



Propriétés d'excitabilité des cellules de Renshaw au cours du développement embryonnaire de la moelle épinière, chez la souris

Juliette Boeri

► To cite this version:

Juliette Boeri. Propriétés d'excitabilité des cellules de Renshaw au cours du développement embryonnaire de la moelle épinière, chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS381 . tel-02866065

HAL Id: tel-02866065

<https://theses.hal.science/tel-02866065>

Submitted on 12 Jun 2020

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale n°158 Cerveau-Cognition-Comportement

*Laboratoire Neurosciences Paris Seine / Equipe « Développement de l'organisation de la
moelle épinière »*

Propriétés d'excitabilité des cellules de Renshaw au cours du développement embryonnaire de la moelle épinière, chez la souris

Par Juliette Boeri

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Pascal Legendre et Antonny Czarnecki

Présentée et soutenue publiquement le 9 Novembre 2018

Devant un jury composé de :

Dr. Muriel THOBY-BRISSON, rapporteur

Dr. Frédéric BROCARD, rapporteur

Dr. Valérie CREPEL, examinatrice

Pr. Stéphane CHARPIER, examinateur

Dr. Pascal LEGENDRE, directeur de thèse

Dr. Antonny CZARNECKI, directeur de thèse

Remerciements

L'heure des remerciements... Pour moi les remerciements se font à l'oral ou de personne à personne où il est plus facile de dire « merci!!!!!! merci!!!!!! merci!!!!!! ». Mais je vais me prêter avec plaisir à la tradition de la page des remerciements des manuscrits de thèse.

Je remercie Pascal et Antonny d'avoir été mes directeurs de thèse. Pascal je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre équipe et de votre suivi pendant ces trois années (en particulier le « coaching », éprouvant mais efficace^^ pour le concours de l'ED). Antonny je te remercie profondément aussi pour ton suivi au cours de ces trois années de thèse. Je te remercie de m'avoir appris l'électrophysiologie et de m'avoir bien encadré tout au long de ma thèse. Un grand merci pour ton expertise, tes conseils pour chaque étape de la thèse, ta grande disponibilité, ta compréhension aussi, et enfin tes grandes qualités de pédagogie ! Oh et puis ça faisait du bien aussi de rire de temps à autres avec ton humour indéniable quand la pression était à son comble !

Je remercie les membres du jury, Muriel Thoby-Brisson, Frédéric Brocard, Valérie Crépel et Stéphane Charpier de me faire l'honneur d'évaluer et de critiquer mon travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier Claire Wyart et Daniel Zytnicki, les deux experts des comités de thèse, pour avoir évalué mon travail et de m'avoir guidé dans certaines réflexions scientifiques et personnelles.

Je remercie le directeur du Laboratoire Neurosciences Paris Seine, Hervé Chneiweiss.

Merci au conseil de d'école doctorale ED3C de m'avoir donné une bourse pour me permettre de faire cette thèse, ainsi qu'au directeur de l'ED Alain Trembleau et à la gestionnaire Christelle Arruebo.

Il me reste maintenant à remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé, de près ou de loin, durant ces trois années de thèse.

Hervé « le grand », merci de m'avoir appris l'immuno, de m'avoir dépanné *via* tes astuces de bricolage-bidouillage, et de ta disponibilité pour me répondre à mes nombreuses questions avec toujours autant de qualités pédagogiques. Ma chère Christine, merci pour le suivi des lignées de souris, le génotypage et toutes les tâches communes que tu réalises pour le bon fonctionnement de l'équipe ! Et puis merci pour ta gentillesse et les chouettes moments passés en ta compagnie à discuter, rigoler et parfois râler ^^ . Je remercie aussi Jean-Marie, le codirecteur de l'équipe DSCO, de m'avoir permis de faire ma thèse dans ton équipe ainsi que pour les échanges

enrichissants, mais qui partent parfois plus loin que la petite question ou sujet de démarrage hihi^^. Enfin je tiens à remercier toutes les autres personnes de l'équipe, Monara, Cuong, Hervé « le petit », Sophie, Silvia, Barbara et Dong-Dong !! « Momo » merci à toi sans qui je n'aurais pas passé ces bons moments de belle complicité.

Pour finir à l'étage du B2, merci général aux membres de « l'équipe d'en face » avec qui partager équipement et tables de déj dans le couloir ^^ fut un plaisir.

Merci aussi à Erika, pour la gestion des commandes de notre équipe. Je remercie aussi à remercier France, Jean-François, Suzanne de la plateforme d'imagerie confocale de m'avoir formé et apporté votre aide. Je tiens à remercier tout le personnel de l'animalerie du B8, en particulier Julie, Odile, Goran, d'avoir géré les lignées de souris dont je me suis servie au cours de ma thèse (Ah Anibio qui nous en fait faire voir...). Je remercie aussi Catherine, la gestionnaire de notre équipe, merci pour ta disponibilité et gentillesse. Merci également à Fatima qui s'est occupé de la laverie de notre très nombreuse vaisselle, je te souhaite une bonne retraite !

Merci à Claude Meunier, avec qui j'ai été initiée à la modélisation ! Je vous remercie pour votre disponibilité et expertise dans ce domaine.

Merci à Pascal Branchereau pour notre collaboration, et de m'avoir reçu à Bordeaux lors de ma 1^{ère} année de thèse pour venir apprendre à faire une « petite fenêtre d'ouverture des méninges » ^^ (bon on ne s'en finalement pas servi... c'est la recherche comme on dit !).

Ma thèse a aussi permis de réaliser une mission d'enseignement que j'ai adoré ! Merci aux responsables de l'UE 2V415 de m'avoir permis d'enseigner les TP de cette UE. J'en garde de très bons souvenirs d'enseignement ! Merci aussi aux responsables et personnels de la plateforme des TP de licence pour l'organisation des TP.

Je tiens à remercier Jean-François Faivre et ses collègues de l'Université de Poitiers d'avoir organisé l'école d'été d'électrophysiologie au cours de laquelle j'ai beaucoup appris et passé une super semaine à vos côtés !

Merci à Fiona d'avoir lu mon manuscrit. Toi la prochaine ;-).

Enfin et pas des moindres, un grand merci à ma famille et mes amis pour leur amour et soutien.

Résumé

La moelle épinière embryonnaire génère, comme la plupart des réseaux neuronaux en développement, une activité récurrente dite « spontanée » (SNA), indépendante de toute afférence extra-spinale et qui est impliquée dans de nombreux processus de maturation du réseau neuronal. Cette première activité du réseau spinal apparaît au début de la synaptogenèse, à ~ 12,5 jours d'âge embryonnaire (E12,5) chez la souris. Cette activité initialement synchronisée à l'ensemble de la moelle épinière se complexifie ensuite pour donner naissance à la première activité locomotrice qui apparaît vers E14,5-E15,5. Dans les motoneurones (MNs), la SNA est caractérisée par des dépolarisations géantes (GDPs) évoquées principalement par une libération massive de GABA cette dernière étant régulée par l'activation de récepteurs cholinergiques. Les mécanismes de libération de ces neurotransmetteurs et l'identification des premiers interneurones (INs) GABAergiques fonctionnels interagissant avec les MNs sont actuellement inconnus. Pour étudier l'activité des INs GABAergiques et leurs propriétés d'excitabilité à l'apparition de la SNA spinale, nous avons choisi d'étudier les cellules de Renshaw (CRs). Les CRs sont parmi les premiers INs spinaux à être générés au cours du développement. Nous avons réalisé des expériences de patch clamp combinées une approche pharmacologique, et des expériences d'immunohistochimie sur des préparations de moelle épinière isolée d'embryon de souris transgéniques GAD67-eGFP.

Une première partie des travaux de ma thèse porte sur l'excitabilité des CRs à E12,5, âge où le réseau spinal commence à générer la SNA chez la souris. Nous avons découvert que les CRs sont aussi activées pendant la SNA. Elles sont dépolarisées par des GDPs, pouvant évoquer une décharge répétée de potentiels d'action ou une décharge de potentiels dépolarisants en plateau. En analysant leurs propriétés d'excitabilité intrinsèque nous montrons que la décharge intrinsèque des CRs embryonnaires sous la forme de « train de PA » ou « potentiels en plateau » dépend des courants sodiques persistants (INaP). Ces courants, essentiels pour l'excitabilité des CRs, le sont aussi à l'échelle du réseau, en modulant le patron de la SNA spinale.

Les CRs à E12,5, ont des capacités de décharge intrinsèque différentes comparé aux CRs matures. Une deuxième partie des travaux de ma thèse a donc visé à déterminer comment évoluent les capacités et propriétés d'excitabilité intrinsèque des CRs au cours du

développement embryonnaire. Nous montrons que leurs capacités de décharge intrinsèque régressent transitoirement entre E12,5 et E16,5. En effet à E14,5, les CRs ne peuvent plus générer en majorité qu'un seul PA tandis qu'à E16,5, leur capacité à soutenir une décharge répétitive de PA, réapparaît. Cette diminution transitoire des propriétés d'excitabilité intrinsèques est sous-tendue par une variation du rapport conductance sodique persistante versus conductance potassique retardée.

Mes travaux de thèse montrent que les CRs sont déjà actives au début de la synaptogenèse, et que cette activité se caractérise par une grande diversité dans leurs propriétés intrinsèques d'excitabilité. De façon remarquable nous avons découvert que le développement de leurs propriétés d'activation n'évolue pas de façon linéaire entre E12,5 et E16,5 alors que leur morphologie se complexifie progressivement durant la même période développementale. L'ensemble de nos résultats pose la question du rôle des interactions fonctionnelles entre les CRs et les MNs et/ou les autres INs spinaux dans le développement des réseaux locomoteurs chez l'embryon.

