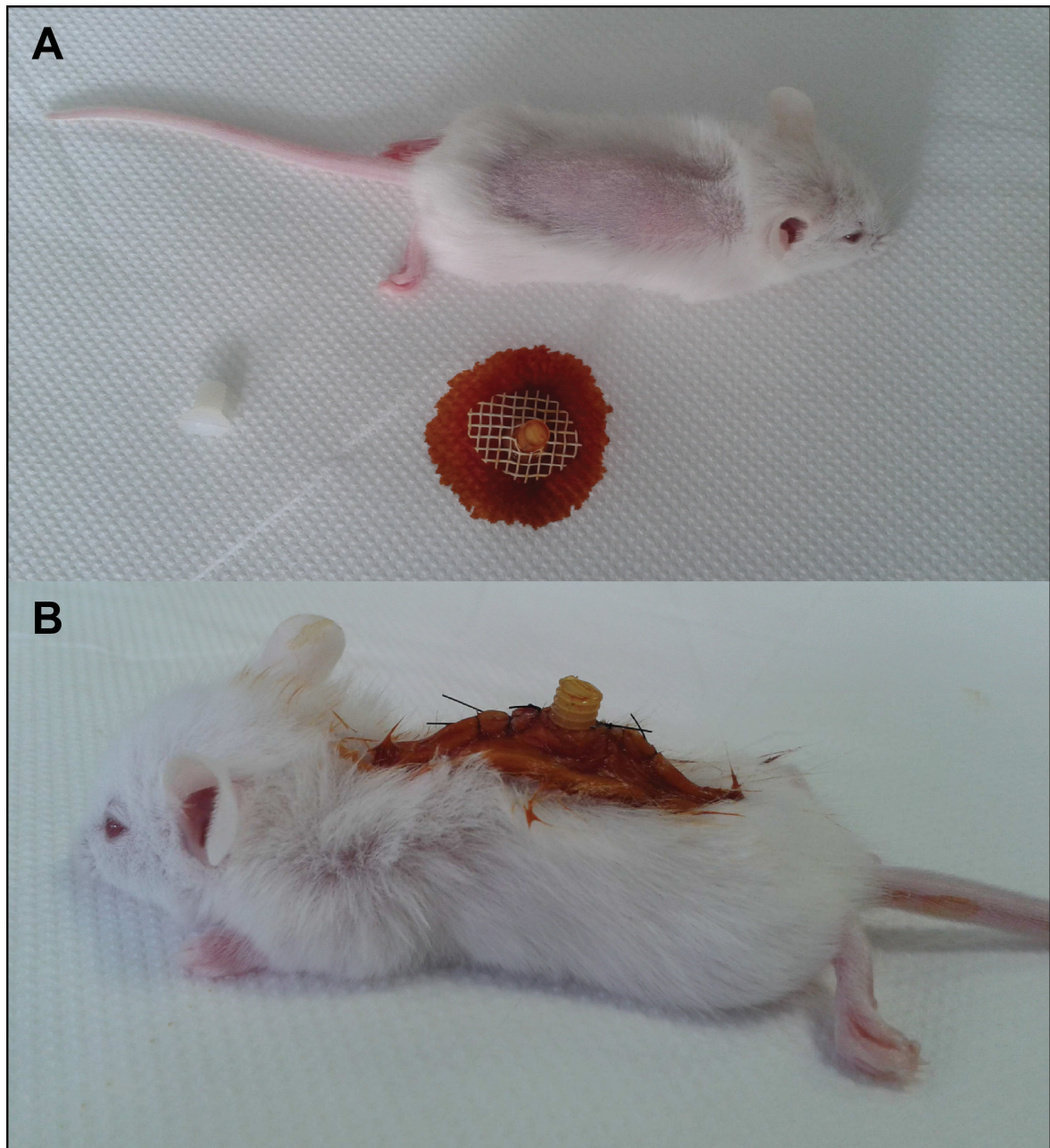


Figure 31 Procédure chirurgicale de mise en place des marqueurs.

Le support permettant par la suite de recevoir les marqueurs réfléchissants les infrarouges était constitué d'un assemblage tulle-vis et placé en sous cutané afin que seule la partie permettant d'ajouter le marqueur ne dépasse du dos de l'animal. Cette procédure a été réalisée sous anesthésie générale.

B. Matériel et méthodes

Cette étude comportementale a été réalisée avec l'aide d'Emma Bestaven, qui s'est occupée de l'entretien quotidien des souris et de l'analyse des données, ainsi que de la supervision des expériences.

Cette étude de suivi a été réalisée sur un groupe total de 16 souris : 8 SOD1 et 8 témoins, opérées à leur sevrage à 21 jours pour l'implantation des marqueurs et enregistrées de 28 à 89 jours postnataux (après 7 jours de repos post-opératoire).

1. Implantation chirurgicale des marqueurs

Les marqueurs (sphères réfléchissant les infrarouges) ont été implantés de façon permanente à l'aide d'une technique chirurgicale visant à les fixer au niveau du dos des animaux (Figure 31).

Pour cela, des souris SOD1 G93A tout juste sevrées (P21) ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (Imalgene® 1000, 100mg/kg) et de xylazine (Rompun® 2 %, 10mg/kg) avant de pratiquer une incision au niveau du dos. Un dispositif composé d'une tige en plastique surmontée d'une sphère réfléchissante a alors pu être implanté en sous-cutané. Des points de suture étaient alors effectués (ethicon F2413, 5-0 16mm) afin de refermer correctement la peau de l'animal autour du dispositif de marquage. Les souris ont été placées sous une lampe chauffante et sous surveillance jusqu'à leur réveil puis placées dans des cages individuelles durant une semaine afin de se remettre de l'effet de l'anesthésie et de s'habituer à la présence du marqueur. Le poids moyen du dispositif au complet (la sphère pouvant être vissée ou dévissée à volonté sur la tige) était de 0,81 gramme soit 4,1% du poids corporel d'une souris de 20 grammes.

Une fois la semaine de rémission passée, les souris ont été placées dans des cages individuelles adaptées au système d'acquisition (biberon fixé à l'extérieur de la cage, nourriture à l'intérieur, système de fermeture des cages modifié et emplacement de chacune délimité précisément).

2. Système de capture, entretien des souris et analyse comportementale

Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un système de capture optoélectronique OptiTrack (NaturalPoint, Corvallis, Etats-Unis) enregistrant les positions tridimensionnelles des marqueurs portés par l'animal. Deux caméras minimum sont requises afin de pouvoir reconstruire la position des marqueurs en trois dimensions (3D). L'ajout d'une troisième

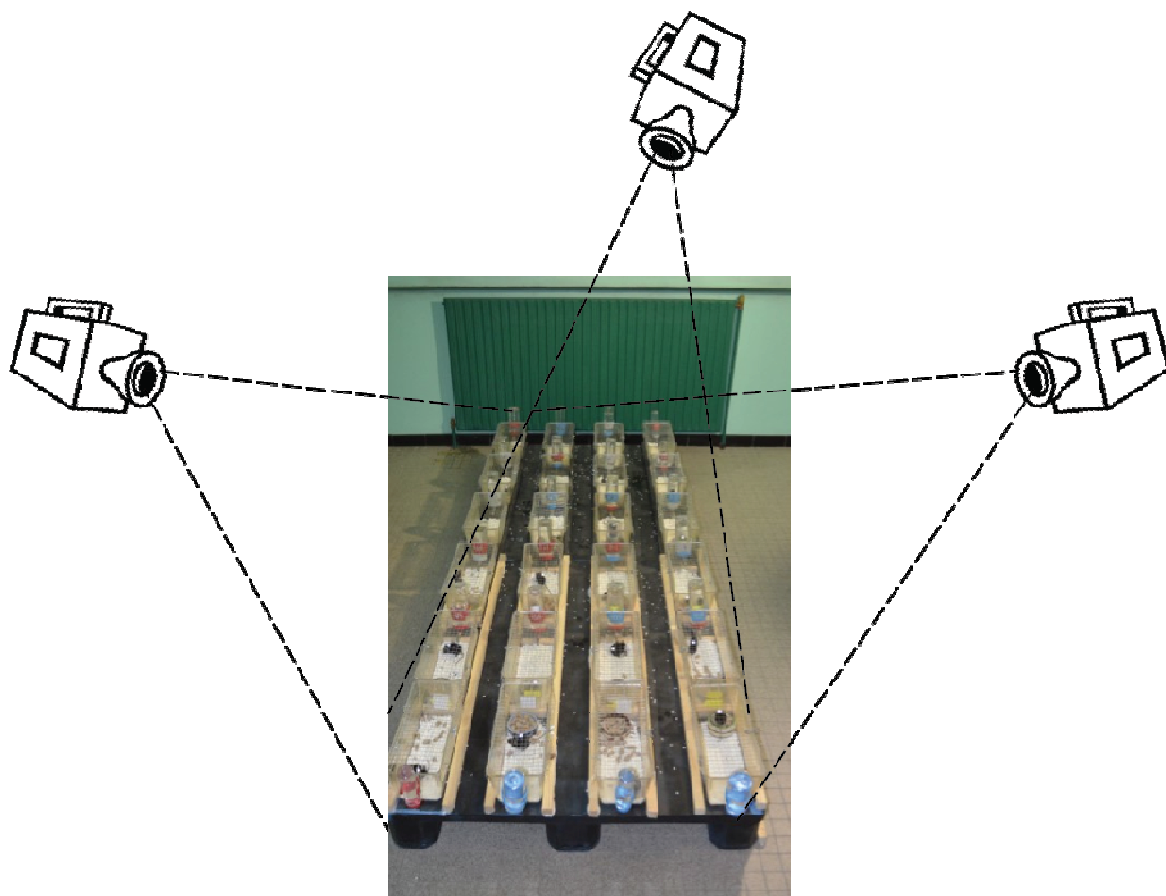


Figure 32 Dispositif d'enregistrement par suivi optocinétique

Les cages contenant les souris étaient positionnées selon des emplacements délimités, sur une plateforme noire, afin de réduire au maximum les artefacts. Trois caméras étaient positionnées dans la pièce afin de couvrir tout le champ contenant les cages et de permettre une reconstruction en 3D de la position des marqueurs tout en limitant leur occultation.

caméra a permis d'améliorer la qualité de l'acquisition en limitant l'occultation des marqueurs. Le système de capture était donc composé de trois caméras à diodes électroluminescentes (LED) infrarouges (V100 : R2, NaturalPoint) disposées de façon à filmer l'ensemble du volume à capturer par le haut (vue de dessus). Les caméras étaient reliées à un ordinateur via un concentrateur USB. Les marqueurs passifs utilisés, étaient des sphères ou des demi-sphères recouvertes d'une substance réfléchissant le signal lumineux émis par les LED infrarouges portées par les caméras. Afin d'établir une relation entre les coordonnées d'un marqueur dans l'espace et le marqueur associé dans l'image, une calibration du système est nécessaire. Cette calibration est réalisée en deux étapes : une calibration dite « statique » suivie d'une calibration dite « dynamique ».

La calibration statique permet d'affecter un référentiel (X, Y, Z) fixe au volume de capture. Pour cela, un objet de référence cartésien (Calibration Square, NaturalPoint) a été disposé sur une surface plane et filmé durant quelques secondes par l'ensemble des caméras. La calibration dynamique permet de délimiter le volume de capture dans lequel l'acquisition est effectuée (Bonney *et al.*, 2005b). Cette étape a été réalisée en balayant l'espace à l'aide d'une mire de calibration (OptiWand, NaturalPoint) composée de trois marqueurs séparés d'une distance connue par le système. La vue deux dimensions (2D) de chaque caméra est affichée à l'écran pendant cette phase de calibration dynamique afin de prendre connaissance du remplissage du volume. Une fois la calibration terminée, la position des caméras doit rester strictement identique tout au long de l'acquisition afin d'éviter tout biais lors de la reconstruction tridimensionnelle.

Une fois la calibration effectuée, les souris ont été placées dans les cages individuelles prévues pour l'acquisition. Préalablement aux acquisitions, les «marqueurs fantômes», artefacts dus à des reflets fixes, ont été supprimés et les paramètres intrinsèques des caméras ajustés. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du logiciel Tracking Tools (NaturalPoint, Corvallis) à une fréquence d'une image par seconde (Figure 32).

Les données recueillies ont été analysées à l'aide d'un programme spécifique développé avec le logiciel de programmation Matlab® (MathWorks Inc, Natick) dans le but de lire les coordonnées X, Y et Z des points et de calculer les paramètres tels que la distance parcourue et la vitesse. Ces mesures ont ensuite pu être classées en fonction du temps, de l'âge des souris mais aussi des cycles jour/nuit.

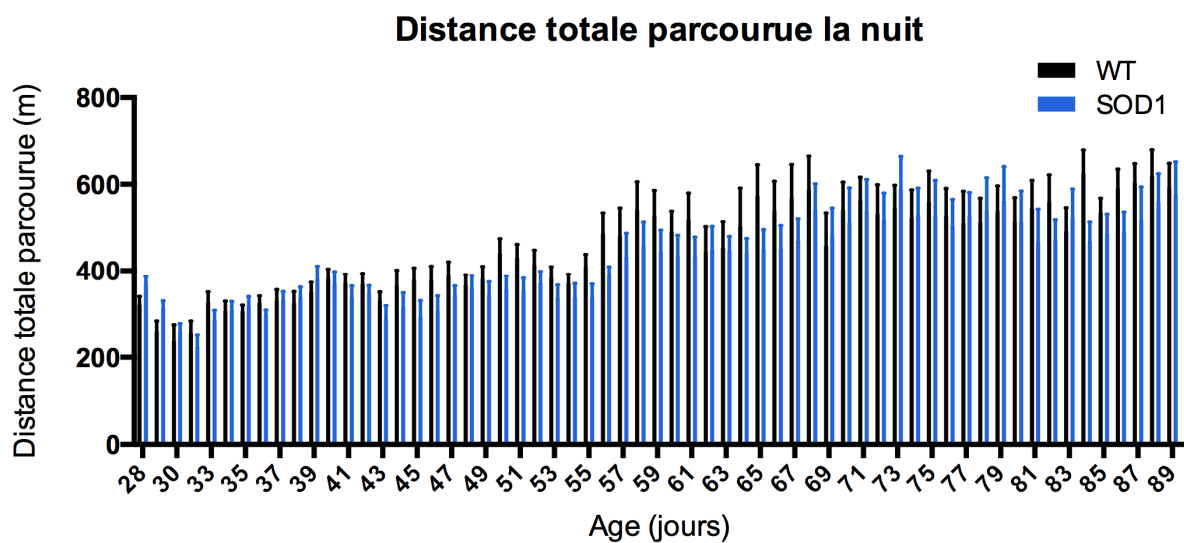


Figure 33 Evolution de la distance totale parcourue par les souris WT et SOD1 durant leur phase active (la nuit) en fonction de l'âge.

La distance moyenne totale parcourue (en m) en 12h durant la nuit (période d'activité des souris) est représentée en fonction de l'âge (en jours) des souris WT (noir) et SOD1 (bleu).

Afin de veiller au bien être des souris, celles-ci étaient surveillées quotidiennement par un même utilisateur qui se chargeait de leur assurer la présence d'eau et de nourriture ad libitum. De plus, un suivi régulier de leur poids a été effectué, afin de refléter d'éventuelles variations de leur état physiologique.

C. Résultats

Les souris WT et SOD1 parcourent des distances équivalentes au cours de leur développement.

Une première analyse des enregistrements optocinétiques obtenus nous a permis de calculer la distance moyenne totale parcourue par les animaux durant 12h, soit dans la phase d'activité (Figure 33), soit durant la phase de repos (Figure 34) des animaux pendant les 2 mois qu'ont duré les enregistrements. Nos résultats montrent que plus les souris WT vieillissent, plus elles parcourent des distances de plus en plus importantes durant leur phase d'activité. En effet, à environ P30-40 les souris parcourent entre 300 et 400 mètres par nuit, cette distance étant pratiquement doublée dès l'âge de P65 et jusqu'à P100 où l'on comptabilise pratiquement 600 m de distance parcourue (Figure 33). Durant leur phase de repos au contraire, les souris WT conservent un niveau d'activité relativement stable au cours du temps, puisque la distance totale parcourue dans cette phase reste autour de 300 m tout au long de la période d'âge testée (Figure 34). Concernant les souris transgéniques SOD1, on observe que la distance parcourue en 12h est relativement semblable à celle des souris WT que ce soit pendant la phase d'activité (Figure 33) ou de repos (Figure 34). Aucune différence significative n'a d'ailleurs été constatée entre les deux génotypes.

Bien que nos résultats ne permettent pas de conclure quant à des divergences d'habitudes motrices entre WT et SOD1, une observation plus poussée des graphes de répartition de la distance parcourue par les souris durant leur période d'activité nous a permis d'observer quelques variations d'un génotype à l'autre en fonction de l'âge des animaux. En effet, concernant les déplacements durant la période d'activité des souris (Figure 33), on constate que chez les souris âgées d'environ 30 à 40 jours, les distances moyennes parcourues par les deux génotypes sont sensiblement identiques. À partir de P43 cependant, la distance parcourue par les SOD1 est systématiquement inférieure de quelques dizaines de mètres à celle des WT jusqu'à P68 où les souris SOD1 retrouvent une activité égale à celle des WT.

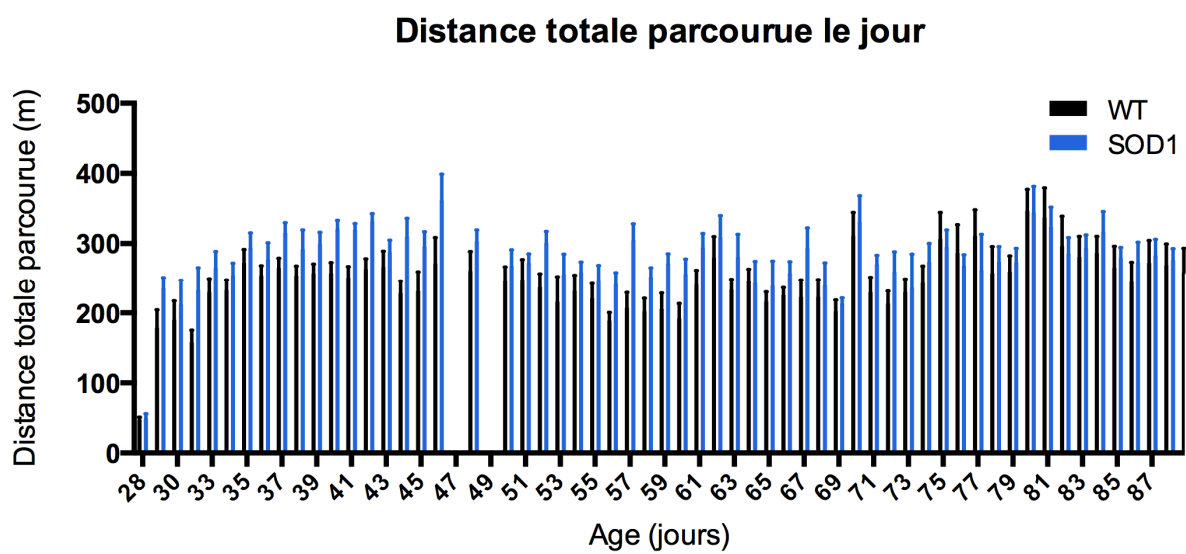


Figure 34 Evolution de la distance totale parcourue par les souris WT et SOD1 durant leur phase de repos (le jour) en fonction de l'âge.

La distance moyenne totale parcourue (en m) en 12h durant le jour (période de repos des souris) est représentée en fonction de l'âge (en jours) des souris WT (noir) et SOD1 (bleu).

Enfin on retrouve une légère tendance pour les SOD1 à parcourir moins de distance que les WT pendant la phase d'activité autour de P80 (Figure 33).

De la même façon, l'étude approfondie des résultats obtenus lors des enregistrements le jour, période plutôt dédiée au repos des souris, montre une tendance des animaux SOD1 à être plus actifs que les WT, dans le sens où ils parcourent plus de distance de P30 à P75, sans pour autant que l'effet du génotype sur l'activité soit significatif. Autour de P80, âge qui correspond au début de l'atteinte dégénérative des souris SOD1, la distance parcourue par ces souris revient à des niveaux légèrement inférieurs à celle des souris WT (Figure 34).

D. Discussion et perspectives

Cette étude, bien que très préliminaire, constitue la première description du comportement moteur volontaire des souris modèle de la SLA, au quotidien. Les résultats obtenus ne démontrent aucune différence significative entre les animaux WT et les SOD1. Cependant, ces données préliminaires laissent entrevoir quelques variations dans la répartition de l'activité. En effet, bien que cette tendance ne soit pas significative, il semble ressortir de nos enregistrements que les souris SOD1 se déplaceraient moins que les WT la nuit, et que cette tendance s'inverserait le jour, dépendamment de l'âge des animaux. Ces observations laissent présager que les souris SOD1 subissent des dérèglements circadiens, ce qui expliquerait leur suractivité en période de repos et leur tendance à moins se déplacer en période d'activité. De tels dérèglements circadiens ont été constatés chez les patients souffrant de SLA (Barthlen & Lange, 2000; Soekadar *et al.*, 2013). Il n'est en effet pas rare d'observer chez les patients atteints de maladies neurodégénératives des altérations des rythmes circadiens, et principalement de la qualité du sommeil (Chokroverty, 1996), à tel point que des traitements thérapeutiques à base de mélatonine favorisant le sommeil ont été envisagés comme médicaments dans le cadre de maladies neurodégénératives (Pandi-Perumal *et al.*, 2013). Chez les souris SOD1 il a été montré que le stress chronique développé par ces animaux pourrait avoir une influence sur l'altération de leurs rythmes circadiens (Fidler *et al.*, 2011). Les patients atteints de SLA bougent beaucoup et présentent des crampes nocturnes durant leur sommeil (Coco & La Bella, 2012; Ebben *et al.*, 2012; Moszczynski *et al.*, 2012). L'ensemble de ces phénomènes accroîtrait donc la fatigue des patients durant la journée. Les premiers résultats obtenus chez nos souris SOD1 iraient donc dans le sens des observations faites chez les patients atteints de SLA. Cependant, les données recueillies sur nos animaux

reflètent leur activité avant même que les symptômes de la SLA n'apparaissent, alors que les observations faites chez l'homme proviennent toutes de patients diagnostiqués et donc souffrant de symptômes moteurs directement liés à une dégénérescence motoneuronale déjà bien avancée.

Nous prévoyons de réaliser une analyse plus fine de la répartition de l'activité motrice au cours de la journée pour chaque animal, afin de caractériser plus avant d'éventuelles perturbations chez les SOD1. En effet, il nous semble intéressant pour la suite de ce projet de se pencher davantage sur la répartition des déplacements des souris SOD1 au cours du temps : s'agit-il de déplacements courts et réguliers, ou au contraire de longues périodes de mobilité suivies de phases de repos ? Enfin, la comparaison des activités d'animaux SOD1 et WT pourrait nous permettre de définir plus clairement si les souris transgéniques subissent un dérèglement précoce de leur rythme circadien, avant même que les symptômes moteurs n'apparaissent.

À partir de P75 et jusqu'à l'arrêt des analyses à P90, nous avons constaté que l'activité des souris SOD1 montrait une tendance à la baisse de nuit comme de jour. Ces résultats sont en accord avec le déclenchement de la dégénérescence motoneuronale dès P50/60 (Schaefer *et al.*, 2005; Kanning *et al.*, 2010).

À court terme, les perspectives de ce travail vont donc être de réaliser une analyse de la vitesse instantanée des déplacements quotidiens des souris WT et SOD1. Une analyse de ce type nous permettra en effet d'observer les patrons d'activité locomotrice des souris : déplacements lents et continus, réguliers, ou bien entrecoupés, courts et rapides... Il a en effet été montré au sein du laboratoire (données non publiées) que les souris WT organisent leurs déplacements suivant un patron très régulier au cours d'une journée. Ce patron est reproduit quasiment à l'identique chaque jour, les souris se réveillant systématiquement à la même heure, et ayant une longue période d'activité la nuit, tandis qu'elles se déplacent de manière beaucoup plus courte et ponctuelle la journée. Il serait intéressant d'obtenir de telles informations concernant les patrons d'activité des souris SOD1.

CHAPITRE 4:

Capacités plastiques des synapses glutamatergiques connectant les motoneurones en culture : étude préliminaire en conditions physiologiques.

A. Introduction

De nos jours, la compréhension et l'étude des mécanismes impliqués dans les maladies neurodégénératives constituent l'une des priorités de la recherche scientifique. Ces dernières années, la multiplication de ces études et le développement de nouvelles techniques expérimentales ont permis d'avancer considérablement dans l'identification de facteurs impliqués dans la perte neuronale dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Parmi ces facteurs, une excitotoxicité liée à la présence en excès du glutamate dans le milieu extracellulaire a été décrite. En effet, l'hyperactivation des récepteurs glutamatergiques induit une entrée massive de Ca^{2+} dans les neurones et déclenche un ensemble de phénomènes intracellulaires qui, dans certains cas, conduisent à l'apoptose des neurones (Ankarcrona *et al.*, 1995; Danbolt, 2001; Ferraiuolo *et al.*, 2011).

Bien qu'indispensable au bon fonctionnement du SNC (Norenberg, 1979; Tokita *et al.*, 1996), le glutamate, s'il est mal régulé, peut donc être à l'origine de mécanismes physiopathologiques. Cette particularité du glutamate à devenir toxique s'il est présent en trop grande quantité a été décrite lors d'expériences visant à décrire l'effet sur le SNC de l'application de glutamate exogène (Hayashi, 1954a; 1954b; Lucas & Newhouse, 1957). Depuis, des dérégulations du système glutamatergique endogène ont été mises en évidence et ce mécanisme physiopathologique a été montré comme impliqué dans un certain nombre de pathologies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson, la chorée de Huntington ou bien encore la maladie d'Alzheimer (Olney, 1969; Ikonomidou & Turski, 1996; Mally *et al.*, 1997; Doherty & Dingledine, 2001; Gubellini *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014b). Il a même récemment été montré que la présence de mécanismes excitotoxiques serait antérieure à la formation de plaques amyloïdes et au développement d'agrégats de protéines tau chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Canas *et al.*, 2014; Zádori *et al.*, 2014; Khundakar & Thomas, 2014), mettant en avant le rôle prépondérant joué par les dérégulations du système glutamatergique dans l'initiation des processus dégénératifs.

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement d'une excitotoxicité au glutamate est également l'une des hypothèses privilégiées concernant les mécanismes dégénératifs impliqués dans la SLA. En effet, il a été montré que le système glutamatergique subissait des modifications importantes chez les patients SLA comme chez les animaux modèles de cette maladie (Rothstein *et al.*, 1992; Plaitakis & Constantakakis, 1993; Lin *et al.*, 1998; Trotti *et al.*, 1999; Van Damme *et al.*, 2005b; Bos *et al.*, 2006; Spalloni *et al.*, 2013)

conduisant à l'accumulation de glutamate dans l'espace extracellulaire, comme cela a été mesuré dans le liquide céphalo-rachidien de patients souffrant de SLA (Rothstein, 1995). De telles modifications de la machinerie du système glutamatergique pourraient avoir des répercussions sur la transmission synaptique au sein des réseaux neuronaux des patients SLA et des modèles animaux (Geracitano *et al.*, 2003; Spalloni *et al.*, 2011). En effet, le glutamate joue un rôle prépondérant dans la communication neuronale et l'adaptation de la transmission synaptique : il est notamment au cœur de processus synaptiques essentiels aux fonctions mnésiques ou motrices (Harris *et al.*, 1984; Collingridge, 1987; Larson & Lynch, 1988). On regroupe ces processus synaptiques sous le nom de plasticité synaptique.

Né du temps des grands philosophes Grecs, le concept de plasticité représente à l'origine la capacité qu'ont les organismes, et principalement les hommes, de modifier leur pensée et leurs actes futurs en fonction de leurs expériences passées. Ainsi, l'histoire personnelle permettrait à chaque individu de se différencier des autres membres de son espèce: « toutes nos pensées sont issues de l'expérience du monde que nous avons » disait alors Aristote. Depuis, bien entendu, le concept de plasticité s'est enrichi, s'est développé, mais son sens est resté intact. Au fil du temps, les connaissances approfondies du SNC et des processus mnésiques qu'il sous-tend, ont apporté un soutien scientifique à ce concept philosophique.

De nos jours, le terme de plasticité est utilisé pour décrire et regrouper les mécanismes permettant au système nerveux central de se modifier, se réorganiser afin de s'adapter aux différentes contraintes ou stimuli qui s'exercent sur lui. On qualifie alors le SNC de malléable, ou plastique. La plasticité est notamment responsable de la diversité de l'organisation fine des réseaux neuronaux entre les individus d'une même espèce, l'organisation générale étant définie par les propriétés génétiques communes à l'espèce. C'est ce concept qui amène aujourd'hui à considérer le SNC comme un système dynamique, en perpétuelle reconfiguration (Begley & Check, 2000).

La plasticité synaptique est la propriété pour un neurone, de modifier la force avec laquelle il va transmettre l'information au neurone suivant, ou bien de modifier sa réponse à la réception d'une information de même intensité. On distingue couramment deux types principaux de plasticité, mettant tous deux en jeu des récepteurs glutamatergiques de type NMDA : 1) la potentialisation qui correspond à une augmentation de la force synaptique et 2) la dépression, phénomène inverse consistant en une diminution de la force synaptique. L'un

des processus majeurs de régulation de la libération synaptique de neurotransmetteur est la plasticité synaptique dépendante de l'activité qui permet à tout instant à une synapse d'adapter son fonctionnement en fonction de son activité antérieure (Bertrand & Cazalets, 2013).

Depuis la mise en évidence en 1915 par Sherrington et Sowton de phénomènes plastiques dans les réseaux de la moelle épinière de chats décérébrés (Sherrington & Sowton, 1915), puis l'utilisation de ces réseaux afin de les étudier (Grumbach & Wilber, 1940; Feng, 1941; Larrabee & Bronk, 1947; Lloyd, 1949; Eccles & McINTYRE, 1953; Evarts & Hughes, 1957), la moelle épinière a été délaissée et très peu d'études s'intéressent actuellement à l'étude de la plasticité synaptique spinale (Wolpaw, 2010; Bertrand & Cazalets, 2013). La plasticité synaptique est néanmoins une propriété cruciale au bon fonctionnement des réseaux neuronaux et à leur adaptation permanente. La moelle épinière et les réseaux moteurs qu'elle abrite ne font pas exception et nécessitent également l'expression de certaines formes de plasticité (Parker, 2000; Wolpaw, 2010; Bertrand & Cazalets, 2013). C'est par exemple le cas lorsque l'on réalise un apprentissage moteur tel qu'un conditionnement opérant (Wolpaw & O'Keefe, 1984; Carp *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2009; Wolpaw, 2010; Chen *et al.*, 2011) ou bien lors d'épisodes locomoteurs où l'expression de plasticité synaptique à long terme peut permettre d'adapter l'activité des CPGs en réponse à une activation des voies descendantes (Clark & Cope, 1998; Parker, 2000; Bertrand & Cazalets, 2013).

Dans ce contexte, l'étude que nous avons entreprise a pour but d'appréhender les capacités plastiques des synapses glutamatergiques qui connectent les motoneurones et de comparer ces phénomènes plastiques entre motoneurones WT et SOD1. Nous avons choisi de réaliser cette étude sur des cultures de motoneurones. En effet, les cultures de neurones présentent deux avantages par rapport aux tranches de moelle : 1) les motoneurones peuvent être étudiés à différents stades de maturation *in vitro* et 2) il est possible de stimuler de manière chimique l'ensemble des synapses connectant un motoneurone en s'affranchissant des particularismes d'une voie synaptique donnée. Ce modèle permet donc d'étudier les caractéristiques et capacités plastiques d'un type de neurones, ici les motoneurones, tout en gardant à l'esprit que le réseau autour de ces neurones se trouve être totalement différent des conditions physiologiques *in vivo*.

Aucune étude n'étant à notre connaissance disponible à l'heure actuelle concernant la description de phénomènes de plasticité synaptique sur des cultures de motoneurones, notre étude a donc été réalisée dans un premier temps sur des cultures de neurones spinaux sains afin de pouvoir ensuite comparer ces résultats avec ceux obtenus sur les cultures de neurones SOD1. Nous avons choisi de déclencher de la plasticité synaptique pharmacologiquement, en

utilisant un cocktail connu pour induire de la LTP sur les cultures de neurones hippocampiques (Otmakhov *et al.*, 2004; Leutgeb *et al.*, 2005; Tominaga-Yoshino *et al.*, 2008), composé de Rolipram et de Forskoline. Ces deux agents permettent en effet d'augmenter la transmission synaptique en agissant respectivement comme inhibiteur de la phosphodiesterase et comme activateur de l'adénylate cyclase.

B. Matériel et méthodes

1. Animaux

Afin d'identifier et d'enregistrer spécifiquement des motoneurones dans les cultures de neurones spinaux, celles-ci ont été réalisées à partir d'embryons de souris transgéniques Hb9-GFP (B6.Cg-Tg(Hlxb9-GFP)1Tmj/J ; Laboratoires Jackson, USA) surexprimant la "Green Fluorescence Protein" (GFP) sous le contrôle du promoteur Mnx1, également appelé Hlxb9) spécifique des Mns et des Ins Hb9 (Arber *et al.*, 1999). Dans cette lignée, la GFP s'exprime dans les axones, les dendrites et le soma des neurones spinaux exprimant la protéine Hb9 du jour embryonnaire 9.5 (E9.5) au jour postnatal 10 (P10) (Wichterle *et al.*, 2002).

Afin de vérifier le génotype des animaux utilisés nous avons réalisé le même protocole de génotypage qu'expliqué précédemment (page 70), à l'exception des cycles de PCR qui étaient les suivantes : 1 cycle de 5 min à 95°C, 37 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C, puis un cycle de 5 min à 72°C. La GFP ainsi obtenues était de 280 pb.

Les amorces utilisées pour les souris Hb9-GFP étaient les suivantes:

5' GCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC 3'

et 5' GCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCC 3' (inverse).

2. Cultures de cellules spinales de souris Hb9-GFP.

Les cultures ont été réalisées par Frédérique Masméjean (IE, CNRS, INCIA) à partir d'embryons de souris à 12,5 jours embryonnaires (E 12,5 = après 12,5 jours de gestation de la mère). À ce stade embryonnaire, il a été montré (Arber *et al.*, 1999) que seuls les motoneurones expriment le facteur de transcription Hb9 : ils sont donc les seuls à exprimer la GFP dans nos cultures (les interneurones Hb9 n'exprimant celui-ci qu'à des stades plus tardifs).

Préparation des lamelles :

Des lamelles couvre-objet d'un diamètre de 10mm (« coverslips » KnittelGlass) ont été déposées une par une dans les puits d'une boîte Nunc. Ces lamelles ont préalablement été coatées avec de la PolyLysine (Sigma P7280) à 2.5 ug/ml. Elles ont ensuite été recouvertes par une solution de laminine (Sigma L2020) préparée extemporanément pendant une nuit à 4°C. Le lendemain la laminine a été retirée et la boîte contenant les lamelles a été séchée sous une hotte à flux laminaire.

Isolement de la moelle épinière des embryons :

Des souris gestantes (E12.5) ont été euthanasiées très rapidement par des vapeurs de dioxyde de carbone par sublimation de la carboglace au contact d'eau versée sous une cloche. Les embryons ont été extraits des cornes utérines un à un puis placés dans du PBS Glucose frais (4°C). Une fois tous les embryons sortis, ils ont été rincés deux fois successivement dans un nouveau bain de PBS Glucose. Les embryons ont ensuite été décapités à l'aide d'une paire de ciseaux sous contrôle binoculaire. Leur moelle épinière a alors été isolée grossièrement, puis débarrassée minutieusement des méninges et des ganglions spinaux. Les tissus spinaux propres ont été conservés dans un tube Eppendorf contenant 500 µL de milieu de culture à 4°C le temps d'isoler de la même manière la moelle de chaque embryon.

Préparation de la suspension cellulaire :

Une dissociation cellulaire a été réalisée mécaniquement avec une pipette Pasteur rodée à la flamme. Le diamètre de la pipette a été réduit progressivement à l'aide de la flamme du bec bunsen afin de bien séparer toutes les cellules de la moelle. La numération de la suspension cellulaire a permis d'ajuster à 30 000 le nombre de cellules déposées par lamelle. Pour cela, la solution contenant les cellules spinales en suspension a été répartie entre les puits (130 µL dans chaque). La boîte a alors été placée dans l'incubateur, pendant 2h au minimum, afin que les cellules puissent adhérer à la lamelle de verre. Une fois cette étape réalisée, 1 ml de milieu de culture complet a été ajouté dans chaque puit et la culture a été placée dans un incubateur à 37°C.

Composition du milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé dans cette étude était composé comme suit : MEM (Invitrogen 51200-038) complémenté par 10 ml de glucose 1M dans du MEM, 5ml de Penicilline-Streptomycine (10000 UI/ml Pénicilline, et 10000ug/ml Streptomycine), 5ml de

Sodium Pyruvate (Sigma S8636), 12,5 ml Hepes (Sigma H0887, 1M), 5ml de N Supplément (Invitrogen 17502-048) et enfin 50 ml de sérum de cheval (Horse Serum Heat Inactivated H1138).

Des facteurs de croissances, BDNF et GDNF, ont été ajoutés au milieu de culture extemporanément tous les 3 jours tout au long de la culture (Abcam Ab 9794 et ab73450) à la concentration de 1ng/ml de milieu de culture.

3. Enregistrements électrophysiologiques intracellulaires des motoneurones en culture.

Afin d'enregistrer les motoneurones, les lamelles ont été placées dans une chambre d'enregistrement placée sur la platine d'un microscope à fluorescence (Nikon E600FN). De l'aCSF oxygéné à température ambiante était continuellement perfusé à l'aide d'une pompe péristaltique (réglée à un flux de 4,5 ml/min) afin de baigner la culture. Les enregistrements intracellulaires ont été réalisés de la même façon que décrit précédemment.

Après identification d'un motoneurone par la présence de GFP, la culture a été mise en présence de strychnine et de gabazine (1 μ M) via le bain d'aCSF, afin de bloquer respectivement l'activation des récepteurs glycinergiques et GABAergiques et de tétródotoxine (TTX) afin de bloquer les canaux sodiques voltages dépendants, et donc de supprimer la genèse de potentiels d'action (PA) et d'enregistrer des courants synaptiques miniatures.

4. Protocole d'enregistrement et d'induction de la plasticité synaptique.

Les motoneurones ont été enregistrés en voltage clamp (potentiel membranaire fixé à -60mV) pendant une période de 15 minutes afin d'observer les courants miniatures contrôles. Un cocktail pharmacologique composé de rolipram (inhibiteur de la phosphodiesterase de type 4) à 0,5 M et de forskoline (activateur de l'adénylate cyclase) également à 0,5 M, dilué dans un aCSF sans magnésium contenant de la TTX (0,1 M) + strychnine (1 μ M) + Gabazine (1 μ M) a ensuite été perfusé sur la culture pendant 15 min. Durant cette application le motoneurone a été laissé en courant imposé de manière à le laisser se dépolariser librement. Enfin, à la fin de l'application, de l'aCSF « normal » contenant de la TTX + strychnine + Gabazine a de nouveau été perfusé dans le bain d'enregistrement et les courants miniatures post-application ont été enregistrés en voltage clamp (-60mV) afin de les comparer à ceux enregistrés en condition contrôle.