Mots-clés : embryon - cellules de Renshaw – propriétés de décharge intrinsèque – courant sodique persistant – courants potassiques voltage-dépendants

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé	5
Liste des abréviations.....	9
Table des illustrations	11
INTRODUCTION	13
Introduction générale.....	14
Chapitre 1 : Ontogenèse de la moelle épinière.....	17
1.1 Formation du tube neural.....	17
1.2 Spécification des neurones dans la moelle épinière ventrale : les motoneurones et les cellules de Renshaw.....	17
1.2.1 Généralités sur la neurogenèse	17
1.2.2 Mise en place des domaines de progéniteurs et spécification des types cellulaires dans la moelle épinière ventrale	19
1.2.3 Spécification des motoneurones	22
1.2.4 Spécification des cellules de Renshaw	24
1.3 Développement de la connectivité dans la moelle épinière ventrale.....	27
1.3.1 Ontogenèse de l'expression des neurotransmetteurs dans les neurones spinaux ventraux.....	27
1.3.2 Croissance des neurites des motoneurones et des cellules de Renshaw	29
1.3.3 Mise en place de la connectivité intra-spinale	30
1.3.4 Mise en place de la connectivité extra-spinale	31
1.3.5 Schéma résumé de la maturation et de l'intégration des cellules de Renshaw dans le réseau spinal ventral	31
Chapitre 2 : Activité spontanée du réseau spinal ventral au cours du développement embryonnaire.....	33
2.1 Description et rôles de l'activité spontanée du réseau spinal en développement	33
2.1.1 Généralités	33
2.1.2 Rôle de l'activité spontanée dans la moelle épinière	35
2.1.3 Caractérisation de l'activité spontanée du réseau spinal ventral au cours du développement embryonnaire.....	36
2.2 Mécanismes impliqués dans la genèse et la propagation de l'activité spontanée dans la moelle épinière ventrale	40
2.2.1 Trois caractéristiques de la SNA	40

2.2.2 Evolution de la neurotransmission impliquée dans la genèse de la SNA au cours du développement embryonnaire.....	41
2.2.3 Mécanismes sous-tendant la génération, la périodicité et la propagation de la SNA aux stades embryonnaires précoces	42
Chapitre 3 : Développement des propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones embryonnaires de la moelle épinière	47
3.1 Maturation des profils de décharge intrinsèque des neurones spinaux	47
3.1.1 Pourquoi étudier les propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones au cours du développement ?	47
3.1.2 Développement des profils de décharge intrinsèque des neurones spinaux	48
3.2 Les canaux ioniques voltage-dépendants dans les neurones spinaux	52
3.2.1 Maturation des courants ioniques au cours du développement embryonnaire	52
3.2.2 Le courants sodique persistant	54
3.2.3 Les courants potassiques des canaux voltage-dépendants de la famille Kv	56
Objectifs de thèse	59
RESULTATS	61
PARTIE 1 : L'excitabilité des cellules des Renshaw dépend du courant sodique persistant dans le réseau spinal embryonnaire précoce.....	62
Problématique et résumé des résultats	62
Article	
PARTIE 2 : Développement des propriétés d'excitabilité intrinsèques des cellules des Renshaw embryonnaires	65
Problématique	65
Matériels et méthodes.....	66
Résultats.....	70
Conclusion et discussion	93
PARTIE 3 : Contrôle cholinergique de l'activité spontanée aux stades précoces du développement embryonnaire	99
Problématique	99
Matériels et méthodes.....	100
Résultats.....	103
Conclusion et discussion	119
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	123
Bibliographie.....	130

Liste des abréviations

4-AP : 4-aminopyridine

ACh : acétylcholine

APV : acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque

BMP : *bone morphogenetic protein*

ChAT : choline acétyltransférase

ChR2 : *channelrhodopsin-2*

CNQX : 6-cyano-7-nitroquinaloxine-2,3-dione

CR(s) : cellule(s) de Renshaw

CR(s) à 1-2 PA : cellule(s) de Renshaw évoquant au maximum 1 ou 2 potentiels d'action

CR(s) à train de PA : cellule(s) de Renshaw évoquant de multiples potentiels d'action

CR(s) à plateau : cellule(s) de Renshaw évoquant un ou des potentiels en plateau dépolarisants

CR(s) mixte : cellule(s) de Renshaw évoquant des multiples potentiels d'action et potentiels en plateau dépolarisants

CPG : *central pattern generator* (centre générateur de rythme)

DH β E : dihydro- β -erythroidine hydrobromide

dTC : d-tubocurarine

E12,5 : 12,5^{ème} jour embryonnaire

E_{cations} : potentiel d'équilibre des cations

ECl : potentiel d'équilibre des ions chlorure

EK⁺ : potentiel d'équilibre des ions potassium

E_{inv} : potentiel d'inversion d'un canal ionique

ENa⁺ : potentiel d'équilibre des ions sodium

FGF : *fibroblast growth factor*

Foxd3 : *forkhead box-3*

FT(s) : facteur(s) de transcription

gA : conductance potassique transitoire voltage-dépendante de type A

GABA : acide γ -aminobutyrique

GAD67 : glutamate decarboxylase (isoforme de poids moléculaire 67 kDa)

GDP(s) : *giant depolarizing potential(s)*

GIC(s) : *giant inward current(s)*

gK_{dr} : conductance potassique voltage-dépendante à rectification retardée

gNa_P : conductance sodique persistante voltage-dépendante

Hb9 : *homeobox-9*

IA : courant potassique transitoire voltage-dépendant de type A

ICa : courant calcique voltage-dépendant

IK_{dr} : courant potassique voltage-dépendant à rectification retardée

IK_v : courants potassiques voltage-dépendants totaux

IN(s) : interneurone(s)

INa_P : courant sodique persistant voltage-dépendant

INa_T : courant sodique transitoire voltage-dépendant

IN(s) V1 : interneurone(s) de type V1, généré(s) à partir des progéniteurs du domaine p1

MN(s) : motoneurone(s)

oGDP(s) : GDP(s) (*giant depolarizing potential(s)*) évoqué(s) à la suite d'une stimulation optogénétique

oGIC(s) : GIC(s) (*giant inward current(s)*) évoqué(s) à la suite d'une stimulation optogénétique

P : jour postnatal

p0 : progéniteur des interneurones V0

p1 : progéniteur des interneurones V1

p2 : progéniteur des interneurones V2

p3 : progéniteur des interneurones V3

PA : potentiel d'action

pMN : progéniteur des motoneurones

SNA : *spontaneous network activity* (activité spontanée de réseau)

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

TTX : tétrodotoxine

VAc_hT : transporteur vésiculaire de l'acétylcholine

V_h : potentiel de membrane imposé (*holding potential*)

Wnt : *wingless integrated*

Table des illustrations

Figure 1 : Profils d'expression des facteurs de transcription dans le neuroépithélium de la moelle épinière ventrale	19
Figure 2 : Programmes génétiques embryonnaires (expression des facteurs de transcription) mis en jeu dans la génération de la diversité des neurones spinaux.....	21
Figure 3 : Diversité des motoneurones.....	23
Figure 4 : Connexions des cellules de Renshaw avec les motoneurones et vice-versa Erreur ! Signet non défini.	25
Figure 5 : Résumé de l'ontogenèse des cellules de Renshaw à partir des progéniteurs p1	26
Figure 6 : Schéma résumant les changements dans l'intégration des cellules de Renshaw dans le réseau spinal ventral au cours du développement	32
Figure 7 : Profils des activités spontanées dans la moelle épinière au cours du développement embryonnaire de souris	39
Figure 8 : SNA dans la moelle épinière aux stades précoces du développement embryonnaire, enregistrée par différentes méthodes	41
Figure 9 : La région des interneurones-R (homologues des cellules de Renshaw des mammifères) est la première à être activée lors d'un épisode d'activité spontanée	44
Figure 10 : Schéma proposé du circuit spinal sous-tendant la génération et propagation de la SNA de la moelle épinière d'embryon de souris à E12,5	46
Figure 11 : Différenciation neuronale codée par les flux calciques transitoires spontanés dans les neurones spinaux d'embryons de Xénope	48
Figure 12 : Maturation du profil de décharge des neurones sensoriels spinaux d'embryon de xénope	49
Figure 13 : Développement des propriétés de décharge et des courants ioniques dans les MNs embryonnaires et postnataux chez le rat..... Erreur ! Signet non défini.	51

Figure 14 : Propriétés électrophysiologiques de décharge intrinsèque des cellules de Renshaw dans la moelle épinière de souris postnatale	52
Figure 15 : Le courant sodique persistant contribue à la décharge répétitive des neurones spinaux et à l'activité du réseau spinal mature.....	56
Figure 16 : Classification fonctionnelle des courants générés par les canaux potassiques voltage-dépendants de la famille Kv, en fonction de leurs propriétés biophysiques	57

INTRODUCTION

Introduction générale

Les neurones s'assemblent pour former des réseaux complexes hiérarchisés, avec une architecture et des fonctions spécifiques. Les réseaux neuronaux sont construits de façon cohérente et coordonnée. Chaque neurone a une place bien précise et participe à une fonction spécifique. Par exemple, le réseau neuronal spinal ventral coordonne l'activité musculaire sous-tendant les comportements moteurs. Il est à l'interface entre la périphérie et l'encéphale. Le réseau spinal ventral mature est composée de deux grandes classes de neurones : les motoneurones (MNs) qui sont les neurones de sortie de la moelle épinière projetant sur les muscles et les interneurones (INs) locaux qui sont soit excitateurs soit inhibiteurs et qui coordonnent l'activité des MNs. L'ensemble de ce système forme les colonnes motrices. Parmi ces INs spinaux, les cellules de Renshaw (CRs) forment un réseau particulier. Elles sont impliquées dans la régulation de la contraction musculaire, *via* la modulation de l'activité des MNs. L'activité d'un groupe de MNs active les CRs qui en retour inhibent ces MNs formant ainsi une boucle fonctionnelle rétroactive.

Au cours du développement des vertébrés, les réseaux locomoteurs se mettent en place rapidement et deviennent fonctionnels dès la fin du développement embryonnaire. Comme tout réseau hiérarchisé, le réseau spinal se construit en plusieurs phases qui sont sous la dépendance d'un programme génétique spécifique qui est modulé par le microenvironnement cellulaire. De façon remarquable, les neurones en développement sont capables de générer une activité dès leur phase de migration. Durant la phase initiale de migration l'activité des premiers neurones se résume à des décharges individuelles. Ces décharges se synchronisent rapidement à la fin de la phase de migration pour générer une activité spontanée phasique lente (appelée SNA pour *spontaneous network activity* en anglais) qui se caractérise dans la moelle épinière ventrale par des épisodes d'activités apparaissant toutes les 2-5 minutes et qui se propagent en vague dans la structure. L'activité synchronisée de la moelle épinière en développement se complexifie ensuite pour donner naissance à la première activité locomotrice qui apparaît chez la souris dès le 14-15^{ème} jour de gestation (E14-E15). La SNA spinale joue un rôle important dans le développement des réseaux locomoteurs. Par exemple, toute perturbation du patron d'activité évoque une altération du guidage axonal des MNs, du moins chez le poulet. La SNA spinale a été étudiée de façon extensive au moyen d'enregistrements extracellulaires associés à des manipulations pharmacologiques. Ces

travaux ont permis de proposer une première ébauche du réseau spinal fonctionnel produisant la SNA avec comme acteur principal le MN. Cependant ces approches indirectes ne permettent pas avec certitude de définir les interactions neuronales qu'elles soient synaptiques ou non synaptiques et les mécanismes cellulaires qui sous-tendent cette activité. Par exemple, il a longtemps été postulé que ce sont les INs glycinergiques qui contrôlent la propagation de la SNA. Il a fallu attendre les études électrophysiologiques au moyen du patch clamp pour découvrir que ce sont les cellules neuroépithéliales radiaires qui libèrent de la glycine et qui régulent la propagation de la SNA. Par ailleurs si d'un point de vue pharmacologique il est maintenant admis que la libération de GABA et d'acétylcholine joue un rôle essentiel dans la production de la SNA, les mécanismes de libération de ces neurotransmetteurs et l'identification des premiers INs interagissant avec les MNs restent actuellement inconnus. Parmi les INs spinaux qui naissent au cours du développement embryonnaire, les CRs sont parmi les premiers à se mettre en place mais leurs propriétés fonctionnelles à ces stades du développement embryonnaire sont également inconnues.

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des propriétés d'excitabilité des CRs au cours du développement embryonnaire de la moelle épinière, chez la souris (E12,5-E16,5).

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

- La première partie est une introduction faisant la revue de la littérature sur la formation de la moelle épinière (chapitre 1), sur l'apparition de la SNA dans le réseau spinal ventral (chapitre 2) et sur le développement des propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones spinaux (chapitre 3) ;
- La deuxième partie présente les résultats des travaux de ma thèse portant sur l'excitabilité des cellules de Renshaw embryonnaires à l'apparition de la SNA du réseau spinal embryonnaire (partie 1) ; le développement des propriétés d'excitabilité intrinsèque des cellules de Renshaw embryonnaires (partie 2) et le contrôle cholinergique de la SNA aux stades précoces du développement embryonnaire (partie 3) ;
- La troisième partie est une discussion générale des résultats, leur intégration dans la littérature et des perspectives.

Chapitre 1 : Ontogenèse de la moelle épinière

1.1 Formation du tube neural

Le Système Nerveux Central (SNC) commence à se former très tôt durant le développement, à la fin de la phase de gastrulation (environ 3 semaines embryonnaires après la formation de l'œuf chez l'Homme, à E6-E7 chez la souris). Le développement du SNC commence par la phase de neurulation, consistant en la formation d'un tube neural à partir de l'invagination d'un tissu ectodermique appelé plaque neurale. Le tube neural va ensuite se polariser et se régionaliser selon un axe antéro-postérieur et un axe dorso-ventral pour donner *in fine* le cerveau, le tronc cérébral et la moelle épinière (pour revue voir Jessell and Sanes 2000). Cette polarisation du tube neural est induite par l'action concertée de gradients de concentration de facteurs inductibles appelés morphogènes (sonic hedgehog, BMP, Wnt, FGF, acide rétinoïque, ...). Brièvement, la mise en place de l'axe dorso-ventral est induite par l'action concertée de deux gradients opposés de morphogènes : d'un côté sonic hedgehog produit par la notochorde et la plaque du plancher et de l'autre les protéines BMP et Wnt produites par l'épiderme dorsal et la plaque du toit (pour revues voir Wilson and Maden 2005, Jessell 2000, Roelink 1996). La régionalisation selon l'axe rostro-caudal est induite par la combinaison de gradients de concentration de l'acide rétinoïque, de FGF et de Wnt (pour revue voir Kimelman and Martin 2012). Puis, l'établissement de différents domaines d'expression des gènes Hox segmente le tube neural selon l'axe antéro-postérieur (pour revue voir Philippidou and Dasen 2013).

1.2 Spécification des neurones dans la moelle épinière ventrale : les motoneurones et les cellules de Renshaw

1.2.1 Généralités sur la neurogenèse

Comme toutes les structures du SNC, la moelle épinière se forme selon un schéma général spatio-temporel de processus cellulaires. Les cellules souches neurales sont localisées dans la zone ventriculaire du tube neural, formant le neuroépithélium. Dans un premier temps, chaque

cellule souche neurale ou neuroépithéliale va se diviser en deux cellules-filles identiques à la cellule-mère. Cette première phase de prolifération, définie par des divisions symétriques, permet d'augmenter la taille du tube neural.

Puis les divisions deviennent asymétriques pour entamer la phase de neurogenèse et gliogenèse. L'une des cellules-filles reste une cellule souche neurale pour garder sa capacité à se diviser et maintenir le stock de cellules souches neurales au cours du développement. L'autre cellule-fille sort du cycle cellulaire pour devenir une cellule neurale différenciée (neurone et cellule gliale) selon les processus de détermination et différenciation. Cette sortie dissymétrique du cycle cellulaire est déterminée par une signalisation Notch.

Chaque cellule-fille produite au niveau du neuroépithélium qui sort du cycle cellulaire, va acquérir un destin de précurseur neural puis se différencier en un type cellulaire spécifique. Selon sa localisation au sein du neuroépithélium, la cellule-fille va subir l'action concertée des différents gradients des morphogènes présentés auparavant. Ces signaux vont induire l'activation d'une première série de cascades d'expression de facteurs de transcription (FTs). Les frontières d'expression de ces premiers FTs, permettent, par leurs combinaisons variées, de délimiter le neuroépithélium en différents domaines progéniteurs. Chaque cellule-fille d'un domaine progéniteur va alors entrer en phase de détermination et différenciation et générer ainsi un type de cellule neurale. A partir de chaque domaine progéniteur donné, un lignage cellulaire va donner naissance à différents sous-types de cellules nerveuses à la fin de la phase de différenciation. De façon générale, la neurogenèse a lieu en premier, puis s'en suit la gliogenèse.

Pour résumer, la régulation génique de la spécification des cellules neurales repose sur un système hiérarchique : signaux inductifs extracellulaires → FTs spécifiques dans les progéniteurs (cellules souches neurales en mitose) → FTs spécifiques dans les précurseurs neuraux (cellules post-mitotiques) → FTs spécifiques/marqueurs neuraux dans les cellules neurales différenciées.

Au cours de cette phase de différenciation génétique, le précurseur neural migre à partir du neuroépithélium jusqu'à sa position finale dans le tissu. Au cours et à la fin de cette migration, les cellules neurales commencent leur différenciation phénotypique (expression d'un neurotransmetteur, etc.), morphologique (croissance des neurites, formation des contacts synaptiques etc.) et fonctionnelle (expression des canaux ioniques, etc.).

Ainsi chacun des sous-types acquiert son identité spécifique, basée sur deux types de critères : une origine embryonnaire génétique et des caractéristiques physiologiques (localisation, phénotype du neurotransmetteur, interactions avec les autres neurones, direction de l'axone, action physiologique).

1.2.2 Mise en place des domaines de progéniteurs et spécification des types cellulaires dans la moelle épinière ventrale

Dans la partie du tube neural qui donnera *in fine* la moelle épinière, les gradients de sonic hedgehog et de BMP vont délimiter 12 domaines de progéniteurs. Dans la région dorsale de la moelle épinière, le gradient de BMP induit la délimitation du neuroépithélium en 6 domaines dorsaux (du plus au moins dorsal : pd1 à pd6). Dans sa partie ventrale, le gradient de sonic hedgehog délimite le neuroépithélium en 5 domaines ventraux (du plus au moins ventral : p3, pMN, p2, p1 et p0) via l'établissement de territoires d'expression de premiers FTs (Nkx2.2, Nkx6.1, Olig2, Pax6, Irx3, Dbx2, Nkx6.2, Dbx1) (**figure 1**). Les frontières entre ces territoires sont déterminées par des interactions répressives entre les FTs deux à deux.

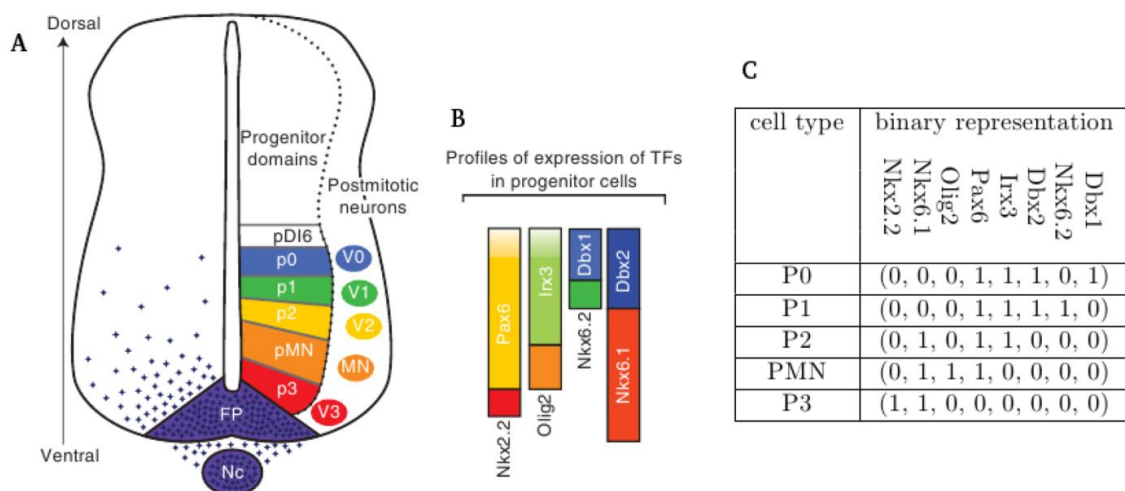


Figure 1 : Profils d'expression des facteurs de transcription dans le neuroépithélium de la moelle épinière ventrale. **A)** Domaines des cellules progénitrices neurales le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière ventrale et **B)** Facteurs de transcription (FTs) correspondants. **C)** Représentation binaire de l'expression des FTs (oui ou non) dans chaque type de cellule progénitrice. *Sources :* Lovrics et al. 2014, Ribes and Briscoe 2009.

Cette première série de FTs exprimés par les progéniteurs induit l'expression d'une autre série de FTs par les progéniteurs sortis du cycle cellulaire (les précurseurs post-mitotiques)

(**figure 2**). Les progéniteurs des domaines dorsaux vont donner naissance aux neurones de la partie dorsale de la moelle épinière qui seront impliqués dans le traitement des informations sensorielles. Je n'aborderai pas la neurogenèse de ces types neuronaux. Dans la partie ventrale de la moelle épinière, les progéniteurs vont donner naissance aux types neuronaux qui seront impliqués dans le traitement des informations motrices. Comme présenté de façon générale au-dessus, la génération des neurones spinaux ventraux fait intervenir des voies génétiques bien définies (pour revues voir Briscoe and Ericson 1999, Lee and Pfaff 2001, Lu et al. 2015, Bikoff et al. 2016). L'idée ici n'est pas de détailler la neurogenèse de tous les types cellulaires de la région ventrale de la moelle épinière. Je vais donc lister les destins cellulaires des différents domaines de progéniteurs ventraux. J'approfondirai dans les deux prochaines sous-parties l'ontogenèse des deux types neuronaux sur lesquels mes travaux de thèse ont porté : les MNs et les CRs.

La neurogenèse débute par la formation des MNs à partir de E9 chez la souris, puis se poursuit par celle des INs, ventraux puis dorsaux qui se termine vers E12,5 (Nornes and Carry 1978). La gliogenèse a ensuite lieu à partir de E13,5.

Le domaine pMN va donner naissance aux MNs entre E9 et E11 (Nornes and Carry 1978, Arber et al. 1999) puis aux oligodendrocytes à partir de E13,5. Je détaillerai la spécification des MNs dans la prochaine sous-partie. Le domaine p0 va donner naissance aux INs V0 (Pierani et al. 2001). La neurogenèse des INs V0 a lieu entre E9,5 et E13,5 chez la souris (Moran-Rivard et al. 2001). Les INs V0 générés sont subdivisés en quatre sous-types d'INs V0 identifiés : V0_V, V0_D, V0_G et V0_C (**figure 2**). Le domaine p1 va donner naissance aux INs V1. La neurogenèse des INs V1 a lieu entre E9,5 et E12,5 chez la souris. Parmi les INs V1 générés, deux sous-types ont été identifiés : les CRs et les INs Ia (**figure 2**). Néanmoins les connaissances tendent à montrer que les autres INs V1 ne constituent pas un ensemble génétiquement homogène mais qu'il y aurait beaucoup d'autres sous-types d'INs V1 (50 sous-ensembles transcriptionnels d'INs V1 selon les profils d'expression de 19 FTs (Bikoff et al. 2016)). Je détaillerai la spécification des CRs dans une prochaine sous-partie. Le domaine p2 va donner naissance aux INs V2. La neurogenèse des INs V2 débute à E10 chez la souris (Francius 2007). Il existe à ce jour trois sous-types d'INs V2 identifiés : V2a, V2b et V2c (**figure 2**). Enfin le domaine p3 va donner naissance aux INs V3, qui se subdivisent en deux sous-types identifiés : les INs V3_V et V3_D (**figure 2**). La neurogenèse des INs V3 a lieu à partir de E10,5 chez la souris (Borowska et al. 2013, Briscoe et al. 1999).