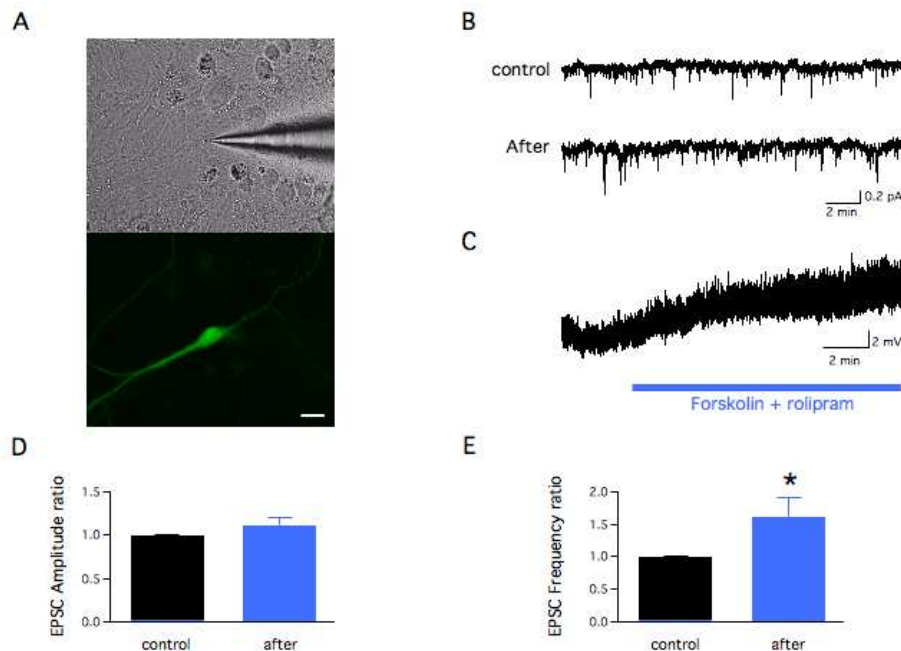


Figure 35 Effet de l'application de forskoline et de rolipram sur les courants miniatures spontanés enregistrés sur les motoneurones WT en culture.

Des enregistrements en patch-clamp configuration cellule entière ont été réalisés sur des motoneurones issus de souris Hb9-GFP, en culture. Les motoneurones sont identifiables par fluorescence dans les cultures cellulaires puisqu'ils expriment la GFP sous le contrôle du promoteur Hb9 (A). Les cultures sont perfusées par de l'aCSF oxygéné contenant de la strychnine, de la gabazine (1 μ M chacun) et de la TTX (0,1 μ M) et des courants miniatures (mEPSC) sont enregistrés, en condition contrôle, et après application de la forskoline et du rolipram (B). L'application de ces composés induit une dépolarisation du potentiel de membrane du motoneurone (C). Les histogrammes représentent les différents paramètres des EPSCs mesurés avant (barres noires) et après (barres bleues) l'application pharmacologique : l'amplitude (D), et la fréquence (E) des courants miniatures spontanés. Les résultats sont exprimés en ratio de l'amplitude (D) ou de la fréquence (E) mesurées après application par rapport à celles enregistrées avant, en condition contrôle. Les astérisques représentent une significativité positive.

Barre d'échelle : 50 μ m (A).

5. Pharmacologie.

Les drogues utilisées dans cette étude ont été obtenues chez abcam pour la TTX (tetrodotoxin citrate ab120055), la forskoline (ab120058) et le rolipram (ab120031) et chez Sigma-Aldrich pour le reste des composants. Des solutions stocks ont été réalisées et stockées à -20°C pour les drogues suivantes : forskoline (à 0,01M dans du DMSO), rolipram (à 0,01 M dans de l'eau distillée) et TTX (à 0,5mM dans de l'eau distillée).

6. Analyses.

L'analyse, comme l'acquisition des données, a été effectuée à l'aide du logiciel Axograph.

C. Résultats

Sur les motoneurones isolés des influences des autres neurones par la perfusion de strychnine et de gabazine, et dont la genèse de PA a été inhibée par de la TTX, nous avons enregistré les courants glutamatergiques miniatures générés en conditions « contrôles » et suite à l'application de forskoline et de rolipram (Figure 35 B). L'application de ce cocktail pharmacologique via le bain de perfusion induit une dépolarisation des motoneurones (Figure 35 C) durant les 15 minutes que dure l'application. Les figures 35 D et E montrent l'effet de l'application de rolipram et de forskoline sur les miniatures glutamatergiques exprimé sous la forme d'un ratio par rapport aux valeurs contrôles (Figure 35 D et E). Nos résultats montrent que la forskoline et le rolipram n'ont pas d'effet sur l'amplitude des miniatures (Figure 35 D) mais induisent une augmentation de la fréquence ces courants (Figure 35 E). Ces résultats ont été obtenus sur 5 neurones sur 7 testés. Cette amplification a été observée jusqu'à la fin des enregistrements, soit jusqu'à près d'1h après l'application du cocktail pharmacologique.

Ces données préliminaires montrent que les synapses glutamatergiques reçues par les motoneurones, en culture expriment de plasticité à long terme.

D. Discussion et perspectives

Cette étude préliminaire nous a donc permis de montrer que, contrairement à de vieilles « croyances » selon lesquelles il n'y aurait pas de plasticité dans la moelle épinière

(Bertrand & Cazalets, 2013), les synapses des neurones spinaux sont capables d'adapter leur transmission en exprimant de la plasticité à long terme. En effet, suite à l'application d'un cocktail pharmacologique couramment utilisé dans l'étude de la plasticité synaptique des cellules hippocampiques, les synapses glutamatergiques reçues par les motoneurones expriment de la potentialisation à long terme.

Ces résultats préliminaires qui doivent bien entendu être complétés et étoffés nous serviront de base pour comparer les capacités plastiques des synapses glutamatergiques connectant les motoneurones SOD1. Nous prévoyons de compléter cette analyse en étudiant non plus les courants miniatures en provenance de l'ensemble des connexions glutamatergiques reçus par les motoneurones mais en réalisant des stimulations électriques dans les cultures de neurones spinaux. L'efficacité d'autres composés neuroactifs décrits comme potentiellement inducteurs de plasticité synaptique tels que la sérotonine ou des agonistes des récepteurs métabotropiques du glutamate (Sugita *et al.*, 1992; Kojic *et al.*, 1997; Bortolotto *et al.*, 2005; Nisticò *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2013) sera aussi testée.

Plusieurs techniques s'offrent à nous afin de générer des cultures de neurones spinaux SOD1-Hb9-GFP : 1) il est possible de transfecter directement les cultures Hb9-GFP avec des virus contenant le gène SOD1 humain muté, afin que celui-ci s'exprime dans les cellules mises en culture (Menzies *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 2002; Sathasivam *et al.*, 2005), ou bien 2) en croisant des souris SOD1 avec des souris Hb9-GFP et en réalisant une culture cellulaire par embryon, on peut obtenir des cultures SOD1-HB9-GFP.

Bien que tout reste à faire concernant cette seconde partie de l'étude, on peut supposer que les phénomènes d'altérations précoces du système glutamatergique observé chez les patients SLA comme chez les souris SOD1 (Rothstein *et al.*, 1992; Plaitakis & Constantakakis, 1993; Lin *et al.*, 1998; Trotti *et al.*, 1999; Van Damme *et al.*, 2005b; Bos *et al.*, 2006; Spalloni *et al.*, 2013) pourraient avoir des conséquences sur la capacité de ces réseaux à exprimer de la plasticité à long terme.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale

Au cours de ce travail de doctorat, l'étude, par différentes approches expérimentales, des réseaux moteurs spinaux des souris SOD1 nous a permis de mettre en évidence des modifications physiologiques profondes de ces réseaux neuronaux. En effet, il apparaît que dès la naissance les systèmes neuromodulateurs fondamentaux des réseaux spinaux sont modifiés chez ces animaux. Nous avons ainsi montré que la sensibilité à la NA du réseau locomoteur spinal des souris SOD1 était accrue par rapport aux souris contrôles, et que les taux de DA tissulaire étaient augmentés dans la moelle de souris SOD1 âgées de 10 jours. De plus, l'étude détaillée du système cholinergique que nous avons réalisé, nous a permis de mettre en évidence des modifications majeures 1) de la morphologie et du nombre de synapses en C au niveau des motoneurones, 2) de l'expression et de la distribution des récepteurs postsynaptiques associés aux boutons en C dans les motoneurones. Enfin, nous avons montré ici pour la première fois que, tout comme les motoneurones, les interneurones cholinergiques de la lamina X subissent des processus dégénératifs dans les stades tardifs de la maladie (P100).

L'ensemble de ces travaux portant sur l'état des systèmes neuromodulateurs au sein des réseaux locomoteurs spinaux a donc permis de montrer que des modifications précoces altèrent l'expression et l'anatomie de ces systèmes dans les réseaux des souris SOD1, dès la naissance. Cependant, mis à part une sensibilité accrue à la noradrénaline, nos résultats n'ont pas révélé de modification majeure du fonctionnement physiologique de ces réseaux chez les animaux juvéniles (dans les deux premières semaines postnatales).

L'absence d'impact fonctionnel de ces modifications pointe du doigt la très probable mise en jeu de mécanismes compensatoires dans les réseaux neuronaux spinaux des animaux jeunes. De nombreuses études portant sur le modèle SOD1 ont également fait l'hypothèse de l'existence de tels mécanismes (Durand *et al.*, 2006; Amendola & Durand, 2008; Filipchuk & Durand, 2012; Martin *et al.*, 2013). Ces mécanismes compensatoires suffiraient à compenser les altérations précoces observées dans les réseaux moteurs spinaux de souris SOD1 dans les stades embryonnaires et postnataux jeunes : modifications de l'excitabilité des motoneurones (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; 2005; Bories *et al.*, 2007; van Zundert *et al.*, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2013), de leur morphologie (Amendola & Durand, 2008; Filipchuk & Durand, 2012), des influences neuromodulatrices (Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013; Milan *et al.*, 2014) et de la mise en place et la maturation des réseaux

spinaux (Durand *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2013). Ces mécanismes qui restent à définir permettent aux réseaux spinaux des souris SOD1 de générer un patron locomoteur correct (Milan *et al.*, 2014) et d'avoir un comportement normal et adapté. Cependant, il semblerait qu'avec le développement de l'animal, ces mécanismes compensatoires ne suffisent plus et soient saturés/dépassés par les altérations multiples et complexes qui affectent les réseaux de neurones SOD1. Les souris âgées de 40 à 60 jours, bien que ne présentant pas de dégénérescence motoneuronale, commencent alors à subir les conséquences du manque d'efficacité des mécanismes compensatoires. On observe alors des déficits moteurs (Veldink *et al.*, 2003; Wooley *et al.*, 2005; van Zundert *et al.*, 2008; Kanning *et al.*, 2010; Mancuso *et al.*, 2011a; Gerber *et al.*, 2012a), ainsi que des modifications brusques et sévères de la physiologie de ces animaux (Herron & Miles, 2012; Milan *et al.*, 2014). C'est à ces stades que les mécanismes dégénératifs (stress oxydatif, altérations mitochondriales, du transport axonal...) (Mourelatos *et al.*, 1996; Stieber *et al.*, 1998; Bendotti *et al.*, 2001; Kieran *et al.*, 2005; Gonatas *et al.*, 2006; De Vos *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2009a; Vinsant *et al.*, 2013a; Vucic *et al.*, 2014) se développent et progressent rapidement avant d'entraîner la perte drastique des motoneurones que l'on connaît (Vucic *et al.*, 2014).

En allant encore plus loin, nos résultats, mis en commun avec les études portant sur les modifications précoces affectant les réseaux moteurs SOD1 (Pieri *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2004; 2005; Durand *et al.*, 2006; Bories *et al.*, 2007; van Zundert *et al.*, 2008; Amendola & Durand, 2008; Pambo-Pambo *et al.*, 2009; Filipchuk & Durand, 2012; Martin *et al.*, 2013; Milan *et al.*, 2014), soulèvent le fait que les réseaux moteurs spinaux des souris SOD1 semblent être totalement différents de ceux des souris contrôles, à la naissance. C'est le cas par exemple des segments lombaires L2 qui, chez les SOD1, sont enrichis en interneurones cholinergiques. Ce point, s'il venait à être confirmé, permettrait d'aller beaucoup plus loin dans le concept de mise en jeu de mécanismes compensatoires : les souris SOD1 ne partant pas avec les mêmes bases génétiques et physiologiques que les souris WT, leur organisme s'adapte et met en place des règles de communication, des propriétés intrinsèques et morphologiques qui lui sont propres. Ainsi, bien que l'architecture générale du réseau, les CPGs, les motoneurones, soit conservée, le rôle et l'impact de chaque système neuromodulateur sur les neurones de ce réseau pourrait être pondéré en fonction des capacités « nouvelles » des neurones. La finalité d'un tel remaniement n'étant pas le développement de nouvelles capacités, mais plutôt de mimer au mieux les fonctions d'un réseau « sain », afin de produire les mêmes patrons d'activité et de répondre de la même manière aux stimuli externes.

Cette hypothèse d'un réseau spinal totalement reconfiguré dès la naissance chez les animaux SOD1, loin d'être une idéologie de chercheur, pourrait réellement constituer une piste de recherche novatrice dans l'étude de la SLA. Cependant, avant d'envisager des études plus poussées, notamment à visée thérapeutique, chez les animaux SOD1, la vérification de la présence de telles différences d'organisation chez les patients atteints de fSLA semble inévitable.

Nous soulevons ici un point sensible récurrent dans l'étude des pathologies neurodégénératives, principalement lorsque celles-ci existent sous des formes familiales (Wagner, 2005). Les limites liées à l'éthique ne permettent évidemment pas d'effectuer des analyses sur des enfants, lorsque des cas de fSLA ont été recensés dans leur famille. Il semblerait effectivement totalement aberrant d'imposer à des personnes, qui ne sont pas en âge de prendre ce type de décisions, un génotypage visant à vérifier ou non l'expression dans leur génome de mutations connues pour favoriser le développement de la SLA. De plus, et quand bien même le destin pathologique de ces enfants serait connu, il n'est pas envisageable de leur faire subir des analyses par IRM, EMG ou encore ENMG afin de détecter au cours de leur croissance de possibles altérations neuronales. Reste donc aux chercheurs à mettre en place des solutions alternatives afin de pouvoir peut-être un jour mettre en évidence un remodelage complet des réseaux spinaux des personnes atteintes, ou destinées à développer une fSLA.

L'un des résultats capitaux de ce travail concerne la mise en évidence d'une perte neuronale affectant des neurones autres que les motoneurones. Ces conclusions viennent ébranler l'un des acquis fondamentaux concernant la SLA :

Non, les motoneurones ne sont pas les seules cellules à dégénérer dans la SLA.

De nombreuses études avaient jusqu'alors suggéré la participation d'autres types cellulaires à la dégénérescence des motoneurones (Clement *et al.*, 2003; King *et al.*, 2011), mais sans évidence directe.

Bien que nos résultats ne nous permettent pas de dater précisément le moment où les interneurones commencent à dégénérer (entre P40 et P100), le fait qu'ils soient situés en amont dans la transmission synaptique tendrait à montrer que ces neurones pourraient bien être les premiers à succomber à l'expression de facteurs apoptotiques. Une telle conclusion amènerait à recentrer toutes les recherches effectuées à l'heure actuelle visant à découvrir le facteur déclenchant de la dégénérescence. Ce facteur pourrait alors non pas agir au niveau des motoneurones, mais plutôt sur les interneurones cholinergiques de la lamina X, et pourquoi

pas sur d'autres populations cellulaires, encore plus en amont dans les réseaux moteurs spinaux. En effet, au-delà de l'ordre dans lequel l'atteinte dégénérative opère, nos résultats pointent du doigt un point particulièrement sensible : le ciblage du profil phénotypique des motoneurones par les processus dégénératifs dans la SLA. La présence de mécanismes comparables, et aux mêmes stades développementaux, au niveau des interneurones cholinergiques à l'origine de la modulation des motoneurones soulève une question : les motoneurones dégénèrent-ils parce qu'ils sont les sorties spinales de l'information motrice, ou bien parce qu'ils sont cholinergiques ? (Tata *et al.*, 2014) Bien que beaucoup reste à faire pour répondre à cette interrogation et que ces mécanismes dégénératifs mettent en jeu de nombreux facteurs physiopathologiques, notre étude apporte un premier élément en faveur d'un phénotype neurochimique préférentiellement affecté dans la SLA, ouvrant ainsi la porte à de futures investigations, et pourquoi pas à un ciblage thérapeutique du système cholinergique.

Les interneurones cholinergiques spinaux semblent donc occuper un rôle central dans les mécanismes physiopathologiques de la SLA. Il a par ailleurs été montré par le passé, que des modifications de l'expression d'autres neurones cholinergiques ont lieu chez les souris SOD1^{G93A} (Azzouz *et al.*, 1999). En effet, cette étude a mis en évidence une augmentation du nombre de neurones cholinergiques dans le striatum des souris, afin de compenser la perte des neurones moteurs, dans les stades tardifs de la maladie. Ces résultats intéressants, ajoutés aux études déjà connues du système cholinergique (Pullen & Athanasiou, 2009; Herron & Miles, 2012; Casas *et al.*, 2013) et à nos travaux, montrent que le système cholinergique joue un rôle clé, à la fois dans les mécanismes compensatoires, mais aussi dans l'initiation de la dégénérescence neuronale. Les neurones cholinergiques apparaissent donc comme une cible privilégiée des modifications physiologiques et des mécanismes dégénératifs mis en jeu dans la SLA. La question se pose alors de savoir si le phénotype neurochimique cholinergique des motoneurones et des interneurones de la lamina X constitue un facteur de vulnérabilité dans la SLA comme c'est le cas pour les neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson et cholinergiques dans la maladie d'Alzheimer (Fortress *et al.*, 2011; Schliebs & Arendt, 2011; Hall *et al.*, 2014).

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral ont permis d'apporter de nouveaux éléments quant à la compréhension des modifications affectant les réseaux locomoteurs spinaux dans les stades présymptomatiques de la SLA. Cependant, beaucoup reste à faire afin d'identifier le facteur déclenchant et la cascade de mécanismes responsables de la dégénérescence neuronale dans la SLA.

Au cours de ce travail, nous avons engagé deux projets de recherche dont les résultats préliminaires ont été présentés dans ce manuscrit. Ces deux études, une fois terminées, permettront de compléter le travail engagé au cours de cette thèse de doctorat et d'apporter des indications supplémentaires concernant l'état du réseau moteur spinal des souris SOD1 dans les stades présymptomatiques.

Les données recueillies au cours du suivi au long cours des habitudes et des capacités motrices des souris SOD1, vont permettre d'effectuer une analyse précise des rythmes circadiens et de la répartition des périodes d'activité des souris au cours des cycles de veille et de sommeil. Nos résultats préliminaires laissent présager que bien que les souris SOD1 aient une activité globale similaire aux souris WT, la manière dont elles répartissent leur déplacement au sein d'une journée pourrait être altérée. La mise en évidence de modifications des rythmes circadiens des souris SOD1, si elle venait à se confirmer, permettrait de venir appuyer nos précédentes conclusions et constituerait un résultat extrêmement intéressant. En effet, il existe un lien fort entre la régulation des rythmes circadiens et le système cholinergique : il a été montré qu'au niveau supraspinal, les structures cérébrales responsables de la rythmicité circadienne sont sous le contrôle permanent du système cholinergique et que la sur- ou la sous-activation de ces voies modulatrices seraient impliquées dans des dérèglements pathologiques de ces rythmes (Mohan & Radha, 1978; Werhun & Lewandowski, 2009; Hut & Van der Zee, 2011; Gritton *et al.*, 2013). De telles atteintes des rythmes veille/sommeil ont également été décrites dans d'autres pathologies dont la maladie d'Alzheimer. Dans cette pathologie une sous-activation du contrôle cholinergique induit des déficits importants de la régulation du sommeil des patients et conduit à des altérations des processus de consolidation mnésiques. En effet, la mémorisation à long terme, que ce soit de mémoire procédurale, motrice ou sémantique, nécessite une régulation parfaite des rythmes circadiens, et notamment des cycles de sommeil (Idzikowski, 1984; Nesca & Koulack, 1994; Walker & Stickgold, 2006; Hu *et al.*, 2006; Cai & Rickard, 2009; Wang *et al.*, 2011; Kumar

& Jha, 2012; Brawn *et al.*, 2013). Dans la maladie d'Alzheimer, où les systèmes de mémoire sont particulièrement ciblés par la dégénérescence, des traitements thérapeutiques cholinergiques ont été développés dans le but d'inhiber les enzymes de dégradation de l'acétylcholine, et de permettre ainsi d'augmenter les taux extracellulaires et la régulation des rythmes circadiens (Davis & Sadik, 2006; Nieoullon *et al.*, 2008). Au vu de nos résultats concernant les modifications précoces du système cholinergique, et de ce que laissent présager les analyses du suivi comportemental, il pourrait également être envisageable dans le futur de tester ce type de thérapeutiques chez les souris SOD1 comme traitement préventif potentiel de la SLA. Un recalibrage du système cholinergique, dans des gammes plus physiologiques, pourrait en effet impacter sur la mise en place des mécanismes dégénératifs mis en jeu dans la SLA, et qui semblent indubitablement cibler les neurones à phénotype cholinergique.

De plus, nous avons mis en évidence au cours de nos travaux, une perte des neurones cholinergiques de la lamina X. Il serait très intéressant de pousser plus avant la description de ces conclusions très prometteuses quant à la description et à l'identification des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SLA. On peut par exemple envisager, à court terme, d'engager des expériences visant à décrire les processus apoptotiques affectant ces interneurons, notamment en mettant en évidence des mécanismes proches de ceux décrits dans les motoneurons : stress oxydatif, agrégats protéiques ou bien encore altérations du fonctionnement mitochondrial et activation de la microglie. Une description plus complète des processus dégénératifs affectant les interneurons cholinergiques nous permettrait en effet de mieux appréhender le décours temporel et les facteurs physiopathologiques impliqués dans la SLA.

L'ensemble de ces travaux, et des perspectives de recherche à court terme qu'ils inspirent, pourra donc permettre de mettre à jour l'état physiopathologique des systèmes neuromodulateurs dans les stades précoces de la SLA, et leurs conséquences sur le remodelage du réseau moteur spinal. Pour aller plus loin, il serait intéressant, à plus long terme, d'envisager un ciblage thérapeutique des neuromodulateurs et en particulier du système cholinergique afin de maintenir le fonctionnement et l'organisation du réseau moteur des souris SOD1 dans des gammes physiologiques. L'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes cholinergiques dès la mise en place des réseaux neuronaux permettrait en effet de cibler les récepteurs dont l'activation est déficitaire ou excédentaire dans la SLA et ainsi éviter la mise

en place de mécanismes compensatoires conduisant à la restructuration du réseau que nous avons décrite. Le développement de telles thérapeutiques, pourrait conduire à développer des traitements pharmacologiques préventifs, dans le cadre de SLA familiales, si tant est que les effets secondaires induits pourront être maintenus dans des gammes raisonnables.

Conclusion

Les réseaux moteurs spinaux sont affectés précocement dans la SLA, bien avant que les symptômes moteurs ne se développent. Un remaniement profond des réseaux neuronaux, orchestré par des modifications des systèmes neuromodulateurs pourrait être à l'origine d'une partie des processus de compensation et de mécanismes dégénératifs mis en jeu au cours du développement des souris SOD1. Ces nouveaux indices concernant les facteurs physiopathologiques mis en jeu dans les stades présymptomatiques de la SLA laissent envisager de possibles nouvelles cibles thérapeutiques visant les systèmes neuromodulateurs des réseaux moteurs spinaux et plus particulièrement le système cholinergique.

Bibliographie

A

- Abe K, Aoki M, Ikeda M, Watanabe M, Hirai S & Itoyama Y (1996). Clinical characteristics of familial amyotrophic lateral sclerosis with Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations. *J Neurol Sci* **136**, 108–116.
- Abe K, Fujimura H, Toyooka K, Sakoda S, Yorifuji S & Yanagihara T (1997). Cognitive function in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **148**, 95–100.
- Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T & Itoyama Y (1995). Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **199**, 152–154.
- Abourachid A (2003). A new way of analysing symmetrical and asymmetrical gaits in quadrupeds. *C R Biol* **326**, 625–630.
- Acsadi G, Angelov RA, Yang H, Toth G, Thomas R, Jani A, Wang Y, Ianakova E, Mohammad S, Lewis RA & Shy ME (2002). Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther* **13**, 1047–1059.
- Ahmed A & Wicklund MP (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: what role does environment play? *Neurol Clin* **29**, 689–711.
- 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.
- Alaburda A, Perrier JF & Hounsgaard J (2002). An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *The Journal of Physiology* **540**, 875–881.
- Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP & Heiman-Patterson TD (2004). Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research* **130**, 7–15.
- Alexianu ME, Kozovska M & Appel SH (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* **57**, 1282–1289.
- Almeida S, Gascon E, Tran H, Chou HJ, Gendron TF, DeGroot S, Tapper AR, Sellier C, Charlet-Berguerand N, Karydas A, Seeley WW, Boxer AL, Petrucelli L, Miller BL & Gao F-B (2013). Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol* **126**, 385–399.
- 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.
- Amendola J & Durand J (2008). Morphological differences between wild-type and transgenic superoxide dismutase 1 lumbar motoneurons in postnatal mice. *J Comp Neurol* **511**, 329–341.
- Amendola J, Verrier B, Roubertoux P & Durand J (2004). Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **20**, 2822–2826.
- Amzica F (2002). In vivo electrophysiological evidences for cortical neuron-glia interactions during slow (<1 Hz) and paroxysmal sleep oscillations. *Journal of Physiology-Paris* **96**, 209–219.
- Andersen PM & Al-Chalabi A (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* **7**, 603–615.
- Andersen SL (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* **27**, 3–18.
- Andersson LS et al. (2012). Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature* **488**, 642–646.

- Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME & Hall ED (1998). Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **71**, 2041–2048.
- Anglister L, Etlin A, Finkel E, Durrant AR & Lev-Tov A (2008). Cholinesterases in development and disease. *Chemico-Biological Interactions* **175**, 92–100.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA & Nicotera P (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961–973.
- Aoki M, Abe K & Itoyama Y (1998). Molecular analyses of the Cu/Zn superoxide dismutase gene in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan. *Cell Mol Neurobiol* **18**, 639–647.
- Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y, Narisawa K, Nakamura S, Itoyama Y & Abe K (1994). Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene: a possible new subtype of familial ALS. *J Neurol Sci* **126**, 77–83.
- Appel V, Stewart SS, Smith G & Appel SH (1987). A rating scale for amyotrophic lateral sclerosis: description and preliminary experience. *Ann Neurol* **22**, 328–333.
- Aquilano K, Vigilanza P, Rotilio G & Ciriolo MR (2006). Mitochondrial damage due to SOD1 deficiency in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a rationale for the redundancy of SOD1. *The FASEB Journal* **20**, 1683–1685.
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM & Sockanathan S (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* **23**, 659–674.
- Ardley HC, Hung C-C & Robinson PA (2005). The aggravating role of the ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *FEBS Lett* **579**, 571–576.
- Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM & Potter H (2004). Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport* **15**, 1751–1754.
- Armon C (2007). Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J Neurol Sci* **262**, 45–53.
- Armstrong DM (1988). The supraspinal control of mammalian locomotion. *The Journal of Physiology* **405**, 1–37.
- Aroniadou VA & Teyler TJ (1991). The role of NMDA receptors in long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in rat visual cortex. *Brain Research* **562**, 136–143.
- Arshavsky YI, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM & Orlovsky GN (1972a). Origin of modulation in neurones of the ventral spinocerebellar tract during locomotion. *Brain Research* **43**, 276–279.
- Arshavsky YI, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM & Orlovsky GN (1972b). Recordings of neurones of the dorsal spinocerebellar tract during evoked locomotion. *Brain Research* **43**, 272–275.
- Arvidsson U, Svedlund J, Lagerbäck PA & Cullheim S (1987). An ultrastructural study of the synaptology of gamma-motoneurons during the postnatal development in the cat. *Brain Research* **465**, 303–312.
- Azzouz M, Krezel W, Dollé P, Vodouhe C, Warter JM, Poindron P & Borg J (1999). Compensatory mechanism of motor defect in SOD1 transgenic mice by overactivation of striatal cholinergic neurons. *Neuroreport* **10**, 1013–1018.
- Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P & Mazarakis ND (2004). VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* **429**, 413–417.

B

- Babin PJ, Goizet C & Raldúa D (2014). Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. *Progress in Neurobiology* **118**, 36–58.
- Bagust J, Lewis DM & Westerman RA (1973). Polyneuronal innervation of kitten skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **101**, 2815–2821.
- Balazs L & Leon M (1994). Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res* **19**, 1131–1137.
- Ballion B, Morin D & Viala D (2001). Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* **14**, 1727–1738.
- 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.
- Bang AG & Goulding MD (1996). Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 25–32.
- Barbeau H & Rossignol S (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Research* **412**, 84–95.
- 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 Research* **546**, 250–260.
- Barbeau H & Rossignol S (1994). Enhancement of locomotor recovery following spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* **7**, 517–524.
- Barbeau H, Julien C & Rossignol S (1987). The effects of clonidine and yohimbine on locomotion and cutaneous reflexes in the adult chronic spinal cat. *Brain Research* **437**, 83–96.
- Barbeito AG, Mesci P & Boillée S (2010). Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *J Neural Transm* **117**, 981–1000.
- Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM & Vaughn JE (1984). The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* **229**, 329–346.
- Barriere 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 JR & 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.
- Barthlen GM & Lange DJ (2000). Unexpectedly severe sleep and respiratory pathology in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* **7**, 299–302.
- Beal MF (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1366**, 211–223.
- Beal MF (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* **32**, 797–803.
- Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW & Brown RH (1997). Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **42**, 644–654.
- Bear MF & Malenka RC (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology* **4**, 389–399.

- Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Millul A, Mitchell D, Swingler R & Traynor BJ (2010). Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: Results of a population-based pilot case-control study. *Amyotroph Lateral Scler* **11**, 289–292.
- Begley S & Check E (2000). Rewiring your gray matter. The brain: you can teach an old brain new tricks. Neuroplasticity promises to give a whole new meaning to 'changing your mind'. *Newsweek* **134**, 63–65.
- Behndig A, Karlsson K, Reaume AG, Sentman ML & Marklund SL (2001). In vitro photochemical cataract in mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* **31**, 738–744.
- Bellingham MC (2011). A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? *CNS Neurosci Ther* **17**, 4–31.
- Benatar M (2007). Lost in translation: Treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiology of Disease* **26**, 1–13.
- Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, Silani V & De Biasi S (2001). Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci* **191**, 25–33.
- 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.
- Bensimon G, Lacomblez L & Meininger V (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* **330**, 585–591.
- Berger AJ, Bayliss DA & Viana F (1992). Modulation of neonatal rat hypoglossal motoneuron excitability by serotonin. *Neurosci Lett* **143**, 164–168.
- Bertel O, Malessa S, Sluga E & Hornykiewicz O (1991). Amyotrophic lateral sclerosis: changes of noradrenergic and serotonergic transmitter systems in the spinal cord. *Brain Research* **566**, 54–60.
- Bertrand SS & Cazalets J-R (2011). Cholinergic partition cells and lamina x neurons induce a muscarinic-dependent short-term potentiation of commissural glutamatergic inputs in lumbar motoneurons. *Front Neural Circuits* **5**, 15.
- Bertrand SS & Cazalets J-R (2013). Activity-dependent synaptic plasticity and metaplasticity in spinal motor networks. *Curr Pharm Des* **19**, 4498–4508.
- Bessou P, Emonet-Dénand F & Laporte Y (1963a). Relation between the conduction rate of motor nerve fibers and the contraction time of their motor units. *C R Hebd Seances Academie Sciences* **24**, 256–262.
- Bessou P, Emonet-Dénand F & Laporte Y (1963b). Occurrence of Intrafusal Muscle Fibres Innervation by Branches of Slow α Motor Fibres in the Cat. *Nature* **198**, 594–595.
- Betley JN, Wright CVE, Kawaguchi Y, Erdélyi F, Szabo G, Jessell TM & Kaltschmidt JA (2009). Stringent Specificity in the Construction of a GABAergic Presynaptic Inhibitory Circuit. *Cell* **139**, 161–174.
- Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L & Schiavo G (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 20523–20528.
- Björklund A & Skagerberg G (1979). Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A11 dopamine cell group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde tracing. *Brain Research* **177**, 170–175.
- Björsten LM, NorrSELL K & NorrSELL U (1976). Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy. *Exp Brain Res* **25**, 115–130.

- Blessing WW & Chalmers JP (1979). Direct projection of catecholamine (presumably dopamine)-containing neurons from hypothalamus to spinal cord. *Neurosci Lett* **11**, 35–40.
- Blijham PJ, Schelhaas HJ, Laak Ter HJ, van Engelen BGM & Zwarts MJ (2007). Early diagnosis of ALS: the search for signs of denervation in clinically normal muscles. *J Neurol Sci* **263**, 154–157.
- Boillee S, VANDEVELDE C & CLEVELAND D (2006). ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* **52**, 39–59.
- Bonnefoy A, Pradon D & Chèze L (2005a). Les systèmes d'analyse du mouvement: Techniques et principes, protocoles, sources d'erreurs et solutions. *ITBM-RBM News*.
- Bonnefoy C, Menudier A, Moesch C, Lachâtre G & Mermet J-M (2005b). Determination of chromium in whole blood by DRC-ICP-MS: spectral and non-spectral interferences. *Anal Bioanal Chem* **383**, 167–173.
- Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V & Vinceti M (2010). Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Ann Ist Super Sanita* **46**, 284–287.
- Booth V & Rinzel J (1995). A minimal, compartmental model for a dendritic origin of bistability of motoneuron firing patterns. *J Comput Neurosci* **2**, 299–312.
- Borchelt DR, Davis J, Fischer M, Lee MK, Slunt HH, Ratovitsky T, Regard J, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS & Price DL (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal* **13**, 159–163.
- Bories C, Amendola J, Lamotte d'Incamps B & Durand J (2007). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* **25**, 451–459.
- Borowska J, Jones CT, Zhang H, Blacklaws J, Goulding M & Zhang Y (2013). Functional Subpopulations of V3 Interneurons in the Mature Mouse Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* **33**, 18553–18565.
- Bortolotto ZA, Collett VJ, Conquet F, Jia Z, van der Putten H & Collingridge GL (2005). The regulation of hippocampal LTP by the molecular switch, a form of metaplasticity, requires mGlu5 receptors. *Neuropharmacology* **49 Suppl 1**, 13–25.
- Bos IWM, Hoogland G, Meine Jansen CF, Willigen GV, Spierenburg HA, van den Berg LH & de Graan PNE (2006). Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochem Int* **48**, 306–311.
- Boukaftane Y, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Meininger V, Malafosse A, Camu W & Rouleau GA (1998). Identification of six novel SOD1 gene mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Can J Neurol Sci* **25**, 192–196.
- Bourke SC, Tomlinson M, Williams TL, Bullock RE, Shaw PJ & Gibson GJ (2006). Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* **5**, 140–147.
- Bouyer LJG & Rossignol S (2003a). Contribution of Cutaneous Inputs From the Hindpaw to the Control of Locomotion. I. Intact Cats. *Journal of Neurophysiology* **90**, 3625–3639.
- Bouyer LJG & Rossignol S (2003b). Contribution of Cutaneous Inputs From the Hindpaw to the Control of Locomotion. II. Spinal Cats. *Journal of Neurophysiology* **90**, 3640–3653.
- Bowling AC, Schulz JB, Brown RH & Beal MF (1993). Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **61**, 2322–2325.
- Boyne LJ, Fischer I & Shea TB (1996). Role of vimentin in early stages of neuritogenesis in cultured hippocampal neurons. *Int J Dev Neurosci* **14**, 739–748.

- Bracci E, Ballerini L & Nistri A (1996). Localization of rhythmogenic networks responsible for spontaneous bursts induced by strychnine and bicuculline in the rat isolated spinal cord. *J Neurosci* **16**, 7063–7076.
- Brawn TP, Nusbaum HC & Margoliash D (2013). Sleep consolidation of interfering auditory memories in starlings. *Psychol Sci* **24**, 439–447.
- Bregman BS (1987). Development of serotonin immunoreactivity in the rat spinal cord and its plasticity after neonatal spinal cord lesions. *Brain Research* **431**, 245–263.
- Bresch S, Delmont E, Soriani MH & Desnuelle C (2014). [Electrodiagnostic criteria for early diagnosis of bulbar-onset ALS: a comparison of El Escorial, revised El Escorial and Awaji algorithm]. *Rev Neurol (Paris)* **170**, 134–139.
- Bretzner F & Brownstone RM (2013). Lhx3-Chx10 Reticulospinal Neurons in Locomotor Circuits. *Journal of Neuroscience* **33**, 14681–14692.
- Briand LA, Flagel SB, Seeman P & Robinson TE (2008). Cocaine self-administration produces a persistent increase in dopamine D2High receptors. *European Neuropsychopharmacology* **18**, 551–556.
- Briscoe J & Ericson J (1999). The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 353–362.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM & Ericson J (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435–445.
- Brocard F, Shevtsova NA, Bouhadjane M, Tazerart S, Heinemann U, Rybak IA & Vinay L (2013). Activity-Dependent Changes in Extracellular Ca. *Neuron* **77**, 1047–1054.
- Brocard F, Tazerart S & Vinay L (2010). Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? *Neuroscientist* **16**, 139–155.
- Brocard F, Verdier D, Arsenault I, Lund JP & Kolta A (2006). Emergence of Intrinsic Bursting in Trigeminal Sensory Neurons Parallels the Acquisition of Mastication in Weanling Rats. *Journal of Neurophysiology* **96**, 2410–2424.
- Brocq H, Soriani MH & Desnuelle C (2006). [Psychological reactions to the announcement of a severe disease diagnosis: the amyotrophic lateral sclerosis example]. *Revue neurologique*.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M & Munsat TL (2000). El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **1**, 293–299.
- Brooks KJ, Hill MDW, Hockings PD & Reid DG (2004). MRI detects early hindlimb muscle atrophy in Gly93Ala superoxide dismutase-1 (G93A SOD1) transgenic mice, an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *NMR Biomed* **17**, 28–32.
- Brooks S, Higgs G, Janghra N, Jones L & Dunnett SB (2012). Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in YAC128 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res Bull* **88**, 113–120.
- Brown DA (2010). Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J Mol Neurosci* **41**, 340–346.
- Brown MC, Crowe A & Matthews PB (1965). Observations on the fusimotor fibres of the Tibialis posterior muscle of the cat. *The Journal of Physiology* **177**, 140–159.
- Brown TG (1911). The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*.
- Brown TG (1914). On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system. *The Journal of Physiology* **48**, 18–46.