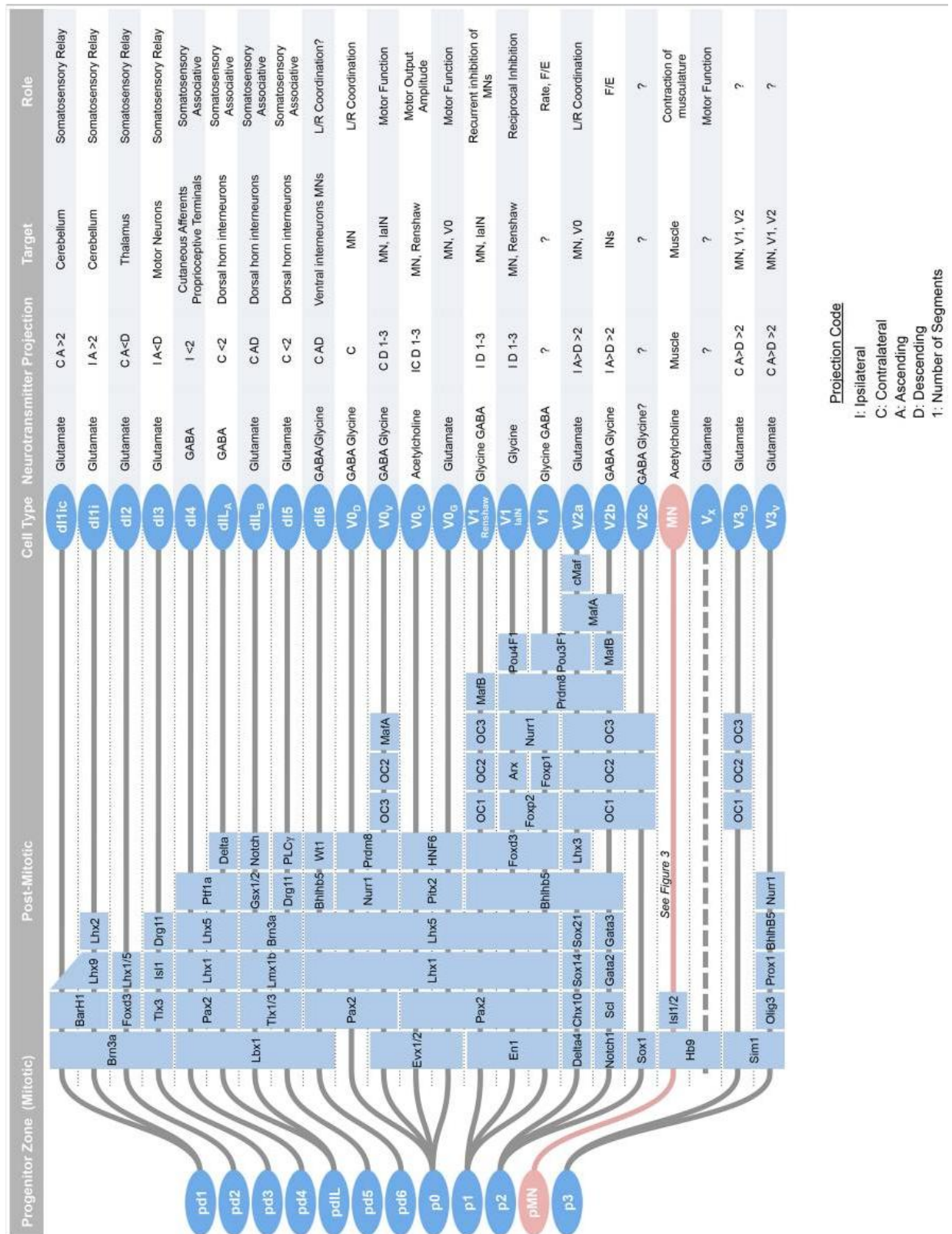


Figure 2 : Programmes génétiques embryonnaires (expression des facteurs de transcription) mis en jeu dans la génération de la diversité des neurones spinaux.
 Source : Lu et al. 2015.

1.2.3 Spécification des motoneurones

Les MNs sont les seuls neurones spinaux dont l'axone sort de la moelle épinière pour projeter directement sur les muscles. Chez l'adulte il existe une diversité de MNs qui se distinguent par leur localisation, l'identité du muscle sur lequel ils projettent et les marqueurs moléculaires qu'ils expriment (pour revue voir Dasen and Jessell 2009).

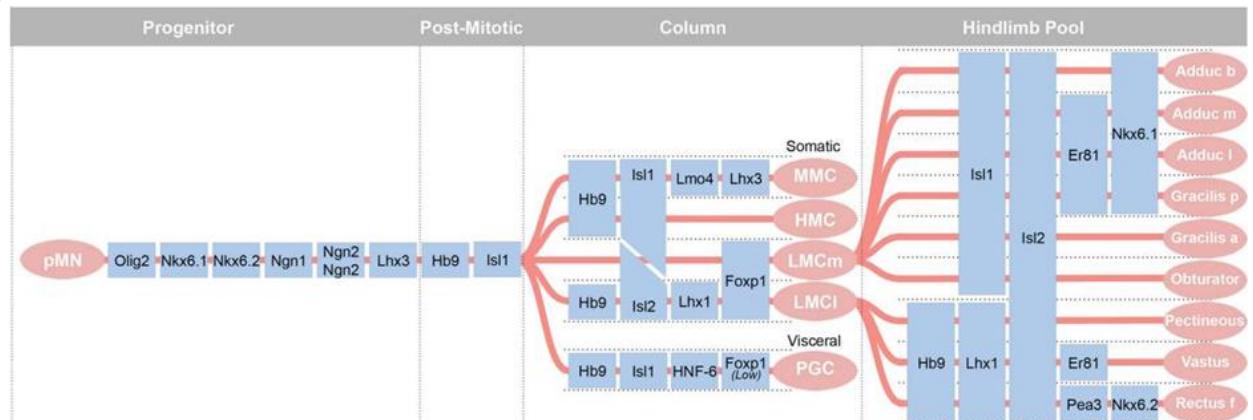
La neurogenèse des MNs débute à E9 et se termine à E11 chez la souris (Nornes and Carry 1978, Arber et al. 1999). Les MNs les plus rostraux et ventraux naissent en premier (Nornes and Carry 1978). Tous les MNs nouvellement générés sont caractérisés par l'expression des FTs Hb9 et Islet 1. Ils vont ensuite se spécifier et différencier davantage pour acquérir différentes identités (Francius and Clotman 2014, Stifani 2014). La diversification des sous-types de MNs dépend de leur localisation rostro-caudale et médio-latérale, et des combinaisons temporelles spécifiques de l'expression de FTs (**figure 3**).

Ainsi un premier niveau de subdivision s'établit au cours du développement : l'établissement des colonnes motrices de MNs selon les axes rostro-caudal et médio-latéral. L'organisation de ces colonnes motrices va de pair avec la subdivision en différents types de muscles innervés (**figure 3**). Six colonnes motrices ont été identifiées à ce jour et leur origine embryonnaire déterminée (Stifani 2014). La colonne motrice latérale (LMC), s'étend aux niveaux lombaire et brachial, les MNs de la LMC innervent les muscles somatiques des membres. La colonne motrice médiale (MMC), localisée à tous les niveaux spinaux, innerve les muscles somatiques axiaux. La colonne motrice hypaxiale (HMC), localisée au niveau thoracique, innerve les muscles abdominaux et intercostaux. La colonne motrice préganglionique (PGC), s'étend de la fin du niveau brachial jusqu'au début du niveau lombaire et innerve les muscles viscéraux. La colonne motrice phrénique (PMC), localisée au niveau cervical, innerve les muscles du diaphragme. La colonne spinale accessoire (SAC), localisée au niveau cervical, innerve les muscles mastoïdes et les muscles du cou.

Un second niveau de subdivision s'établit aussi au cours du développement, organisant au sein des colonnes motrices les MNs qui innervent un seul et même muscle en pools.

Les différentes combinaisons temporelles de FTs dans chaque colonne et pool de MNs va dicter le développement de l'identité de chaque type de MNs (la trajectoire de l'axone, sa connectivité et l'identité du muscle cible) (Dasen and Jessell 2009).

A



B

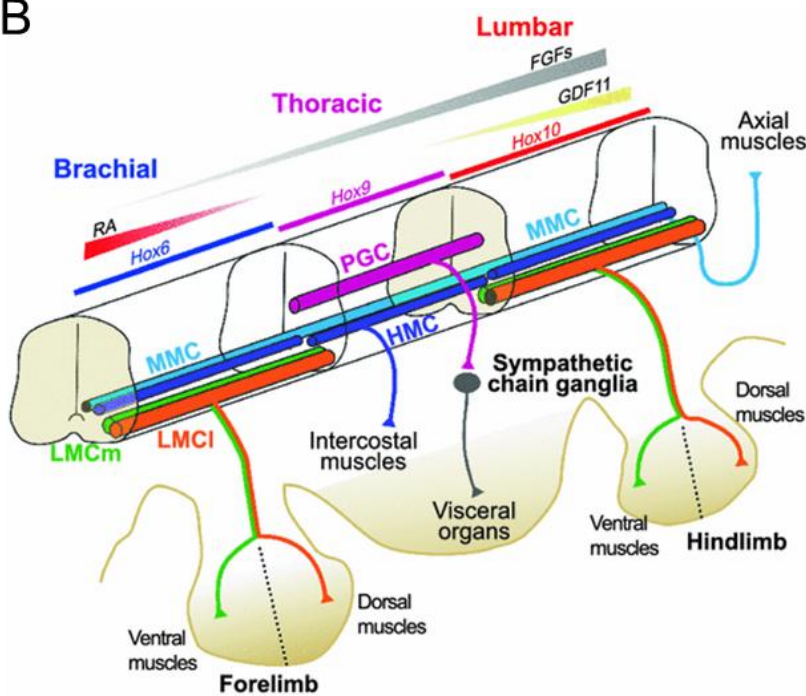


Figure 3 : Diversité des motoneurones. A) Programmes génétiques embryonnaires (expression des facteurs de transcription) mis en jeu dans la génération des sous-types de MNs. **B)** Organisation des colonnes motrices de MNs selon les axes rostro-caudal (du niveau brachial au niveau lombaire) et médio-latéral. Les colonnes motrices SAC et PMC, localisées au niveau cervical ne sont pas représentées ici. Sources : Lu et al. 2015, Francius and Clotman 2014.

1.2.4 Spécification des cellules de Renshaw

a) Qu'est-ce qu'une cellule de Renshaw ?

Le concept de cellule de Renshaw a été découvert par Birdsey Renshaw en 1941-1946 (Renshaw 1946). Ce neuroscientifique américain (1911-1948) a découvert l'effet inhibiteur sur les MNs de la stimulation antidromique des racines ventrales. Il postulait l'existence de connexions entre les collatérales des MNs et des INs. En enregistrant l'activité de ces potentiels INs spinaux ventraux, il a découvert que certains de ces INs émettent de façon répétée et prolongée des potentiels d'action (PA) à haute fréquence suite à la stimulation antidromique des MNs. John Carew Eccles et ses collaborateurs démontrèrent en 1954 que cette action inhibitrice sur les MNs par la stimulation antidromique des MNs, passe par une transmission monosynaptique cholinergique *via* des synapses que font les collatérales des MNs sur les INs ventraux, appelés désormais cellules de Renshaw (CRs) (Eccles et al. 1954). Les CRs sont les seuls neurones qui reçoivent des connections monosynaptiques provenant des MNs.