- Brown TG & Sherrington CS (1912). The rule of reflex response in the limb reflexes of the mammal and its exceptions. *The Journal of Physiology* **44**, 125–130.
- Brownstone RM (2006). Beginning at the end: Repetitive firing properties in the final common pathway. *Progress in Neurobiology* **78**, 156–172.
- Brownstone RM & Bui TV (2010). Spinal interneurons providing input to the final common path during locomotion. *Progress in Brain Research* **187**, 81–95.
- Brownstone RM & Wilson JM (2008). Strategies for delineating spinal locomotor rhythm-generating networks and the possible role of Hb9 interneurons in rhythmogenesis. *Brain Research Reviews* **57**, 64–76.
- Brownstone RM, Jordan LM, Kriellaars DJ, Noga BR & Shefchyk SJ (1992). On the regulation of repetitive firing in lumbar motoneurons during fictive locomotion in the cat. *Exp Brain Res* **90**, 441–455.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL & Cleveland DW (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**, 327–338.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW & Cleveland DW (1998). Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. *Science* **281**, 1851–1854.
- Brujin LI, Miller TM & Cleveland DW (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* **27**, 723–749.
- Brumley MR, Hentall ID, Pinzon A, Kadam BH, Blythe A, Sanchez FJ, Taberner AM & Noga BR (2007). Serotonin Concentrations in the Lumbosacral Spinal Cord of the Adult Rat Following Microinjection or Dorsal Surface Application. *Journal of Neurophysiology* **98**, 1440–1450.
- Bui TV, Grande G & Rose PK (2008). Multiple modes of amplification of synaptic inhibition to motoneurons by persistent inward currents. *Journal of Neurophysiology* **99**, 571–582.
- Bui TV, Ter-Mikaelian M, Bedrossian D & Rose PK (2006). Computational estimation of the distribution of L-type Ca(2+) channels in motoneurons based on variable threshold of activation of persistent inward currents. *Journal of Neurophysiology* **95**, 225–241.
- Buratti E & Baralle FE (2009). *The Molecular Links Between TDP-43 Dysfunction and Neurodegeneration*, 1st edn. *Advances in Genetics* **66**, 1–34.
- Burke RE, Levine DN & Zajac FE (1971). Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* **174**, 709–712.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P & Zajac FE (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *The Journal of Physiology* **234**, 723–748.
- Burrill JD, Moran L, Goulding MD & Saueressig H (1997). PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development. *Development* **124**, 4493–4503.
- Butera RJ, Rinzel J & Smith JC (1999). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex. II. Populations Of coupled pacemaker neurons. *Journal of Neurophysiology* **82**, 398–415.
- Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R & Hardiman O (2011). Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **82**, 623–627.

C

- Cai DJ & Rickard TC (2009). Reconsidering the role of sleep for motor memory. *Behav Neurosci* **123**, 1153–1157.
- Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA & Meininger V (1999). Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. *J Neurol Sci* **165 Suppl 1**, S21–S26.
- Canas PM, Simões AP, Rodrigues RJ & Cunha RA (2014). Predominant loss of glutamatergic terminal markers in a β -amyloid peptide model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **76 Pt A**, 51–56.
- Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, Strange RW, Doucette PA, Valentine JS, Tiwari A, Hayward LJ, Padua S, Cohlberg JA, Hasnain SS & Hart PJ (2008). Structures of the G85R Variant of SOD1 in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 16169–16177.
- Carlin KP, Bui TV, Dai Y & Brownstone RM (2009). Staircase Currents in Motoneurons: Insight into the Spatial Arrangement of Calcium Channels in the Dendritic Tree. *Journal of Neuroscience* **29**, 5343–5353.
- 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.
- Carlsson A, Falck B, Fuxe K & Hillarp N-Å (1964). Cellular Localization of Monoamines in the Spinal Cord. *Acta Physiologica Scandinavica* **60**, 112–119.
- Caroni P (1997). Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* **71**, 3–9.
- Carp JS, Tennissen AM, Chen XY & Wolpaw JR (2006). H-reflex operant conditioning in mice. *Journal of Neurophysiology* **96**, 1718–1727.
- Casas C, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Mancuso R, Osta R & Navarro X (2013). Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* **3**, 145–158.
- Caughey B & Lansbury PT (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**, 267–298.
- Caulfield MP (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **58**, 319–379.
- 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.
- Cazalets JR, Gardette M & Hilaire G (2000). Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *Journal of Neurophysiology* **83**, 2468–2470.
- Cazalets JR, 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. *Neurosci Lett* **111**, 116–121.
- Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y & Clarac F (1992a). 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 JR, Sqalli-Houssaini Y & Clarac F (1992b). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *The Journal of Physiology* **455**, 187–204.

- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW & Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805.
- Chang Q & Martin LJ (2009). Glycinergic Innervation of Motoneurons Is Deficient in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Am J Pathol* **174**, 574–585.
- Chang Q & Martin LJ (2011a). Motoneuron subtypes show specificity in glycine receptor channel abnormalities in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *channels* **5**, 299–303.
- Chang Q & Martin LJ (2011b). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Neuroscience* **31**, 2815–2827.
- Charcot JM & Joffroy A (1869). *Deux cas d'atrophie musculaire progressive*. Archives de physiologie normale et pathologique.
- Chau C, Barbeau H & Rossignol S (1998). Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *Journal of Neurophysiology* **79**, 392–409.
- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV & Kiernan MC (2010). Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem* **17**, 1942–1199.
- Chen Y, Chen L, Wang Y, Wolpaw JR & Chen XY (2011). Operant conditioning of rat soleus H-reflex oppositely affects another H-reflex and changes locomotor kinematics. *Journal of Neuroscience* **31**, 11370–11375.
- Cheng L, Samad OA, Xu Y, Mizuguchi R, Luo P, Shirasawa S, Goulding M & Ma Q (2005). Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. *Nat Neurosci* **8**, 1510–1515.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R & Mora G (2005). Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* **128**, 472–476.
- Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM & Gurney ME (1995). Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* **6**, 349–362.
- Choi C-I, Lee Y-D, Gwag BJ, Cho SI, Kim S-S & Suh-Kim H (2008). Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J Neurol Sci* **268**, 40–47.
- Chokroverty S (1996). Sleep and degenerative neurologic disorders. *Neurol Clin* **14**, 807–826.
- Choquet D & Triller A (2013). The dynamic synapse. *Neuron* **80**, 691–703.
- Christie KJ & Whelan PJ (2005). Monoaminergic Establishment of Rostrocaudal Gradients of Rhythmicity in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **94**, 1554–1564.
- Cina C & Hochman S (1998). Serotonin receptor pharmacology of the mammalian locomotor CPG: Activation by a 5-HT₇ receptor agonist in the isolated rat spinal cord. *Soc Neurosci Abstr*.
- Clarac F, Brocard F & Vinay L (2004). The maturation of locomotor networks. *Prog Brain Res* **143**, 57–66.
- Clark BD & Cope TC (1998). Frequency-dependent synaptic depression modifies postsynaptic firing probability in cats. *The Journal of Physiology* **512** (Pt 1), 189–196.
- Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL & Graham SH (2000). Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* **74**, 740–753.
- Clarke RW & Harris J (2002). RX 821002 as a tool for physiological investigation of alpha(2)-adrenoceptors. *CNS Drug Rev* **8**, 177–192.
- Cleland CL & Rymer WZ (1990). Neural mechanisms underlying the clasp-knife reflex in the cat. I. Characteristics of the reflex. *Journal of Neurophysiology* **64**, 1303–1318.

- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LSB & Cleveland DW (2003). Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* **302**, 113–117.
- Cleveland DW & Rothstein JD (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 806–819.
- Cochard P & Paulin D (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci* **4**, 2080–2094.
- Coco Lo D & La Bella V (2012). Fatigue, sleep, and nocturnal complaints in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* **19**, 760–763.
- Collingridge G (1987). Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* **330**, 604–605.
- Commissiong JW (1983). Development of catecholaminergic nerves in the spinal cord of the rat. *Brain Research* **264**, 197–208.
- Conforti L, Adalbert R & Coleman MP (2007). Neuronal death: where does the end begin? *Trends in Neurosciences* **30**, 159–166.
- Conradi S & Ronnevi LO (1993). Selective vulnerability of alpha motor neurons in ALS: relation to autoantibodies toward acetylcholinesterase (AChE) in ALS patients. *Brain Res Bull* **30**, 369–371.
- Conradi S & Skoglund S (1969). Observations on the ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the cat during postnatal development. *Acta Physiol Scand Suppl* **333**, 5–52.
- 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. *The Journal of Physiology* **405**, 369–384.
- Corcia P, Valdmans P, Millecamps S, Lionnet C, Blasco H, Mouzat K, Daoud H, Belzil V, Morales R, Pageot N, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Pradat PF, Couratier P, Salachas F, Lumbroso S, Rouleau GA, Meininger V & Camu W (2012). Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations. *Neurology* **78**, 1519–1526.
- 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. *Neurosci Lett* **171**, 147–150.
- Cowley KC & Schmidt BJ (1997). Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **77**, 247–259.
- Creed RS & Ruch TC (1932). Regional variations in sensitivity to flicker. *The Journal of Physiology* **74**, 407–423.
- Crick H & Wallis DI (1991). Inhibition of reflex responses of neonate rat lumbar spinal cord by 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* **103**, 1769–1775.
- 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. *The Journal of Physiology* **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. *Journal of Neuroscience* **29**, 7098–7109.

D

- Da Cruz S & Cleveland DW (2011). Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Current Opinion in Neurobiology* **21**, 904–919.
- Dadon-Nachum M, Melamed E & Offen D (2011). The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* **43**, 470–477.
- Dahlström A & Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica*.
- Dahlström A & Fuxe K (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. *Acta Physiologica Scandinavica*.
- Dal Canto MC & Gurney ME (1994). Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* **145**, 1271–1279.
- Dal Canto MC & Gurney ME (1997). A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **93**, 537–550.
- Danbolt NC (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* **65**, 1–105.
- Dangond F, Hwang D, Camelo S, Pasinelli P, Frosch MP, Stephanopoulos G, Stephanopoulos G, Brown RH & Gullans SR (2004). Molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of postmortem spinal cord gray matter. *Physiol Genomics* **16**, 229–239.
- Daube JR (2000). Electrodiagnostic studies in amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders. *Muscle Nerve* **23**, 1488–1502.
- Davis B & Sadik K (2006). Circadian cholinergic rhythms: implications for cholinesterase inhibitor therapy. *Dement Geriatr Cogn Disord* **21**, 120–129.
- de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J & Swash M (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* **119**, 497–503.
- De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, Brownlees J, Ackerley S, Shaw PJ, McLoughlin DM, Shaw CE, Leigh PN, Miller CCJ & Grierson AJ (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics* **16**, 2720–2728.
- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S & Miller CCJ (2008). Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases*. *Annu Rev Neurosci* **31**, 151–173.
- Deardorff AS, Romer SH, Deng Z, Bullinger KL, Nardelli P, Cope TC & Fyffe REW (2013). Expression of postsynaptic Ca²⁺-activated K⁺ (SK) channels at C-bouton synapses in mammalian lumbar -motoneurons. *The Journal of Physiology* **591**, 875–897.
- Deardorff AS, Romer SH, Sonner PM & Fyffe REW (2014). Swimming against the tide: investigations of the C-bouton synapse. *Front Neural Circuits* **8**, 106.
- Deforges S, Branchu J, Biondi O, Grondard C, Pariset C, Lécolle S, Lopes P, Vidal P-P, Chanoine C & Charbonnier F (2009). Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology* **587**, 3561–3572.
- Deitch JS, Alexander GM, Bensinger A, Yang S, Jiang JT & Heiman-Patterson TD (2014). Phenotype of Transgenic Mice Carrying a Very Low Copy Number of the Mutant Human G93A Superoxide Dismutase-1 Gene Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis ed. Abraham E. *PLoS ONE* **9**.
- DeJesus-Hernandez M et al. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245–256.

- Del Bo R, Ghezzi S, Corti S, Pandolfo M, Ranieri M, Santoro D, Ghione I, Prella A, Orsetti V, Mancuso M, Sorarù G, Briani C, Angelini C, Siciliano G, Bresolin N & Comi GP (2009). TARDBP (TDP-43) sequence analysis in patients with familial and sporadic ALS: identification of two novel mutations. *Eur J Neurol* **16**, 727–732.
- Delestrée N, Manuel M, Iglesias C, ElBasiouny SM, Heckman CJ & Zytnicki D (2014). Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology* **592**, 1687–1703.
- Deliagina TG, Orlovsky GN & Pavlova GA (1983). The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Exp Brain Res* **53**, 81–90.
- Deng H-X et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* **477**, 211–215.
- Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, Lannes B, Spreux-Varoquaux O, Gutknecht L, Rene F, Echaniz-Laguna A, Gonzalez de Aguilar JL, Lesch KP, Meininger V, Loeffler JP & Dupuis L (2013). Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* **136**, 483–493.
- Destexhe A & Sejnowski TJ (1995). G protein activation kinetics and spillover of gamma-aminobutyric acid may account for differences between inhibitory responses in the hippocampus and thalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9515–9519.
- Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S & Eggan KC (2008). Human Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation. *Stem Cell* **3**, 637–648.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T & Eggan K (2007). Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* **10**, 608–614.
- Dietz V, Müller R & Colombo G (2002). Locomotor activity in spinal man: significance of afferent input from joint and load receptors. *Brain* **125**, 2626–2634.
- Doble A (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* **47**, S233–S241.
- Doherty J & Dingledine R (2001). Reduced excitatory drive onto interneurons in the dentate gyrus after status epilepticus. *Journal of Neuroscience* **21**, 2048–2057.
- Dougherty KJ & Kiehn O (2010a). Functional organization of V2a-related locomotor circuits in the rodent spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* **1198**, 85–93.
- Dougherty KJ & Kiehn O (2010b). Firing and Cellular Properties of V2a Interneurons in the Rodent Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* **30**, 24–37.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47–95.
- Dubey M, Hoda S, Chan WK-H, Pimenta A, Ortiz DD & Shea TB (2004). Reexpression of vimentin in differentiated neuroblastoma cells enhances elongation of axonal neurites. *J Neurosci Res* **78**, 245–249.
- Dubuc R, Cabelguen JM & Rossignol S (1988). Rhythmic fluctuations of dorsal root potentials and antidromic discharges of primary afferents during fictive locomotion in the cat. *J Neurophysiol* **60**, 2014–2036.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar J-L, Oudart H, de Tapia M, Barbeito L & Loeffler J-P (2004). Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Trigger and a Target. *Neurodegenerative Dis* **1**, 245–254.
- Dupuis L, Rene F, Scala FD, Aguilar J-LG, Tapia M & Loeffler J-P (2002). Denervation Is Not a Primary Cause of Prion Protein Down-Regulation Occurring in the Spinal Cord of a Transgenic Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 116–119.

- Dupuis L, Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Jullien P, Lacomblez L, Salachas F, Bruneteau G, Pradat P-F, Loeffler J-P & Meininger V (2010). Platelet serotonin level predicts survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* **5**, e13346.
- Durand J, Amendola J, Bories C & Lamotte d'Incamps B (2006). Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Physiology-Paris* **99**, 211–220.
- Dyck J, Lanuza GM & Gosgnach S (2012). Functional characterization of dI6 interneurons in the neonatal mouse spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **107**, 3256–3266.

E

- Ebben MR, Shahbazi M, Lange DJ & Krieger AC (2012). REM behavior disorder associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* **13**, 473–474.
- Eccles JC (1969). Central cholinergic transmission and its behavioral aspects. Historical introduction. *Fed Proc* **28**, 90–94.
- Eccles JC & McIntyre AK (1953). The effects of disuse and of activity on mammalian spinal reflexes. *The Journal of Physiology* **121**, 492–516.
- Eccles JC, Fatt P & Koketsu K (1954). Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *The Journal of Physiology* **126**, 524–562.
- Eccles RM & Lundberg A (1958). Integrative pattern of Ia synaptic actions on motoneurons of hip and knee muscles. *The Journal of Physiology* **144**, 271–298.
- Elbasiouny SM, Amendola J, Durand J & Heckman CJ (2010). Evidence from computer simulations for alterations in the membrane biophysical properties and dendritic processing of synaptic inputs in mutant superoxide dismutase-1 motoneurons. *Journal of Neuroscience* **30**, 5544–5558.
- ElBasiouny SM, Schuster JE & Heckman CJ (2010). Clinical Neurophysiology. *Clin Neurophysiol* **121**, 1669–1679.
- Engberg I & Lundberg A (1969). An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiologica Scandinavica* **75**, 614–630.
- Engelhardt JJ & Appel SH (1990). IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **47**, 1210–1216.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, Van Heyningen V, Jessell TM & Briscoe J (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169–180.
- Erlanger J & Bishop GH (1926). The action potential waves transmitted between the sciatic nerve and its spinal roots. *American Journal of Physiology* **78**, 574–591.
- Evarts EV & Hughes JR (1957). Effects of prolonged optic nerve tetanization on lateral geniculate potentials. *Am J Physiol* **188**, 245–248.

F

- Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, Halloran MA, Gleeson PA, Blair IP, Soo KY, King AE & Atkin JD (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics* **23**, 3579–3595.
- Feng TP (1941). Studies on the neuromuscular junction XXVL the changes of the end-plate potential during and after prolonged stimulation. *Chin J Physiol* **16**, 341–372.

- Feng-Chen KC & Wolpaw JR (1996). Operant conditioning of H-reflex changes synaptic terminals on primate motoneurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9206–9211.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M & Shaw PJ (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* **7**, 616–630.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH & Beal MF (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **69**, 2064–2074.
- Fidler JA, Treleaven CM, Frakes A, Tamsett TJ, McCrate M, Cheng SH, Shihabuddin LS, Kaspar BK & Dodge JC (2011). Disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: the influence of chronic stress and corticosterone. *The FASEB Journal* **25**, 4369–4377.
- Filali M, Lalonde R & Rivest S (2011). Sensorimotor and cognitive functions in a SOD1(G37R) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Behavioural Brain Research* **225**, 215–221.
- Filipchuk AA & Durand J (2012). Postnatal dendritic development in lumbar motoneurons in mutant superoxide dismutase 1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **209**, 144–154.
- Fine EJ, Ionita CC & Lohr L (2002). The history of the development of the cerebellar examination. *Semin Neurol* **22**, 375–384.
- Fischer LR & Glass JD (2007). Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* **4**, 431–442.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA & Glass JD (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology* **185**, 232–240.
- Fleshman JW, Lev-Tov A & Burke RE (1984). Peripheral and central control of flexor digitorum longus and flexor hallucis longus motoneurons: the synaptic basis of functional diversity. *Exp Brain Res* **54**, 133–149.
- Fleshman JW, Rudomin P & Burke RE (1988). Supraspinal control of a short-latency cutaneous pathway to hindlimb motoneurons. *Exp Brain Res* **69**, 449–459.
- Fliegner KH, Kaplan MP, Wood TL, Pintar JE & Liem RK (1994). Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *J Comp Neurol* **342**, 161–173.
- Fone KC, Robinson AJ & Marsden CA (1991). Characterization of the 5-HT receptor subtypes involved in the motor behaviours produced by intrathecal administration of 5-HT agonists in rats. *Br J Pharmacol* **103**, 1547–1555.
- Forrest V, Ince P, Leitch M, Marshall EF & Shaw PJ (1996). Serotonergic neurotransmission in the spinal cord and motor cortex of patients with motor neuron disease and controls: quantitative autoradiography for 5-HT_{1a} and 5-HT₂ receptors. *J Neurol Sci* **139 Suppl**, 83–90.
- Forssberg H, Grillner S & Halbertsma J (1980a). The locomotion of the low spinal cat. I. Coordination within a hindlimb. *Acta Physiologica Scandinavica* **108**, 269–281.
- Forssberg H, Grillner S, Halbertsma J & Rossignol S (1980b). The locomotion of the low spinal cat. II. Interlimb coordination. *Acta Physiologica Scandinavica* **108**, 283–295.
- Fortress AM, Buhusi M, Helke KL & Granholm A-CE (2011). Cholinergic Degeneration and Alterations in the TrkA and p75NTR Balance as a Result of Pro-NGF Injection into Aged Rats. *J Aging Res* **2011**, 460543.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W & Caroni P (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *Journal of Neuroscience* **20**, 2534–2542.

- Fritschy JM & Grzanna R (1990). Demonstration of two separate descending noradrenergic pathways to the rat spinal cord: evidence for an intragriseal trajectory of locus coeruleus axons in the superficial layers of the dorsal horn. *J Comp Neurol* **291**, 553–582.
- Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, Rojas F, Brown RH, Madrid R & Zundert B (2013). Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motoneuron death by inducing hyperexcitability. *Journal of Neurophysiology* **109**, 2803–2814.
- Fujii R & Takumi T (2005). TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *Journal of Cell Science* **118**, 5755–5765.
- Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG & Takumi T (2005). The RNA Binding Protein TLS Is Translocated to Dendritic Spines by mGluR5 Activation and Regulates Spine Morphology. *Current Biology* **15**, 587–593.
- Fung SJ, Manzoni D, Chan JYH, Pompeiano O & Barnes CD (1991). Locus coeruleus control of spinal motor output. In, pp. 395–409. Progress in brain research.

G

- Gajdusek DC & Salazar AM (1982). Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology* **32**, 107–126.
- Gallo V et al. (2009). Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort. *Ann Neurol* **65**, 378–385.
- Garcia-Campmany L, Stam FJ & Goulding M (2010). From circuits to behaviour: motor networks in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* **20**, 116–125.
- Garcia-Rill E, Skinner RD, Conrad C, Mosley D & Campbell C (1986). Projections of the mesencephalic locomotor region in the rat. *Brain Res Bull* **17**, 33–40.
- García-Marín V, García-López P & Freire M (2007). Cajal's contributions to glia research. *Trends in Neurosciences* **30**, 479–487.
- Gardoni F, Ghiglieri V, Di Luca M & Calabresi P (2010). *Assemblies of glutamate receptor subunits with post-synaptic density proteins and their alterations in Parkinson*. Prog Brain Res **183**, 196–182
- Garruto RM, Yanagihara R & Gajdusek DC (1985). Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology* **35**, 193–198.
- Geiman EJ, Zheng W, Fritschy J-M & Alvarez FJ (2002). Glycine and GABAA receptor subunits on Renshaw cells: Relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *J Comp Neurol* **444**, 275–289.
- Geracitano R, Paolucci E, Prisco S, Guatteo E & Zona C (2003). Altered long-term corticostriatal synaptic plasticity in transgenic mice overexpressing human CU/ZN superoxide dismutase (GLY 93→ALA) mutation. *Neuroscience* **118**, 399–408.
- Gerber YN, Sabourin J-C, Hugnot J-P & Perrin FE (2012a). Unlike Physical Exercise, Modified Environment Increases the Lifespan of SOD1G93A Mice However Both Conditions Induce Cellular Changes ed. Le W. *PLoS ONE* **7**, e45503.
- Gerber YN, Sabourin J-C, Rabano M, Vivanco MDM & Perrin FE (2012b). Early Functional Deficit and Microglial Disturbances in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis ed. Cai H. *PLoS ONE* **7**, e36000.
- Gerin C & Privat A (1998). Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity: II. A study with microdialysis probes implanted in the ventral horn of the spinal cord. *Brain Research* **794**, 169–173.

- Gerin C, Becquet D & Privat A (1995). Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity. I. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. *Brain Research* **704**, 191–201.
- Geser F, Lee VMY & Trojanowski JQ (2010). Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: A spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathology* **30**, 103–112.
- Gillberg PG, Gordh T, Hartvig P, Jansson I, Pettersson J & Post C (1989). Characterization of the antinociception induced by intrathecally administered carbachol. *Pharmacol Toxicol* **64**, 340–343.
- Giménez y Ribotta M, Sandillon F & Privat A (1998). Influence of hypergravity on the development of monoaminergic systems in the rat spinal cord. *Brain Res Dev* **111**, 147–157.
- Gonatas NK, Stieber A & Gonatas JO (2006). Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J Neurol Sci* **246**, 21–30.
- Gordon IT & Whelan PJ (2006). Monoaminergic Control of Cauda-Equina-Evoked Locomotion in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* **96**, 3122–3129.
- Gordon PH (2011). Amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* **25**, 1–15.
- Gordon PH (2013). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. *Aging Dis* **4**, 295–310.
- 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 Publishing Group* **440**, 215–219.
- Gould TW & Oppenheim RW (2011). Motor neuron trophic factors: therapeutic use in ALS? *Brain Research Reviews* **67**, 1–39.
- Goulding M (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 1–12.
- Goulding M & Lamar E (2000). Neuronal patterning: Making stripes in the spinal cord. *Curr Biol* **10**, R565–R568.
- Goulding M & Pfaff SL (2005). Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* **15**, 14–20.
- Goulding M, Lanuza G, Sapir T & Narayan S (2002). The formation of sensorimotor circuits. *Current Opinion in Neurobiology* **12**, 508–515.
- Gómez-Tortosa E, Gallego J, Guerrero-López R, Marcos A, Gil-Neciga E, Sainz MJ, Díaz A, Franco-Macías E, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C & Pérez-Pérez J (2013). C9ORF72 hexanucleotide expansions of 20–22 repeats are associated with frontotemporal deterioration. *Neurology* **80**, 366–370.
- Granit R, Kernell D & Smith RS (1963). Delayed depolarization and the repetitive response to intracellular stimulation of mammalian motoneurons. *The Journal of Physiology* **168**, 890–910.
- Grillner S (1981). Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. *Comprehensive Physiology* 1179–1236.
- Grillner S (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 573–586.
- Grillner S & Rossignol S (1978). Contralateral reflex reversal controlled by limb position in the acute spinal cat injected with clonidine iv. *Brain Research* **144**, 411–414.
- Grillner S & Zangger P (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res* **34**, 241–261.

- Grillner S & Zangger P (1984). The effect of dorsal root transection on the efferent motor pattern in the cat's hindlimb during locomotion. *Acta Physiologica Scandinavica* **120**, 393–405.
- Grillner S, McClellan A, Sigvardt K, Wallen P & Wilén M (1981). Activation of NMDA-receptors elicits “Fictive locomotion” in lamprey spinal cord in vitro. *Acta Physiologica Scandinavica* **113**, 549–551.
- Grillner S, Perret C & Zangger P (1976). Central generation of locomotion in the spinal dogfish. *Brain Research* **109**, 255–269.
- Grinsted A, Moore JC & Jevrejeva S (2004). *Application of the cross wavelet transform and wavelet coherence to geophysical time series*. HAL - CCSD.
- Gritton HJ, Stasiak AM, Sarter M & Lee TM (2013). Cognitive performance as a zeitgeber: cognitive oscillators and cholinergic modulation of the SCN entrain circadian rhythms. *PLoS ONE* **8**, e56206.
- Gros-Louis F, Gaspar C & Rouleau GA (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1762**, 956–972.
- Gross MK, Dottori M & Goulding M (2002). Lbx1 Specifies Somatosensory Association Interneurons in the Dorsal Spinal Cord. *Neuron* **34**, 535–549.
- Grumbach L & Wilber DT (1940). Post-tetanic potentiation and suppression in muscle. *American Journal of Physiology*.
- Gubellini P, Pisani A, Centonze D, Bernardi G & Calabresi P (2004). Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Progress in Neurobiology* **74**, 271–300.
- Guilmatre A, Huguet G, Delorme R & Bourgeron T (2013). The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders ed. Carbonetto S & Bourgeron T. *Devel Neurobio* **74**, 113–122.
- Guo Y-S, Wu D-X, Wu H-R, Wu S-Y, Yang C, Li B, Bu H, Zhang Y-S & Li C-Y (2009). Sensory involvement in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Mol Med* **41**, 140.
- Gurfinkel VS & Shik ML (1974). The control of posture and locomotion. *Motor control* 217-234.
- Gurney ME (1997). The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci* **152 Suppl 1**, S67–S73.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW & Deng HX (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772–1775.

H

- Haenggeli C & Kato AC (2002). Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett* **335**, 39–43.
- Haga T (2013). Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad, Ser B* **89**, 226–256.
- Halaris AE, Jones BE & Moore RY (1976). Axonal transport in serotonin neurons of the midbrain raphe. *Brain Research* **107**, 555-574.
- Hall ED, Oostveen JA & Gurney ME (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* **23**, 249–256.
- Hall H, Reyes S, Landeck N, Bye C, Leanza G, Double K, Thompson L, Halliday G & Kirik D (2014). Hippocampal Lewy pathology and cholinergic dysfunction are associated with dementia in Parkinson's disease. *Brain* **137**, 2493–2508.

- Hammar I & Jankowska E (2003). Modulatory effects of alpha1-,alpha2-, and beta -receptor agonists on feline spinal interneurons with monosynaptic input from group I muscle afferents. *Journal of Neuroscience* **23**, 332–338.
- 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.
- Hamon M & Blier P (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **45**, 54–63.
- Han P & Whelan PJ (2009). Modulation of AMPA currents by D 1-like but not D 2-like receptors in spinal motoneurons. *Neuroscience* **158**, 1699–1707.
- Hanisch U-K (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155.
- Harris EW, Ganong AH & Cotman CW (1984). Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research* **323**, 132–137.
- Harris JJ, Jolivet R & Attwell D (2012). Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron* **75**, 762–777.
- Harris-Warrick RM & Cohen AH (1985). Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord. *J Exp Biol* **116**, 27–46.
- Harris-Warrick RM & Marder E (1991). Modulation of neural networks for behavior. *Annu Rev Neurosci* **14**, 39–57.
- Hartvig P, Gillberg PG, Gordh TJ & Post C (1989). Cholinergic mechanisms in pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci Suppl*, 75–79.
- Harvey PJ, Li Y & Bennett DJ (2006). Persistent Sodium Currents and Repetitive Firing in Motoneurons of the Sacrocaudal Spinal Cord of Adult Rats. *Journal of Neurophysiology* **96**, 1141–1157.
- Harwood CA, McDermott CJ & Shaw PJ (2009). Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotroph Lateral Scler* **10**, 191–204.
- Hayashi T (1954a). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio journal of medicine* **4** vol 3 183–192.
- Hayashi T (1954b). A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Keio Journal of medicine*. 46–64.
- Hayworth CR & Gonzalez-Lima F (2009). Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6.SOD1(G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* **164**, 975–985.
- Häggglund M, Borgius L, Dougherty KJ & Kiehn O (2010). Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat Neurosci* **13**, 246–252.
- 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.
- Heckman CJ, Johnson M, Mottram C & Schuster J (2008). Persistent Inward Currents in Spinal Motoneurons and Their Influence on Human Motoneuron Firing Patterns. *The Neuroscientist* **14**, 264–275.
- Heckman CJ, Lee RH & Brownstone RM (2003). Hyperexcitable dendrites in motoneurons and their neuromodulatory control during motor behavior. *Trends in Neurosciences* **26**, 688–695.

- Heckman CJ, Mottram C, Quinlan K, Theiss R & Schuster J (2009). Clinical Neurophysiology. *Clin Neurophysiol* **120**, 2040–2054.
- Heckmann CJ, Gorassini MA & Bennett DJ (2005). Persistent inward currents in motoneuron dendrites: implications for motor output. *Muscle Nerve* **31**, 135–156.
- Hedlund E, Hefferan MP, Marsala M & Isacson O (2007). Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders. *Eur J Neurosci* **26**, 1721–1737.
- Hegedus J, Putman CT & Gordon T (2007). Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* **28**, 154–164.
- Heinemann U & Lux HD (1977). Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Research* **120**, 231–249.
- Heinemann U, Schaible HG & Schmidt RF (1990). Changes in extracellular potassium concentration in cat spinal cord in response to innocuous and noxious stimulation of legs with healthy and inflamed knee joints. *Exp Brain Res* **79**, 283–292.
- Hellström J, Arvidsson U, Elde R, Cullheim S & Meister B (1999). Differential expression of nerve terminal protein isoforms in VACHT-containing varicosities of the spinal cord ventral horn. *J Comp Neurol* **411**, 578–590.
- Hellström J, Oliveira ALR, Meister B & Cullheim S (2003). Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol* **460**, 476–486.
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR & Appel SH (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* **55**, 221–235.
- Henneman E (1957). Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* **126**, 1345–1347.
- Hensler JG, Artigas F, Bortolozzi A, Daws LC, De deurwaerdère P, Milan L, Navailles S & Koek W (2013). Catecholamine/Serotonin interactions: systems thinking for brain function and disease. *Adv Pharmacol* **68**, 167–197.
- Herron LR & Miles GB (2012). Gender-specific perturbations in modulatory inputs to motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **226**, 313–323.
- Hewett JA (2009). Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem* **110**, 1717–1736.
- Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, Arapovic D, White EK, Koury MJ, Oltz EM, Van Kaer L & Ruley HE (2000). Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* **24**, 175–179.
- Higgins CM, Jung C & Xu Z (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* **4**, 16.
- Hikosaka O (1991). Basal ganglia — possible role in motor coordination and learning. *Current Opinion in Neurobiology* **1**, 638–643.
- Hiley CR & Burgen AS (1974). The distribution of muscarinic receptor sites in the nervous system of the dog. *J Neurochem* **22**, 159–162.
- Hillel AD & Miller R (1989). Bulbar amyotrophic lateral sclerosis: patterns of progression and clinical management. *Head Neck* **11**, 51–59.
- Hinckley CA & Ziskind-Conhaim L (2006). Electrical coupling between locomotor-related excitatory interneurons in the mammalian spinal cord. *Journal of Neuroscience* **26**, 8477–8483.

- Hinckley CA, Hartley R, Wu L, Todd A & 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.
- Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S & Nakano I (1984a). Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**, 461–470.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW & Saccomanno G (1984b). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**, 471–480.
- Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I & Hutz RJ (1998). Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* **273**, 7765–7769.
- Honda M & Ono H (1999). Differential effects of (R)- and (S)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin on the monosynaptic spinal reflex in rats. *Eur J Pharmacol* **373**, 171–179.
- Hossaini M, Cardona Cano S, van Dis V, Haasdijk ED, Hoogenraad CC, Holstege JC & Jaarsma D (2011). Spinal inhibitory interneuron pathology follows motor neuron degeneration independent of glial mutant superoxide dismutase 1 expression in SOD1-ALS mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**, 662–677.
- Hounsgaard J & Kiehn O (1989). Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *The Journal of Physiology* **414**, 265–282.
- Hounsgaard J & Kiehn O (1993). Calcium spikes and calcium plateaux evoked by differential polarization in dendrites of turtle motoneurons in vitro. *The Journal of Physiology* **468**, 245–259.
- Hounsgaard J & Mintz I (1988). Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *The Journal of Physiology* **398**, 591–603.
- Hounsgaard J, Hultborn H, Jespersen B & Kiehn O (1984). Intrinsic membrane properties causing a bistable behaviour of alpha-motoneurons. *Exp Brain Res* **55**, 391–394.
- Hounsgaard 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. *The Journal of Physiology* **405**, 345–367.
- Houser CR (1990). Cholinergic synapses in the central nervous system: studies of the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *Journal of electron microscopy technique* **15**, 2–19.
- Houssaini YS, Cazalets JR, Martini F & Clarac F (1993). Induction of fictive locomotion by sulphur-containing amino acids in an in vitro newborn rat preparation. *Eur J Neurosci* **5**, 1226–1232.
- Hsiao CF, Trueblood PR, Levine MS & Chandler SH (1997). Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *Journal of Neurophysiology* **77**, 2910–2924.
- Hu P, Stylos-Allan M & Walker MP (2006). Sleep facilitates consolidation of emotional declarative memory. *Psychol Sci* **17**, 891–898.
- Huang A, Noga BR, Carr PA, Fedirchuk B & Jordan LM (2000). Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization. *Journal of Neurophysiology* **83**, 3537–3547.
- Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu Y-J, Wang D, Wei X & Xia X-G (2011). FUS Transgenic Rats Develop the Phenotypes of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration ed. Cox GA. *PLoS Genet* **7**, e1002011.
- Huang JC & Peroutka SJ (1987). Identification of 5-hydroxytryptamine 1 binding site subtypes in rat spinal cord. *Brain Research* **436**, 173–176.

- Hulme EC, Birdsall NJM & Buckley NJ (1990). Muscarinic Receptor Subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**, 633–673.
- Hultborn H (1999). Plateau potentials and their role in regulating motoneuronal firing. *Prog Brain Res* **123**, 39–48.
- Hultborn H, Illert M & Santini M (1976a). Convergence on interneurons mediating the reciprocal Ia inhibition of motoneurons. I. Disynaptic Ia inhibition of Ia inhibitory interneurons. *Acta Physiologica Scandinavica* **96**, 193–201.
- Hultborn H, Illert M & Santini M (1976b). Convergence on interneurons mediating the reciprocal Ia inhibition of motoneurons. II. Effects from segmental flexor reflex pathways. *Acta Physiologica Scandinavica* **96**, 351–367.
- Hultborn H, Illert M & Santini M (1976c). Convergence on interneurons mediating the reciprocal Ia inhibition of motoneurons. III. Effects from supraspinal pathways. *Acta Physiologica Scandinavica* **96**, 368–391.
- 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? *Neurosci Lett* **1**, 147–152.
- Humphreys JM & Whelan PJ (2012). Dopamine exerts activation-dependent modulation of spinal locomotor circuits in the neonatal mouse. *Journal of Neurophysiology* **108**, 3370–3381.
- Hunt CC (1954). Relation of function to diameter in afferent fibers of muscle nerves. *J Gen Physiol* **38**, 117–131.
- Hunt CC & Kuffler SW (1951). Further study of efferent small-nerve fibres to mammalian muscle spindles. Multiple spindle innervation and activity during contraction. *The Journal of Physiology*.
- Hut RA & Van der Zee EA (2011). The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behavioural Brain Research* **221**, 466–480.

I

- Idzikowski C (1984). Sleep and memory. *Br J Psychol* **75** (Pt 4), 439–449.
- Ikemoto A, Nakamura S, Akiguchi I & Hirano A (2002). Differential expression between synaptic vesicle proteins and presynaptic plasma membrane proteins in the anterior horn of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **103**, 179–187.
- Ikonomidou C & Turski L (1996). Neurodegenerative disorders: clues from glutamate and energy metabolism. *Crit Rev Neurobiol* **10**, 239–263.
- Inoue K, Fujimura H, Ogawa Y, Satoh T, Shimada K & Sakoda S (2002). Familial amyotrophic lateral sclerosis with a point mutation (G37R) of the superoxide dismutase 1 gene: a clinicopathological study. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **3**, 244–247.
- Isakson P, Holland P & Simonsen A (2013). The role of ALFY in selective autophagy. *Cell Death and Differentiation* **20**, 12–20.

J

- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JAC, Hawkins R, Van Duijn W, Verpaget HW, London J & Holstege JC (2000). Human Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Overexpression in Mice Causes Mitochondrial Vacuolization, Axonal Degeneration, and Premature Motoneuron Death and Accelerates Motoneuron Disease in Mice Expressing a Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Mutant SOD1. *Neurobiology of Disease* **7**, 623–643.

- Jaarsma D, Rognoni F, Van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED & Holstege JC (2001). CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* **102**, 293–305.
- Jacobs BL & Fornal CA (1997). Serotonin and motor activity. *Current Opinion in Neurobiology* **7**, 820–825.
- Jankowska E (1992). Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Progress in Neurobiology* **38**, 335–378.
- Jehle T, Bauer J, Blauth E, Hummel A, Darstein M, Freiman TM & Feuerstein TJ (2000). Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* **130**, 1227–1234.
- Jessell TM (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature Reviews Genetics* **1**, 20–29.
- Ji K, Miyauchi J & Tsirka SE (2013). Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plast* **2013**, 627325.
- Jiang Z, Carlin KP & Brownstone RM (1999). An in vitro functionally mature mouse spinal cord preparation for the study of spinal motor networks. *Brain Research* **816**, 493–499.
- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME & Kopito RR (2000). Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12571–12576.
- Johnston JA, Ward CL & Kopito RR (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of Cell Biology* **143**, 1883–1898.
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar J-L, Pradat P-F, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw J-J, Loeffler J-P & Meininger V (2005). Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* **57**, 553–556.
- Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brännström T, Lindberg M, Oliveberg M & Marklund SL (2006). Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models. *Brain* **129**, 451–464.
- 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.
- Joshi K, Lee S, Lee B, Lee JW & Lee S-K (2009). LMO4 Controls the Balance between Excitatory and Inhibitory Spinal V2 Interneurons. *Neuron* **61**, 839–851.
- Joyce PI, Fratta P, Fisher EMC & Acevedo-Arozena A (2011). SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome* **22**, 420–448.
- Julien J-P (2001). Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review Unfolding the Toxicity of the Misfolded. *Cell* **104**, 581–591.
- Julien J-P & Beaulieu J-M (2000). Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? *J Neurol Sci* **180**, 7–14.
- Juneja T, Pericak-Vance MA, Laing NG, Dave S & Siddique T (1997). Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology* **48**, 55–57.
- Juvin L, Le Gal JP, 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.