Les CRs appartiennent à la classe des INs V1 (représentent environ 10 % des INs V1). Chez l'adulte, elles libèrent de la glycine principalement et du GABA, leur conférant une action inhibitrice. Les CRs reçoivent des synapses cholinergique et glutamatergique excitatrices provenant des collatérales des MNs alpha (Nishimaru et al. 2005) avec lesquels elles forment en retour une synapse glycinergique/GABA inhibitrice. Ces connections que les CRs font sur les MNs forment ce qu'on appelle les circuits d'inhibition récurrente (**figure 4**). Les CRs forment également des synapses sur les MNs alpha des muscles synergistes, sur les CRs innervant les MNs des muscles antagonistes ainsi que sur les MNs gamma.

Cette inhibition récurrente qu'exercent les CRs sur les MNs a pour effet de limiter la fréquence de décharge des MNs. Les CRs jouent ainsi un rôle dans la régulation de la contraction musculaire, *via* l'auto-modulation de l'activation des MNs d'un muscle donné et des muscles synergistes.

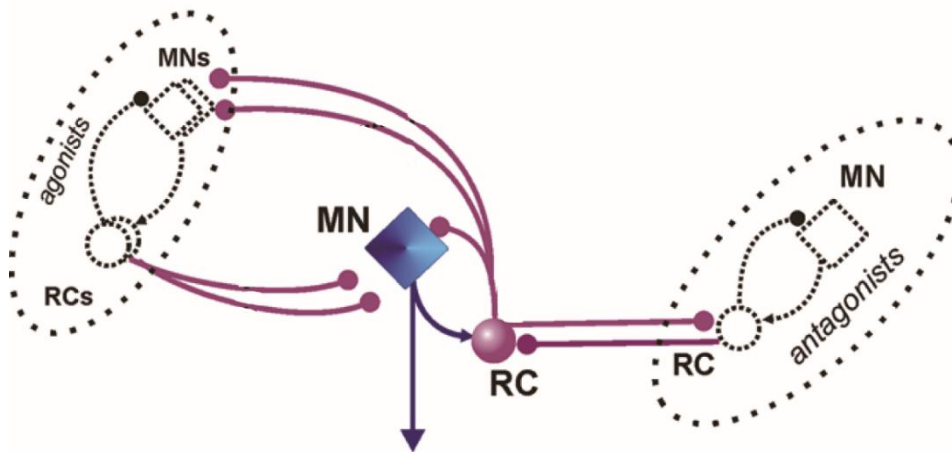


Figure 4 : Connexions des cellules de Renshaw avec les motoneurones et vice-versa. Les projections des CRs sont ipsilatérales. Les CRs sont excitées par les collatérales des MNs (qui bifurquent de l'axone avant qu'il sorte de la moelle épinière). La fonction principale des CRs matures, est d'inhiber des MNs. Elles inhibent les MNs qui les excitent, ainsi que les MNs innervant des muscles synergistes. Ces connexions que les CRs font sur les MNs forment ce qu'on appelle les circuits d'inhibition récurrente. A noter que l'existence d'inhibition récurrente n'a pas été montrée dans tous les segments de la moelle épinière. *Adapté de Markin et al. 2016.*

b) Spécification des cellules de Renshaw

Comme tous les autres neurones, la spécification des CRs repose sur le contrôle temporel de leur neurogenèse et un programme transcriptionnel temporel spécifique (pour revue voir Alvarez et al. 2013). La spécification des CRs repose sur l'expression des FTs *Engrailed-1*, *Foxd3*, *Oc1*, *Oc2* et *MafB* (Stam et al. 2012). Ces FTs jouent chacun un rôle essentiel dans l'induction et le maintien du phénotype des CRs et leur survie (**figure 5**).

Les progéniteurs du domaine p1 sortent du cycle cellulaire pour générer toute la diversité des INs V1 à partir de E9,5 jusqu'à E12,5 chez la souris. Dès qu'ils deviennent post-mitotiques, tous les INs V1 sont caractérisés par l'expression des FTs *Engrailed-1* et *Foxd3*. L'expression de *Engrailed-1* diminue à partir de E13 (Saueressig et al. 1999) tandis que celle de *Foxd3* perdure pendant plus longtemps (Stam et al. 2012). Les CRs sont parmi les premiers INs V1 à être générés, lors d'une première vague de neurogenèse, entre E9,5 et E10,5 chez la souris (Stam et al. 2012, Benito-Gonzalez and Alvarez 2012). Les CRs migrent ensuite ventro-latéralement, jusqu'au bord ventral que forme la corne ventrale avec le funiculus ventral et se placent à proximité des MNs. Les INs V1 précoces, générés lors de cette première vague de neurogenèse, expriment la calbindine (protéine chélatrice du calcium). Seules les CRs vont maintenir l'expression de calbindine chez l'adulte ; les autres INs V1

précoces cesseront d'exprimer la calbindine en période postnatale. Chez l'embryon, l'expression de la calbindine dans les INs V1 situés ventro-latéralement aux pools de MNs, représente un marqueur moléculaire spécifique des CRs. La **figure 5** résume les étapes clés de l'ontogenèse des CRs à partir des progéniteurs p1.

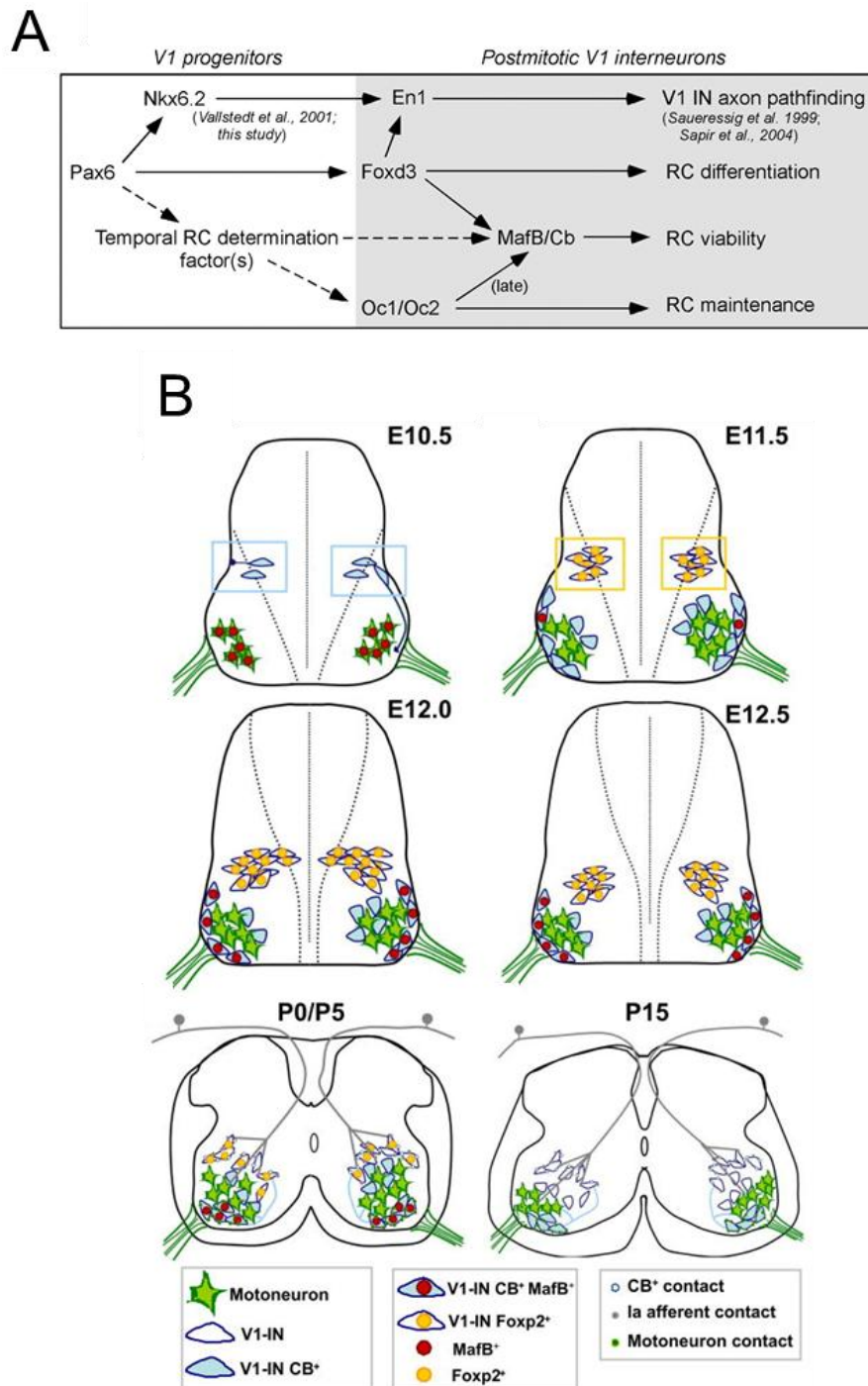


Figure 5 : Résumé de l'ontogenèse des cellules de Renshaw à partir des progéniteurs p1. A) Programme génétique transcriptionnel qui contrôle la différenciation des CRs à partir des progéniteurs du domaine p1. *Source* : Stam et al. 2012. **B)** Deux vagues de neurogenèse des INs V1 chez la souris. La première phase (E9,5 et E10,5) produit les CRs, désignées comme les « V1-IN CB⁺ », qui migrent

ventro-latéralement aux MNs. La deuxième phase (E10,5-E12,5) produit d'autres INs V1 comme les INs Ia, n'exprimant pas la calbindine. RC = *Renshaw cells*. CB = calbindine. Source : Benito-Gonzalez and Alvarez 2012.

1.3 Développement de la connectivité dans la moelle épinière ventrale

La mise en place de la connectivité dans la moelle épinière ventrale implique une série d'événements : l'expression des neurotransmetteurs des neurones spinaux, le développement de leurs neurites puis l'orientation vers les cibles adéquates et enfin l'établissement des synapses. Mes travaux de thèse ayant porté sur les CRs et les MNs embryonnaires, je ne présente ici que la mise en place des phénotypes GABAergique/glycinergique et cholinergique.

1.3.1 Ontogenèse de l'expression des neurotransmetteurs dans les neurones spinaux ventraux

a) Le GABA et la glycine

Les travaux de Pascal Branchereau et ses collaborateurs ont décrit l'ontogenèse de l'expression du GABA et de la glycine dans la moelle épinière durant le développement embryonnaire chez la souris, à partir de E9,5 jusqu'à P0 (Allain et al. 2004, Allain et al. 2006). L'expression du GABA et de la glycine est d'abord détectée dans la région ventrale de la moelle épinière, à partir de E11,5-E12,5 au niveau cervical. Le système GABAergique se met en place un jour avant le système glycinergique : au niveau cervical, les premiers marquages de cellules GABAergiques sont détectés à E11,5 tandis que ceux des cellules glycinergiques sont détectés à E12,5. Notez que la mise en place des populations GABAergiques et glycinergiques se fait selon un gradient rostro-caudal et ventro-dorsal : par exemple, un décalage d'environ un jour existe dans l'apparition et la maturation des populations GABAergiques et glycinergiques entre le niveau cervical et le niveau lombaire.