K

- Kabashi E, Agar JN, Taylor DM, Minotti S & Durham HD (2004). Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **89**, 1325–1335.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Velde CV, Bouchard J-P, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat P-F, Camu W, Meininger V, Dupre N & Rouleau GA (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **40**, 572–574.
- Kanai K, Shibuya K, Sato Y, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Iose S, Fujimaki Y, Ohmori S, Koga S & Kuwabara S (2012). Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **83**, 734–738.
- Kanning KC, Kaplan A & Henderson CE (2010). Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annu Rev Neurosci* **33**, 409–440.
- Karoum F, Commissiong JC, Neff NH & Wyatt RJ (1981). Regional differences in catecholamine formation and metabolism in the rat spinal cord. *Brain Research* **212**, 361–366.
- Karunaratne A, Hargrave M, Poh A & Yamada T (2002). GATA Proteins Identify a Novel Ventral Interneuron Subclass in the Developing Chick Spinal Cord. *Developmental Biology* **249**, 30–43.
- Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD & Gage FH (2003). Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**, 839–842.
- Kawamata H & Manfredi G (2010). Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of Ageing and Development* **131**, 517–526.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T & McGeer PL (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* **140**, 691–707.
- Kawamura Y, Dyck PJ, Shimono M, Okazaki H, Tateishi J & Doi H (1981). Morphometric comparison of the vulnerability of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **40**, 667–675.
- Kernell D (1965). Synaptic influence on the repetitive activity elicited in cat lumbosacral motoneurons by long-lasting injected currents. *Acta Physiologica Scandinavica* **63**, 409–410.
- Khundakar AA & Thomas AJ (2014). Neuropathology of Depression in Alzheimer's Disease: Current Knowledge and the Potential for New Treatments. *J Alzheimers Dis*.
- Kidd GL (1964). Excitation of primary muscle spindle endings by beta-axon stimulation. *Nature* **203**, 1248–1251.
- Kiehn O (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* **29**, 279–306.
- Kiehn O & Dougherty K (2013). Locomotion: Circuits and Physiology. *Neuroscience in the 21st Century*, pp. 1209–1236. Locomotion: Circuits and Physiology, New York, NY.
- Kiehn O & Harris-Warrick RM (1992). 5-HT modulation of hyperpolarization-activated inward current and calcium-dependent outward current in a crustacean motor neuron. *Journal of Neurophysiology* **68**, 496–508.
- 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, 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 O, Sillar KT, Kjaerulff O & McDearmid JR (1999). Effects of noradrenaline on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* **82**, 741–746.
- Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JRT, Martin J, Schiavo G, Fisher EMC & Greensmith L (2005). A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *The Journal of Cell Biology* **169**, 561–567.
- Kim TS (1989). Hope as a mode of coping in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Nursing* **21**.
- King AE, Dickson TC, Blizzard CA, Woodhouse A, Foster SS, Chung RS & Vickers JC (2011). Neuron–glia interactions underlie ALS-like axonal cytoskeletal pathology. *NBA* **32**, 459–469.
- Kirby J, Menzies FM, Cookson MR, Bushby K & Shaw PJ (2002). Differential gene expression in a cell culture model of SOD1-related familial motor neurone disease. *Human Molecular Genetics* **11**, 2061–2075.
- Kjaerulff O & Kiehn O (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study. *J Neurosci* **16**, 5777–5794.
- Kloppel C, Michels C, Zimmer J, Herrmann JM & Riemer J (2010). Biochemical and Biophysical Research Communications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **403**, 114–119.
- Koelliker A (1862). Untersuchungen über die letzten Endigungen der Nerven. *Kupfertafeln*.
- Kojic L, Gu Q, Douglas RM & Cynader MS (1997). Serotonin facilitates synaptic plasticity in kitten visual cortex: an in vitro study. *Brain Res Dev Brain Res* **101**, 299–304.
- Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ & Chan PH (1997). Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **17**, 4180–4189.
- Kong J & Xu Z (1998). Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* **18**, 3241–3250.
- Kölliker Von A & Turner WA (1891). The Minute Anatomy of the Spinal Cord and Cerebellum Demonstrated by Golgi's Method. *J Anat Physiol* **25**, 443–460.
- Krakora D, Macrander C & Suzuki M (2012). Neuromuscular Junction Protection for the Potential Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology Research International* **2012**, 1–8.
- 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.
- Kreutzberg GW (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* **19**, 312–318.
- Kríz N, Syková E, Ujec E & Vyklický L (1974). Changes of extracellular potassium concentration induced by neuronal activity in the spinal cord of the cat. *The Journal of Physiology* **238**, 1–15.
- Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A & Wess J (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature Publishing Group* **13**, 549–560.
- Kudo N & Yamada T (1987a). Morphological and physiological studies of development of the monosynaptic reflex pathway in the rat lumbar spinal cord. *The Journal of Physiology* **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. *Neurosci Lett* **75**, 43–48.

- Kudo T, Loh DH, Truong D, Wu Y & Colwell CS (2011a). Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* **232**, 66–75.
- Kudo T, Schroeder A, Loh DH, Kuljis D, Jordan MC, Roos KP & Colwell CS (2011b). Dysfunctions in circadian behavior and physiology in mouse models of Huntington's disease. *Experimental Neurology* **228**, 80–90.
- Kuffler SW, Hunt CC & Quilliam JP (1951). Function of medullated small-nerve fibers in mammalian ventral roots; efferent muscle spindle innervation. *Journal of Neurophysiology* **14**, 29–54.
- Kumar T & Jha SK (2012). Sleep deprivation impairs consolidation of cued fear memory in rats. *PLoS ONE* **7**, e47042.
- Kuo JJ, Lee RH, Johnson MD, Heckman HM & Heckman CJ (2003). Active dendritic integration of inhibitory synaptic inputs in vivo. *Journal of Neurophysiology* **90**, 3617–3624.
- Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults NA, Fu R, Bär PR, Anelli R, Heckman CJ & Kroese ABA (2004). Hyperexcitability of Cultured Spinal Motoneurons From Presymptomatic ALS Mice. *Journal of Neurophysiology* **91**, 571–575.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R & Heckman CJ (2005). Increased persistent Na⁺ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *The Journal of Physiology* **563**, 843–854.
- Kurihara T, Suzuki H, Yanagisawa M & Yoshioka K (1993). Muscarinic excitatory and inhibitory mechanisms involved in afferent fibre-evoked depolarization of motoneurons in the neonatal rat spinal cord. *Br J Pharmacol* **110**, 61–70.
- Kurland LT & Mulder DW (1955a). Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. I. *Neurology* **5**, 182–196.
- Kurland LT & Mulder DW (1955b). Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. II. *Neurology* **5**, 249–268.
- Kurland LT, Mulder DW & Westlund KB (1955). Multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis; etiologic significance of recent epidemiologic and genetic studies. *N Engl J Med* **252**, 649–653.
- Kuroda M, Wang X, Sok J, Yin Y, Chung P, Giannotti JW, Jacobs KA, Fitz LJ, Murtha-Riel P, Turner KJ & Ron D (1999). Induction of a secreted protein by the myxoid liposarcoma oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5025–5030.
- Kurt A, Nijboer F, Matuz T & Kübler A (2007). Depression and anxiety in individuals with amyotrophic lateral sclerosis: epidemiology and management. *CNS Drugs* **21**, 279–291.
- Kühne W (1863). Die Muskelspindeln. *Archiv f pathol Anat* **28**, 528–538.
- Kwan AC, Dietz SB, Webb WW & Harris-Warrick RM (2009). Activity of Hb9 Interneurons during Fictive Locomotion in Mouse Spinal Cord. *Journal of Neuroscience* **29**, 11601–11613.
- Kwiatkowski TJ et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205–1208.

L

- Lagerbäck PA (1985). An ultrastructural study of cat lumbosacral gamma-motoneurons after retrograde labelling with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **240**, 256–264.
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M & Cleveland DW (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* **19**, R46–R64.
- Lai YY & Siegel JM (1990). Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *J Neurosci* **10**, 2727–2734.

- Lamanauskas N & Nistri A (2008). Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* **27**, 2501–2514.
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascaño J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS & Holzbaur ELF (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* **34**, 715–727.
- Lamotte d'Incamps B & Ascher P (2008). Four Excitatory Postsynaptic Ionotropic Receptors Coactivated at the Motoneuron-Renshaw Cell Synapse. *Journal of Neuroscience* **28**, 14121–14131.
- Lancelot E, Lecanu L, Revaud ML, Boulu RG, Plotkine M & Callebert J (1998). Glutamate induces hydroxyl radical formation in vivo via activation of nitric oxide synthase in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett* **242**, 131–134.
- 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. *The Journal of Physiology* **587**, 1499–1511.
- Laporte AM, Fattaccini CM, Lombard MC, Chauveau J & Hamon M (1995). Effects of dorsal rhizotomy and selective lesion of serotonergic and noradrenergic systems on 5-HT1a , 5-HT1b and 5-HT3 receptors in the rat spinal cord. *J Neural Transm* **100**, 207–223.
- Larkman PM & Kelly JS (1997). Modulation of IH by 5-HT in neonatal rat motoneurons in vitro: mediation through a phosphorylation independent action of cAMP. *Neuropharmacology* **36**, 721–733.
- Larrabee MG & Bronk DW (1947). Prolonged facilitation of synaptic excitation in sympathetic ganglia. *Journal of Neurophysiology* **10**, 139–154.
- Larson J & Lynch G (1988). Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta-rhythm. *Brain Research* **441**, 111–118.
- Laviola G, Ognibene E, Romano E, Adriani W & Keller F (2009). Gene-environment interaction during early development in the heterozygous reeler mouse: clues for modelling of major neurobehavioral syndromes. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 560–572.
- Le Masson G, Przedborski S & Abbott LF (2014). A Computational Model of Motor Neuron Degeneration. *Neuron* **83**, 975–988.
- Leblond CS, Kaneb HM, Dion PA & Rouleau GA (2014). Experimental Neurology. *Experimental Neurology* 1–11.
- Lee RH & Heckman CJ (1999). Paradoxical effect of QX-314 on persistent inward currents and bistable behavior in spinal motoneurons in vivo. *Journal of Neurophysiology* **82**, 2518–2527.
- Lee RH & Heckman CJ (2001). Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing. *Journal of Neurophysiology* **85**, 472–475.
- Leksell L (1945). The action potentials and excitatory effects of the small ventral root fibres to skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 10(suppl31)1-84.

- Lerman BJ, Hoffman EP, Sutherland ML, Bouri K, Hsu DK, Liu F-T, Rothstein JD & Knoblach SM (2012). Deletion of galectin-3 exacerbates microglial activation and accelerates disease progression and demise in a SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* **2**, 563–575.
- Leutgeb JK, Frey JU & Behnisch T (2005). Single cell analysis of activity-dependent cyclic AMP-responsive element-binding protein phosphorylation during long-lasting long-term potentiation in area CA1 of mature rat hippocampal-organotypic cultures. *Neuroscience* **131**, 601–610.
- Levant B & McCarson KE (2001). D(3) dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neurosci Lett* **303**, 9–12.
- Leveille A, Kiernan J, Goodwin JA & Antel J (1982). Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **39**, 684–686.
- Levitt P & Moore RY (1978). Developmental organization of raphe serotonin neuron groups in the rat. *Anat Embryol* **154**, 241–251.
- Lezi E & Swerdlow RH (2012). Mitochondria in Neurodegeneration. *Advances in experimental medicine and biology* **942**, 269–286.
- Li J, Huang K-X & Le W-D (2013). Establishing a novel *C. elegans* model to investigate the role of autophagy in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Publishing Group* **34**, 644–650.
- Li W, Ochalski PA, Brimijoin S, Jordan LM & Nagy JI (1995). C-terminals on motoneurons: electron microscope localization of cholinergic markers in adult rats and antibody-induced depletion in neonates. *Neuroscience* **65**, 879–891.
- Li X, Murray K, Harvey PJ, Ballou EW & Bennett DJ (2006). 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.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L & Rothstein JD (1998). Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**, 589–602.
- Lin MT & Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795.
- Lin SI & Yang WC (2011). Effect of plantar desensitization on postural adjustments prior to step initiation. *Gait & Posture* **34**, 451–456.
- Lindsay AD & Feldman JL (1993). Modulation of respiratory activity of neonatal rat phrenic motoneurons by serotonin. *The Journal of Physiology* **461**, 213–233.
- Lindvall O, Björklund A & Skagerberg G (1983). Dopamine-containing neurons in the spinal cord: anatomy and some functional aspects. *Ann Neurol* **14**, 255–260.
- Liu IS, Chen J-D, Ploder L, Vidgen D, van der Kooy D, Kalnins VI & McInnes RR (1994). Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): Evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* **13**, 377–393.
- Liu J & Jordan LM (2005). Stimulation of the Parapyramidal Region of the Neonatal Rat Brain Stem Produces Locomotor-Like Activity Involving Spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} Receptors. *Journal of Neurophysiology* **94**, 1392–1404.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brännström T, Gredal O, Wong PC, Williams DS & Cleveland DW (2004). Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* **43**, 5–17.

- Lloyd DPC (1949). Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of the spinal cord. *J Gen Physiol* **33**, 147–170.
- Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK & Miller B (2003). Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* **60**, 1094–1097.
- Lothman EW & Somjen GG (1975). Extracellular potassium activity, intracellular and extracellular potential responses in the spinal cord. *The Journal of Physiology* **252**, 115–136.
- Lucas DR & Newhouse JP (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* **58**, 193–201.
- Lucas SJ, Bortolotto ZA, Collingridge GL & Lodge D (2013). Selective activation of either mGlu2 or mGlu3 receptors can induce LTD in the amygdala. *Neuropharmacology* **66**, 196–201.
- Luche RM, Maiwald R, Carlson EJ & Epstein CJ (1997). Novel mutations in an otherwise strictly conserved domain of CuZn superoxide dismutase. *Mol Cell Biochem* **168**, 191–194.
- Lundberg A (1971). Function of the ventral spinocerebellar tract. A new hypothesis. *Exp Brain Res* **12**, 317–330.
- 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.

M

- Mackenzie IR, Rademakers R & Neumann M (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology* **9**, 995–1007.
- Madriaga MA, 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.
- Magnuson DSK, Lovett R, Coffee C, Gray R, Han Y, Zhang YP & Burke DA (2005). Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat. *J Neurotrauma* **22**, 529–543.
- Magrane J, Cortez C, Gan WB & Manfredi G (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Human Molecular Genetics* **23**, 1413–1424.
- Majoer-Krakauer D, Mulder PGH, Rowland LP & Ottman R (2005). A link between ALS and short residence on Guam. *Neurology* **64**, 1819–1820.
- Majounie E et al. (2012). Frequency of the *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology* **11**, 323–330.
- Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A & Talbott EO (2012). Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies. *Environmental Research* **117**, 112–119.
- Mally J, Szalai G & Stone TW (1997). Changes in the concentration of amino acids in serum and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **151**, 159–162.
- Mancuso R, Oliván S, Osta R & Navarro X (2011a). Evolution of gait abnormalities in SOD1. *Brain Research* **1406**, 65–73.
- Mancuso R, Santos-Nogueira E, Osta R & Navarro X (2011b). Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* **122**, 1660–1670.

- Mandillo S, Heise I, Garbugino L, Tocchini-Valentini GP, Giuliani A, Wells S & Nolan PM (2014). Early motor deficits in mouse disease models are reliably uncovered using an automated home-cage wheel-running system: a cross-laboratory validation. *Dis Model Mech* **7**, 397–407.
- Mannen T, Iwata M, Toyokura Y & Nagashima K (1977). Preservation of a certain motoneurone group of the sacral cord in amyotrophic lateral sclerosis: its clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **40**, 464–469.
- Mannen T, Iwata M, Toyokura Y & Nagashima K (1981). The Onuf's nucleus and the external anal sphincter muscles in amyotrophic lateral sclerosis and Shy-Drager syndrome. *Acta Neuropathol* **58**, 255–260.
- Mantovani S, Garbelli S, Pasini A, Alimonti D, Perotti C, Melazzini M, Bendotti C & Mora G (2009). Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *Journal of Neuroimmunology* **210**, 73–79.
- Marat AL, Dokainish H & McPherson PS (2011). DENN Domain Proteins: Regulators of Rab GTPases. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 13791–13800.
- Marchetti C, Beato M & Nistri A (2001). Alternating rhythmic activity induced by dorsal root stimulation in the neonatal rat spinal cord in vitro. *The Journal of Physiology* **530**, 105–112.
- Marchetto MCN, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG & Gage FH (2008). Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1. *Stem Cell* **3**, 649–657.
- Marcoux J & Rossignol S (2000). Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *J Neurosci* **20**, 8577–8585.
- Marder E (2012). Neuromodulation of Neuronal Circuits: Back to the Future. *Neuron* **76**, 1–11.
- Marder E & Thirumalai V (2002). Cellular, synaptic and network effects of neuromodulation. *Neural Netw* **15**, 479–493.
- Marin M & Zytnicki D (2011). Alpha, Beta, and Gamma motoneurons: Functional diversity in the motor system's final pathways. *J Integr Neurosci* **10**, 243–276.
- Marlier L, Teilhac JR, Cerruti C & Privat A (1991). Autoradiographic mapping of 5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT₂ receptors in the rat spinal cord. *Brain Research* **550**, 15–23.
- Martin JP & Hurwitz LJ (1962). Locomotion and the basal ganglia. *Brain* **85**, 261–276.
- Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA & Golden WC (2007). Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol* **500**, 20–46.
- Martin, Cazenave W, Cattaert D & Branchereau P (2013). Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* **54**, 116–126.
- Matise MP & Joyner AL (1997). Expression patterns of developmental control genes in normal and Engrailed-1 mutant mouse spinal cord reveal early diversity in developing interneurons. *J Neurosci* **17**, 7805–7816.
- Matsumoto S, Goto S, Kusaka H, Ito H & Imai T (1994). Synaptic pathology of spinal anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J Neurol Sci* **125**, 180–185.
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF & Manfredi G (2002). Mutated Human SOD1 Causes Dysfunction of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 29626–29633.
- Mattson MP, Keller JN & Begley JG (1998). Evidence for synaptic apoptosis. *Experimental Neurology* **153**, 35–48.
- Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR & Lebovitz RM (1998). Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology* **139**, 4008–4011.

- McCrea DA & Rybak IA (2007). Modeling the mammalian locomotor CPG: insights from mistakes and perturbations. *Prog Brain Res* **165**, 235–253.
- McDermott CJ & Shaw PJ (2008). Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ* **336**, 658–662.
- McGeer PL, McGeer EG, Kawamata T, Yamada T & Akiyama H (1991). Reactions of the immune system in chronic degenerative neurological diseases. *Can J Neurol Sci* **18**, 376–379.
- Mead RJ, Bennett EJ, Kennerley AJ, Sharp P, Sunyach C, Kasher P, Berwick J, Pettmann B, Battaglia G, Azzouz M, Grierson A & Shaw PJ (2011). Optimised and Rapid Pre-clinical Screening in the SOD1G93A Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE* **6**, e23244.
- Meehan CF, Moldovan M, Marklund SL, Graffmo KS, Nielsen JB & Hultborn H (2010). Intrinsic properties of lumbar motor neurones in the adult G127insTGGG superoxide dismutase-1 mutant mouse in vivo: evidence for increased persistent inward currents. *Acta Physiol (Oxf)* **200**, 361–376.
- Mendonça DMF, Chimelli L & Martinez AMB (2005). Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Braz J Med Biol Res* **38**, 925–933.
- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Dong L, Figlewicz DA & Shaw PJ (2002). Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **125**, 1522–1533.
- Michaud JL, Rosenquist T, May NR & Fan CM (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* **12**, 3264–3275.
- Milan L, Barriere G, De deurwaerdère P, Cazalets J-R & Bertrand SS (2014). Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1G93A newborn mice. *Front Neural Circuits* **8**, 1–11.
- Miles GB & Sillar KT (2011). Neuromodulation of Vertebrate Locomotor Control Networks. *Physiology* **26**, 393–411.
- Miles GB, Hartley R, Todd AJ & Brownstone RM (2007). Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2448–2453.
- Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* **66**, 355–474.
- Millecamps S, Corcia P, Cazeneuve C, Boillee S, Seilhean D, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Pradat PF, Le Forestier N, Lacomblez L, Bruneteau G, Camu W, Brice A, Meininger V, LeGuern E & Salachas F (2012). Mutations in *UBQLN2* are rare in French amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroBiology of Aging* **33**, 839.
- Miller JF, Paul KD, Rymer WZ & Heckman CJ (1995). 5-HT_{1B/1D} agonist CGS-12066B attenuates clasp knife reflex in the cat. *Journal of Neurophysiology* **74**, 453–456.
- Miller R (1975). Distribution and properties of commissural and other neurons in cat sensorimotor cortex. *J Comp Neurol* **164**, 361–373.
- Miller RG, Mitchell JD & Moore DH (2012). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *The cochrane library* **3**.
- Miller S, Van Der Burg J & Van der Meche F (1975). Locomotion in the cat: basic programmes of movement. *Brain Research* **91**, 239–253.
- Missale C, Nash R, Robinson AJ, Jaber M & Caron MG (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* **78**, 189–225.

- Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B, Tudor EL, Smith BN, Klasen C, Miller CCJ, Cooper JD, Greensmith L & Shaw CE (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol* **125**, 273–288.
- Mitra P & Brownstone RM (2012). An in vitro spinal cord slice preparation for recording from lumbar motoneurons of the adult mouse. *Journal of Neurophysiology* **107**, 728–741.
- Mizuguchi R, Kriks S, Cordes R, Gossler A, Ma Q & Goulding M (2006). Ascl1 and Gsh1/2 control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat Neurosci* **9**, 770–778.
- Mizusawa H, Matsumoto S, Yen SH, Hirano A, Rojas-Corona RR & Donnenfeld H (1989). Focal accumulation of phosphorylated neurofilaments within anterior horn cell in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **79**, 37–43.
- Mohan C & Radha E (1978). Circadian rhythms in the central cholinergic system in aging animals. *Adv Exp Med Biol* **108**, 275–299.
- Monroe PJ & Smith DJ (1983). Characterization of Multiple [3H] 5-Hydroxytryptamine Binding Sites in Rat Spinal Cord Tissue. *J Neurochem* **41**, 349–355.
- Mor Y & Lev-Tov A (2007). Analysis of Rhythmic Patterns Produced by Spinal Neural Networks. *Journal of Neurophysiology* **98**, 2807–2817.
- Morales M, Battenberg E & Bloom FE (1998). Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT3 receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* **402**, 385–401.
- Moran-Rivard L, Kagawa T, Saueressig H, Gross MK, Burrill J & Goulding M (2001). Evx1 Is a Postmitotic Determinant of V0 Interneuron Identity in the Spinal Cord. *Neuron* **29**, 385–399.
- Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, Brown RH, Brown H, Tiwari A, Hayward L, Edgar J, Nave KA, Garberrn J, Atagi Y, Song Y, Pigino G & Brady ST (2009). Axonal Transport Defects in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neuroscience* **29**, 12776–12786.
- 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 Research* **505**, 66–74.
- Morita M, Al-Chalabi A, Andersen PM, Hosler B, Sapp P, Englund E, Mitchell JE, Habgood JJ, De Bellerocche J, Xi J, Jongjaroenprasert W, Horvitz HR, Gunnarsson L-G & Brown RH (2006). A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology* **66**, 839–844.
- Morrison BM, Hof PR & Morrison JH (1998). Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* **44**, S32–S44.
- Moszczynski AJ, Tandon A, Coelho FMS, Zinman L & Murray B (2012). Mortality associated with periodic limb movements during sleep in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Einstein (Sao Paulo)* **10**, 428–432.
- Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME & Dal Canto MC (1996). The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5472–5477.
- Muennich EAL & Fyffe REW (2004). Focal aggregation of voltage-gated, Kv2.1 subunit-containing, potassium channels at synaptic sites in rat spinal motoneurons. *The Journal of Physiology* **554**, 673–685.

- Murakami T, Yang SP, Xie L, Kawano T, Fu D, Mukai A, Bohm C, Chen F, Robertson J, Suzuki H, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Kaminski Schierle GS, Chan FTS, Moloney A, Crowther D, Kaminski CF, Zhen M & St George-Hyslop P (2012). ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Human Molecular Genetics* **21**, 1–9.
- Musienko P, van den Brand R, Märzendorfer O, Roy RR, Gerasimenko Y, Edgerton VR & Courtine G (2011). Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries. *Journal of Neuroscience* **31**, 9264–9278.
- ## N
- Naderi S, Türe U & Pait TG (2004). History of spinal cord localization. *Neurosurgical focus* **16**, 1–6.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H & Przedborski S (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* **10**, 615–622.
- Nagao M, Misawa H, Kato S & Hirai S (1998). Loss of cholinergic synapses on the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 329–333.
- Nagy JI, Yamamoto T & Jordan LM (1993). Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat. *Synapse* **15**, 17–32.
- Nakajima K, Matsuyama K & Mori S (1998). Prenatal administration of para-chlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. *Neurosci Res* **31**, 155–169.
- Navarrete R & Vrbová G (1993). Activity-dependent interactions between motoneurons and muscles: their role in the development of the motor unit. *Progress in Neurobiology* **41**, 93–124.
- Nesca M & Koulack D (1994). Recognition memory, sleep and circadian rhythms. *Can J Exp Psychol* **48**, 359–379.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ & Lee VMY (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* **314**, 130–133.
- Nguyen MD, Larivière RC & Julien J-P (2001). Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* **30**, 135–148.
- Nicholson C, Bruggencate ten G, Stöckle H & Steinberg R (1978). Calcium and potassium changes in extracellular microenvironment of cat cerebellar cortex. *Journal of Neurophysiology* **41**, 1026–1039.
- Nie H & Weng HR (2009). Glutamate Transporters Prevent Excessive Activation of NMDA Receptors and Extrasynaptic Glutamate Spillover in the Spinal Dorsal Horn. *Journal of Neurophysiology* **101**, 2041–2051.
- Nieoullon A, Bentué-Ferrer D, Bordet R, Tsolaki M & Förstl H (2008). Importance of circadian rhythmicity in the cholinergic treatment of Alzheimer's disease: focus on galantamine*. *Curr Med Res Opin* **24**, 3357–3367.
- Nisticò R, Dargan SL, Amici M, Collingridge GL & Bortolotto ZA (2011). Synergistic interactions between kainate and mGlu receptors regulate bouton Ca signalling and mossy fibre LTP. *Sci Rep* **1**, 103.
- Noga BR, Kettler J & Jordan LM (1988). Locomotion produced in mesencephalic cats by injections of putative transmitter substances and antagonists into the medial reticular formation and the pontomedullary locomotor strip. *J Neurosci* **8**, 2074–2086.

Norenberg MD (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* **27**, 756–762.

O

O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M & Poyton RO (2004). Mitochondrial Protein Oxidation in Yeast Mutants Lacking Manganese-(MnSOD) or Copper- and Zinc-containing Superoxide Dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 51817–51827.

Olney JW (1969). Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* **28**, 455.

Orlovsky GN (1972). The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion. *Brain Research* **40**, 359–371.

Orlovsky GN & Pavlova GA (1972). Response of Deiters' neurons to tilt during locomotion. *Brain Research* **42**, 212–214.

Orrego F & Villanueva S (1993). The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience* **56**, 539–555.

Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B & Lisman J (2004). Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *Journal of Neurophysiology* **91**, 1955–1962.

P

Pace RW, Mackay DD, Feldman JL & Del Negro CA (2007). Role of persistent sodium current in mouse preBotzinger Complex neurons and respiratory rhythm generation. *The Journal of Physiology* **580**, 485–496.

Pambo-Pambo A, Durand J & Gueritaud JP (2009). Early Excitability Changes in Lumbar Motoneurons of Transgenic SOD1G85R and SOD1G93A-Low Mice. *Journal of Neurophysiology* **102**, 3627–3642.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, Hardeland R & Cardinali DP (2013). Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res* **23**, 267–300.

Panek I, Bui T, Wright AT & Brownstone RM (2014). Cutaneous afferent regulation of motor function. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **74**, 158–171.

Pappas SS, Behrouz B, Janis KL, Goudreau JL & Lookingland KJ (2008). Lack of D2 receptor mediated regulation of dopamine synthesis in A11 diencephalospinal neurons in male and female mice. *Brain Research* **1214**, 1–10.

Parker D (2000). Spinal-Cord plasticity: independent and interactive effects of neuromodulator and activity-dependent plasticity. *Mol Neurobiol* **22**, 55–80.

Parkinson J (1817). An essay on the shaking palsy. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*.

Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacsikai BJ, Hyman BT, Trotti D & Brown RH (2004). Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* **43**, 19–30.

- Paton JFR, Abdala APL, Koizumi H, Smith JC & St-John WM (2006). Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nat Neurosci* **9**, 311–313.
- Pearlstein E (2013). Role of descending aminergic pathways in the development of locomotion. *Curr Pharm Des* **19**, 4332–4340.
- Peng C-Y, Yajima H, Burns CE, Zon LI, Sisodia SS, Pfaff SL & Sharma K (2007). Notch and MAML Signaling Drives Scl-Dependent Interneuron Diversity in the Spinal Cord. *Neuron* **53**, 813–827.
- Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R & Fainzilber M (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* **45**, 715–726.
- Perret C (1983). Centrally generated pattern of motoneuron activity during locomotion in the cat. *Symp Soc Exp Biol* **37**, 405–422.
- Perrier J-F & Delgado-Lezama R (2005). Synaptic release of serotonin induced by stimulation of the raphe nucleus promotes plateau potentials in spinal motoneurons of the adult turtle. *Journal of Neuroscience* **25**, 7993–7999.
- Perrier J-F, Rasmussen HB, Christensen RK & Petersen AV (2013). Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Curr Pharm Des* **19**, 4371–4384.
- Perrier JF & Hounsgaard J (2000). Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Res Bull* **53**, 529–535.
- Perrin FE, Boisset G, Docquier M, Schaad O, Descombes P & Kato AC (2005). No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Human Molecular Genetics* **14**, 3309–3320.
- Perrin FE, Boisset G, Lathuilière A & Kato AC (2006). Cell death pathways differ in several mouse models with motoneurone disease: analysis of pure motoneurone populations at a presymptomatic age. *J Neurochem* **98**, 1959–1972.
- Philippson M (1905). L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux. *Trav Lab Physiol Inst Solvay* 1–208.
- Philips T & Robberecht W (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet Neurology* **10**, 253–263.
- 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.
- Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S & Zona C (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **351**, 153–156.
- Pillai A, Mansouri A, Behringer R, Westphal H & Goulding M (2007). Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord. *Development* **134**, 357–366.
- Pisotta I & Molinari M (2014). Cerebellar contribution to feedforward control of locomotion. *Frontiers in human neuroscience* **8**, 1–5.
- Plaitakis A & Constantakakis E (1993). Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* **30**, 381–386.
- Pompeiano M, Palacios JM & Mengod G (1994). Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **23**, 163–178.

- Pradat P-F, Bruneteau G, Gonzalez de Aguilar J-L, Dupuis L, Jokic N, Salachas F, Le Forestier N, Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Hauw J-J, Tranchant C, Loeffler J-P & Meininger V (2007). Muscle Nogo-A expression is a prognostic marker in lower motor neuron syndromes. *Ann Neurol* **62**, 15–20.
- Pradat PF & Bruneteau G (2006a). [Clinical characteristics of amyotrophic lateral sclerosis subsets]. *Revue neurologique*.
- Pradat PF & Bruneteau G (2006b). [Differential diagnosis and atypical subsets of amyotrophic lateral sclerosis]. *Revue neurologique*.
- Pramatarova A, Figlewicz DA, Krizus A, Han FY, Ceballos-Picot I, Nicole A, Dib M, Meininger V, Brown RH & Rouleau GA (1995). Identification of new mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* **56**, 592–596.
- Proctor DT, Coulson EJ & Dodd PR (2011). Post-synaptic scaffolding protein interactions with glutamate receptors in synaptic dysfunction and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* **93**, 509–521.
- Proudfit HK & Clark FM (1991). The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. *Prog Brain Res* **88**, 123–141.
- Pullen AH & Athanasiou D (2009). Increase in presynaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *European Journal of Neuroscience* **29**, 551–561.
- Pullen AH & Sears TA (1983). Trophism between C-type axon terminals and thoracic motoneurons in the cat. *The Journal of Physiology* **337**, 373–388.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L & Caroni P (2006). Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* **9**, 408–419.

Q

- Qu S, Ondo WG, Zhang X, Xie WJ, Pan TH & Le WD (2006). Projections of diencephalic dopamine neurons into the spinal cord in mice. *Exp Brain Res* **168**, 152–156.
- Quinlan KA, Schuster JE, Fu R, Siddique T & Heckman CJ (2011). Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology* **589**, 2245–2260.

R

- Rademakers R & van Blitterswijk M (2013). Motor neuron disease in 2012: Novel causal genes and disease modifiers. *Nat Rev Neurol* **9**, 63–64.
- Radunović A & Leigh PN (1996). Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **61**, 565–572.
- Rajaofetra N, Poulat P, Marlier L, Geffard M & Privat A (1992a). Pre- and postnatal development of noradrenergic projections to the rat spinal cord: an immunocytochemical study. *Developmental Brain Research* **67**, 237–246.
- Rajaofetra N, Ridet JL, Poulat P, Marlier L, Sandillon F, Geffard M & Privat A (1992b). Immunocytochemical mapping of noradrenergic projections to the rat spinal cord with an antiserum against noradrenaline. *J Neurocytol* **21**, 481–494.

- Rajaofetra N, Sandillon F, Geffard M & Privat A (1989). Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J Neurosci Res* **22**, 305–321.
- Rangaraju V, Calloway N & Ryan TA (2014). Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function. *Cell* **156**, 825–835.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW & Snider WD (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**, 43–47.
- Reiner A, Medina L, Figueredo-Cardenas G & Anfinson S (1995). Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Experimental Neurology* **131**, 239–250.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW & Feldman JL (2000). Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* **80**, 767–852.
- Renton AE et al. (2011). A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257–268.
- Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM & Schulz PE (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* **65**, 586–590.
- Robberecht W (2000). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology* **247**, VI2–VI6.
- Robberecht W & Philips T (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 248–264.
- Roberts A, Hill NA & Hicks R (2000). Simple mechanisms organise orientation of escape swimming in embryos and hatchling tadpoles of *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* **203**, 1869–1885.
- Roberts A, Soffe SR, Wolf ES, Yoshida M & Zhao FY (1998). Central circuits controlling locomotion in young frog tadpoles. *Ann N Y Acad Sci* **860**, 19–34.
- Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM & Ribeiro JA (2013). Early Changes of Neuromuscular Transmission in the SOD1(G93A) Mice Model of ALS Start Long before Motor Symptoms Onset ed. Raoul C. *PLoS ONE* **8**, e73846.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP & Deng HX (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62.
- Rossignol S, Barrière G, Frigon A & Barthélemy D (2008). Plasticity of locomotor sensorimotor interactions after peripheral and/or spinal lesions. *Brain Research* **57**, 228–240.
- Rossignol S, Bouyer L, Langlet C, Barthélemy D, Chau C, Giroux N, Brustein E, Marcoux J, Leblond H & Reader TA (2004). Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat. *Progress in Brain Research* **143**, 163–172.
- Rossignol S, Chau C, Brustein E, Bélanger M, Barbeau H & Drew T (1996). Locomotor capacities after complete and partial lesions of the spinal cord. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **56**, 449–463.
- Rossignol S, Chau C, Brustein E, Giroux N, Bouyer L, Barbeau H & Reader TA (1998). Pharmacological activation and modulation of the central pattern generator for locomotion in the cat. *Ann N Y Acad Sci* **860**, 346–359.
- Rossignol S, Drew T & Brustein E (1999). Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat. *Prog Brain Res*.
- Rossignol S, Dubuc R & Gossard JP (2006). Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion. *Physiol Rev* **86**, 89–154.

- Rothstein JD (1995). Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci* **3**, 348–359.
- Rothstein JD, Martin LJ & Kuncl RW (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **326**, 1464–1468.
- Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP & Figlewicz D (1996). SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **39**, 128–131.
- Roy DN, Sabri MI, Kayton RJ & Spencer PS (1996). beta-Cyano-L-alanine toxicity: evidence for the involvement of an excitotoxic mechanism. *Nat Toxins* **4**, 247–253.
- Roy J, Minotti S, Dong L, Figlewicz DA & Durham HD (1998). Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* **18**, 9673–9684.
- Rybak IA, Shevtsova NA, Lafreniere-Roula M & McCrea DA (2006). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *The Journal of Physiology* **577**, 617–639.
- Ryczko D, Dubuc R & Cabelguen J-M (2010). Rhythmogenesis in axial locomotor networks: an interspecies comparison. *Prog Brain Res* **187**, 189–211.

S

- Saeed M, Yang Y, Deng HX, Hung W-Y, Siddique N, Dellefave L, Gellera C, Andersen PM & Siddique T (2009). Age and founder effect of SOD1 A4V mutation causing ALS. *Neurology* **72**, 1634–1639.
- Saito K (1979). Development of spinal reflexes in the rat fetus studied in vitro. *The Journal of Physiology* **294**, 581–594.
- Sapir T, Gelman EJ, Wang Z, Velasquez T, Mitsui S, Yoshihara Y, Frank E, Alvarez FJ & Goulding M (2004). Pax6 and Engrailed 1 Regulate Two Distinct Aspects of Renshaw Cell Development. *Journal of Neuroscience* **24**, 1255–1264.
- Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, Chin W, Gann A, Genise H, Gorenstein J, Huang M, Sailer W, Scheffler M, Valesky M, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T, Horvitz HR & Brown RH (2003). Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* **73**, 397–403.
- Sapp PC, Rosen DR, Hosler BA, Esteban J, McKenna-Yasek D, O'Regan JP, Horvitz HR & Brown RH (1995). Identification of three novel mutations in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord* **5**, 353–357.
- Sasaki S & Iwata M (2007). Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**, 10–16.
- Sasaki S & Maruyama S (1994). Synapse loss in anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* **88**, 222–227.
- Sasaki S, Shibata N, Komori T & Iwata M (2000). iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* **291**, 44–48.
- Sasayama H, Shimamura M, Tokuda T, Azuma Y, Yoshida T, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N, Nagai Y & Yamaguchi M (2012). Knockdown of the Drosophila Fused in Sarcoma (FUS) Homologue Causes Deficient Locomotive Behavior and Shortening of Motoneuron Terminal Branches ed. Iijima KM. *PLoS ONE* **7**, e39483.

- Sathasivam S, Grierson AJ & Shaw PJ (2005). Characterization of the caspase cascade in a cell culture model of SOD1-related familial amyotrophic lateral sclerosis: expression, activation and therapeutic effects of inhibition. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**, 467–485.
- Sato T, Yamamoto Y, Nakanishi T, Fukada K, Sugai F, Zhou Z, Okuno T, Nagano S, Hirata S, Shimizu A & Sakoda S (2004). Identification of two novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: mass spectrometric and genomic analyses. *J Neurol Sci* **218**, 79–83.
- Sau D, Rusmini P, Crippa V, Onesto E, Bolzoni E, Ratti A & Poletti A (2011). Dysregulation of axonal transport and motoneuron diseases. *Biology of the Cell* **103**, 87–107.
- Saueressig H, Burrill J & Goulding M (1999). Engrailed-1 and netrin-1 regulate axon pathfinding by association interneurons that project to motor neurons. *Development* **126**, 4201–4212.
- Saxena S, Cabuy E & Caroni P (2009a). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* **12**, 627–636.
- Saxena S, Cabuy E & Caroni P (2009b). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* **12**, 627–636.
- Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien J-P, Gros-Louis F & Caroni P (2013). Neuroprotection through Excitability and mTOR Required in ALS Motoneurons to Delay Disease and Extend Survival. *Neuron* **80**, 80–96.
- Schaefer AM, Sanes JR & Lichtman JW (2005). A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* **490**, 209–219.
- Schapira A, Cooper JM & Dexter D (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **54**, 823–827.
- Schäfer MK, Weihe E, Varoqui H, Eiden LE & Erickson JD (1994). Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J Mol Neurosci* **5**, 1–26.
- Schäfer S & Hermans E (2011). Reassessment of motor-behavioural test analyses enables the detection of early disease-onset in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Behavioural Brain Research* **225**, 7–14.
- Schiffer D, Cordera S, Cavalla P & Migheli A (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **139**, 27–33.
- Schliebs R & Arendt T (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research* **221**, 555–563.
- Schmidt BJ (1994). Afterhyperpolarization modulation in lumbar motoneurons during locomotor-like rhythmic activity in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Exp Brain Res* **99**, 214–222.
- 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.
- Schneider SP & Fyffe R (1992). Involvement of A and Glycine in Recurrent Inhibition of Spinal Motoneurons. *J Neurophysiol* **68**, 397–406.
- Schuster JE, Fu R, Siddique T & Heckman CJ (2011). Effect of prolonged riluzole exposure on cultured motoneurons in a mouse model of ALS. *Journal of Neurophysiology* **107**, 484–492.
- Schwindt P & Crill W (1980a). Role of a persistent inward current in motoneuron bursting during spinal seizures. *Journal of Neurophysiology* **43**, 1296–1318.
- Schwindt PC & Crill WE (1980b). Properties of a persistent inward current in normal and TEA-injected motoneurons. *Journal of Neurophysiology* **43**, 1700–1724.
- Seeman P (2013). Are dopamine D2 receptors out of control in psychosis? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **46**, 146–152.

- Shan X, Chiang P-M, Price DL & Wong PC (2010). Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 16325–16330.
- Sharma K, Sheng HZ, Lettieri K, Li H, Karavanov A, Potter S, Westphal H & Pfaff SL (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* **95**, 817–828.
- Sharples SA, Koblinger K, Humphreys JM & Whelan PJ (2014). Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Front Neural Circuits* **8**, 55.
- Shaw B & Valentine J (2007). How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 78–85.
- Shen HW, Scofield MD, Boger H, Hensley M & Kalivas PW (2014). Synaptic Glutamate Spillover Due to Impaired Glutamate Uptake Mediates Heroin Relapse. *Journal of Neuroscience* **34**, 5649–5657.
- Sherrington CS (1910). Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *The Journal of Physiology* **40**, 28–121.
- Sherrington CS & Sowton SC (1915). Observations on reflex responses to single break-shocks. *The Journal of Physiology* **49**, 331–348.
- Shibuta Y, Shimatani Y, Nodera H, Izumi Y & Kaji R (2013). Clinical Neurophysiology. *Clin Neurophysiol* **124**, 2046–2053.
- Shik ML, Severin FV & Orlovskii GN (1966). [Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]. *Biofizika* **11**, 659–666.
- Shik ML, Severin FV & Orlovskii GN (1967). [Structures of the brain stem responsible for evoked locomotion]. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* **53**, 1125–1132.
- Shimatani Y, Shibuta Y, Nodera H, Nodera A, Asanuma K, Izumi Y & Kaji R (2011). [Increased variability of membrane potentials in amyotrophic lateral sclerosis]. *Rinsho Shinkeigaku* **51**, 1114–1117.
- Shin J-H, London J, Le Pecheur M, Weitzdoerfer R, Hoeger H & Lubec G (2005). Proteome analysis in hippocampus of mice overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase 1. *Neurochem Int* **46**, 641–653.
- Shute CC & Lewis PR (1975). Cholinergic pathways. *Pharmacol Ther B* **1**, 79–87.
- Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung W-Y, Bebout J & McKenna-Yasek D (1991). Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* **324**, 1381–1384.
- Skagerberg G & Lindvall O (1985). Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Research* **342**, 340–351.
- Smith E, Hargrave M, Yamada T, Begley CG & Little MH (2002). Coexpression of SCL and GATA3 in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord. *Dev Dyn* **224**, 231–237.
- 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 (1988). Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. *FASEB J* **2**, 2283–2288.
- Smith RS, Bliston G & Ovalle WK (1973). Skeletomotor and fusimotor organization in amphibians. *Control of Posture and Locomotion* **7**, 105–117.

- Soekadar SR, Born J, Birbaumer N, Bensch M, Halder S, Murguialday AR, Gharabaghi A, Nijboer F, Schölkopf B & Martens S (2013). Fragmentation of slow wave sleep after onset of complete locked-in state. *J Clin Sleep Med* **9**, 951–953.
- Sofic E, Riederer P, Gsell W, Gavranovic M, Schmidtke A & Jellinger K (1991). Biogenic amines and metabolites in spinal cord of patients with Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **3**, 133–142.
- Son M, Fathallah-Shaykh HM & Elliott JL (2001). Survival in a transgenic model of FALS is independent of iNOS expression. *Ann Neurol* **50**, 273.
- Soto C (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 49–60.
- Spalloni A, Nutini M & Longone P (2013). Role of the N-methyl-d-aspartate receptors complex in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 312–322.
- Spalloni A, Origlia N, Sgobio C, Trabalza A, Nutini M, Berretta N, Bernardi G, Domenici L, Ammassari-Teule M & Longone P (2011). Postsynaptic alteration of NR2A subunit and defective autophosphorylation of alphaCaMKII at threonine-286 contribute to abnormal plasticity and morphology of upper motor neurons in presymptomatic SOD1G93A mice, a murine model for amyotrophic lateral sclerosis. *Cereb Cortex* **21**, 796–805.
- Sqalli-Houssaini Y & Cazalets JR (2000). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Research* **852**, 100–109.
- Sqalli-Houssaini Y, Cazalets JR & Clarac F (1993). Oscillatory properties of the central pattern generator for locomotion in neonatal rats. *Journal of Neurophysiology* **70**, 803–813.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, De Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G & Shaw CE (2008). TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* **319**, 1668–1672.
- Stallings NR, Puttaparthi K, Luther CM, Burns DK & Elliott JL (2010). Neurobiology of Disease. *Neurobiology of Disease* **40**, 404–414.
- Stepien AE, Tripodi M & Arber S (2010). Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron* **68**, 456–472.
- Stepito A, Gallo J-M, Shaw CE & Hirth F (2014). Modelling C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* **127**, 377–389.
- Stieber A, Chen Y, Wei S, Mourelatos Z, Gonatas J, Okamoto K & Gonatas NK (1998). The fragmented neuronal Golgi apparatus in amyotrophic lateral sclerosis includes the trans-Golgi-network: functional implications. *Acta Neuropathol* **95**, 245–253.
- Sugita S, Goldsmith JR, Baxter DA & Byrne JH (1992). Involvement of protein kinase C in serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in sensorimotor connections of Aplysia. *Journal of Neurophysiology* **68**, 643–651.
- Suzuki N, Maroof AM, Merkle FT, Koszka K, Intoh A, Armstrong I, Moccia R, Davis-Dusenbery BN & Egan K (2013). The mouse C9ORF72 ortholog is enriched in neurons known to degenerate in ALS and FTD. *Nature Neuroscience* **16**, 1725–1727.
- Swash M & Desai J (2000). Motor neuron disease: classification and nomenclature. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1**, 105–112.
- Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Trimmer PA, Miller SW, Maguire DJ, Sheehan JP, Maguire RS, Pattee G, Juel VC, Phillips LH, Tuttle JB, Bennett JP, Davis RE & Parker WD (1998). Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* **153**, 135–142.

T

- Taccola G & Nistri A (2006). Oscillatory circuits underlying locomotor networks in the rat spinal cord. *Crit Rev Neurobiol* **18**, 25–36.
- Talbot K & Ansorge O (2006). Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: common pathways in neurodegenerative disease. *Human Molecular Genetics* **15**, R182–R187.
- Tan N, Kakulas BA, Masters CL, Gajdusek DC, Garruto RM, Chen KM & Gibbs CJ (1986). Observations on the clinical presentations and the neuropathological findings of amyotrophic lateral sclerosis in Australia and Guam. *Ann Acad Med Singap* **15**, 62–66.
- Tanabe Y & Jessell TM (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274**, 1115–1123.
- Tang W, Tasch U, Neerchal NK, Zhu L & Yarowsky P (2009). Measuring early pre-symptomatic changes in locomotion of SOD1-G93A rats--a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Methods* **176**, 254–262.
- Tapscott SJ, Bennett GS, Toyama Y, Kleinbart F & Holtzer H (1981). Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. *Developmental Biology* **86**, 40–54.
- Tartas M, Morin F, Barrière G, Goillandeau M, Lacaille JC, Cazalets JR & Bertrand S (2010). Noradrenergic modulation of intrinsic and synaptic properties of lumbar motoneurons in the neonatal rat spinal cord. *Front Neural Circuits* **4**, 1–16.
- Tata AM, Velluto L, D'Angelo C & Reale M (2014). Cholinergic System Dysfunction and Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect? *CNS Neurol Disord Drug Targets* **13**, 1294–1303.
- Taylor DM, Minotti S, Agar JN & Durham HD (2004). Overexpression of metallothionein protects cultured motor neurons against oxidative stress, but not mutant Cu/Zn-superoxide dismutase toxicity. *Neurotoxicology* **25**, 779–792.
- Taylor JE, Yaksh TL & Richelson E (1982). Agonist regulation of muscarinic acetylcholine receptors in rat spinal cord. *J Neurochem* **39**, 521–524.
- Tazerart S, Viemari JC, Darbon P, Vinay L & Brocard F (2007). Contribution of Persistent Sodium Current to Locomotor Pattern Generation in Neonatal Rats. *Journal of Neurophysiology* **98**, 613–628.
- Tazerart S, Vinay L & Brocard F (2008). The Persistent Sodium Current Generates Pacemaker Activities in the Central Pattern Generator for Locomotion and Regulates the Locomotor Rhythm. *Journal of Neuroscience* **28**, 8577–8589.
- Thoby-Brisson M & Ramirez J-M (2001). Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *Journal of Neurophysiology* **86**, 104–112.
- Thompson AK, Chen XY & Wolpaw JR (2009). Acquisition of a simple motor skill: task-dependent adaptation plus long-term change in the human soleus H-reflex. *Journal of Neuroscience* **29**, 5784–5792.
- Tokita Y, Bessho Y, Masu M, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M & Nakanishi S (1996). Characterization of excitatory amino acid neurotoxicity in N-methyl-D-aspartate receptor-deficient mouse cortical neuronal cells. *Eur J Neurosci* **8**, 69–78.
- Tominaga-Yoshino K, Urakubo T, Okada M, Matsuda H & Ogura A (2008). Repetitive induction of late-phase LTP produces long-lasting synaptic enhancement accompanied by synaptogenesis in cultured hippocampal slices. *Hippocampus* **18**, 281–293.
- Torrence C & Compo GP (1998). A practical guide to wavelet analysis. *Bulletin of the American Meteorological society* **79**, 61–78.

- Trotti D, Rolfs A, Danbolt N, Brown R & Hediger M (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* **2**, 848.
- Tsao W, Jeong YH, Lin S, Ling J, Price DL, Chiang P-M & Wong PC (2012). Rodent models of TDP-43: Recent advances. *Brain Research* **1462**, 26–39.
- Turner BJ & Talbot K (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progress in Neurobiology* **85**, 94–134.
- Turner MR et al. (2013). Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology* **12**, 310–322.
- Turner RC, Seminerio MJ, Naser ZJ, Ford JN, Martin SJ, Matsumoto RR, Rosen CL & Huber JD (2012). Effects of aging on behavioral assessment performance: implications for clinically relevant models of neurological disease. *J Neurosurg* **117**, 629–637.

U

- Udo M, Oda Y, Tanaka K & Horikawa J (1976). Cerebellar control of locomotion investigated in cats: discharges from Deiters' neurones, EMG and limb movements during local cooling of the cerebellar cortex. *Prog Brain Res* **44**, 445–459.

V

- Valdmanis PN & Rouleau GA (2008). Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **70**, 144–152.
- Vallstedt A & Kullander K (2013). Dorsally derived spinal interneurons in locomotor circuits. *Ann N Y Acad Sci* **1279**, 32–42.
- van Blitterswijk PhD M et al. (2013). Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of. *The Lancet Neurology* **12**, 978–988.
- Van Damme P, Braeken D, Callewaert G, Robberecht W & Van Den Bosch L (2005a). GluR2 deficiency accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 605–612.
- Van Damme P, Dewil M, Robberecht W & Van Den Bosch L (2005b). Excitotoxicity and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Dis* **2**, 147–159.
- Van Den Bosch L (2011). Genetic Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, 1–11.
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E & Robberecht W (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* **1762**, 1068–1082.
- van Doormaal PTC, van Rheenen W, van Blitterswijk M, Schellevis RD, Schelhaas HJ, de Visser M, van der Kooi AJ, Veldink JH & van den Berg LH (2012). in familial amyotrophic lateral sclerosis in the Netherlands. *Neurobiology of Aging* **33**, 2233.e7–2233.e8.
- van Zundert B, Izaurieta P, Fritz E & Alvarez FJ (2012). Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biochem* **113**, 3301–3312.
- van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, Brown RH, Constantine-Paton M & Bellingham MC (2008). Neonatal Neuronal Circuitry Shows Hyperexcitable Disturbance in a Mouse Model of the Adult-Onset Neurodegenerative Disease Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience* **28**, 10864–10874.

- Vance C et al. (2009). Mutations in the FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* **323**, 1208–1211.
- Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas HJ, Kusters B, Troost D, Baas F, De Jong V & Shaw CE (2006). Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain* **129**, 868–876.
- Varejao A & Filipe V (2007). Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion in rats. *Behavioural Brain Research* **176**, 193–201.
- Vatovec S, Kovanda A & Rogelj B (2014). Unconventional features of C9ORF72 expanded repeat in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiology of Aging* **35**, 2421.e1–2421.e12.
- Vaughn JE & Grieshaber JA (1973). A morphological investigation of an early reflex pathway in developing rat spinal cord. *J Comp Neurol* **148**, 177–209.
- Veldink JH, Bär PR, Joosten EAJ, Otten M, Wokke JHJ & van den Berg LH (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* **13**, 737–743.
- Viader F, Mondou A, Desgranges B & Carlier L (2014). [Cognitive disorders and amyotrophic lateral sclerosis. Beyond motor impairment]. *Presse Med* **43**, 587–594.
- Viala D & Buser P (1971). [Methods of obtaining locomotor rhythms in the spinal rabbit by pharmacological treatments (DOPA, 5-HTP, D-amphetamine)]. *Brain Research* **35**, 151–165.
- Viala D & Vidal C (1978). Evidence for distinct spinal locomotion generators supplying respectively fore- and hindlimbs in the rabbit. *Brain Research* **155**, 182–186.
- Viala G & Buser P (1969). [Stereotyped rhythmic motor activities in the rabbit. A study of their general characteristics]. *Exp Brain Res* **8**, 346–363.
- Vidal M, Morris R, Grosveld F & Spanopoulou E (1990). Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* **9**, 833–840.
- Vinay L, Brocard F, Clarac F, Norreel JC, Pearlstein E & Pflieger JF (2002). Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res Rev* **40**, 118–129.
- Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y & Mandrioli J (2012). Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health* **27**, 19–41.
- Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Moore VDG, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW & Milligan C (2013a). Characterization of early pathogenesis in the SOD1 G93A mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav* **3**, 335–350.
- Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Moore VDG, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW & Milligan C (2013b). Characterization of early pathogenesis in the SOD1 G93A mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* **3**, 431–457.
- Vucic S, Rothstein JD & Kiernan MC (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends in Neurosciences* 1–10.

W

- Wagner JE (2005). Practical and ethical issues with genetic screening. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 498–502.
- Wagner ML & Landis BE (1997). Riluzole: a new agent for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Pharmacother* **31**, 738–744.

- Walker MP & Stickgold R (2006). Sleep, memory, and plasticity. *Annu Rev Psychol* **57**, 139–166.
- Walton KD & Chesler M (1988). Activity-related extracellular potassium transients in the neonatal rat spinal cord: an in vitro study. *Neuroscience* **25**, 983–995.
- Wang G, Grone B, Colas D, Appelbaum L & Mourrain P (2011). Synaptic plasticity in sleep: learning, homeostasis and disease. *Trends in Neurosciences* **34**, 452–463.
- Wang L, Deng H-X, Grisotti G, Zhai H, Siddique T & Roos RP (2009). Wild-type SOD1 overexpression accelerates disease onset of a G85R SOD1 mouse. *Human Molecular Genetics* **18**, 1642–1651.
- Warita H, Itoyama Y & Abe K (1999). Selective impairment of fast anterograde axonal transport in the peripheral nerves of asymptomatic transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research* **819**, 120–131.
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Cizewski Culotta V, Price DL, Wong PC & Rothstein JD (2001). Histological Evidence of Protein Aggregation in Mutant SOD1 Transgenic Mice and in Amyotrophic Lateral Sclerosis Neural Tissues. *Neurobiology of Disease* **8**, 933–941.
- Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM & Baloh RH (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 18809–18814.
- Wei J, Walton EA, Milici A & Buccafusco JJ (1994). m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. *J Neurochem* **63**, 815–821.
- Welton J, Stewart W, Kerr R & Maxwell DJ (1999). Differential expression of the muscarinic m2 acetylcholine receptor by small and large motoneurons of the rat spinal cord. *Brain Research* **817**, 215–219.
- Werhun K & Lewandowski MH (2009). The effects of muscarinic cholinergic receptor antagonist on slow bursting neuronal activity in the rat intergeniculate leaflet. *Folia Biol (Krakow)* **57**, 187–192.
- Wetts R & Vaughn JE (2001). Development of cholinergic terminals around rat spinal motor neurons and their potential relationship to developmental cell death. *J Comp Neurol* **435**, 171–183.
- 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.
- Whelan PJ (1996). Control of locomotion in the decerebrate cat. *Progress in Neurobiology* **49**, 481–515.
- Whelan PJ (2003). Developmental aspects of spinal locomotor function: insights from using the in vitro mouse spinal cord preparation. *The Journal of Physiology* **553**, 695–706.
- White SR, Fung SJ & Barnes CD (1991). Norepinephrine effects on spinal motoneurons. *Prog Brain Res* **88**, 343–350.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA & Jessell TM (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385–397.
- Williamson TL & Cleveland DW (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* **2**, 50–56.
- Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C & Kumar-Singh S (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 3858–3863.
- Wilson JM, Hartley R, Maxwell DJ, Todd AJ, Lieberam I, kaltschmidt JA, Yoshida Y, Jessell TM & Brownstone RM (2005). Conditional Rhythmicity of Ventral Spinal Interneurons Defined by Expression of the Hb9 Homeodomain Protein. *Journal of Neuroscience* **25**, 5710–5719.

- Wilson JM, Rempel J & Brownstone RM (2004). Postnatal development of cholinergic synapses on mouse spinal motoneurons. *J Comp Neurol* **474**, 13–23.
- Wishart TM, Parson SH & Gillingwater TH (2006). Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**, 733–739.
- Witts EC, Zagoraiou L & Miles GB (2013). Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *J Anat* **224**, 52–60.
- Wolpaw JR (2010). What Can the Spinal Cord Teach Us about Learning and Memory? *Neuroscientist* **16**, 532–549.
- Wolpaw JR & O'Keefe JA (1984). Adaptive plasticity in the primate spinal stretch reflex: evidence for a two-phase process. *J Neurosci* **4**, 2718–2724.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW & Price DL (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**, 1105–1116.
- Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA & Seburn KL (2005). Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* **32**, 43–50.
- Wutzke CJ, Mercer VS & Lewek MD (2013). Influence of lower extremity sensory function on locomotor adaptation following stroke: a review. *Top Stroke Rehabil* **20**, 233–240.

X

- Xu Y-F, Zhang Y-J, Lin W-L, Cao X, Stetler C, Dickson DW, Lewis J & Petrucelli L (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration* **6**, 73.
- Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, Casey MC, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J & Petrucelli L (2010). Wild-Type Human TDP-43 Expression Causes TDP-43 Phosphorylation, Mitochondrial Aggregation, Motor Deficits, and Early Mortality in Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* **30**, 10851–10859.
- Xu Z, Poidevin M, Li X, Li Y, Shu L, Nelson DL, Li H, Hales CM, Gearing M & Wingo TS (2013). Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 7778–7783.

Y

- Yaksh TL & Tyce GM (1980). Release of norepinephrine and serotonin in cat spinal cord: direct in vivo evidence for the activation of descending monoamine pathways by somatic stimulation. *J Physiol (Paris)* **77**, 483–487.
- Yamamoto T, Hertzberg EL & Nagy JI (1990). Epitopes of gap junctional proteins localized to neuronal subsurface cisterns. *Brain Research* **527**, 135–139.
- Yamamoto T, Hertzberg EL & Nagy JI (1991). Subsurface cisterns in alpha-motoneurons of the rat and cat: immunohistochemical detection with antibodies against connexin32. *Synapse* **8**, 119–136.
- Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Okamoto K, Fujita Y, Jackson M, Ikeda M, Nakazato Y, Ikeda Y, Matsubara E, Kawarabayashi T & Shoji M (2010). Journal of the Neurological Sciences. *J Neurol Sci* **296**, 59–63.
- Yang Z & Klionsky DJ (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Publishing Group* **12**, 814–822.

Z

- Zacharias DA, Baird GS & Tsien RY (2000). Recent advances in technology for measuring and manipulating cell signals. *Current Opinion in Neurobiology* **10**, 416–421.
- 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.
- Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Klivényi P, Toldi J & Vécsei L (2014). Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *J Alzheimers Dis* **42**, S177–S187.
- Zhang B, Tu P-H, Abtahian F, Trojanowski JQ & Lee VMY (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *The Journal of Cell Biology* **139**, 1307–1315.
- Zhang D, Iyer LM, He F & Aravind L (2012). Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front Genet* **3**, 283.
- Zhang HM, Zhou HY, Chen SR, Gautam D, Wess J & Pan HL (2007). Control of Glycinergic Input to Spinal Dorsal Horn Neurons by Distinct Muscarinic Receptor Subtypes Revealed Using Knockout Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **323**, 963–971.
- Zhang J, Lanuza GM, Britz O, Wang Z, Siembab VC, Zhang Y, Velasquez T, Alvarez FJ, Frank E & Goulding M (2014a). V1 and V2b Interneurons Secure the Alternating Flexor-Extensor Motor Activity Mice Require for Limbed Locomotion. *Neuron* **82**, 138–150.
- Zhang J, Li Y, Xu J & Yang Z (2014b). The role of N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **339**, 123–129.
- 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, 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. *Journal of Neuroscience* **30**, 170–182.
- Zhou Y, Yamamoto M & Engel JD (2000). GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development* **127**, 3829–3838.
- Zhu H, Clemens S, Sawchuk M & Hochman S (2007). Expression and distribution of all dopamine receptor subtypes (D(1)-D(5)) in the mouse lumbar spinal cord: a real-time polymerase chain reaction and non-autoradiographic in situ hybridization study. *Neuroscience* **149**, 885–897.
- Ziskind-Conhaim L, Mentis GZ, Wiesner EP & Titus DJ (2010). Synaptic integration of rhythmogenic neurons in the locomotor circuitry: the case of Hb9 interneurons. *Ann N Y Acad Sci* **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.
- Zou W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J & Liu X (2002). Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* **67**, 837–843.

Annexes



Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1^{G93A} newborn mice

Léa Milan¹, Grégory Barrière¹, Philippe De Deurwaerdère², Jean-René Cazalets¹ and Sandrine S. Bertrand¹*

¹ CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

² Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Edited by:

Shawn Hochman, Emory University, USA

Reviewed by:

David Parker, Cambridge University, UK

Brian R. Noga, University of Miami, USA

Patrick John Whelan, University of Calgary, Canada

*Correspondence:

Sandrine S. Bertrand, CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, UMR5287, Université de Bordeaux, Bat 2, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France
e-mail: sandrine.bertrand@u-bordeaux.fr

Mutations in the gene that encodes Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) are the cause of approximately 20% of familial forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of motor neurons. While ALS symptoms appear in adulthood, spinal motoneurons exhibit functional alterations as early as the embryonic and postnatal stages in the murine model of ALS, the SOD1 mice. Monoaminergic – i.e., dopaminergic (DA), serotonergic (5-HT), and noradrenergic (NA) – pathways powerfully control spinal networks and contribute significantly to their embryonic and postnatal maturation. Alterations in monoaminergic neuromodulation during development could therefore lead to impairments in the motoneuronal physiology. In this study, we sought to determine whether the monoaminergic spinal systems are modified in the early stages of development in SOD1 mice. Using a post-mortem analysis by high performance liquid chromatography (HPLC), monoaminergic neuromodulators and their metabolites were quantified in the lumbar spinal cord of SOD1 and wild-type (WT) mice aged one postnatal day (P1) and P10. This analysis underscores an increased content of DA in the SOD1 lumbar spinal cord compared to that of WT mice but failed to reveal any modification of the other monoaminergic contents. In a next step, we compared the efficiency of the monoaminergic compounds in triggering and modulating fictive locomotion in WT and SOD1 mice. This study was performed in P1–P3 SOD1 mice and age-matched control littermates using extracellular recordings from the lumbar ventral roots in the *in vitro* isolated spinal cord preparation. This analysis revealed that the spinal networks of SOD1^{G93A} mice could generate normal locomotor activity in the presence of NMA-5-HT. Interestingly, we also observed that SOD1 spinal networks have an increased sensitivity to NA compared to WT spinal circuits but exhibited similar DA responses.

Keywords: serotonin, dopamine, noradrenaline, spinal cord, ALS, fictive locomotion, HPLC, extracellular recordings

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration of M1 neurons in the cerebral cortex and motor neurons in the brainstem and spinal cord. Approximately 20% of familial forms of ALS cases are associated with inherited dominant mutations in the gene that encodes Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1). While ALS syndrome occurs during adulthood in both humans and ALS animal models, a growing body of evidence shows that spinal locomotor networks exhibit functional alterations as early as the embryonic and postnatal stages in mice expressing the human mutated SOD1 protein, the SOD1 mouse model. Behavioral tests performed during the first postnatal week revealed a delay in the maturation processes of sensorimotor modalities such as righting and hind-paw grasping responses in mutant SOD1^{G85R} mice (Amendola et al., 2004). At the cellular level, developing SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} motoneurons have been shown to exhibit dendritic abnormalities and alterations in both excitability and synaptic inputs compared to the motoneurons of age-matched wild-type (WT) mice (Bories et al., 2007; Pambo-Pambo et al., 2009; Chang

and Martin, 2011; Filipchuk and Durand, 2012; Martin et al., 2013). Differences in neurochemical sensitivity have also been reported between newborn WT and SOD1 mice. Indeed, the classical rhythmogenic drug cocktail (a mixture of glutamate agonist plus serotonin) used to activate the locomotor central pattern generators (CPGs) in the isolated spinal cord preparation of newborn rodents has been shown to be inefficient in inducing fictive locomotion in SOD1^{G85R} mice (Amendola et al., 2004). As such early alterations could prime neuronal circuits and make them more permissive to pathological changes later in life, it appears of importance to further decipher the changes undergone by the spinal motor networks in early developmental stages in the SOD1 models of ALS.

Motoneurons are targeted by numerous extra- and intraspinal neuromodulatory systems that control both their intrinsic membrane properties and incoming synaptic inputs (for review see Miles and Sillar, 2011). In addition to their role in excitability control, neuromodulatory influences contribute significantly to the embryonic and postnatal development of the spinal cord motor networks (for review see Vinay et al., 2002; Miles and Sillar, 2011).

Amongst neuromodulatory systems, monoaminergic – i.e., dopaminergic (DA), serotonergic (5-HT), and noradrenergic (NA) – pathways have been shown to initiate and facilitate the expression of spinal motor outputs, to control segmental reflexes and to play a major role in the maturation of spinal locomotor networks (Barbeau and Rossignol, 1991; Crick and Wallis, 1991; Cazalets et al., 1992; Sqalli-Houssaini et al., 1993; Kiehn and Kjaerulff, 1996; Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000; Whelan et al., 2000; Vinay et al., 2002; Barrière et al., 2004, 2008; Han et al., 2007; Han and Whelan, 2009; Tartas et al., 2010; Miles and Sillar, 2011; Humphreys and Whelan, 2012; Pearlstein, 2013). Alterations in monoaminergic controls during development could therefore lead to significant reorganizations of the spinal locomotor circuits and contribute to the developmental impairments described in SOD1 motoneurons. However, to the best of our knowledge, data concerning the possible changes in the spinal monoaminergic inputs in the early developmental stages of SOD1 mice are not currently available. In the present study, we sought to determine whether spinal monoaminergic content and sensitivity is modified in newborn SOD1 mice. Specifically, we performed a high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the spinal monoamine contents and compared the effects of 5-HT, DA, and NA on the locomotor activity recorded extracellularly from isolated spinal cord preparations from newborn SOD1 and age-matched control littermates. This study found that well-organized locomotor-like activity could be generated in the isolated spinal cord preparation from SOD1^{G93A} mice by classical pharmacological activation. We also reported an increased content of spinal DA content in the second postnatal week, as well as an increased sensitivity to NA, in SOD1 spinal networks compared to those of WT mice.

MATERIALS AND METHODS

ETHICS STATEMENTS AND ANIMALS

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 used in the experiments. Transgenic mice expressing a mutated human SOD-1 gene from the B6SJL-TgN (SOD1^{G93A}) 1 Gur/J line (SOD1 mice) were purchased from Jackson Laboratories. These mice were bred in our laboratory and maintained as hemizygotes by mating transgenic males with wild-type B6SJL females. Two hundred thirty-eight newborn mice were used in this study. All of the experiments and analyses presented here have been performed blind to the genotype of the animals. Mice were genotyped from genomic DNA purified from tail biopsies by PCR using the following primers: 5' CATCAGCCCTAATC-CATCTGA 3' (forward), 5' CGCGACTAACAATCAAAGTGA 3' (reverse).

TISSUE PROCESSING FOR POST-MORTEM ANALYSIS

After decapitation, the lumbar spinal cord of postnatal 1 (P1) or P10 SOD1 and age-matched control littermate male mice was quickly removed by a laminectomy, placed in dry ice and stored at -80°C until experiment processing. When needed, the lumbar spinal cord was placed on the side and cut in the middle of the

dorso-ventral axis with micro dissecting knives to separate the ventral and dorsal part of the cord.

POST-MORTEM HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) MEASUREMENTS

On the day of the biochemical analysis, after weighing the samples, tissue was homogenized in 0.1 N perchloric acid (HClO_4), sonicated and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C . The tissue contents of monoamines (DA, NA, 5-HT) and their metabolites (5-hydroxyindole-3-acetic acid: 5-HIAA a 5-HT metabolite and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid: DOPAC, a DA metabolite) were measured by a sensitive HPLC-electrochemical detection (ECD) system. Aliquots of the sample supernatant were placed in an automated autosampler (Shimadzu, SIL-20A, Paris, France) at 4°C to be injected into the HPLC column (Hypersyl C18, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μm ; C.I.L.-Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) protected by a Brownlee-Newguard precolumn (RP-8, 15 \times 3.2 mm, 7 μm ; C.I.L.-Cluzeau). The mobile phase was delivered at a flow rate of 1.3 ml/min using a HPLC pump (LC20-AD, Shimadzu, France) and was composed as follows (in millimoles): 60 NaH_2PO_4 , 0.1 disodium EDTA and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to a pH of 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22 mm Millipore filter. Monoamines and their metabolites were detected using a coulometric cell (Analytical cell 5011, Coulochem) coupled to a programmable detector (Coulochem II, ESA, Paris, France). The potential of the electrodes was set at +350 mV for the oxidation and -270 mV for the reduction. Output signals were recorded on a computer (Beckman, system GOLD). Under these conditions, the sensitivity for NA, DA, 5-HT, DOPAC, and 5-HIAA was 3, 1, 8, 6, and 5 pg/10 μl , respectively, with a signal/noise ratio of 3:1. The tissue content of monoamines was expressed in pg/mg of tissue and corresponded to the mean \pm SEM values in each group. Differences of the monoamine content between P1/P10 SOD1 mice and control littermates were analyzed using repeated measures two-way analyses of variance (ANOVA) with Sidak's multiple comparison tests (Graph Pad Prism). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

ISOLATED SPINAL CORD PREPARATION

Newborn SOD1 and WT littermate mice aged P1–P3 were deeply anesthetized with 4% isoflurane, decapitated and eviscerated. A laminectomy was then performed to expose and remove the spinal cord. All dissections and recording procedures were performed under continuous superfusion with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in millimoles): NaCl 130, KCl 3, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.3, NaH_2PO_4 0.58, NaHCO_3 25, and glucose 10, with a pH of 7.4 when bubbled with 95% O_2 + 5% CO_2 at room temperature ($24\text{--}26^{\circ}\text{C}$).

PHARMACOLOGY

All drugs (*N*-methyl-D, L-aspartate: NMA; 5-HT, DA, and NA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Stock solutions of 5-HT and NMA were prepared at 0.1 mM in distilled water and stored at -20°C . Fresh drug solutions of DA and NA were prepared daily and protected from light exposure. Pharmacological compounds were bath-applied using a peristaltic pump (flow rate 7 ml/min).

EXTRACELLULAR RECORDINGS AND ANALYSIS

Motor outputs were recorded extracellularly from the lumbar ventral roots using glass suction electrodes. In each *in vitro* spinal cord preparation, motor outputs from the right and left lumbar 2 (rL2, lL2, respectively) and one L5 ventral root were simultaneously recorded to investigate both the bilateral segmental alternation and the flexor/extensor activity (Cazalets et al., 1992; Kiehn and Kjaerulff, 1996). The neurograms were amplified ($\times 10000$) using high impedance AC amplifiers (200–3000 Hz) built at the laboratory and digitized at 5 kHz (Axograph, Sydney, NSW, Australia) for future analysis. Pharmacologically induced locomotor rhythms were analyzed using non-stationary analysis techniques in a Matlab-based software developed at the laboratory. This custom-made software is similar to SpinalCore, a software developed by the Lev-Tov group (Mor and Lev-Tov, 2007), and is based on the MatLab wavelet coherence package provided by Aslak Grinsted (<http://noc.ac.uk/using-science/crosswavelet-wavelet-coherence>; Torrence and Compo, 1998; Grinsted et al., 2004). Two-minute sections of pairs of neurograms were analyzed using cross wavelet transform and wavelet coherence. These methods were applied to high-pass (50 Hz), rectified and low-pass filtered (5–10 Hz) signals. For convenience, cross wavelet spectrum and wavelet coherence maps were combined into a mixed cross/coherence map (Figure 2B1) highlighting coherent, common high power frequency regions. In these maps, the evolution of the frequency components of the extracellular signals (y -axis, logarithmic scale) is represented as a function of time (x -axis), and the power of each frequency is color-coded with warm colors assigned to high power regions and cool colors to low power regions. The asymptotic lines in the mixed cross/coherence maps indicate the cone of influence. This cone delimits the region where edge effect becomes too important. The values outside of this cone were thus excluded from the statistical analysis (Torrence and Compo, 1998; Mor and Lev-Tov, 2007). The high power band of the generated time/frequency map was selected as a region of interest (ROI) and arbitrarily segmented into 1 s bins to compute the mean frequency, coherence, and phase relationship between pairs of neurograms. The critical level of statistical significance of the wavelet coherence was calculated using Monte-Carlo simulations (Mor and Lev-Tov, 2007). The power and phase of the mean vector of pairs of ventral root recordings were extracted for each experiment with this procedure. Using the Igor Pro software (Wavemetrics), angular distribution tests and Watson nonparametric circular two sample U2 tests were performed to compare circular data between WT and SOD1 mice in the different pharmacological conditions tested.

Motor burst amplitudes were computed in a custom-made Matlab-based software. For each preparation, the burst amplitude values were normalized to the amplitude measured in the presence of 10 μM 5-HT for experiments with increasing doses of 5-HT or to the amplitude observed during bath-applications of NMA-5-HT (16 μM each; Sqalli-Houssaini et al., 1993) alone prior to the addition of NA or DA to the bath. Repeated measures two-way analyses of variance (ANOVA) with Sidak's multiple comparison tests were performed to evaluate monoamines and mouse genotype effects (Graph Pad Prism). All data are expressed as means \pm SEM. Asterisks in the Figures

and Tables indicate positive significance levels of *post hoc* analysis ($p < 0.05$).

RESULTS

SPINAL MONOAMINERGIC CONTENTS IN NEWBORN WILD-TYPE AND SOD1 MICE

In rats, the first connections between brainstem monoaminergic cells and spinal neurons are established during the last week of gestation and mature sequentially along the rostrocaudal and ventro-dorsal axes until the second postnatal week (Commissiong, 1983; Bregman, 1987; Rajaofetra et al., 1989, 1992; Giménez y Ribotta et al., 1998; Clarac et al., 2004). To get an overview of the spinal monoaminergic innervation, we first conducted an HPLC analysis of the endogenous spinal content of biogenic amines and their metabolites in SOD1 mice and WT littermates (Figure 1A). To assess the impact of the descending pathway maturation on monoamine contents, we performed these procedures on the lumbar spinal cord samples from both P1 and P10 animals. This HPLC analysis revealed that the NA and 5-HT contents were about 20 times greater than the DA content in the lumbar spinal cord of both P1 and P10 mice. We also observed that regardless of the mouse genotype, the contents of NA (Figure 1B1), DA (Figure 1C1) and 5-HT (Figure 1D1) were significantly higher in P10 animals compared to P1 mice. In contrast, DOPAC and 5-HIAA were not significantly different between the two developmental stages tested (Table 1). *Post hoc* pairwise comparisons conducted between WT and SOD1 mice revealed no significant change in NA, 5-HT, DOPAC, or 5-HIAA. However, we observed that the DA content was significantly enhanced in the whole lumbar spinal cord of SOD1 P10 mice compared to age-matched WT animals.

Monoaminergic pathways densely innervate both dorsal and ventral spinal circuits. To specifically look for changes in the monoaminergic contents in spinal motor networks, the same HPLC analysis was repeated on the ventral half of the lumbar spinal cord (Figures 1B2,C2,D2). In these experimental conditions, we observed that the contents of all of the monoaminergic compounds tested (Figures 1B2,C2,D2) except 5-HIAA (Table 1) significantly increased during development. In contrast to the aforementioned results obtained using the whole spinal cord, the mouse genotype had no detectable influence on the monoaminergic contents measured in the ventral part of the cord.