A E12,5, l'expression du GABA est détectée dans la substance grise ventrale au niveau de corps cellulaires localisés autour des colonnes de MNs, ainsi qu'à proximité de la zone ventriculaire. On trouve aussi la présence de fibres GABAergiques dans les zones marginales ventro-latérale et ventro-médiane. A E12,5 l'expression de la glycine est détectée principalement dans les fibres de la glie radiaire (Scain et al. 2010). De très rares corps

cellulaires de neurones semblent exprimer la glycine à cet âge. L'expression des deux neurotransmetteurs dans la corne ventrale augmente ensuite jusqu'à E13,5-E15,5. Puis l'expression du GABA diminue entre E15,5 et P0, tandis que celle de la glycine est stable. Le système glycinergique devient majoritaire aux stades tardifs du développement jusqu'aux stades adultes. Il est important de rappeler que l'effet de l'activation des récepteurs ionotropiques GABAergiques et glycinergiques est dépolarisant et excitateur dans les neurones immatures pour devenir inhibiteur dans les neurones matures. Dans les MNs spinaux, l'action du GABA et de la glycine est excitatrice jusque E15,5 chez la souris (Delpy et al. 2008). Ce changement excitateur/inhibiteur repose sur la diminution du potentiel d'équilibre au chlore (E_{Cl^-}) durant la maturation des neurones. Au début du développement, l' E_{Cl^-} est supérieur au potentiel de membrane des neurones et au potentiel de déclenchement des PA, tandis qu'aux stades plus tardifs du développement et chez l'adulte, l' E_{Cl^-} a une valeur proche du potentiel de membrane au repos des neurones. La diminution de l' E_{Cl^-} au cours du développement est due à une modification de la balance de l'activité de deux transporteurs du Cl^- : le co-transporteur K^+/Cl^- de type KCC2 responsable de la sortie de Cl^- et le co-transporteur $Na^+/K^+/Cl^-$ de type NKCC1 responsable de l'entrée de Cl^- (Rivera et al. 1999, Delpy et al. 2008). Dans les MNs spinaux il a été montré que l'inactivation et la diminution de l'expression de NKCC1 couplées à une augmentation de l'expression de KCC2 au cours du développement sous-tendent le changement excitateur/inhibiteur de l'action du GABA et de la glycine (Delpy et al. 2008, Stil et al., 2009).

Les premières évidences de l'expression du GABA par les CRs embryonnaires ont été montrées à E15,5 chez la souris (Sapir et al. 2004). Par ailleurs, indirectement d'après la localisation connue des CRs embryonnaires (Benito-Gonzalez and Alvarez 2012, Stam et al. 2012) et les immunomarquages du GABA et de la glycine réalisés sur des coupes de moelle épinière aux niveaux brachial et lombaire d'embryons (Allain et al. 2004, Allain et al. 2006), les CRs *à priori* exprimeraient du GABA à partir de E12,5 et de la glycine à partir de E13,5.

b) L'acétylcholine

Dans le réseau spinal mature, il existe des populations de neurones cholinergiques autres que les MNs. Chez le rat, les cellules cholinergiques de partition et les cellules cholinergiques du canal central ont été décrites (Barber et al. 1984, Phelps et al. 1984). Des études plus récentes ont décrit un sous-type d'INs V0 cholinergiques : les INs V0_C, identifiés par

l'expression du FT Pitx2 (Zagoraïou et al. 2009, Enjin et al. 2010). Ces INs sont localisés proche du canal central. Certains auteurs ont proposé que les INs Pitx2⁺ seraient les cellules de partition (Enjin et al. 2010).

Chez l'embryon, la choline acétyltransférase (ChAT), enzyme de synthèse de l'ACh est détectée chez la souris à partir de E9,5 (Stifani et al. 2008) et n'est exprimée que par les MNs, du moins jusque E12,5-E13,5 (Sharma et al. 1998, Cho et al. 2014). Les INs V0_C ont été mis en évidence à E11,5 chez la souris, localisés à proximité de la zone ventriculaire (Zagoraïou et al. 2009), mais aucune étude à ma connaissance ne montre que ces INs expriment l'ACh ou la ChAT à ces stades embryonnaires précoces. Néanmoins, une étude a montré qu'à E14,5 chez le rat, la ChAT est fortement détectée dans la zone des MNs, mais aussi dans quelques neurones à proximité de la zone ventriculaire (Phelps et al. 1990). La localisation de ces neurones ChAT⁺ indique que ces INs seraient les INs V0_C. Le stade E14,5 chez le rat correspond à environ E13 chez la souris. L'ensemble de ces données indique qu'avant ~ E13 chez la souris, l'ACh n'est exprimée que par les MNs.

1.3.2 Croissance des neurites des motoneurones et des cellules de Renshaw

Les MNs, dès qu'ils sont générés, étendent leur axone en dehors de la moelle épinière formant ainsi les racines ventrales (à partir de E9,5 chez la souris). Puis les axones se développent en direction des muscles. Les axones des MNs se regroupent au niveau du plexus à la base des bourgeons des membres puis se subdivisent en faisceaux pour aller innerver des muscles spécifiques. Les axones des MNs entrent dans les muscles à E12-E13 chez la souris (Carry et al. 1983). En fonction des sous-types de MNs, leurs axones suivent des trajectoires bien définies jusqu'aux muscles qu'ils vont innerver (Kania 2014) (Bonanomi and Pfaff 2010).

Les axones des premiers INs V1 générés, sortent dès E9 de la corne ventrale vers le funiculus ventral, puis se développent suivant l'axe caudo-rostral à E10,5-E12,5 chez la souris. Les axones projettent ensuite dans la corne ventrale ipsilatérale à proximité des MNs (Saueressig et al. 1999). Il a été montré plus spécifiquement que la croissance des axones des CRs commence à E10,5 pour atteindre le funiculus à E11,5 (Benito-Gonzalez and Alvarez 2012). Leurs projections, décrites à E13,5 et en postnatal (Sapir et al. 2004), s'étendent bidirectionnellement en rostral et caudal.

1.3.3 Mise en place de la connectivité intra-spinale

a) Couplage électrique

Le couplage électrique est très présent durant le développement embryonnaire, puis diminue au cours de la maturation postnatale jusqu'à représenter une minorité des modes de transmission dans les réseaux matures chez l'adulte.

Dans la moelle épinière ventrale, dès le début du développement, la présence de couplages électriques a été démontrée entre les progéniteurs (Bittman et al. 2004). Puis l'existence d'un couplage électrique entre les MNs a été mise en évidence à la fin de leur différenciation (à E14-E16 chez la souris (Bittman et al. 2004)). Cependant, au début du développement, les MNs couplés électriquement ne sont pas tous du même sous-type et peuvent aussi être couplés avec d'autres types de neurones (Bittman et al. 2004). Le couplage électrique entre les MNs d'un même pool innervant un seul et même muscle s'établit donc au cours du développement embryonnaire pour être en place à la naissance puis diminue au fur et à mesure que les synapses chimiques se forment.

Concernant les CRs, aucune étude à ma connaissance n'a mis en évidence de couplage électrique aux stades embryonnaires. Par contre, il existe un couplage électrique entre les CRs aux stades postnataux chez la souris (Lamotte d'Incamps et al. 2012).

b) Transmission chimique

Les premières preuves de l'existence de synapses sont observées à E11-E12 chez la souris (Vaughn 1989) et les premières preuves d'une activité synaptique sont observées à E12,5 sur le MN (Scain et al. 2010) (Czarnecki et al. 2014).

La présence d'une connectivité récurrente fonctionnelle entre les CRs et les MNs n'a été mise en évidence qu'à partir des stades embryonnaires tardifs (E18,5 chez la souris (Sapir et al. 2004) ; E6-E7 chez le poulet (Xu et al. 2005)). Il est important de rappeler que ce circuit est excitateur aux stades précoces du développement, l'action du GABA et de la glycine étant dépolarisante (Delpy et al. 2008).

1.3.4 Mise en place de la connectivité extra-spinale

La majorité des travaux ayant étudié l'établissement et la maturation des circuits afférents et efférents de la moelle épinière ont été faits chez le poulet et le rat (pour revue voir Vinay et al. 2000). Les études chez la souris sont aujourd'hui moins nombreuses.

Le réseau spinal ventral est électriquement « isolé » du reste du SNC, du SNP et des muscles avant ~ E14 chez la souris. C'est à partir de ~ E14 que les afférences périphériques sensorielles et les afférences supraspinales descendantes s'établissent (pour revue voir Ladle et al. 2007). Il faut garder à l'esprit qu'il existe un décalage d'un ou deux jours dans le développement rostro-caudal de la moelle épinière. La partie cervicale de la moelle épinière reçoit les afférences extra-spinales avant la partie lombaire par exemple.

Les premières synapses neuromusculaires se forment aux alentours de E14,5 chez la souris (Carry et al. 1983, Pun et al. 2002). Cependant il est possible que les MNs libèrent de l'ACh avant l'établissement des jonctions neuromusculaires, comme cela a été montré chez le xénope (Young and Poo 1983, Sun and Poo 1987). Les MNs embryonnaires de xénope mis en culture avec des muscles, libèrent spontanément de l'ACh par leur soma et leur cône de croissance axonal, avant la formation de synapses neuromusculaires.

Les connexions sensori-motrices spinales *via* les projections des neurones proprioceptifs sur les MNs s'établissent à partir d'environ E16-E17 chez la souris (Mears and Frank 1997, Chen and Frank 1999).

Parmi les afférences supraspinales descendantes, les projections sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé sont parmi les premières à envahir la moelle épinière (Ballion et al. 2002). Elles s'étendent jusqu'aux niveaux cervicaux à E12,5 chez la souris, jusqu'aux niveaux thoraciques à E14,5 et jusqu'aux niveaux lombaires à E16,5. Les afférences provenant du cortex s'établissent plus tard en période néonatale (Bareyre et al. 2005).

1.3.5 Schéma résumé de la maturation et de l'intégration des cellules de Renshaw dans le réseau spinal ventral

La **figure 6** résume l'ensemble des étapes de l'intégration des CRs dans le réseau spinal ventral, de leur « naissance » jusqu'aux stades adultes chez la souris. Il récapitule les étapes clés du développement jusqu'au réseau mature en les divisant en cinq périodes. Si le schéma

indique la présence d'une connectivité récurrente entre les CRs et les MNs à E13-E16, basé sur des immunomarquages des interactions entre les CRs les MNs (Alvarez et al. 2013), la fonctionnalité de cette connectivité récurrente n'a jamais été clairement établie avant E18,5 (Sapir et al. 2004).