RHYTHMOGENIC CAPABILITIES OF SOD1^{G93A} SPINAL NETWORKS AND SEROTONINERGIC MODULATION

As previously mentioned, Amendola et al. (2004) reported that NMA (10–20 μM) plus 5-HT (5–20 μM), a mixture known to generate locomotor-like activity in the *in vitro* spinal cord preparation of newborn rodents, induces only tonic activity when bath-applied to SOD1^{G85R} mouse spinal networks (Amendola et al., 2004). Dramatically different alterations in the motoneuronal physiology have been reported depending on the SOD1 mouse model used (see for example Meehan et al., 2010; Delestrée et al., 2014). The question then arises as to whether NMA-5-HT effects are similar in the SOD1^{G85R} and SOD1^{G93A} high expressor line mouse strains. To address this question, we compared the efficiency of

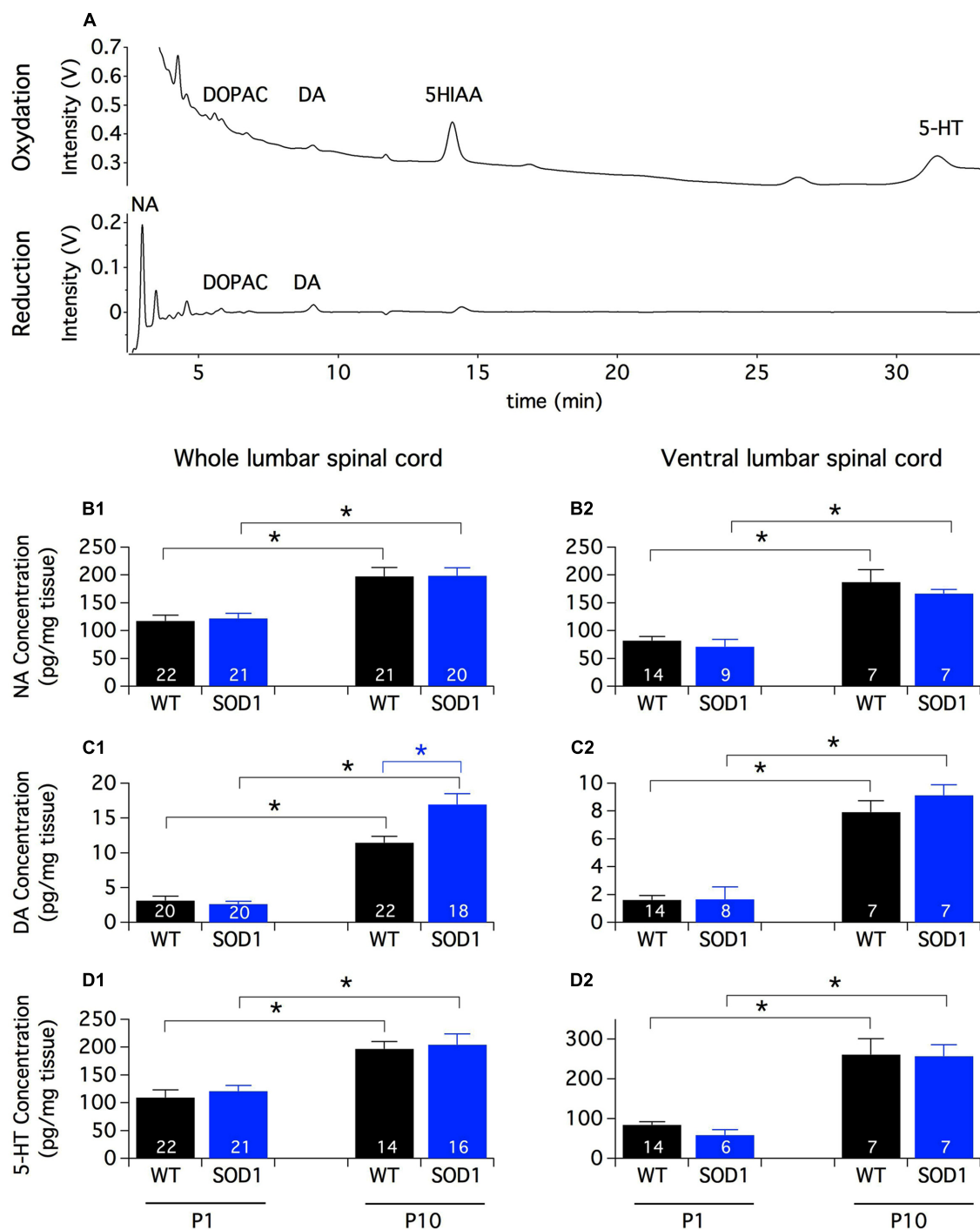


FIGURE 1 | Monoamine contents in the lumbar spinal cord of newborn mice. (A) Example of HPLC chromatograms of a whole spinal cord sample from a P10 SOD1 mouse. The chromatograms represent the output Coulometric signals (nanoampere converted in ± 1 V output by the recorder) produced after their separation by the compounds at the level of the electrode of oxidation (upper trace; +350 mV) and/or the electrode of reduction (lower trace; -270 mV) of the Coulometric cell. Most of the quantitative analyses are performed using the oxidation channel (all compounds of interest except NA which is often confounded in the solvent front) and NA, DOPAC and DA

quantities can be also analyzed using the reduction channel. (B–D) Contents of NA (B1,B2), DA (C1,C2), and 5-HT (D1,D2) measured by HPLC assays in the whole lumbar spinal cord (B1–D1) or in its ventral half (B2–D2) from P1 and P10 WT (black bars) and SOD1 (blue bars) mice. Note the increased concentration of monoamines with age and the significant difference in DA content between WT and SOD1 P10 mice. Asterisks indicate positive significance levels and the numbers in histogram bars refer to the number of samples tested. NA: noradrenaline, DA: dopamine, 5-HT: serotonin, DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 5-HIAA: 5-hydroxyindole-3-acetic.

Table 1 | HPLC measurements of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindole-3-acetic (5-HIAA) contents in the whole or ventral part of the lumbar spinal cord from P1 and P10 WT and SOD1 mice.

		Wild-type		SOD1	
		P1	P10	P1	P10
DOPAC	Whole lumbar	14.3 ± 4 (14)	27.8 ± 3 (18)	33.4 ± 10 (17)	26.9 ± 4 (17)
	Ventral lumbar	8.8 ± 1 (13)	28.2 ± 8 (7)*	11.5 ± 3 (6)	34.8 ± 9 (7)*
5-HIAA	Whole lumbar	148.9 ± 14	174.4 ± 18	154.7 ± 11	176.1 ± 17
	Ventral lumbar	99.4 ± 11	122.8 ± 15	100.9 ± 22	128.7 ± 19

The numbers in brackets correspond to the number of samples tested. Asterisks indicate significant differences between the P1 and P10 developmental stages.

NMA (16 μ m) in the presence of increasing concentrations of 5-HT in activating the spinal locomotor CPGs in SOD1^{G93A} and age-matched littermate controls. **Figure 2A** shows that, regardless of the 5-HT concentration tested, the bath-application of NMA-5-HT triggered an alternating bursting activity of the right and left L2 and homolateral flexor L2 and extensor L5 ventral roots in both WT (**Figure 2A1**) and SOD1 mice (**Figure 2A2**). This motor pattern, with a mean period ranging from 3 to 4 s (**Figure 2D1**), is characteristic of a locomotor-like activity (Cazalets et al., 1992; Kiehn and Kjaerulff, 1996). Regardless of the animal genotype, raising the 5-HT concentration from 10 to 12.5 or 15 μ m did not significantly affect the rhythm phase relationships (**Figures 2B,C; Table 1**), period (**Figure 2D1**) or motor burst duration (L2: **Figure 2D2**, Data not shown for L5). In contrast, the locomotor burst amplitude was significantly increased in the presence of 12.5 or 15 μ m 5-HT compared to the 10 μ m 5-HT condition (**Figure 2D3** for L2 bursts, data not shown for L5). This 5-HT-induced amplification was, however, not significantly different between the WT and SOD1 mice.

Overall, these data suggest that the spinal networks of newborn SOD1^{G93A} mice could generate well-organized locomotor patterns under NMA-5-HT chemical stimulation and present a WT-like serotonergic sensitivity.

NORADRENERGIC MODULATION

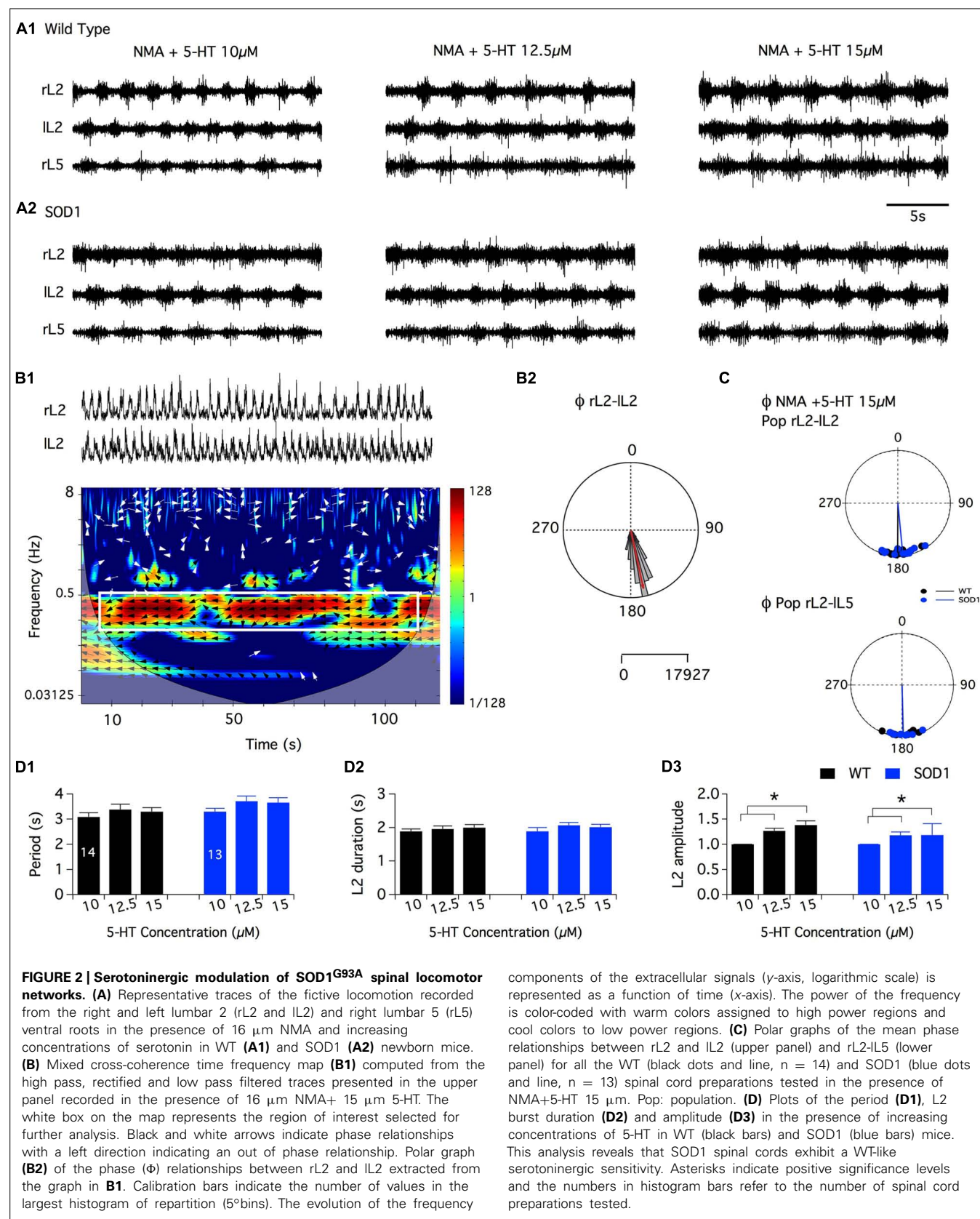
In a first series of experiments, the effects of the bath-application of NA alone (10^{-5} , 5×10^{-5} , and 10^{-4} M (Sqalli-Houssaini and Cazalets, 2000) or in combination with NMA were tested. Under these conditions, tonic or very irregular motor activities were generated in both WT and SOD1 preparations, preventing accurate measurements from being performed (data not shown). In this context, we decided to restrict the analysis of the noradrenergic effects to the modulation of the NMA-5-HT-induced rhythm. After inducing control fictive locomotion with NMA-5-HT (16 μ m each), WT and SOD1 spinal cords were challenged with increasing NA concentrations in the presence of NMA-5-HT (**Figure 3**). Regardless of the NA concentration and mouse genotype, the phase relationships of the NA+NMA/5-HT-induced rhythms were similar to those computed in the absence of NA (**Table 2; Figure 3B**; Data not shown for the L2/L5 alternation). In contrast, the locomotor rhythm was strongly slowed down in the presence of NA (**Figure 3A**). In WT animals (**Figure 3A1**), all of the NA concentrations tested (10, 50, and

100 μ m) induced a significant increase in the locomotor parameters (period, **Figure 3C1**; L2 burst duration, **Figure 3C2**, and amplitude, L2: **Figure 3C3**, black bars, L5: data not shown) compared to the NMA-5-HT control conditions. The rhythm period and L2 burst duration values computed in the presence of 50 μ m NA were also significantly different from the ones obtained with 10 μ m NA in WT animals. In SOD1 mice (**Figure 3A2**), both the L2 burst durations and amplitude values were significantly enhanced compared to the NMA-5-HT condition for all of the NA concentrations tested (**Figures 3C2,C3**, blue bars). In contrast, the locomotor rhythm period was only significantly different from the control condition in the presence of 50 μ m NA (**Figure 3C1**).

Interestingly, a *post hoc* analysis revealed that the NA-induced amplification of the L2 (**Figure 3C3**) and L5 (data not shown) burst amplitude values observed in the presence of 10 and 50 μ m NA was significantly higher in SOD1 mice compared to WT animals. This result underscores the differences in the NA sensitivity between WT and SOD1 spinal locomotor networks.

DOPAMINERGIC MODULATION

As previously described for NA, the superfusion of DA by itself (10^{-4} and 5×10^{-4} M) or in combination with NMA (DA: 10^{-5} M, 5×10^{-5} M and 10^{-4} M (Barrière et al., 2004; Spalloni et al., 2011) on *in vitro* spinal cord preparations failed to generate regular motor activities that could be accurately analyzed in both WT and SOD1 preparations (data not shown; see also (Jiang et al., 1999). The comparison of the dopaminergic modulation between WT and SOD1 spinal cord networks was therefore restricted to the NMA-5-HT-induced locomotor like activity. For this purpose, control fictive locomotion was first acquired in the presence of NMA-5-HT (16 μ m each, **Figure 4A**) and subsequent DA bath-applications of increasing concentration (50 and 500 μ m) were realized. Similar to the other two amines tested, DA did not affect the phase relationships of the NMA-5-HT-induced locomotor activity (**Table 2** and **Figure 4B**, data not shown for the L2/L5 alternation) in both WT and SOD1 spinal cord preparations. However, irrespective of the mouse genotype, 50 or 500 μ m DA significantly increased the values of all locomotor parameters (period, **Figure 4C1**; L2 burst duration, **Figure 4C2** and burst amplitude values, **Figure 4C3**, data not shown for L5) compared to the control NMA-5-HT condition. The period of the locomotor rhythm in WT animals (**Figure 4C1**) as well as the L2 burst amplitudes in SOD1 mice (**Figure 4C3**) computed in the presence of



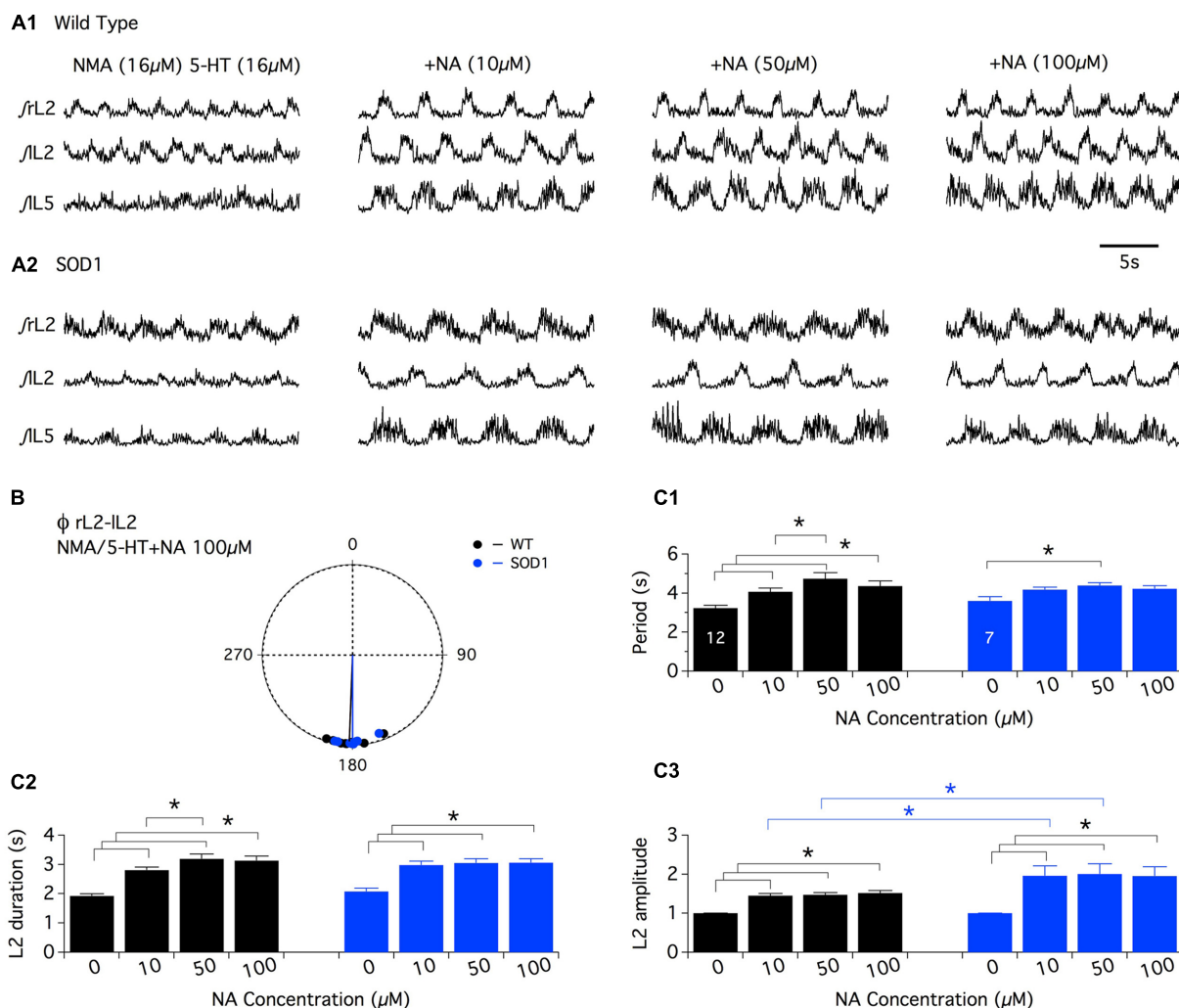


FIGURE 3 | Neuromodulatory actions of noradrenaline on NMA+5-HT-induced fictive locomotion in SOD1 and age-matched control mice. (A) Representative integrated (\int) extracellular recordings from the right, left L2 and left L5 ventral roots (rL2, IL2, and IL5) in the presence of NMA+5-HT (16 μ M each) alone or with noradrenaline (NA; 10, 50, or 100 μ M) in WT animals (**A1**) and SOD1 mice (**A2**). **(B)** Polar graph of the rL2-IL2 phase (Φ) relationships computed in WT (black dots and line, $n = 12$) and SOD1

(blue dots and line, $n = 7$) spinal cords in the presence of 100 μ M NA. **(C)** Plots of the period (**C1**), L2 burst duration (**C2**) and amplitude (**C3**) in the absence or presence of NA bath-applied at increasing concentrations on WT (black bars) and SOD1 (blue bars) spinal cord preparations. Note the significant difference in L2 motor burst modulation between WT and SOD1 mice. Asterisks indicate positive significance levels and the numbers in histogram bars refer to the number of spinal cord preparations tested.

50 μ M DA were significantly enhanced when DA concentration was raised to 500 μ M. In contrast, the other locomotor parameters tended to increase in the presence of 500 μ M DA but were not significantly different from those computed in the presence of 50 μ M DA (**Figure 4C**). These results indicate that DA neuromodulatory processes are similar in WT and SOD1 spinal motor networks. These results are in agreement with the HPLC analysis of spinal DA content that failed to reveal differences between WT and SOD1 mice at this developmental stage.

DISCUSSION

FICTIVE LOCOMOTION GENERATION IN SOD1 SPINAL NETWORKS

Our data show that in contrast to what has been previously described in the SOD1^{G85R} mouse line (Amendola et al., 2004),

coordinated fictive locomotion could be efficiently triggered by the bath-application of NMA plus 5-HT in the SOD1^{G93A} mouse spinal cord. Several mutant SOD1 mouse models that serve as invaluable tools to understand the pathophysiology of ALS have been developed. To date, 12 lines of transgenic mouse expressing different human mutated SOD1 proteins are available. Transgenic SOD1^{G93A} mice are principally used in ALS research, followed by SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R}, and SOD1^{G86R} mice. All of these models exhibit slightly different time courses of the disease and associated neurodegenerative processes depending on the SOD1 mutation site, related enzymatic activity, transgene copy number and genetic background (Jonsson et al., 2006; Turner and Talbot, 2008; Van Den Bosch, 2011). SOD1^{G93A} proteins, for example, are about 10 times more active than the native SOD1 proteins

Table 2 | Circular statistics of the phase relationships between right and left L2s in the presence of the different monoaminergic concentrations.

	NMA 16 μm							
	+ 5-HT 10 μm		+ 5-HT 12.5 μm		+ 5-HT 15 μm			
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1		
Mean vector	0.901	0.875	0.893	0.89	0.942 (14)	0.924 (13)		
Mean angle	−3.11	3.11	−3.12	2.99	−3.13	3.04		
	NMA + 5-HT		+ DA 50 μm		+ DA 500 μm			
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1		
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1		
Mean vector	0.893	0.876	0.960	0.954	0.957 (16)	0.910 (11)		
Mean angle	−3.09	2.98	3.02	−3.10	3.02	−3.02		
	NMA + 5-HT		+ NA 10 μm		+ NA 50 μm		+ NA 100 μm	
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
Mean vector	0.950	0.931	0.971	0.975	0.968	0.964	0.961 (12)	0.954 (7)
Mean angle	−3.09	3.03	3.13	3.08	3.06	3.08	−3.105	3.139

16 μ m NMA and 16 μ m 5-HT were used to induce control locomotor-like activity. The number of preparations tested in each condition is indicated in brackets. Circular two sample test analysis revealed no significant differences between the experimental conditions tested.

while in contrast, SOD1^{G85R} mutant proteins are almost inactive. Striking discrepancies between SOD1 models have been previously reported concerning motoneuron excitability (Meehan et al., 2010; Delestrée et al., 2014). Pambo-Pambo et al. (2009) have also shown that motoneurons are more immature in the SOD1^{G93A} low expressor line (SOD1^{G93A} low) compared to SOD1^{G85R}. Indeed, in newborn mice, SOD1^{G93A} low motoneurons have a more depolarized resting membrane potential and appear to be more excitable than SOD1^{G85R} and WT motoneurons. The difference between SOD1^{G93A} and SOD1^{G85R} mouse lines in NMA/5-HT's effectiveness in triggering fictive locomotion further emphasizes the heterogeneity of SOD1 mouse mutants. This observed heterogeneity certainly parallels the complex etiology of ALS and stresses the importance of the complementary use of the different SOD1 mouse models to explore the different aspects of this motor disease.

In the present study, the NMA-5-HT-evoked rhythm was neither qualitatively nor quantitatively different between SOD1 and WT animals. These results suggest that whereas different groups have described early developmental alterations in motoneuron functioning, the locomotor outputs recorded from motoneuron axons in SOD1 mice are similar to the WT locomotor outputs. In the SOD1^{G93A} model, motoneurons at birth have been shown to be more immature, more excitable than WT motoneurons and to present a different dendritic branching pattern (Kuo, 2003; Pieri et al., 2003; Kuo et al., 2005; Pambo-Pambo et al., 2009). The question then arises as to whether these changes have a real impact on motoneuron output or whether the whole spinal network in charge of locomotion generation operates in such a way that these alterations are compensated. For example, it is well known that after a lesion, the spinal locomotor networks undergo a restructuring

and can, after training, adapt their functioning and produce almost the same locomotor pattern that existed before the lesion (Barbeau and Rossignol, 1987; Rossignol et al., 2008). Such compensatory mechanisms may occur in newborn SOD1 spinal networks to ensure normal locomotor network function. A limitation of the present study is that locomotor activity was assessed using extracellular recordings. Further research is needed to further decipher the impact, at the cellular level, of the previously reported impairments in motoneuron excitability and morphology on the motor circuits.

SPINAL MONOAMINERGIC NEUROMODULATION

Our HPLC data of either whole or ventral half spinal samples show that the monoaminergic rates rose between birth and the second postnatal week in the lumbar enlargement. This result is in agreement with developmental studies that have reported a progressive rostrocaudal gradient of the monoaminergic innervation associated with an increase in axonal density (Commissiong, 1983; Rajaoeftra et al., 1989, 1992; Giménez y Ribotta et al., 1998; Pappas et al., 2008; Pearlstein, 2013). Interestingly, we report an increased content of DA in the whole lumbar spinal cord of P10 SOD1 mice compared to WT animals. As this discrepancy was not observed in ventral spinal cord samples, our results provide insights into changes in the DA contents in the dorsal part of the SOD1 lumbar cord. This area is densely innervated and controlled by dopaminergic pathways (for review see Millan, 2002). Significant damages in the sensory system have been described in the presymptomatic stages in SOD1 models (Guo et al., 2009; Filali et al., 2011). Altered sensorimotor development characterized by a delay in maturation processes has also been reported in newborn SOD1 mice (Amendola et al., 2004). The increased

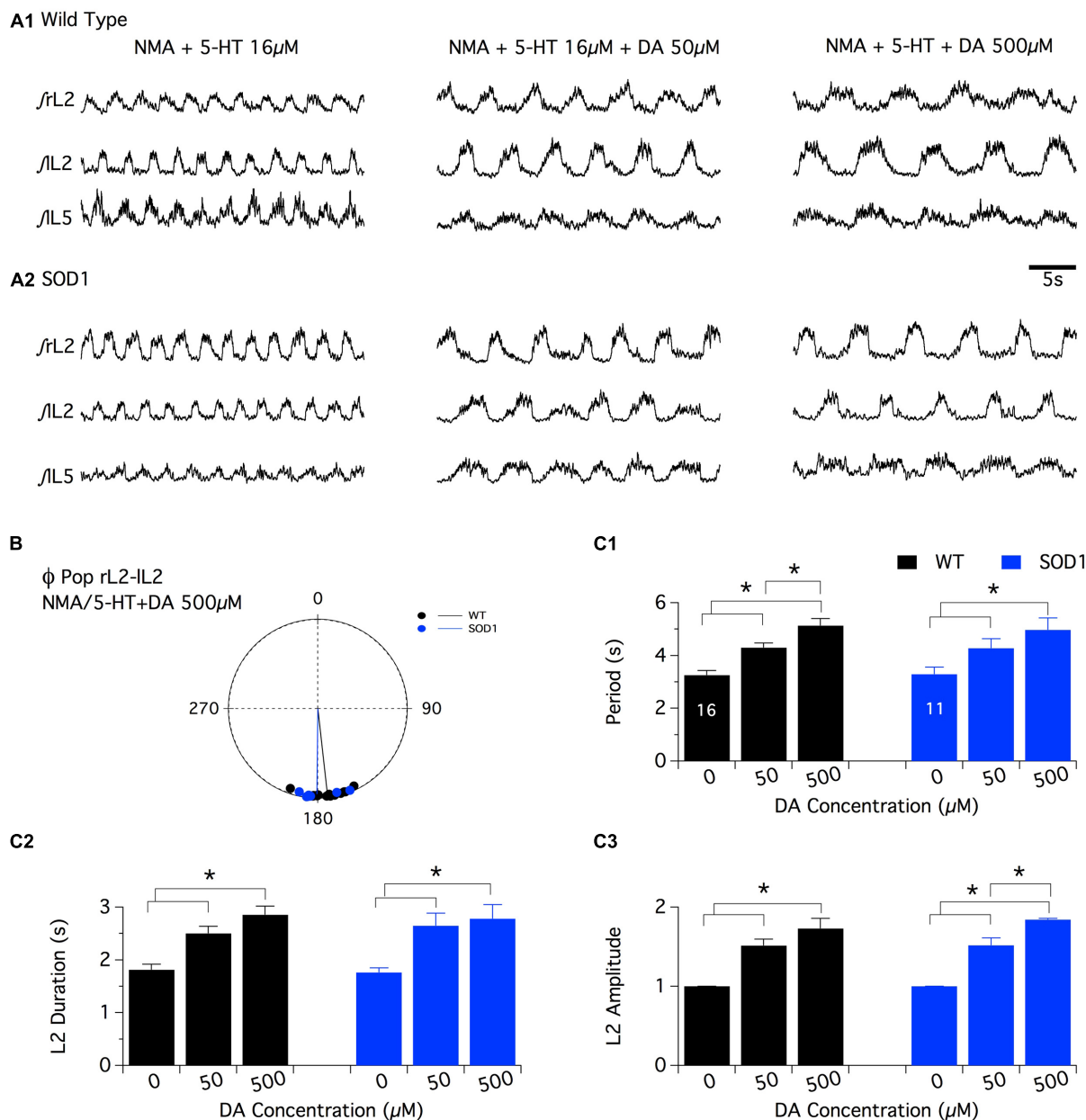


FIGURE 4 | Effects of dopamine on NMA+5-HT-induced fictive locomotion in SOD1 and age-matched control mice. (A) Representative integrated (f) traces of NMA + 5-HT (16 μ M each)-induced fictive locomotion recorded extracellularly from the right, left L2 and left L5 ventral roots (rL2, IL2, and IL5) in the absence or presence of dopamine (DA, 50 or 500 μ M). Upper panels present traces obtained in WT animals (**A1**) and lower panels in SOD1 mice (**A2**). **(B)** Polar graph of the rL2-IL2 phase (Φ) relationships computed in WT (black dots and line, $n = 16$) and SOD1 (blue

dots and line, $n = 11$) spinal cords in the presence of 500 μ M DA. **(C)** Plots of the period (**C1**), L2 burst duration (**C2**) and amplitude (**C3**) in the absence (NMA + 5-HT alone) or presence of increasing concentrations of DA in WT (black bars) and SOD1 (blue bars) mice. These data show that the SOD1 genotype has no effect on the DA neuromodulation when investigated at the extracellular level. Asterisks indicate positive significance levels and the numbers in histogram bars refer to the number of spinal cord preparations tested.

DA content in the SOD1 dorsal spinal cord found in this study may contribute to these early alterations. It has been shown that both a reduction or an amplification of the monoaminergic spinal content leads to a delay in spinal circuit maturation (Nakajima et al., 1998; Cazalets et al., 2000; Vinay et al., 2002), suggesting that a precise intraspinal level of these compounds is required

for normal spinal cord network development. In the present study, we observed that regardless of the mouse genotype, the three monoamines tested potentiate locomotor activity by boosting the amplitude of the ventral root bursts and increasing the locomotor period. While DA contents were increased in the P10 SOD1 lumbar spinal cords, we failed to report any modification

in DA neuromodulation in SOD1 mice. This discrepancy could be explained by the fact that extracellular recordings were performed on spinal cord preparations from P1–P3 mice, ages where DA rates are similar between SOD1 and WT mice. The sustainable locomotor activities necessary for neuromodulatory studies are difficult to achieve in *in vitro* preparations from P10 mice (but see (Jiang et al., 1999)). To assess the impact of the DA content increase on both basal membrane properties and DA sensitivity of the P10 lumbar motoneurons, patch-clamp recordings in spinal cord slices will be needed to investigate the effects of DA antagonists and agonists on these neurons. Dose-response curves will also have to be performed to assess and compare DA sensitivity in WT and SOD1 motoneurons.

It is generally acknowledged that changes in the period and/or phase relationships of the locomotor rhythm reflects effects on the locomotor CPG while modifications in the burst amplitudes are associated with changes in the motoneuron or last order interneuron excitability (Miles and Sillar, 2011). In SOD1 mice, the period and phase relationships of the rhythm expressed in the presence of the three monoamines tested were similar to those found in WT animals. The modulation of burst amplitude was also comparable between SOD1 and WT mice in the presence of 5-HT and DA. In contrast, the amplitude values of the bursts recorded in the presence of NA were more amplified in SOD1 mice compared to WT littermates. These results suggest that the monoaminergic neuromodulation of the locomotor CPG is preserved and normal in newborn SOD1^{G93A} mice but that SOD1 motoneurons exhibit an increased sensitivity to NA compared to WT motoneurons. As the spinal cord size is not different between SOD1 and WT mice (personal unpublished observation), this effect could not be explained by differences in NA penetration into and the final concentrations attained within the spinal tissue (see for example Brumley et al., 2007). Lumbar motoneurons express the α_1 , α_2 , and β_1 receptors at birth (Rekling et al., 2000; Tartas et al., 2010). We have previously shown in newborn rats that the activation of these receptors increased the lumbar motoneuron excitability partly via the inhibition of the inwardly rectifying K^+ current, K_{IR} , a key determinant of neuronal excitability (Tartas et al., 2010). In addition, NA, through the activation of presynaptic α_1 and β receptors, enhanced the synaptic transmission originating from the upper lumbar segments in motoneurons (Tartas et al., 2010). Possible alterations in the expression of Kir channels and/or noradrenergic receptors could sustain part of the increased sensitivity to NA in SOD1 spinal cord by modifying both the intrinsic membrane properties of motoneurons and the excitatory synaptic inputs they receive. Up-regulation of NA receptor number, for example, could lead to NA supersensitivity in SOD1 motoneurons. This kind of phenomenon has been described for DA receptors in diverse pathological conditions (see for examples: Briand et al., 2008; Seeman, 2013).

Due to their lack of Ca^{2+} buffering proteins, motoneurons are more prone to excitotoxicity than other neurons. An excess of excitatory inputs has been hypothesized to play a major role in the neuronal degeneration observed in ALS (Turner et al., 2013). The NA hypersensitivity we reported in the present study could trigger aberrant depolarizations and subsequent Ca^{2+} entries in the lumbar motoneurons leading to progressive damage to the

intracellular machinery. It is thus of interest to further decipher the cellular basis of the NA neuromodulation in newborn SOD1 motoneurons and to investigate the NA antagonist effects on the SOD1 mouse life span.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the “Association Française contre les Myopathies” (AFM). Léa Milan was supported by a Ph-D fellowship from AFM. This project was also supported by the grant LABEX BRAIN ANR-10-LABX-43. Many thanks to A. Fayoux for providing animal care.

REFERENCES

- Amendola, J., Verrier, B., Roubertoux, P., and Durand, J. (2004). Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2822–2826. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03745.x
- Barbeau, H., and Rossignol, S. (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res.* 412, 84–95. doi: 10.1016/0006-8993(87)91442-9
- Barbeau, H., and 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. doi: 10.1016/0006-8993(91)91489-N
- Barrière, 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
- Barrière, G., Tartas, M., Cazalets, J.-R., and Bertrand, S. S. (2008). Interplay between neuromodulator-induced switching of short-term plasticity at sensorimotor synapses in the neonatal rat spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 1903–1920. doi: 10.1113/jphysiol.2008.150706
- Bories, C., Amendola, J., Lamotte d'Incamps, B., and Durand, J. (2007). Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 451–459. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05306.x
- Bregman, B. S. (1987). Development of serotonin immunoreactivity in the rat spinal cord and its plasticity after neonatal spinal cord lesions. *Brain Res.* 431, 245–263. doi: 10.1016/0165-3806(87)90213-6
- Briand, L. A., Flagel, S. B., Seeman, P., and Robinson, T. E. (2008). Cocaine self-administration produces a persistent increase in dopamine D2High receptors. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 18, 551–556. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.01.002
- Brumley, M. R., Hentall, I. D., Pinzon, A., Kadam, B. H., Blythe, A., Sanchez, E. J., et al. (2007). Serotonin concentrations in the lumbosacral spinal cord of the adult rat following microinjection or dorsal surface application. *J. Neurophysiol.* 98, 1440–1450. doi: 10.1152/jn.00309.2007
- Cazalets, J.-R., Gardette, M., and Hilaire, G. (2000). Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *J. Neurophysiol.* 83, 2468–2470.
- 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. (Lond.)* 455, 187–204.
- Chang, Q., and Martin, L. J. (2011). Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 31, 2815–2827. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2475-10.2011
- Clarac, F., Brocard, F., and Vinay, L. (2004). The maturation of locomotor networks. *Prog. Brain Res.* 143, 57–66. doi: 10.1016/S0079-6123(03)43006-9
- Commissiong, J. W. (1983). Development of catecholaminergic nerves in the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 264, 197–208. doi: 10.1016/0006-8993(83)90817-X
- Crick, H., and Wallis, D. I. (1991). Inhibition of reflex responses of neonate rat lumbar spinal cord by 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1769–1775. doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb09861.x
- Delestrée, N., Manuel, M., Iglesias, C., Elbasiouny, S. M., Heckman, C. J., and Zytnicki, D. (2014). Adult spinal motoneurons are not hyperexcitable in a mouse model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 1687–1703. doi: 10.1113/jphysiol.2013.265843
- Filali, M., Lalonde, R., and Rivest, S. (2011). Behavioural brain research. *Behav. Brain Res.* 225, 215–221. doi: 10.1016/j.bbr.2011.07.034

- Filipchuk, A. A., and Durand, J. (2012). Postnatal dendritic development in lumbar motoneurons in mutant superoxide dismutase 1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 209, 144–154. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.046
- Giménez y Ribotta, M., Sandillon, F., and Privat, A. (1998). Influence of hypergravity on the development of monoaminergic systems in the rat spinal cord. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 111, 147–157. doi: 10.1016/S0165-3806(98)00132-1
- Grinsted, A., Moore, J. C., and Jevrejeva, S. (2004). 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
- Guo, Y.-S., Wu, D.-X., Wu, H.-R., Wu, S.-Y., Yang, C., Li, B., et al. (2009). Sensory involvement in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Mol. Med.* 41, 140–150. doi: 10.3858/emmm.2009.41.3.017
- 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
- Han, P., and Whelan, P. J. (2009). Modulation of AMPA currents by D 1-like but not D 2-like receptors in spinal motoneurons. *Neuroscience* 158, 1699–1707. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.11.040
- Humphreys, J. M., and Whelan, P. J. (2012). Dopamine exerts activation-dependent modulation of spinal locomotor circuits in the neonatal mouse. *J. Neurophysiol.* 108, 3370–3381. doi: 10.1152/jn.00482.2012
- 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
- Jonsson, P. A., Graffmo, K. S., Andersen, P. M., Brännström, T., Lindberg, M., Oliveberg, M., et al. (2006). Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models. *Brain* 129, 451–464. doi: 10.1093/brain/awh704
- Kiehn, O. O., and Kjaerulff, O. O. (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *J. Neurophysiol.* 75, 1472–1482.
- Kuo, J. J. (2003). Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.* 91, 571–575. doi: 10.1152/jn.00665.2003
- Kuo, J. J., Siddique, T., Fu, R., and Heckman, C. J. (2005). Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol. (Lond.)* 563, 843–854. doi: 10.1113/jphysiol.2004.074138
- Martin, E., Cazenave, W., Cattaert, D., and Branchereau, P. (2013). Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 54, 116–126. doi: 10.1016/j.nbd.2013.02.011
- Meehan, C. F., Moldovan, M., Marklund, S. L., Graffmo, K. S., Nielsen, J. B., and Hultborn, H. (2010). Intrinsic properties of lumbar motor neurones in the adult G127insTGGG superoxide dismutase-1 mutant mouse in vivo: evidence for increased persistent inward currents. *Acta Physiol. (Oxf.)* 200, 361–376. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02188.x
- Miles, G. B., and Sillar, K. T. (2011). Neuromodulation of vertebrate locomotor control networks. *Physiology* 26, 393–411. doi: 10.1152/physiol.00013.2011
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00009-6
- 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
- Nakajima, K., Matsuyama, K., and Mori, S. (1998). Prenatal administration of para-chlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. *Neurosci. Res.* 31, 155–169. doi: 10.1016/S0168-0102(98)00034-0
- Pambo-Pambo, A., Durand, J., and Gueritaud, J. P. (2009). Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G93A-low Mice. *J. Neurophysiol.* 102, 3627–3642. doi: 10.1152/jn.00482.2009
- Pappas, S. S., Behrouz, B., Janis, K. L., Goudreau, J. L., and Lookingland, K. J. (2008). Lack of D2 receptor mediated regulation of dopamine synthesis in A11 diencephalic neurons in male and female mice. *Brain Res.* 1214, 1–10. doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.010
- Pearlstein, E. (2013). Role of descending aminergic pathways in the development of locomotion. *Curr. Pharm. Des.* 19, 4332–4340. doi: 10.2174/1381612811319240002
- Pieri, M., Albo, F., Gaetti, C., Spalloni, A., Bengtson, C. P., Longone, P., et al. (2003). Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 351, 153–156. doi: 10.1016/j.neulet.2003.07.010
- Rajaofetra, N., Poulat, P., Marlier, L., Geffard, M., and Privat, A. (1992). Pre- and postnatal development of noradrenergic projections to the rat spinal cord: an immunocytochemical study. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 67, 237–246. doi: 10.1016/0165-3806(92)90224-K
- Rajaofetra, N., Sandillon, F., Geffard, M., and Privat, A. (1989). Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 22, 305–321. doi: 10.1002/jnr.490220311
- Rekling, J. C., Funk, G. D., Bayliss, D. A., Dong, X. W., and Feldman, J. L. (2000). Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol. Rev.* 80, 767–852.
- Rossignol, S., Barrière, G., Frigon, A., Barthélemy, D., Bouyer, L., Provencher, J., et al. (2008). Plasticity of locomotor sensorimotor interactions after peripheral and/or spinal lesions. *Brain Res. Rev.* 57, 228–240. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.019
- Seeman, P. (2013). Are dopamine D2 receptors out of control in psychosis? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 46, 146–152. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.07.006
- Spalloni, A., Origlia, N., Sgobio, C., Tralbalza, A., Nutini, M., Berretta, N., et al. (2011). Postsynaptic alteration of nr2a subunit and defective autophosphorylation of alphaCaMKII at threonine-286 contribute to abnormal plasticity and morphology of upper motor neurons in presymptomatic SOD1G93A mice, a murine model for amyotrophic lateral sclerosis. *Cereb. Cortex* 21, 796–805. doi: 10.1093/cercor/bhq152
- 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.
- Tartas, M., Morin, F., Barrière, G., Goillandeau, M., Lacaille, J.-C., Cazalets, J.-R., et al. (2010). Noradrenergic modulation of intrinsic and synaptic properties of lumbar motoneurons in the neonatal rat spinal cord. *Front. Neural Circuits* 4:4. doi: 10.3389/neuro.04.004.2010
- Torrence, C., and Compo, G. P. (1998). 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
- Turner, B. J., and Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.* 85, 94–134. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.01.001
- Turner, M. R., Hardiman, O., Benatar, M., Brooks, B. R., Chio, A., de Carvalho, M., et al. (2013). Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 12, 310–322. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70036-X
- Van Den Bosch, L. (2011). Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:348765. doi: 10.1155/2011/348765
- Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J. C., Pearlstein, E., and Pflieger, J. F. (2002). Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 40, 118–129. doi: 10.1016/S0165-0173(02)00195-9
- 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.