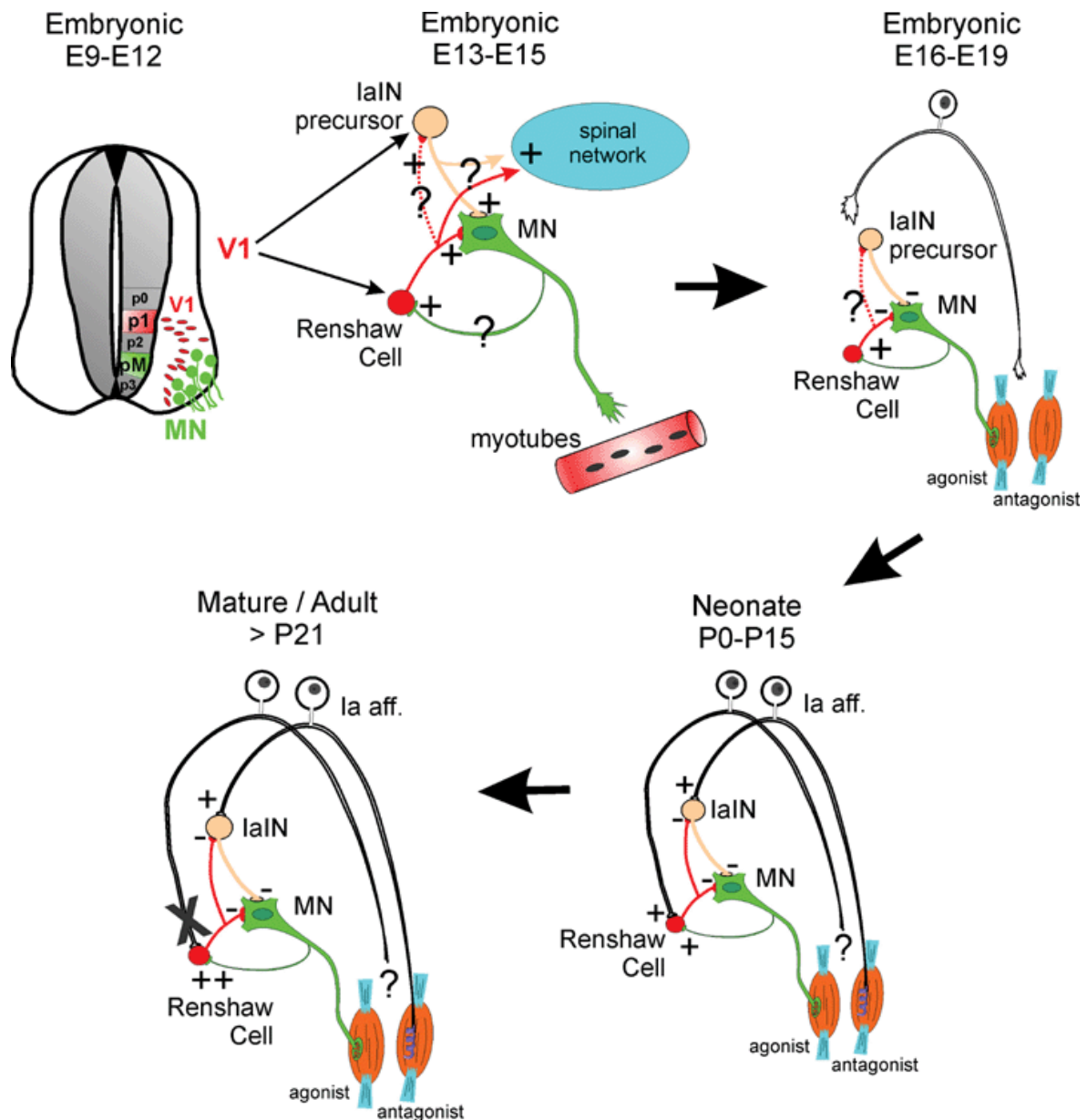


Figure 6 : Schéma résumant les changements dans l'intégration des cellules de Renshaw dans le réseau spinal ventral au cours du développement. Source : Alvarez and Fyffe 2007.

Chapitre 2 : Activité spontanée du réseau spinal ventral au cours du développement embryonnaire

2.1 Description et rôles de l'activité spontanée du réseau spinal en développement

2.1.1 Généralités

Dès la génération et mise en place des premiers groupes de neurones, la plupart des structures nerveuses du SNC en formation, génère spontanément des activités électriques récurrentes (pour revues voir O'Donovan 1999, Blankenship and Feller 2010). C'est le cas de la moelle épinière, du tronc cérébral, de l'hippocampe, du cortex, de la rétine, de la cochlée, ou encore du cervelet. La moelle épinière est l'une des structures du SNC dans laquelle apparaît le plus précocement une activité spontanée, durant la période embryonnaire (pour revue voir Momose-Sato and Sato 2013). Ces activités spontanées précoces sont retrouvées chez plusieurs espèces (le rat, la souris, le poulet, le xénope, le poisson zèbre). Ces activités sont dites spontanées car elles sont générées de façon autonome, indépendamment de toute afférence (stimulus sensoriel ou entrées d'autres structures nerveuses). La structure nerveuse générant une telle activité spontanée continuera de la générer même si elle est isolée du reste de l'organisme. Durant le développement on parle d'activité spontanée générée dans une structure nerveuse, lorsque les entrées sensorielles ne sont pas encore établies. Ces activités spontanées ont été décrites avant et après la mise en place des synapses chimiques (pour revue voir Spitzer 2006).

Par exemple dans l'hippocampe et le cortex en développement, une séquence temporelle de différents patrons d'activité spontanée a été décrite aux stades embryonnaires tardifs et postnataux (Crépel et al. 2007, Allene et al. 2008). Un premier profil d'activité (à partir de E16 dans l'hippocampe et E20 dans le cortex, chez la souris) est caractérisé par des flux transitoires calciques appelés PA calciques qui apparaissent sporadiquement dans une minorité de cellules. Ces PA calciques ne sont pas synchronisés entre les neurones. Un deuxième profil d'activité est caractérisé par des plateaux calciques générés et synchronisés

par des petits groupes de neurones. Ce patron d'activité, appelé SPA (= *synchronous plateau assemblies*), reflète l'émergence d'une cohérence entre l'activité des neurones. Ce second patron d'activité est dépendant du couplage électrique par les jonctions gap mais ne dépend pas de l'activité de synapses chimiques. Enfin un troisième profil d'activité est caractérisé par des dépolarisations géantes, appelées GDPs (= *giant depolarizing potentials*) (Ben-Ari et al. 1989) ou des longues vagues d'oscillations calciques, appelées cENO (= *cortical early network oscillations*). Ces deux patrons d'activité résultent de l'activation synchrone d'un plus grand nombre de neurones. Ce troisième type d'activité est dépendant de la neurotransmission synaptique. L'hippocampe et le cortex en formation, génèrent donc spontanément d'abord une activité asynchronisée et non corrélée dans une minorité de cellules, remplacée ensuite par une activité synchronisée et corrélée à un plus grand nombre de cellules.

Dans la moelle épinière, il a été décrit chez l'embryon de xénope des formes d'activités spontanées avant la formation des synapses (Gu et al. 1994). Les neurones spinaux embryonnaires génèrent deux types de flux transitoires calciques : les PA calciques et les vagues calciques. Ces activités spontanées très précoces ne sont pas corrélées entre les neurones. Plus tard au cours du développement embryonnaire, lorsque les neurones forment des premiers contacts, d'où émerge des premiers circuits neuronaux, l'activité spontanée dans la moelle épinière résulte de l'activation synchrone des neurones du réseau (pour revue voir Momose-Sato and Sato 2013). Cette activité spontanée du réseau spinal (SNA pour *spontaneous network activity*) concerne toute la moelle épinière selon l'axe rostro-caudal. La SNA est générée dans la partie ventrale et la partie dorsale de la moelle épinière (Momose-Sato et al. 2012). Il a été montré chez le poulet qu'elle apparaissait d'abord dans la région ventrale avant de se propager à la région dorsale (O'Donovan et al. 1994, Arai et al. 2007).

Bien que la plupart des travaux aient étudié dans différentes espèces la SNA de la moelle épinière d'une part (O'Donovan 1999, Hanson and Landmesser 2003, Yvert et al. 2004, Ren and Greer 2003) et la SNA du tronc cérébral d'autre part (Abadie et al. 2000, Fortin et al. 1995, Bosma 2010, Thoby-Brisson et al. 2005), les travaux de Yoko Momose-Sato et ses collaborateurs ont montré que la SNA spinale et la SNA du tronc cérébral ne sont pas indépendantes, mais qu'il s'agit plutôt des vagues d'activité qui concernent l'ensemble de la moelle épinière et du tronc cérébral (pour revue voir Momose-Sato and Sato 2013). Cependant les deux structures nerveuses isolées (la moelle épinière et le tronc cérébral) sont toutes les deux capables de générer une SNA. Bien que l'origine de la SNA soit

majoritairement dans les régions les plus rostrales aux premiers stades de son apparition, puis dans les régions plus caudales à des stades développementaux plus tardifs, n'importe quelle région de la moelle épinière (cervicale, thoracique, lombaire) est capable de générer une SNA quand elle est isolée (Ren and Greer 2003, Yvert et al. 2004). La SNA du réseau spinal se caractérise par des GDPs dans les MNs, qui sont, dès leur apparition, dépendants à la fois de la neurotransmission chimique et du couplage électrique par les jonctions gap (Czarnecki et al. 2014).

2.1.2 Rôle de l'activité spontanée dans la moelle épinière

Il a été montré que l'activité spontanée influence de nombreux processus cellulaires développementaux comme la prolifération, la migration, la croissance et le guidage axonal, la différenciation neuronale, l'excitabilité intrinsèque et le raffinement des synapses (pour revues voir Blankenship and Feller 2010, Spitzer 2006, Kirkby et al. 2013).

Les rôles des activités spontanées dans le développement de la moelle épinière embryonnaire ont été étudiés *via* des expériences d'altération des activités (suppression, diminution, augmentation). Les conséquences de l'altération de l'activité spontanée ont été évaluées sur les processus cellulaires mis en jeu dans la formation et maturation du réseau spinal. Elles peuvent refléter un rôle attribué à l'activité spontanée dans un de ces processus cellulaires mais également rendre compte de régulation homéostatique pour compenser l'activité perturbée.

Chez le xénope, la fréquence de l'activité neurale diffère entre les différentes sous-classes de neurones spinaux et régule la nature du neurotransmetteur exprimé (Borodinsky et al. 2004). En effet, il a été montré que des modifications de l'incidence et la fréquence des flux calciques transitoires spontanés altèrent l'expression des neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs dans la moelle épinière d'embryon de xénope. Ces modifications ont été attribuées à une régulation homéostatique : la suppression de l'activité conduit à une augmentation du nombre des neurones exprimant des neurotransmetteurs excitateurs (ACh et glutamate) et une diminution du nombre des neurones exprimant des neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA et glycine). L'inverse a lieu quand l'activité est augmentée. Par ailleurs, une étude a montré qu'à la suite d'une diminution de l'activité spontanée chez l'embryon de poulet *in ovo*, certaines caractéristiques d'excitabilité cellulaire intrinsèque des MNs sont modifiées (augmentation

de la fréquence de décharge, augmentation des courants sodiques et diminution des courants potassiques) (Wilhelm et al. 2009). Ces modifications sont aussi assimilées à un processus de régulation homéostatique pour compenser la diminution d'activité. Une autre étude a montré que bloquer la libération synaptique dépendante du calcium retarde la maturation des propriétés d'excitabilité intrinsèque des MNs embryonnaires d'explants de moelle épinière de rat (Xie and Ziskind-Conhaim 1995). Toujours dans le cadre d'une régulation homéostatique il a été montré que la diminution de l'activité spontanée chez l'embryon de poulet *in ovo* mène au renforcement des synapses AMPA et GABAergiques sur les MNs spinaux (Gonzalez-Islas and Wenner 2006).