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: 10 April 2014; accepted: 18 June 2014; published online: 04 July 2014.

Citation: Milan L, Barrière G, De Deurwaerdère P, Cazalets J-R and Bertrand SS (2014) Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1^{G93A} newborn mice. *Front. Neural Circuits* 8:77. doi: 10.3389/fncir.2014.00077

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

Copyright © 2014 Milan, Barrière, De Deurwaerdère, Cazalets and Bertrand. 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.

Age-related changes in pre- and post-synaptic partners of the cholinergic C-Boutons in wild-type and SOD1^{G93A} lumbar motoneurons.

Léa Milan, Gilles Courtand, Laura Cardoit, Frédérique Masmejean, Grégory Barrière, Jean-René Cazalets, Maurice Garret and Sandrine S. Bertrand.

INCIA, Université de Bordeaux, CNRS UMR5287, Bordeaux, France

Abbreviated title: C-boutons in WT and SOD1 lumbar motoneurons

Corresponding author:

Sandrine S. Bertrand, PhD
INCIA CNRS UMR5287
Université de Bordeaux, Bat 2
146 rue Léo Saignat,
33076 Bordeaux, cedex, France
sandrine.bertrand@u-bordeaux.fr

Number of pages: 29

Number of Figures: 8

Number of Tables: 2

Number of words:

-Abstract: 234

-Introduction: 499

-Discussion: 1364

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM). Léa Milan was supported by a PhD-fellowship from AFM. This project was also supported by the grant LABEX BRAIN ANR-10-LABX-43. The authors thank Delphine Gonzales and the genotyping facility from Magendie Neurocenter in Bordeaux for mouse genotyping. This work has benefited from the facilities and expertise of the Bordeaux Imaging Center (BIC: www.bic.u-bordeaux2.fr) and the imagery platform Imag'In (www.incia.u-bordeaux1.fr), which is supported by the CNRS and Région Aquitaine. The activated caspase 3 antibody was a gift from Dr. Jérôme Badaut (INCIA, Bordeaux).

ABSTRACT

Large cholinergic synaptic terminals known as C-boutons densely innervate the soma and proximal dendrites of motoneurons that are prone to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Studies using the Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mouse model of ALS have generated conflicting data regarding C-bouton alterations exhibited during ALS pathogenesis. In the present work, a longitudinal study combining immunohistochemistry, biochemical approaches and extra- and intra-cellular electrophysiological recordings revealed that the whole spinal cholinergic system is modified in the SOD1 mouse model of ALS compared to wild type (WT) mice as early as the second postnatal week. In WT motoneurons, both C-bouton terminals and associated M2 postsynaptic receptors presented a complex age-related dynamic that appeared completely disrupted in SOD1 motoneurons. Indeed, parallel to C-bouton morphological alterations, analysis of confocal images revealed a clustering process of M2 receptors during WT motoneuron development and maturation that was absent in SOD1 motoneurons. Our data demonstrated for the first time that the lamina X cholinergic interneurons, the neuronal source of C-boutons, are over-abundant in high lumbar segments in SOD1 mice and are subject to neurodegeneration in the presymptomatic ALS stages in the SOD1 animal model. Finally, we showed that early C-bouton system alterations have no physiological impact on the cholinergic neuromodulation of newborn motoneurons. Altogether, these data suggest a complete reconfiguration of the spinal cholinergic system in SOD1 spinal networks that could be part of the compensatory mechanisms established during spinal development.

INTRODUCTION.

Synapses converging onto the soma and the highly branched dendritic tree of motoneurons (Mns) have been divided into five different types: S, T, M, F and C (McLaughlin, 1972; Starr and Wolpaw, 1994). C-terminals or C-boutons are characterized by spherical synaptic vesicles and the presence of postsynaptic subsynaptic cisterns (Conradi and Skoglund, 1969). These synapses are cholinergic (Nagy et al., 1993; Hellström et al., 2003) and originate from interneurons located around the central canal that express the transcription factor Dbx-1, a maker of the V0 interneuron cohort (Zagoraïou et al., 2009).

Given the importance of cholinergic neuromodulation in spinal locomotor networks, numerous studies have investigated C-bouton morphology in physiological and pathological conditions (Deardorff et al., 2014; Witts et al., 2014). These synapses are extremely plastic and exhibit morphological changes after operant conditioning (Feng-Chen and Wolpaw, 1996) or spinal hemisection (Pullen and Sears, 1983). Recently, the postsynaptic membrane (PSM) adjacent to C-boutons on Mns has been described as a highly organized structure with interdigitating clusters of type-2 muscarinic receptors (M2), small conductance calcium-activated potassium channels (SK2/3) and Kv2.1 channels (Deardorff et al., 2014).

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder that affects spinal motoneurons (Mns) and cortical motor neurons. In ALS patients and rodent models of the disease, it has been shown that Mns innervating fast-twitch muscles (fast Mns) are much more vulnerable to neurodegenerative processes than those connecting slow-twitch muscle fibers (slow Mns) (Frey et al., 2000; Hegedus et al., 2008). Interestingly, C-boutons are noticeably more prevalent on fast Mns compared to slow Mns, and groups of Mns that are preserved in ALS, such as the ocular motor nuclei, do not present C-boutons (Hellström et al., 2003). C-terminals thus appear to be a hallmark of Mns prone to cell death in ALS. In the Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mouse model of ALS, the timeline of morphological changes

of C-boutons during ALS pathogenesis has been investigated (Pullen and Athanasiou, 2009; Herron and Miles, 2012; Casas et al., 2013; Saxena et al., 2013). Although these studies all demonstrate early alterations of C-boutons in presymptomatic stages of the disease, they report conflicting data. These studies also raise the unexplored question of whether C-bouton alterations originate solely from their postsynaptic targets, the Mns, or whether impairments of the lamina X cholinergic interneurons, are also involved.

In the present work, by combining immunohistochemistry, extra- and intracellular electrophysiology and biochemistry, we revealed major reorganizations of the spinal cholinergic system in SOD1 mice compared to wild-type (WT) animals as early as the second postnatal week. Our data identified that (1) C-bouton evolution exhibits different temporal profiles in WT and SOD1 Mns, (2) M2 receptors present a complex dynamic in C-bouton PSM in WT Mns that is completely disrupted in SOD1 Mns, (3) lamina X cholinergic interneurons are more abundant in high lumbar segments in SOD1 mice compared to WT, (4) these neurons are subjected to neurodegeneration in the SOD1 ALS model and (5) early C-bouton alterations have no physiological impact on cholinergic neuromodulation of newborn Mns.

MATERIAL AND METHODS

Animals. All procedures were conducted in accordance with the local ethics committee of the University of Bordeaux and the European Committee Council Directive. High-expressor hemizygous G93A SOD1 male mice (strain B6SLJ-Tg-(SOD1^{G93A})1Gur/J from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were bred with non-transgenic B6SJLF1/J females (Janvier Laboratory, France). Male offspring expressing the mutant SOD1-G93A gene (hereafter referred to as SOD1 mice) and age-matched WT littermates were used. Mice were genotyped from genomic DNA purified from tail biopsies by PCR using the following

primers: 5' CATCAGCCCTAATCCATCTGA 3' (forward), 5' CGCGACTAACAATCAAAGTGA 3' (reverse). All of the experiments and analyses presented here were performed blind to the genotype of the animals.

Immunohistochemistry. For double immunofluorescence labeling, WT and SOD1 mice aged 1 postnatal day (P1), P10, P21, P40, P75 and P100 were anesthetized with an intraperitoneal injection of 20% urethane. After the loss of nociceptive reflexes, mice were perfused with cold phosphate-buffered saline (PBS), followed by cold 4% paraformaldehyde (PAF) in PBS. Spinal cords were dissected free, post-fixed in 4% PAF for 2 hours, and then cryoprotected overnight in 20% PBS-sucrose. Lumbar spinal cords were cryosectioned in transverse slices (30 μ m thick) and mounted on slides. Sections were incubated overnight in the primary antibody mixture containing 0.3% triton and 1% bovine serum albumin (BSA). After washing in PBS, sections were incubated for 1 h with secondary antibodies in 0.3% triton and 1% BSA. For activating caspase 3 labeling, a citrate buffer antigen-retrieval protocol was performed to break protein cross-links. For this purpose, slides were placed at 80°C for 40 min in 0.1 M citrate buffer prior to the primary antibody incubation. The following primary antibodies were used: goat anti-CholineAcetylTransferase (ChAT; 1:100, Millipore AB144P); rat anti-M2 receptor (1:400, Millipore MAB367) and rabbit anti-activated caspase 3 (1:50, Millipore AB3623). All of the secondary antibodies, Alexa fluor 568 donkey anti-goat, Alexa fluor 488 donkey anti-rat and Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen), were used at 1:500 dilution.

For the cholinergic interneuron counting experiments, a biotinylated anti-goat (RPN1025V, Amersham) secondary antibody was used, and ChAT-positive neurons were visualized with successive incubations with streptavidin (Vectastain ABC kit, Biovalley), 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide solutions.

Acquisition and Image analysis. Images were acquired on a Leica SP5 confocal microscope

using a 63x oil immersion lens and analyzed with FIJI (ImageJ) plugins developed at the laboratory. For each animal, three different slides of lumbar spinal cord sections were randomly selected and processed for immunohistochemistry. Images of three randomly sampled lumbar spinal cord sections were then acquired for each slide. Table 1 summarizes the number of animals used and motoneurons analyzed in each age group and animal genotype. Care was taken not to image motoneurons with vacuolar structures. Images of Mn soma composed of 15 slices in a stack (0.25 μm step) were acquired. Mns were manually selected and outlined on the maximum image intensity obtained by maximum pixels intensity projection along the z-axis of the ChAT channel (Fig. 2A). From this selection, values of area, perimeter and geometric center (centroid) of Mns were calculated. C-boutons were automatically detected according to defined morphologic criteria and pixel intensity in a region of interest (ROI) defined by the expansion (2 μm) of the Mn contour defined above.

To analyze M2 receptor expression in the PSM adjacent to C-boutons, a sum projection along the z-axis was performed on both the ChAT and M2 channels. Constant-width bands (2.83 μm) of both channels centered on the Mn contour were extracted from this projection. Variations in the intensity of these two bands were measured along their length with the FIJI plot profile tool (see Fig. 4A). ROIs containing C-boutons in the ChAT channel were automatically detected and applied to the M2 channel after an expansion of 1 μm . M2 labeling area and intensity under C-boutons were then computed. The M2 intensity under C-bouton was normalized by the mean M2 intensity computed in the Mn membrane devoid of C-boutons.

Slide scanning and interneuron counting. ChAT/DAB immunostained slices from P10, P40 and P100 WT and SOD1 mice were scanned with a Nanozoomer (Nanozoomer 2.0 HT Hamamatsu C9600-12) available on the BIC platform. Lamina X cholinergic interneurons located in an area 80 μm around the central canal were manually counted in individual slices

with the NDP viewer software (Hamamatsu). To count neurons in a similar spinal region in each age-matched animal group, the intermediolateral neurons (IML) were used as anatomical landmarks. IML are cholinergic neurons, thereby appearing in ChAT/DAB labeling, which express a well-defined anatomical distribution throughout spinal segments. Indeed, IML extend from the first thoracic segment (T1) through to the second lumbar segment (L2). The measured lumbar segment lengths were 450, 950 and 1000 μm in P10, P40 and P100 mice, respectively. The individual slice thickness was 30 μm , and cholinergic lamina X interneurons were counted in 15 slices at P10 and 33 slices at P40-P100 more rostral from the last slice containing IML and in 50 slices at P10 and 100 slices at P40-P100 more caudal from the last slice containing IML. With this method, cholinergic lamina X neurons could be accurately counted from the L2 to the L5 cord segments.

Western blot analysis. M2 muscarinic receptor protein expression was assessed in spinal cord tissue from P1, P10, P21, P40, P75 and P100 SOD1 mice and WT littermates using a previously described protocol (Chaumont et al., 2013). Briefly, proteins extracted from tissue samples were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes. The primary antibody binding (rat anti-M2 receptor, 1:300, Millipore MAB367) was probed with an anti-rat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000, Jackson) and visualized with an enhanced chemiluminescence kit (Lumiglo/Eurobio). An antibody against β -actin (1:2000, Synaptic System) was used to control for equal protein loading. Bands were quantified using ImageJ, and the results obtained for each sample were normalized to the amount of β -actin measured.

Extracellular recordings in *in vitro* spinal cord preparations from newborn mice. WT and SOD1 mice aged P1-P3 were anesthetized using isoflurane until reflexes were lost and were decapitated. The spinal cord was then dissected free and placed ventral side up in a recording chamber. All dissections and recording procedures were performed under

continuous perfusion with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing the following (in mM): NaCl 130, KCl 3, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.3, NaH₂PO₄ 0.58, NaHCO₃ 25 and glucose 10, with a pH of 7.4 when bubbled with 95% O₂ + 5% CO₂ at room temperature (24-26°C). Motor outputs were recorded extracellularly from the lumbar ventral roots using glass suction electrodes. In each *in vitro* spinal cord preparation, motor outputs from the right and left lumbar 2 (rL2, IL2, respectively) and one L5 ventral root were simultaneously recorded to investigate both the bilateral segmental alternation and the flexor/extensor activity (Cazalets et al., 1992; Kiehn and Kjaerulff, 1996). Neurograms were amplified, displayed and stored using a classical electrophysiological device. Motor burst parameters were computed using custom-made Matlab-based software. For each preparation, the burst amplitude values were normalized to the amplitude measured in the presence of an agonist of the N- methyl-D-L- aspartate (NMDA) receptors, NMA and serotonin (5-HT) (16 µM each) prior to the addition of oxotremorine to the bath.

Whole-cell recordings in spinal cord slices. In deeply anesthetized P7-P11 WT and SOD1 mice, a laminectomy was performed to remove the spinal cord in an ice-cold sucrose-based saline solution containing the following: 2 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 1.15 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 11 mM glucose, and 205 mM sucrose. The saline was bubbled with 95% O₂, 5% CO₂. Transverse slices (350 µm) of the spinal lumbar enlargement were cut with a vibroslicer and then transferred in a holding chamber. Slices were allowed to recover in oxygenated aCSF (130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄, 0.58 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate and 5 µM (reduced) L- glutathione) for at least 1 hour at 30°C. The slices were transferred to a second holding chamber containing the same aCSF at 30°C but without sodium pyruvate and (reduced) L- glutathione before recordings. Whole-cell current-clamp recordings from Mns, identified by their relatively large size in lamina IX, were made under visual control with a Multiclamp

700B amplifier. Recording glass microelectrodes (4-7 M Ω) were filled with the following: 120 mM K-gluconate, 20 mM KCl, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM GTP, 0.2 mM cAMP, 0.1 mM leupeptin, 77 mM d-mannitol, and 3 mM Na₂-ATP, with a pH of 7.3. A bipolar tungsten electrode was used to stimulate axons crossing through the ventral commissure. The polysynaptic transmission was decreased using a high cation-containing aCSF with 7.5 mM CaCl₂ and 8 mM MgSO₄ in order to record monosynaptic excitatory postsynaptic potentials (EPSPs). Strychnine (1 μ M), Gabazine (1 μ M) and DNQX (5 μ M) were added throughout the experiments to block glycinergic, GABA_A and AMPA/kainate receptor activation, respectively. Oxotremorine (500 μ M) was bath applied on the slices. All of the experiments were performed at room temperature (25°C).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed on raw data. C-bouton morphological parameters were analyzed using SPSS statistics (IBM). The other statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism software (GraphPad Prism). Comparisons between two conditions were tested using t-tests. Two-way analyses of variance (ANOVAs) with Sidak's multiple comparison tests were performed to evaluate drug/age and mouse genotype effects. Small samples (electrophysiological experiments) with n<10 were analyzed using non-parametric tests. All data are expressed as the means \pm SEM. Asterisks in the figures and tables indicate positive significances (p<0.05).

RESULTS

Age-related morphological changes in C-boutons are different between WT and SOD1 mice.

In the first part of this study, we examined the evolution of C-bouton terminals juxtaposed to Mns throughout the life span of WT and SOD1 mice. For this purpose, ChAT-

immunolabeling was performed in the lumbar spinal cords from male SOD1 mice and WT littermates at key developmental stages and over the course of the disease, in P1, P10, P21, P40, P75 and P100 animals (Fig. 1A-D; red channel; data not shown for P40 and P75 mice). Regardless of the mouse genotype, we found that, as previously reported (Wilson et al., 2004), C-boutons are absent or too small to be detected in P1 animals (Fig. 1A) but are easily distinguishable as large ChAT-immunopositive structures surrounding Mn somata and proximal dendrites in P10 mice (arrowheads in Fig. 1B). The mean C-bouton number and the mean C-bouton area and position on Mn soma and proximal dendrites were then computed in P10, P21, P40, P75 and P100 WT (Fig. 2, black bars) and SOD1 (Fig. 2, white bars) mice. As C-bouton number can vary with Mn size, we measured Mn soma perimeter (Fig. 2B) and expressed the results as the density of C-boutons on Mns (C-bouton number/Mn perimeter, Fig. 2C). This analysis showed, first, that in juvenile stages (P1-P10), the perimeter of lumbar SOD1 Mns were significantly smaller than age-matched WT Mns (Fig. 2B). We also observed that in WT animals, the density of C-boutons juxtaposed to Mns increased from P10 to P21, stabilized until P75, and then increased again in P100 mice (Fig. 2C), while the mean C-bouton area exhibited a progressive increase with age (Fig. 2D). This temporal profile was different in SOD1 mice where C-bouton density strongly increased from P10 to P40 as in WT but decreased at P75 (Fig. 2C). In parallel, the mean C-bouton area progressively augmented with age until P75 and decreased at P100 (Fig. 2D). Interestingly, pair-wise comparison of data obtained in each age group between WT and SOD1 mice revealed that the density of C-terminals was significantly higher at P21 and P40 in SOD1 mice and significantly lower at P100 compared to WT mice (Fig. 2C). In addition, the mean C-bouton area was found to be significantly lower in P10 and P100 and significantly higher in P21 SOD1 mice compared to WT animals (Fig. 2D). In a next step, we investigated the C-bouton distribution in Mn soma and proximal dendrites by computing the distance between C-bouton centroids and Mn

centroid. We observed that this parameter did not evolve with age in either WT or SOD1 mice (Fig. 2E). C-boutons were located within a radius of 20-23 μm around the Mn centroid as early as P10. Because Mns were smaller in size in P10 SOD1 mice compared to WT, the C-boutons appeared more clustered in these neurons (Fig. 2E). In contrast, although P21 and P100 Mns exhibited similar perimeter values in both genotypes, C-boutons appeared significantly closer to the Mn centroid in SOD1 P21 and P100 animals compared to WT mice.

Altogether, these data show early alterations in the developing pattern of C-boutons juxtaposed to lumbar Mns and a loss of the most distal of these cholinergic synapses in presymptomatic stages (P100) in the SOD1 mice.

Longitudinal analysis of M2 receptor expression in WT and SOD1 Mns.

Anatomical studies have shown accumulations of M2 receptors in the PSM of C-boutons (Hellström et al., 2003; Muennich, 2003; Zagoraiou et al., 2009; Herron and Miles, 2012) and electrophysiological experiments have further demonstrated the role of these muscarinic receptors in Mn cholinergic modulation (Miles et al., 2007; Bertrand and Cazalets, 2011). As C-boutons exhibit morphological alterations in SOD1 lumbar Mns compared to WT, we addressed the question of whether the postsynaptic partners of these synapses were also modified. For this purpose, a western blot analysis was first performed to compare M2 receptor expression in the ventral spinal cord of WT and SOD1 mice from birth to presymptomatic stages (P100). Figure 3 shows that the M2 protein level was similar in the ventral spinal cord of WT and SOD1 mice from P1 to P21 (Fig. 3A and 3B). In P40 animals, the M2 protein content in SOD1 cords tended to decrease compared to WT and became significantly smaller at P75 and P100 (Fig. 3A and 3B). These results suggest that the loss of C-boutons we observed on lumbar Mns in P75 and P100 mice parallels a decrease in M2 protein level in the ventral spinal cord at the same stages.

To go one step further, analysis of M2 receptor accumulation under C-boutons during normal development and ALS pathogenesis was performed using ChAT and M2 receptor double immunofluorescence staining (Fig. 1 and 4, Table 1). For this purpose, Mn contour cutting including both presynaptic C-boutons in ChAT labeling (red channel in Fig. 1 and 4A) and postsynaptic M2 receptors (green channel in Fig. 1 and 4A) were realized (for details see Material and Methods). Figure 4 shows the plots of ChAT and M2 labeling intensities of pixels along the Mn contour extracted from a P10 SOD1 Mn (Fig. 4A1) and a P100 WT Mn (Fig. 4A2) with red peaks highlighting the presence of C-boutons. To characterize M2 receptor expression in C-bouton PSM, two different parameters were computed: 1) the portion of the PSM containing M2 receptors in front of C-boutons expressed as the ratio of the area of M2 receptor labeling to that of C-bouton labeling (Fig. 4B) and 2) the M2 receptor labeling intensity under C-boutons normalized by the mean M2 labeling computed in Mn membranes devoid of C-boutons (Fig. 4C). The histogram in Figure 4B shows that in WT Mns, the PSM occupied by M2 receptors under C-boutons progressively decreased from P10 to P75 and then re-increased in P100 Mns. This evolution was mirrored in the intensity values of the M2 receptor staining (Fig. 4C). Indeed, M2 intensity progressively increased from P10 to P75 and then decreased in P100 Mns. As previously mentioned, we found that the mean C-bouton area exhibits a progressive increase from P10 to P75 in WT Mns (Fig. 2D). Our data, therefore, interestingly suggest that in this age range, while M2 receptor expression is enhanced under enlarging C-boutons, these receptors do not spread into the PSM but are sequestered/clustered in specific areas. At P100, in contrast, a “regeneration” of C-boutons juxtaposed to lumbar Mns appeared to occur in WT Mns with an increased number of C-boutons (Fig. 2C) and the dispersion of M2 receptors under these synaptic contacts.

Strikingly, this dynamic process is absent in SOD1 Mns. The histograms in Figures 4B show that the ratio between the M2 area and the C-bouton area remained constant from P10 to

P75 and decreased at P100 while the M2 intensity progressively increased throughout the time window tested (Fig. 4C).

Altogether, these data identify a complex dynamic of M2 receptors in the PSM of C-boutons during development and maturation of Mns that is impaired in SOD1 animals.

Lamina X cholinergic neurons in WT and SOD1 spinal networks.

A growing body of evidence suggests that ALS is not just a motoneuron disease, but that other cellular subtypes are also prone to neurodegeneration in spinal networks during disease progression. C-boutons have been shown to originate from a subclass of V0 interneurons located in lamina X around the central canal (Zagoraiou et al., 2009). In this context, we asked whether the alterations we reported on the pre- and postsynaptic subcellular partners of C-boutons adjacent to SOD1 lumbar Mns could be linked to changes in lamina X cholinergic interneurons (lamina X ChIns).

To address this question, in a first series of experiments, lamina X ChIns were visualized using ChAT/DAB staining (Fig. 5A) and counted from the L2 to the L5 segments in the spinal cord of five WT and five SOD1 P10, four WT and five SOD1 P40 and five WT and four SOD1 P100 mice (for details see Materials and Methods). The data were expressed as the mean number of lamina X ChIns per spinal cord sections (30 μ m, Fig. 5B-C). When computed in the whole lumbar spinal cord, the mean number of DAB positive-neurons per section in the SOD1 spinal cord showed a tendency to be higher at P10 and was significantly increased at P40 compared to WT mice. In contrast, at P100, we observed a significant drop in the mean number of lamina X ChIns per section compared to WT. When the spatial distribution of lamina X ChIns throughout the different lumbar segments was assessed in P10 (Fig. 5C1), P40 (Fig. 5C2) and P100 (Fig. 5C3) mice, we found that, regardless of the animal genotype and age, the L2 segments contained significantly more lamina X ChIns than the

other lumbar segments (Zagoraïou et al., 2009). Interestingly, post-hoc analysis revealed that the mean number of lamina X ChIns per slice was significantly higher in L2 segments in SOD1 P10 and P40 mice compared to WT animals, whereas no significant difference was found between WT and SOD1 L2 segments at P100. This counting approach importantly revealed that SOD1 spinal networks develop with an atypical enrichment of lamina X ChIns in the L2 segments.

This enrichment was no more present in SOD1 P100 mice, suggesting a loss of lamina X ChIns at this stage. Because the death-mediating protease, caspase-3, is activated in SOD1^{G93A} motoneurons, we investigated the possible activation of this apoptosis marker in lamina X ChIns in SOD1 P100 spinal cord (Li et al., 2000). While activated caspase-3 staining was not detected in spinal cord sections of WT littermates (Fig. 6A), both immunopositive motoneurons and lamina X ChIns were found in P100 SOD1 mice. These data further validate that Mns are not the only neurons to degenerate in the SOD1 spinal motor network and indicate for the first time that lamina X ChIns are subject to neurodegeneration in presymptomatic stages in the SOD1 ALS model.

Extra- and intracellular investigations of the functional impact of early C-bouton alterations. In the last part of this study, we addressed the question of whether the alterations reported above in both C-bouton morphology and lamina X ChIns number in L2 segments in early development stages impair the spinal cholinergic neuromodulation of newborn spinal motor networks. For this purpose, we first compared the effects of the broad-spectrum muscarinic receptor agonist, oxotremorine on pharmacologically induced fictive locomotion in *in vitro* spinal cord preparations from P1-P3 WT and SOD1 newborn mice (Fig. 7). As recently shown by our group (Milan et al., 2014), pharmacological stimulation of SOD1 spinal cords with NMA and 5-HT induces WT-like coordinated locomotor activities

characterized by left-right and flexor-extensor alternations of motor bursts when recorded extracellularly from the L2 and L5 ventral roots (Fig. 7A-B). After inducing control fictive locomotion with NMA-5-HT (16 μ M each), WT and SOD1 spinal cords were challenged with increasing concentrations of oxotremorine (5, 10 and 20 μ M) in the presence of NMA-5-HT (Fig. 7A-B). Regardless of the mouse genotype, oxotremorine failed to modify the locomotor period at any concentration tested (Fig. 7C). In contrast, the amplitude values of the L2 (Fig. 7D) and L5 (data not shown) motor bursts were significantly increased in the presence of 5 or 10 μ M oxotremorine. Two way-ANOVA showed that this increase in motor burst amplitude was similar between SOD1 and WT littermates. These results indicate that when investigated at the extracellular level, muscarinic receptor activation triggered the same effects in WT and SOD1 spinal motor networks. These data however do not eliminate the possibility of specific modifications in the cholinergic neuromodulation of lumbar Mns. This extracellular analysis was therefore completed by an intracellular investigation of the effects of oxotremorine on motoneuronal membrane properties in spinal cord slices from WT and SOD1 P7-P11 mice (Fig. 8). In Mns that were synaptically isolated by adding strychnine (1 μ M), gabazine (1 μ M) and DNQX (5 μ M) to a high cation-containing aCSF, the superfusion of 10 μ M oxotremorine induced a depolarization of the membrane potential that was not significantly different between WT and SOD1 Mns (Fig. 8A1-2). As previously shown (Miles et al., 2007) and independent of animal genotype, the oxotremorine-induced depolarization was accompanied by an increase in the input membrane resistance of the Mns (Fig. 8A3) and a reduction in the spike after hyperpolarization (AHP, Fig. 8A4-5). This latter inhibitory effect was linked to M2 receptor activation as oxotremorine-induced reduction in AHP amplitude was counteracted by the superfusion of the M2 receptor antagonist, AF-DX 116 (50 μ M; Fig. 8A4). Two way-ANOVA analyses showed that the oxotremorine effects on both input membrane resistance and AHP reduction were similar between SOD1 and WT littermates.

We have previously shown in newborn rat spinal cord slices that electrical stimulations of the ventral commissure induced long-lasting muscarinic excitatory postsynaptic potentials (musc-EPSPs), partly supported by M2 receptor activation in lumbar Mns (Bertrand and Cazalets, 2011). These muscarinic responses were dependent on both the commissural stimulation frequency and the number of shocks in the stimulation trains. In WT and SOD1 P7-P11 Mns, we therefore tested the efficiency of different stimulation protocols in inducing musc-EPSPs when applied to the ventral commissure. As in rats, these stimulations triggered long-lasting depolarizations in synaptically isolated Mns (Fig. 8B1-2) that were sensitive to the bath-application of the muscarinic receptor antagonist atropine (200 μ M, Fig. 8B2) and whose amplitudes were dependent on the frequency and number of shocks in the ventral commissure stimulations (Fig. 8B3). Two way-ANOVA showed again that musc-EPSP amplitude values were similar when compared between WT and SOD1 Mns.

Altogether these data suggest that the early alterations of the C-bouton system do not impact the cholinergic neuromodulatory influences on newborn Mns in SOD1 spinal networks.

DISCUSSION

Previous studies have shown that C-boutons contacting motoneurons are subject to morphological changes in physiological and pathophysiological conditions (Pullen and Sears, 1983; Feng-Chen and Wolpaw, 1996; Pullen and Athanasiou, 2009; Herron and Miles, 2012; Casas et al., 2013; Saxena et al., 2013). The present findings confirm and extend this idea by identifying a complex age-related sequence occurring during normal differentiation and maturation of the pre- and post-synaptic partners of C-boutons, a process that appears completely impaired during ALS pathogenesis. Our data also provide, for the first time,

evidence that the C-bouton-originating neurons, the lamina X ChIns, degenerate in presymptomatic stages in the SOD1 mouse model. The present study therefore constitutes a major advance in our understanding of spinal motor network physiology and ALS pathophysiology.

The cholinergic spinal system in WT mice. Rodents are classically considered as adults at P60-75 (Andersen, 2003). Strikingly, in WT mice, we observed that C-boutons undergo long-lasting maturation processes with a progressive increase in area until P40-P75, corroborating the results obtained in rats (Wetts and Vaughn, 2001). In addition, we found that while the C-bouton area and M2 receptor labeling intensity progressively increase from P10 to P75, the postsynaptic membrane portion containing M2 receptors in front of C-boutons progressively decreases. These data therefore suggest that M2 receptors do not invade the postsynaptic territory during the expansion of the presynaptic terminal but rather are clustered in the PSM. At P100, we observed an increase in C-bouton number without changes in their area values and a diffusion of M2 receptors in the PSM of these synapses. As synaptogenesis is classically associated with postsynaptic receptor clustering (Sanes and Lichtman, 2001), our data raise the question of whether this sequence of C-bouton enlargement, M2 receptors clustering followed by a renewal of C-terminals on Mns constitutes a cycle that will be repeated all along the animal life span or whether this is an hallmark of developing C-boutons. Few data are available concerning G-protein coupled receptor organization and dynamics in postsynaptic densities. Postsynaptic cluster stability and dynamics are tightly controlled by their anchorage to the postsynaptic actin cytoskeleton (Choquet and Triller, 2013). As previously stated, the C-bouton PSM has been recently described as a mosaic domain composed of M2 receptors, Kv2.1 channels and SK2/3 channels clusters (Deardorff et al., 2013). Future studies characterizing the ultrastructure of C-boutons, their associated

scaffolding postsynaptic proteins and the role of M2 receptor clusters will be necessary to further assess the physiology of these highly flexible synaptic terminals.

The cholinergic spinal system in SOD1 mice. Table 2 summarizes the changes we observed across the different parameters analyzed in SOD1 mice compared to age-matched WT animals. We found that as early as birth, the SOD1 spinal cholinergic system markedly differs from the WT with smaller C-boutons and an increased number of lamina X ChIns in L2 segments. During development (P21-P40), SOD1 Mns exhibit a cholinergic hyperinnervation characterized by an increased density of large C-boutons. This synaptic hyperinnervation could be linked to the over-abundance of lamina X ChIns we observed in L2 segments at the same ages. It has been shown that lamina X ChINs in high lumbar segments project to more distal segments (Stepien et al., 2010) and could therefore contribute to the higher C-bouton number observed in SOD1 Mns. In latter stages (up to P75), when Mns have already begun to degenerate, we observed a general deterioration of the SOD1 spinal cholinergic system characterized by a decrease in C-bouton number and area in surviving motoneurons, a decrease of M2 receptor expression in the ventral spinal cord and the degeneration of lamina X ChIns. Interestingly, M2 receptor labeling ana

lysis revealed that the age-related sequence of C-bouton enlargement, M2 receptor clustering and C-bouton renewal described in WT Mns was absent in SOD1 Mns. The distribution of M2 receptors in the PSM juxtaposed to C-boutons then appears altered in SOD1 Mns. Comparable changes in membrane channel localization have been previously reported in Mns. Indeed, a rapid declustering of Kv2.1 has been described in these neurons following peripheral nerve injury (Romer et al., 2014). Mounting evidence indicates that dysfunctions of PSM scaffolding proteins are important features of neurodegenerative diseases (see for examples: Guilmatre et al., 2013; Proctor et al., 2011). A proteomic analysis has revealed aberrantly expressed cytoskeletal proteins in the hippocampus of SOD1 mice

(Shin et al., 2005). The role of these proteins in ALS pathogenesis in spinal motor networks is, however, largely ignored.

The assumption that cortical motor neurons and spinal motoneurons are the only cellular subtypes to degenerate in ALS has often been questioned. A loss of Renshaw cells in stages that preceded motoneuronal degeneration has been reported in SOD1 spinal networks (Chang and Martin, 2009). The present findings, in addition to corroborating a recent study that showed a decrease in ChAT expression density in lamina X ChIns in the SOD1 mouse (Casas et al., 2013), further support the fact that motoneurons are not the only neurons to degenerate in the spinal cord of SOD1 mice and that spinal interneurons are also targeted by apoptotic processes in this ALS model.

Functional impact of C-bouton alterations. Conflicting reports have been made concerning the age-related morphological changes of C-boutons juxtaposed to SOD1 Mns (Pullen and Athanasiou, 2009; Herron and Miles, 2012; Casas et al., 2013; Saxena et al., 2013). The data presented here also exhibit some discrepancies with these studies that could be linked to differences in the SOD1 model used, the method of analysis and the method of labeling C-boutons. Herron and Miles (2012), for example, used the vesicular acetylcholine transporter (VAChT) to stain C-boutons. C-boutons could, however, be ChAT-positive but negative for VAChT in P100 animals (personal unpublished observation). ChAT thus appears to be a reliable marker for cholinergic terminals because it is maintained throughout the entire disease duration. Regardless of differences, both previous and the present studies report early alterations in the C-bouton system in SOD1 spinal cord. In the present findings, however, we did not report any functional consequences of these impairments on the spinal cholinergic neuromodulation when assessed at both the extra- and intra-cellular levels in newborn mice. In a recent study, we have shown that the dopaminergic neuromodulation of spinal locomotor networks was similar in WT and SOD1 spinal cord, whereas the dopamine spinal content

differed (Milan et al., 2014). In the same way, the motor outputs triggered by NMA-5HT bath-applications to the *in vitro* spinal cord preparations from WT and SOD1^{G93A} mice were identical (Milan et al., 2014) despite previously reported morphological and physiological alterations in the Mns (Amendola et al., 2004; Filipchuk and Durand, 2012). Altogether, these data suggest the existence of compensatory mechanisms to overcome cellular dysfunctions and to maintain homeostasis in SOD1 spinal networks. In P10-P40 animals, the question then arises as to whether the over-abundance of lamina X ChIns in L2 segments we observed and the increased number of C-boutons on SOD1 Mns are part of these compensatory mechanisms or whether this hypercholinergic state is detrimental for Mns and favors pathology onset. C-boutons have been shown to be involved in motor tasks requiring significant Mn discharge such as swimming (Zagoraiou et al., 2009). In this sense, cholinergic release through C-boutons inhibits AHP expression and increases Mn firing frequency (Miles et al., 2007). It has been recently demonstrated that hyperexcitation can be neuroprotective for SOD1 Mns and that the muscarinic receptor antagonist, methoctramine enhanced the accumulation of misfolded SOD1 proteins in these neurons (Saxena et al., 2013). We could therefore hypothesize that a cholinergic hyperinnervation would constitute a self-defense mechanism in SOD1 Mns. Alterations in M2 receptor clustering could however threaten this potential protective mechanism by modifying acetylcholine efficiency on its receptors. Electrophysiological recordings from mature Mns in slices are still challenging and require very special experimental conditions (Jiang et al., 1999; Carp et al., 2008; Mitra and Brownstone, 2012). *In vivo* patch-clamp recordings could be an alternative, but control over the Mn extracellular medium is limited compared to *in vitro* conditions. However, it would be of particular interest to investigate acetylcholine effects on mature WT and SOD1 Mns to further investigate the muscarinic influences received by these neurons and to determine whether this neuromodulatory system is a key contributor to ALS pathogenesis.

REFERENCES

Amendola J, Verrier B, Roubertoux P, Durand J (2004) Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:2822–2826.

Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27:3–18.

Bertrand SS, Cazalets J-R (2011) Cholinergic partition cells and lamina x neurons induce a muscarinic-dependent short-term potentiation of commissural glutamatergic inputs in lumbar motoneurons. *Front Neural Circuits* 5:15.

Carp J, Tennissen A, Mongeluzi D, Dudek C, Chen X, Wolpaw J (2008) An In Vitro Protocol for Recording From Spinal Motoneurons of Adult Rats. *J Neurophysiol* 100:474–481.

Casas C, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Mancuso R, Osta R, Navarro X (2013) Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* 3:145–158.

Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1992) Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J Physiol (Lond)* 455:187–204.

Chang Q, Martin LJ (2009) Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: a quantitative confocal analysis. *Am J Pathol* 174:574–585.

Chaumont S, Andre C, Perrais D, Boue-Grabot E, Taly A, Garret M (2013) Agonist-dependent endocytosis of γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors revealed by a $\gamma 2$ (R43Q) epilepsy mutation. *Journal of Biological Chemistry* 288:28254–28265.

Choquet D, Triller A (2013) The Dynamic Synapse. *Neuron* 80:691–703.

Conradi S, Skoglund S (1969) Observations on the ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the cat during postnatal development. *Acta Physiol Scand Suppl* 333:5–52.

Deardorff AS, Romer SH, Deng Z, Bullinger KL, Nardelli P, Cope TC, Fyffe REW (2013) Expression of postsynaptic Ca^{2+} -activated K^{+} (SK) channels at C-bouton synapses in mammalian lumbar -motoneurons. *J Physiol (Lond)* 591:875–897.

Deardorff AS, Romer SH, Sonner PM, Fyffe REW (2014) Swimming against the tide: investigations of the C-bouton synapse. *Front Neural Circuits* 8:106.

Feng-Chen KC, Wolpaw JR (1996) Operant conditioning of H-reflex changes synaptic terminals on primate motoneurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9206–9211.

Filipchuk AA, Durand J (2012) Postnatal dendritic development in lumbar motoneurons in mutant superoxide dismutase 1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 209:144–154.

Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20:2534–2542.

Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T (2013) The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. Carbonetto S, Bourgeron T, eds. *Dev Neurobiol* 74:113–122.

Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T (2008) Preferential motor unit loss in the SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol (Lond)* 586:3337–3351.

Hellström J, Oliveira ALR, Meister B, Cullheim S (2003) Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol* 460:476–486.

Herron LR, Miles GB (2012) Gender-specific perturbations in modulatory inputs to motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 226:313–323.

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.

Kiehn OO, Kjaerulff OO (1996) Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *J Neurophysiol* 75:1472–1482.

Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288:335–339.

McLaughlin BJ (1972) The fine structure of neurons and synapses in the motor nuclei of the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 144:429–460.

Milan LA, Barrière GG, De Deurwaerdère P, Cazalets J-R, Bertrand SS (2014) Monoaminergic control of spinal locomotor networks in SOD1G93A newborn mice. *Front Neural Circuits* 8.

Miles GB, Hartley R, Todd AJ, Brownstone RM (2007) Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2448–2453.

Mitra P, Brownstone RM (2012) An in vitro spinal cord slice preparation for recording from lumbar motoneurons of the adult mouse. *J Neurophysiol* 107:728–741.

Muennich EAL (2003) Focal aggregation of voltage-gated, Kv2.1 subunit-containing, potassium channels at synaptic sites in rat spinal motoneurons. *J Physiol (Lond)* 554:673–685.

Nagy JI, Yamada T, Jordan LM (1993) Evidence for the cholinergic nature of C-terminals associated with subsurface cisterns in alpha-motoneurons of rat. *Synapse* 15:17–32.

Proctor DT, Coulson EJ, Dodd PR (2011) Post-synaptic scaffolding protein interactions with glutamate receptors in synaptic dysfunction and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 93:509–521.

Pullen AH, Athanasiou D (2009) Increase in presynaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *Eur J Neurosci* 29:551–561.

Pullen AH, Sears TA (1983) Trophism between C-type axon terminals and thoracic motoneurons in the cat. *J Physiol (Lond)* 337:373–388.

Romer SH, Dominguez KM, Gelpi MW, Deardorff AS, Tracy RC, Fyffe REW (2014) Redistribution of Kv2.1 ion channels on spinal motoneurons following peripheral nerve injury. *Brain Res* 1547:1–15.

Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791–805.

Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien J-P, Gros-Louis F, Caroni P (2013) Neuroprotection through Excitability and mTOR Required in ALS Motoneurons to Delay Disease and Extend Survival. *Neuron* 80:80–96.

Shin J-H, London J, Le Pecheur M, Weitzdoerfer R, Hoeger H, Lubec G (2005) Proteome analysis in hippocampus of mice overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase 1.

Neurochemistry International 46:641–653.

Starr KA, Wolpaw JR (1994) Synaptic terminal coverage of primate triceps surae motoneurons. *J Comp Neurol* 345:345–358.

Stepien AE, Tripodi M, Arber S (2010) Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron* 68:456–472.

Wetts R, Vaughn JE (2001) Development of cholinergic terminals around rat spinal motor neurons and their potential relationship to developmental cell death. *J Comp Neurol* 435:171–183.

Wilson JM, Rempel J, Brownstone RM (2004) Postnatal development of cholinergic synapses on mouse spinal motoneurons. *J Comp Neurol* 474:13–23.

Witts EC, Zagoraiou L, Miles GB (2014) Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *J Anat* 224:52–60.

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.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Immunostaining of C-boutons and M2 muscarinic receptors in wild type and SOD1 lumbar motoneurons. Lamina IX confocal microscopy photomicrographs of double-immunofluorescence labeling directed against CholineAcetylTransferase (ChAT, red channel) and M2 muscarinic receptors (green channel) in wild type (WT) and SOD1 postnatal day 1 (P1, **A**), P10 (**B**), P21 (**C**) and P100 (**D**) mice. Arrowheads point to cholinergic large synapses juxtaposed to motoneurons: the C-boutons. Note the absence of C-boutons in P1 motoneurons. Scale bar: 15 μ m.

Figure 2. Age-related changes in morphological parameters of lumbar motoneurons and C-boutons in wild type and SOD1 mice. **A.** Example of automatic detection of C-boutons surrounding a P100 motoneuron in CholineAcetylTransferase (ChAT) labeling images. Scale bar: 15 μ m. Histograms of the motoneuron perimeter (**B**), C-bouton number normalized by motoneuron (Mn) perimeter (**C**), mean-C-bouton area (**D**) and mean distance of C-bouton centroid from Mn centroid (**E**) as a function of animal age expressed in postnatal days (P) in wild type (WT, black bars) and SOD1 (white bars) mice. Asterisks indicate positive significance.

Figure 3. M2 receptor expression is decreased in presymptomatic stages in the SOD1 ventral spinal cord. **A.** Representative protein levels of the M2 muscarinic receptor detected by western blot in wild type (WT) and SOD1 (SOD) mice at different postnatal (P) stages. All blots were reprobated for β -actin as a loading control. The molecular weight in kDa is shown on the left side of the picture. **B.** Mean M2 receptor/ β -actin expression ratio as a function of

animal age in WT (black bars) and SOD1 (white bars) mice. At least four WT and four SOD1 mice were tested in each group. Asterisks indicate positive significance.

Figure 4. M2 receptor expression in the postsynaptic membrane of C-boutons. A. Representative intensity plot profiles of CholineAcetylTransferase (ChAT, red channel and trace) and M2 receptor (green channel and trace) immunolabeling computed from the contour cutting of a P10 SOD1 motoneuron (**A1**) and a P100 wild-type (WT) motoneuron (**A2**). **B.** The portion of postsynaptic membrane containing M2 receptors in front of C-boutons was computed as the ratio of the area of M2 receptor labeling to that of C-bouton labeling and expressed as a function of the postnatal (P) WT (black bars) and SOD1 (white bars) mouse age. **C.** Histogram of the mean M2 receptor labeling intensity under C-boutons normalized by the mean M2 labeling computed in Mn membrane devoid of C-bouton. Asterisks indicate positive significance.

Figure 5. Counting of lamina X cholinergic interneurons in the lumbar spinal cords of wild type and SOD1 mice at different postnatal stages. A. Representative photomicrographs of CholineAcetylTransferase (ChAT) immunopositive neurons in entire spinal cord sections and at a higher magnification in the lamina X of the lumbar 2 (L2) and L5 segments. Images from wild type (WT) and SOD1 mice aged 10 postnatal days (P10, upper panels) and P100 (lower panels) are displayed. Scale bars: 200 μ m for entire spinal cord sections and 50 μ m for the lamina X magnifications. **B.** Mean lamina X ChAT-positive interneurons (ChAT+ INs) per spinal cord sections (30 μ m thick) in the whole lumbar spinal cord in P10, P40 and P100 WT (black bars) and SOD1 (white bars) mice. **C.** Mean ChAT+ interneurons (INs) per spinal cord sections for each lumbar segments in P10 (**C1**), P40 (**C2**)

and P100 (C3) WT (black bars) and SOD1 (white bars) mice. Black asterisks indicate positive significance, and the numbers in histogram bars refer to the number of animals tested in each group. Gray asterisks indicate positive significance between the L2 segments and the other ones in the same group.

Figure 6. Immunohistochemical observation of activated caspase 3 in lamina X cholinergic interneurons in presymptomatic stages of ALS. Representative epifluorescence photomicrographs of double labeling of CholineAcetylTransferase (ChAT, red channel) and activated caspase 3 (green channel) in motoneurons and lamina X cholinergic interneurons from a 100 postnatal days (P100) wild type (A) and SOD1 mouse (B). Arrowheads point to activated caspase 3 immunopositive motoneurons and lamina X cholinergic interneurons. Note the absence of activated caspase 3 positive neurons in WT mice. CC: central canal. Scale bar: 10 μ m.

Figure 7. Muscarinic neuromodulatory actions on NMA+5-HT-induced fictive locomotion in SOD1 and age-matched control mice. Representative integrated (f) extracellular recordings from the right, left L2 and left L5 ventral roots (rL2, lL2 and lL5) in the presence of NMA+5-HT (16 μ M each) alone or with oxotremorine (Oxo; 5, 10 or 20 μ M) in wild type (WT) (A) and SOD1 mice (B). Plots of the period (C) and L2 burst amplitude (D) in the absence or presence of oxotremorine bath applied at increasing concentrations on WT (black bars) and SOD1 (white bars) spinal cord preparations. Asterisks indicate positive significance levels and the numbers in histogram bars refer to the number of spinal cord preparations tested.

Figure 8. Oxotremorine-induced effects on motoneuron membrane properties and cholinergic commissural transmission in SOD1 and age-matched control mice. A. Representative trace of oxotremorine-induced depolarizations observed in synaptically isolated motoneurons recorded in whole-cell patch-clamp conditions (**A1**). Plots of the mean oxotremorine (oxo)-induced depolarization measured in wild type (WT, black bars) and SOD1 (white bars) motoneurons (**A2**). Plot of the mean membrane input resistance of WT and SOD1 motoneurons in the absence (black bars) and presence (gray bars) of oxotremorine (**A3**). Representative traces of the spike AHP in control (black trace), in the presence of oxotremorine (gray trace) and in the presence of oxotremorine plus the M2 receptor antagonist AF-DX116 (50 μ M, dashed trace) (**A4**). Summary plot of the mean AHP amplitude measured in WT and SOD1 motoneurons in the absence (black bars) and presence (gray bars) of oxotremorine (**A5**). **B.** Representative traces of muscarinic excitatory postsynaptic potentials (musc-EPSPs) induced by different protocols of commissural stimulation (**B1-B2**) in the absence or presence of the muscarinic receptor antagonist, atropine (200 μ M, gray trace). Summary plot of the mean musc-EPSP amplitude as a function of the number of shocks and frequency of the commissural stimulation recorded from WT (black bars) and SOD1 (white bars) motoneurons (**B3**). Asterisks indicate positive significance, and the numbers in the histogram bars refer to the number of motoneurons tested.

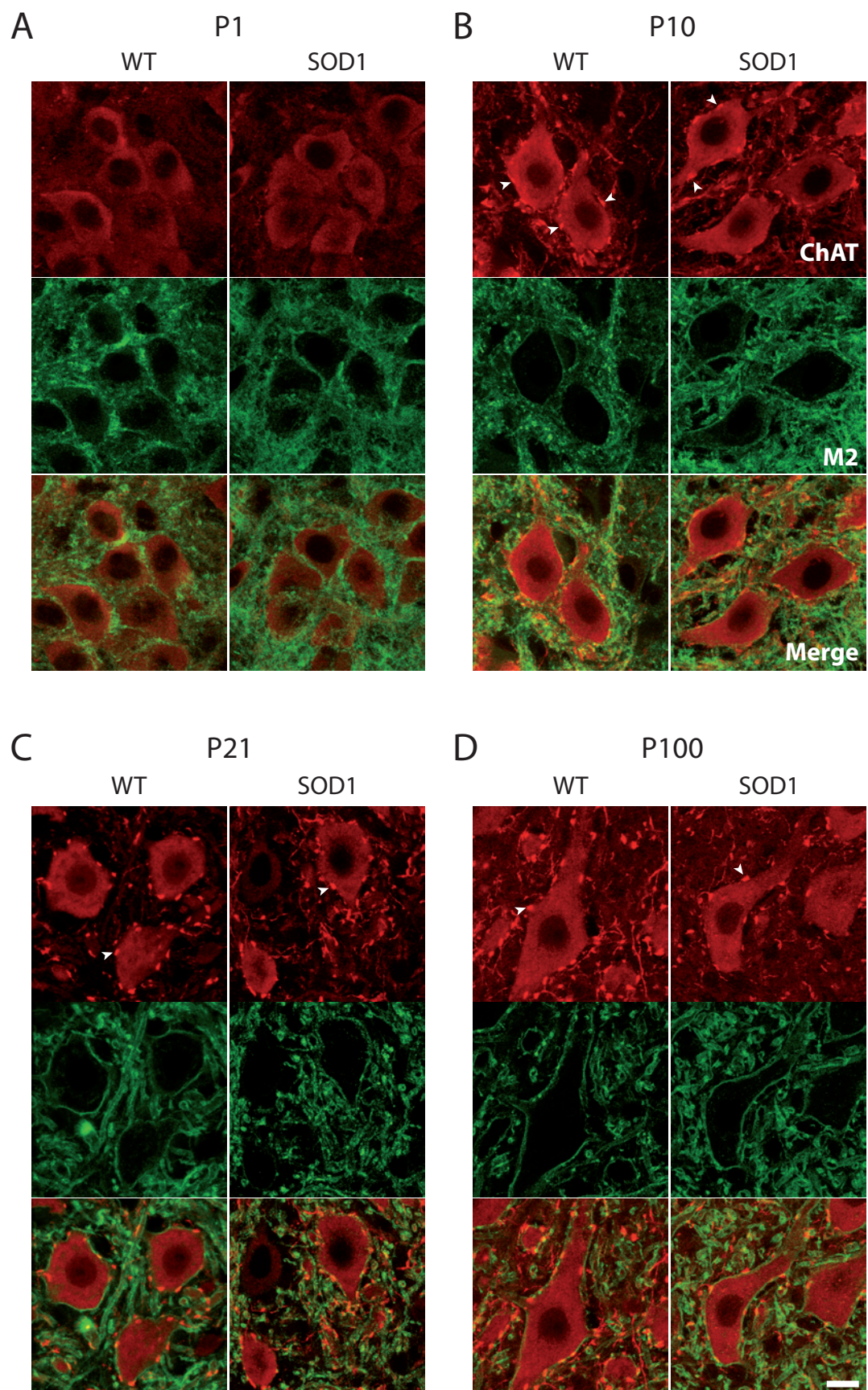


Figure 1
Milan et al,

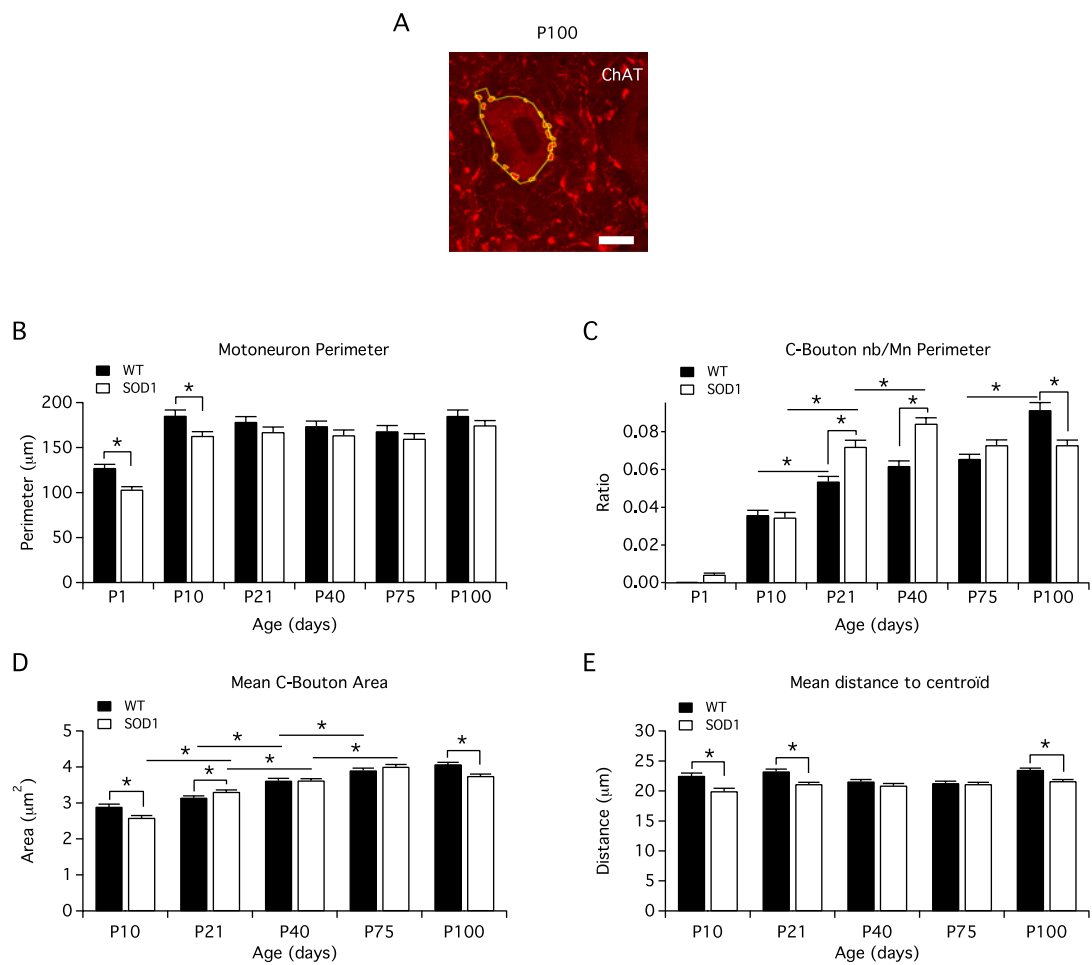
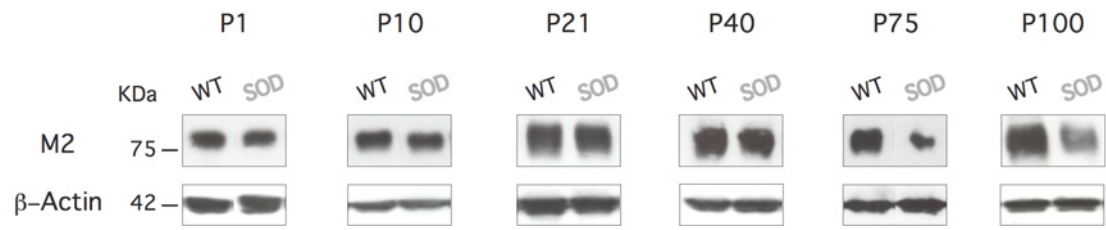


Figure 2
Milan et al.

A



B

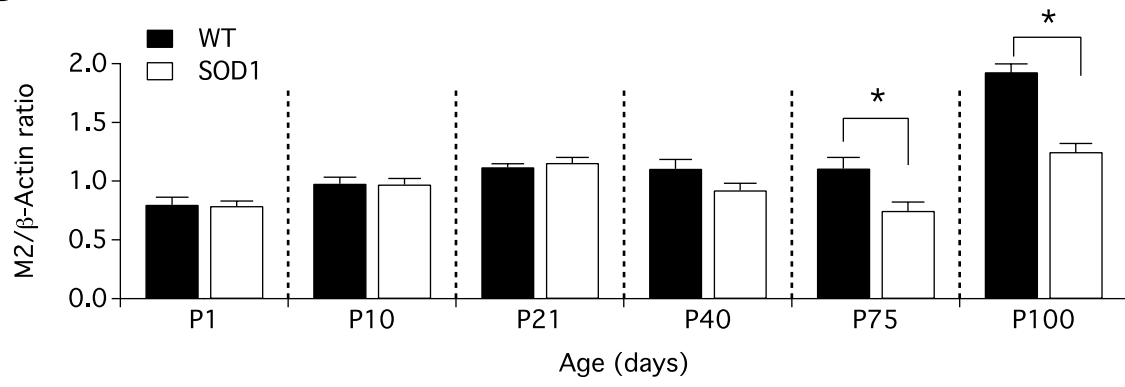


Figure 3
Milan et al.

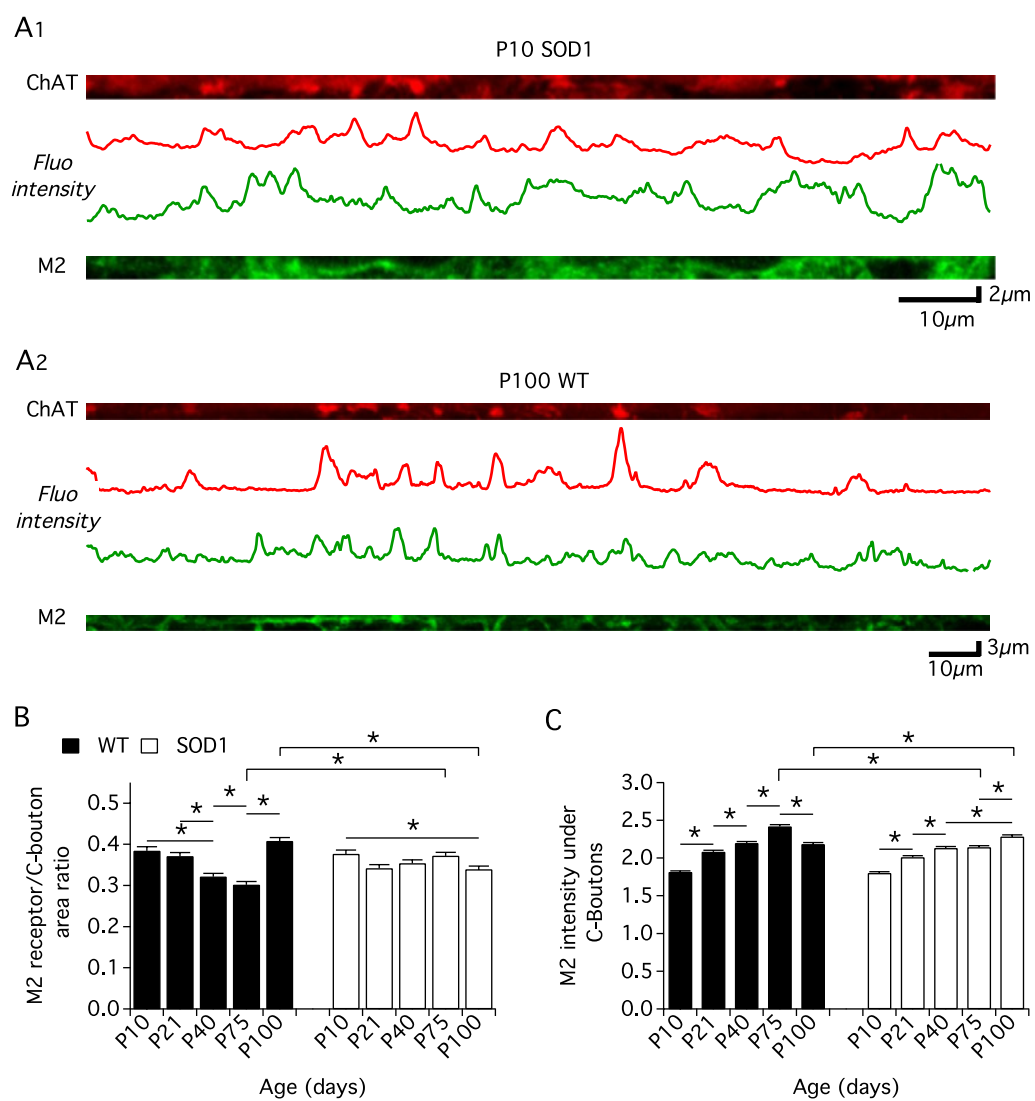


Figure 4
Milan et al.

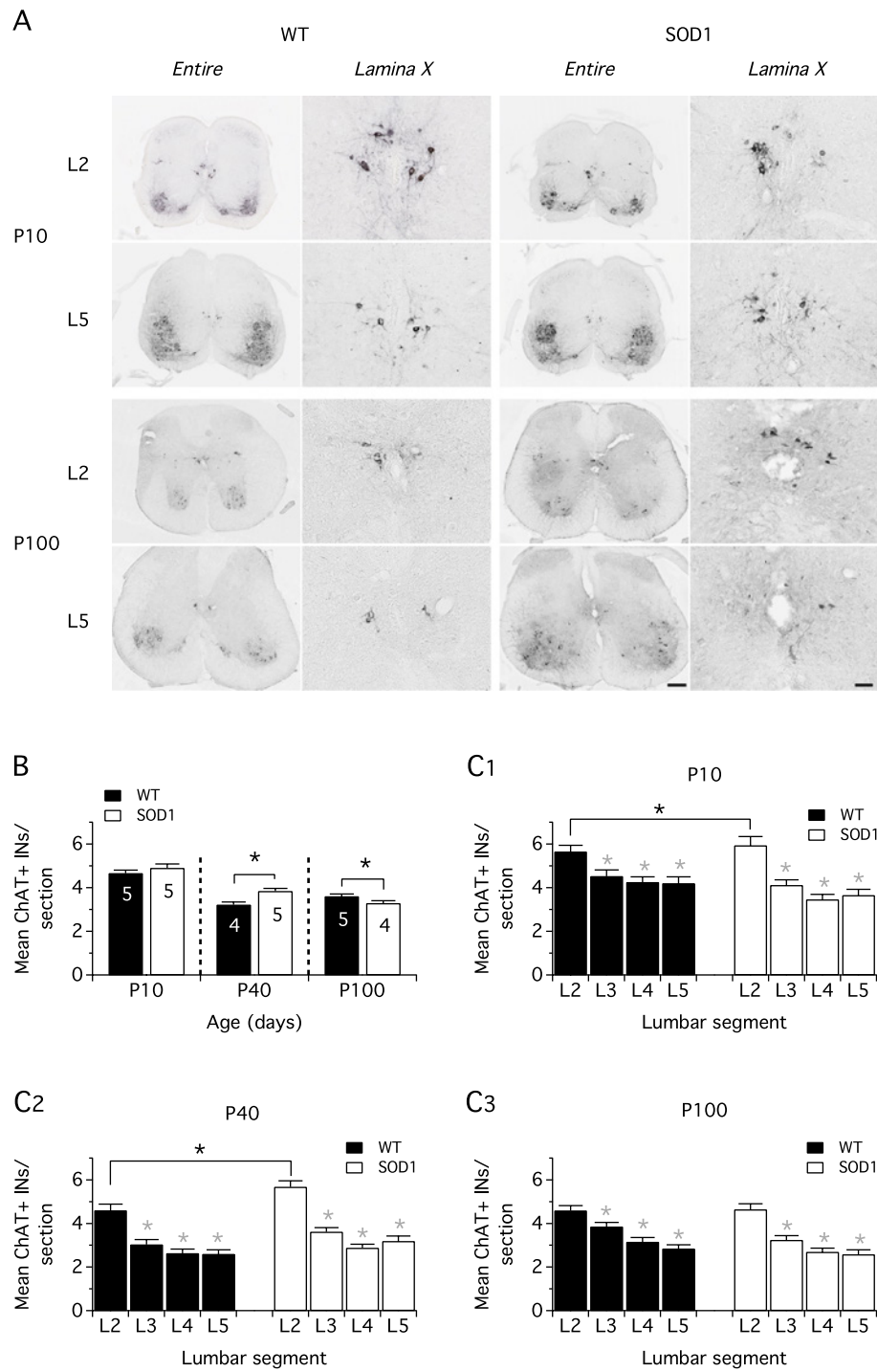


Figure 5
Milan et al.

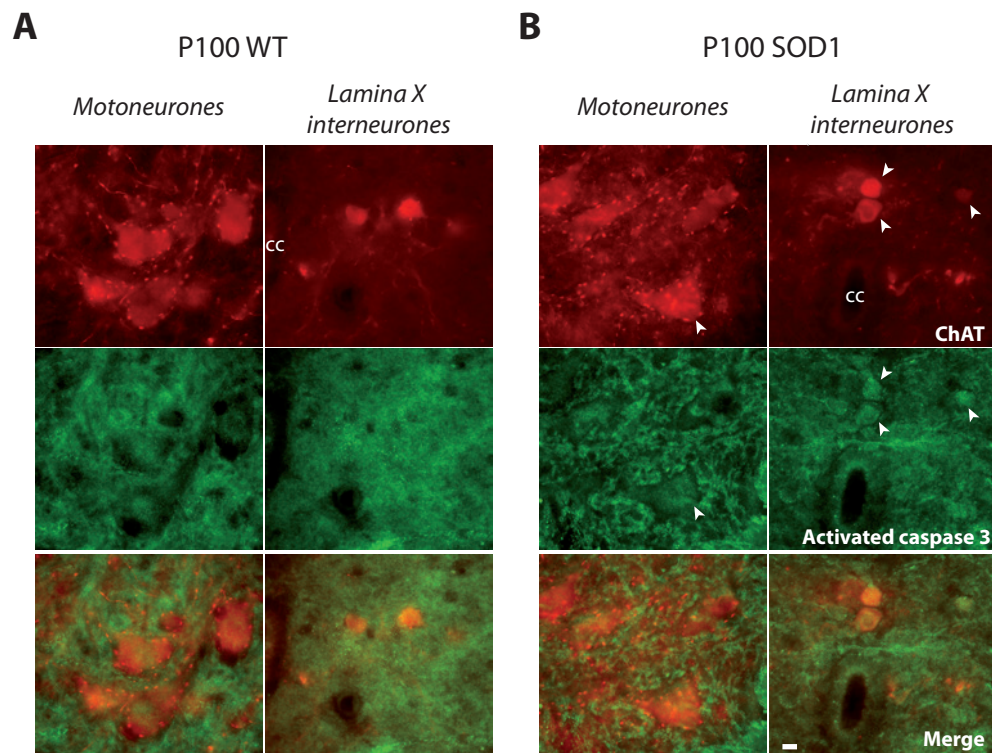


Figure 6
Milan et al.

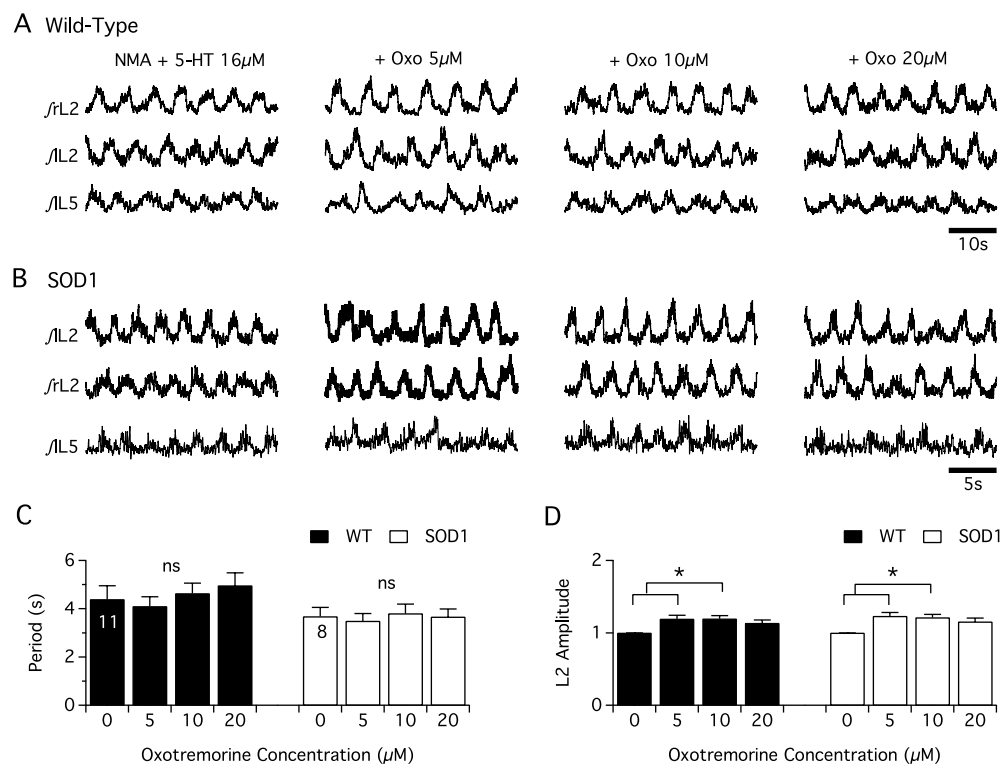


Figure 7
Milan et al.

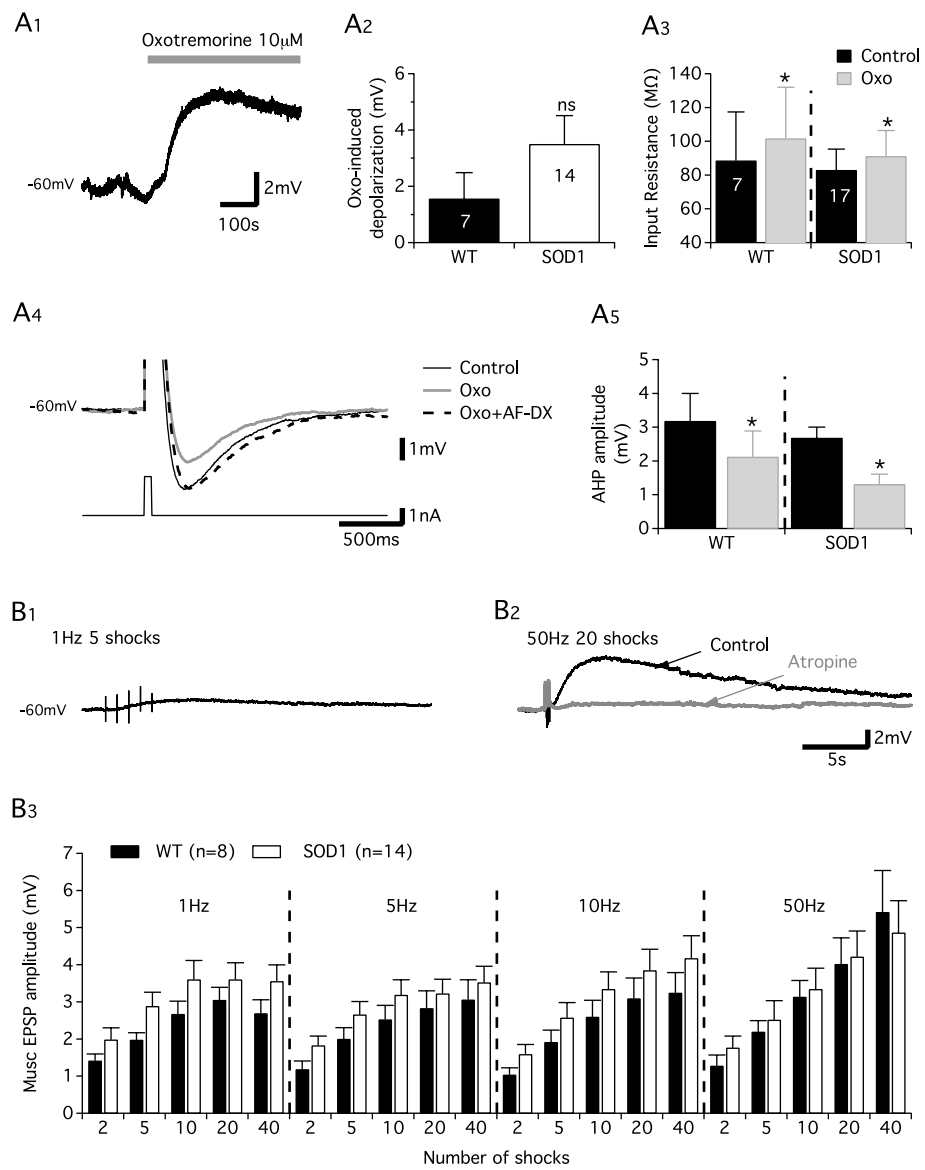


Figure 8
Milan et al.

	P1		P10		P21		P40		P75		P100	
	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1	WT	SOD1
Animal number	4	4	6	6	7	6	8	6	6	7	5	8
Motoneuron Number	100	83	130	133	148	131	130	126	124	145	116	156

Table 1. Number of animals used and motoneurons analyzed in each age group in wild-type (WT) and SOD1 mice.

	P1	P10	P21	P40	P75	P100
Mn perimeter	-	-	=	=	=	=
C-Bouton nb	na	=	+	+	=	-
C-Bouton area	na	-	+	=	=	-
M2 ratio	=	=	=	=	-	-
Nb of Ins in L2 segment	na	+	na	+	na	=

Table 2. Summary of the changes observed for the different parameters analyzed in SOD1 mice compared to wild-type mice at different postnatal ages (P). -: smaller, =: equal, +: higher, na: non-available. Mn: motoneurone, nb: number, Ins: Lamina X interneurons.