Enfin Lynn Landmesser et ses collaborateurs ont démontré l'importance d'un patron normal d'activité pour le guidage précoce des axones des MNs spinaux vers les muscles cibles chez l'embryon de poulet. En effet la modification de la fréquence des épisodes d'activité entraîne des erreurs d'orientation dorso-ventrale et antéro-postérieure des axones des MNs lorsqu'ils convergent dans le plexus à la base des bourgeons des membres puis se regroupent en faisceaux spécifiques de l'innervation musculaire (Kastanenka and Landmesser 2010, Kastanenka and Landmesser 2013). La perturbation de la fréquence des épisodes entraîne ainsi des erreurs de l'innervation des muscles cibles (pour revue voir Hanson et al. 2008)). D'autres études faites chez le xénope, ont montré que la vitesse de croissance des neurites des neurones embryonnaires spinaux est inversement proportionnelle à la fréquence des événements calciques transitoires spontanés (Gu and Spitzer 1995, Gomez and Spitzer 1999). La suppression de ces flux calciques transitoires accélère l'extension de l'axone alors que leur augmentation ralentit la croissance axonale. L'ensemble de ces travaux mettent en évidence un rôle de l'activité spontanée dans le guidage axonal des MNs et la croissance des neurites.

2.1.3 Caractérisation de l'activité spontanée du réseau spinal ventral au cours du développement embryonnaire

L'étude des activités de la moelle épinière en développement a commencé sur l'embryon de poulet dans les années 1980. Les travaux de Michael J. O'Donovan, Lynn T. Landmesser et leurs collaborateurs ont mis en évidence, chez le poulet, les premières activités électriques spontanées de la moelle épinière embryonnaire, corrélées à une motilité spontanée de l'embryon *in ovo* (Hamburger and Balaban 1963). Ces activités apparaissent à E3,5-E4, alors

que les MNs ne font pas encore contact avec les muscles (Milner and Landmesser 1999, Hanson and Landmesser 2004). A ces stades précoces, les activités des nerfs moteurs sont synchronisées, avec néanmoins un léger décalage entre les nerfs les plus rostraux et les plus caudaux. A des stades embryonnaires plus tardifs, après l'innervation des muscles, les activités des nerfs se désynchronisent, avec la mise en place d'une alternance d'activité des nerfs à action antagoniste (pour revue voir O'Donovan 1999c). L'établissement de cette alternance est une caractéristique de la maturation des réseaux spinaux. Les activités spontanées précoces de la moelle épinière et des muscles sont d'origine neurogénique et non myogénique. Elles sont générées en absence d'entrées sensorielles et supraspinales.

Chez la souris et le rat, des activités électriques spontanées sont aussi observées dans la moelle épinière embryonnaire. Elles apparaissent après celles du rhombencéphale (E9,5-E10,5) (Bosma 2017) à E11,5-E12,5 chez la souris (Branchereau et al., 2002, Hanson and Landmesser 2003) et à E13,5 chez le rat (Nishimaru et al. 1996, Nakayama et al. 1999, Ren and Greer 2003). A ces stades, la neurogenèse est pratiquement terminée, la synaptogenèse intra-spinale commence, les MNs ne font pas de contact synaptique avec les muscles et enfin les afférences descendantes supraspinales et les afférences périphériques sensorielles n'ont pas encore envahi la moelle épinière. Des mouvements spontanés de l'embryon de souris ont été décrits à partir de E12,5 (Suzue 1996, Suzue and Shinoda 1999). Cependant l'existence d'une corrélation entre l'activité spontanée de la moelle épinière à E11,5-E12,5 et les mouvements spontanés de l'embryon n'a pas été étudiée.

L'évolution temporelle de la SNA dans la moelle épinière a été décrite au cours du développement embryonnaire chez la souris à partir d'enregistrements extracellulaires dans les racines ventrales sur une préparation de moelle épinière entière isolée (Hanson and Landmesser 2003, Yvert et al. 2004) (**figure 7**). A E11,5-E12,5, la SNA se caractérise par des bouffées rythmiques de PA de 2-5 secondes apparaissant toutes les ~ 2 minutes avec une propagation le long de la moelle épinière majoritairement selon l'axe rostro-caudal (Momose-Sato et al. 2012). Cette première activité spinale spontanée n'est pas assimilée à une activité de type locomotrice. En effet les épisodes d'activité sont synchronisés entre les deux côtés droite/gauche de la moelle épinière et sont observés à tous les niveaux rostro-caudaux (Hanson and Landmesser 2003). A E13,5, le patron d'activité est similaire à celui que l'on observe à E12,5 (Yvert et al. 2004). A E14,5, tous les travaux ne s'accordent pas sur les modifications des profils d'activité. Il est toutefois admis que l'activité de la moelle épinière se complexifie, devenant moins synchronisée et plus spécialisée dans différentes zones de la

moelle épinière (Yvert et al. 2004, Momose-Sato et al. 2012). Certains travaux ont montré que le profil d'activité se modifie avec un allongement de la durée des épisodes d'activité et une diminution de leur fréquence à E14,5 (Hanson and Landmesser 2003). Une autre étude a montré qu'à E14,5 un second patron d'activité s'ajoute, caractérisé par des épisodes plus longs (~ 20 secondes) et moins fréquents (toutes les ~ 10 minutes) (Yvert et al. 2004). A E15,5-E17,5, les activités sont davantage erratiques, certains niveaux de la moelle épinière ne générant plus de SNA (Yvert et al. 2004). A partir de E18,5, l'activité spinale devient dépendante des afférences supraspinales, et n'est dès lors plus spontanée. Induite par la sérotonine et le NMDA, l'activité spinale devient une activité de type locomotrice, caractérisée par une parfaite alternance de l'activité entre les deux côtés de la moelle épinière (Branchereau et al. 2000, Nishimaru and Kudo 2000).

En résumé, au cours du développement embryonnaire entre E11,5-E18,5 chez la souris, les activités de la moelle épinière passent d'un profil d'activité spontanée synchronisée à un patron d'activité locomotrice. La maturation de ces activités est corrélée à des modifications du réseau spinal, passant d'un réseau spinal isolé avant ~ E14,5 à un réseau connecté au reste du SNC, au SNP et aux muscles après ~ E14,5 (voir chapitre 1.3.4).

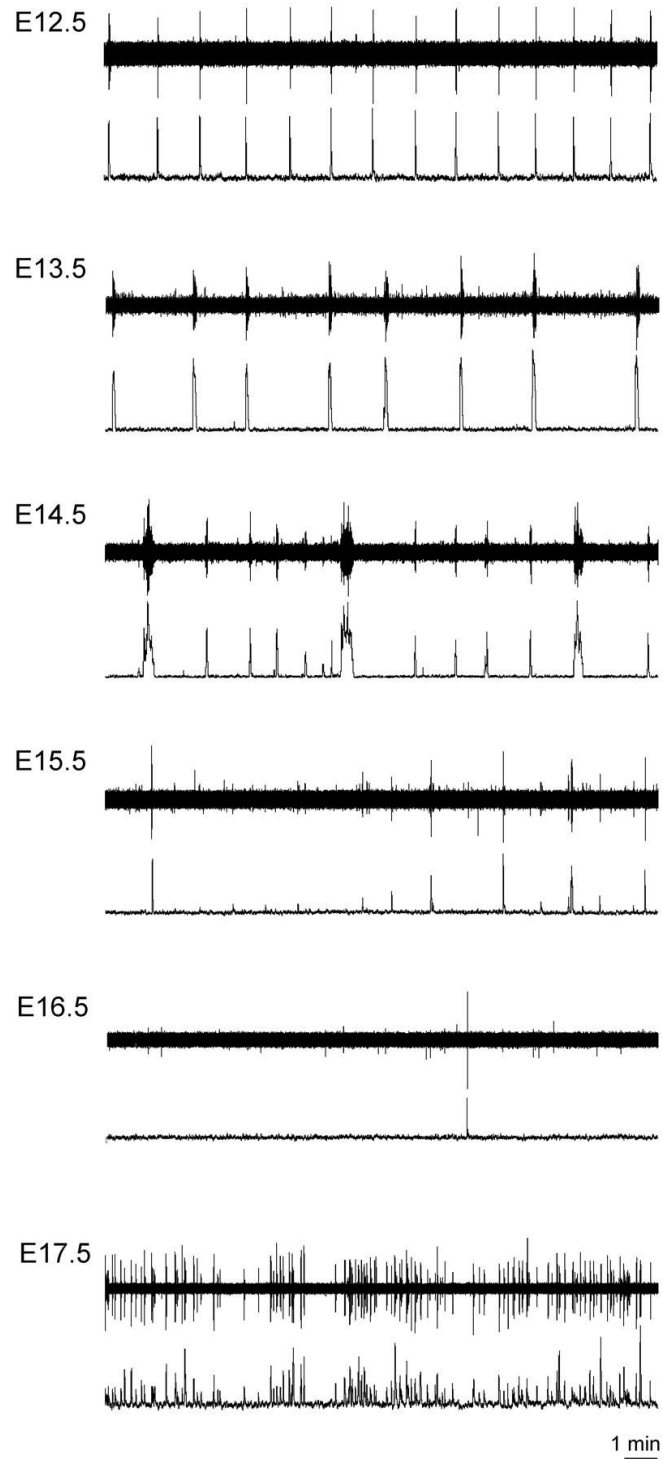


Figure 7 : Profils des activités spontanées dans la moelle épinière au cours du développement embryonnaire de souris. Enregistrement extracellulaire de racine ventrale au niveau lombaire dans une préparation de moelle épinière entière isolée. *Source* : Yvert et al. 2004.

2.2 Mécanismes impliqués dans la genèse et la propagation de l'activité spontanée dans la moelle épinière ventrale

2.2.1 Trois caractéristiques de la SNA

La SNA de la moelle épinière a trois caractéristiques majeures :

- la durée d'un épisode d'activité (plusieurs secondes),
- la rythmicité de ces épisodes d'activité (intervalle de quelques minutes),
- le niveau de synchronisation

Comprendre l'origine et ce qui détermine ces caractéristiques nécessite d'identifier les populations de cellules impliquées dans chacun des mécanismes qui sous-tendent : la génération d'un épisode d'activité, l'intervalle entre les épisodes et enfin leur propagation spatio-temporelle (pour revue voir Momose-Sato and Sato 2013). Avant tout, la génération de la SNA dans la moelle épinière embryonnaire est considérée comme un processus de synchronisation transitoire des neurones du réseau ; aucun neurone pacemaker n'ayant été identifié. Cependant il est important de noter que les études de la SNA ont été effectuées au moyen d'enregistrements électriques extracellulaires de la moelle épinière ou des nerfs moteurs, d'imagerie calcique ou encore d'imagerie *via* des fluorochromes sensibles au voltage (**figure 8**). Ce n'est qu'avec les études utilisant la technique de patch clamp qu'un certain nombre de mécanismes sous-tendant cette activité à E12,5 ont pu être identifiés (Czarnecki et al. 2014) (**figure 8**). Les travaux du laboratoire ont montré qu'en courant imposé, la SNA est caractérisée dans les MNs par des dépolarisations géantes (GDPs = *giant depolarizing potentials*) évoquant un à trois PA, et qu'en potentiel imposé elle est caractérisée par des courants géants entrants (GICs = *giant inward currents*). Ces GDPs sont la résultante d'une libération synchronisée de GABA et dans une moindre mesure de glutamate et de glycine. A ma connaissance, aucune autre étude n'a enregistré l'activité spontanée spécifique d'autres populations de neurones spinaux à E12,5 chez la souris.

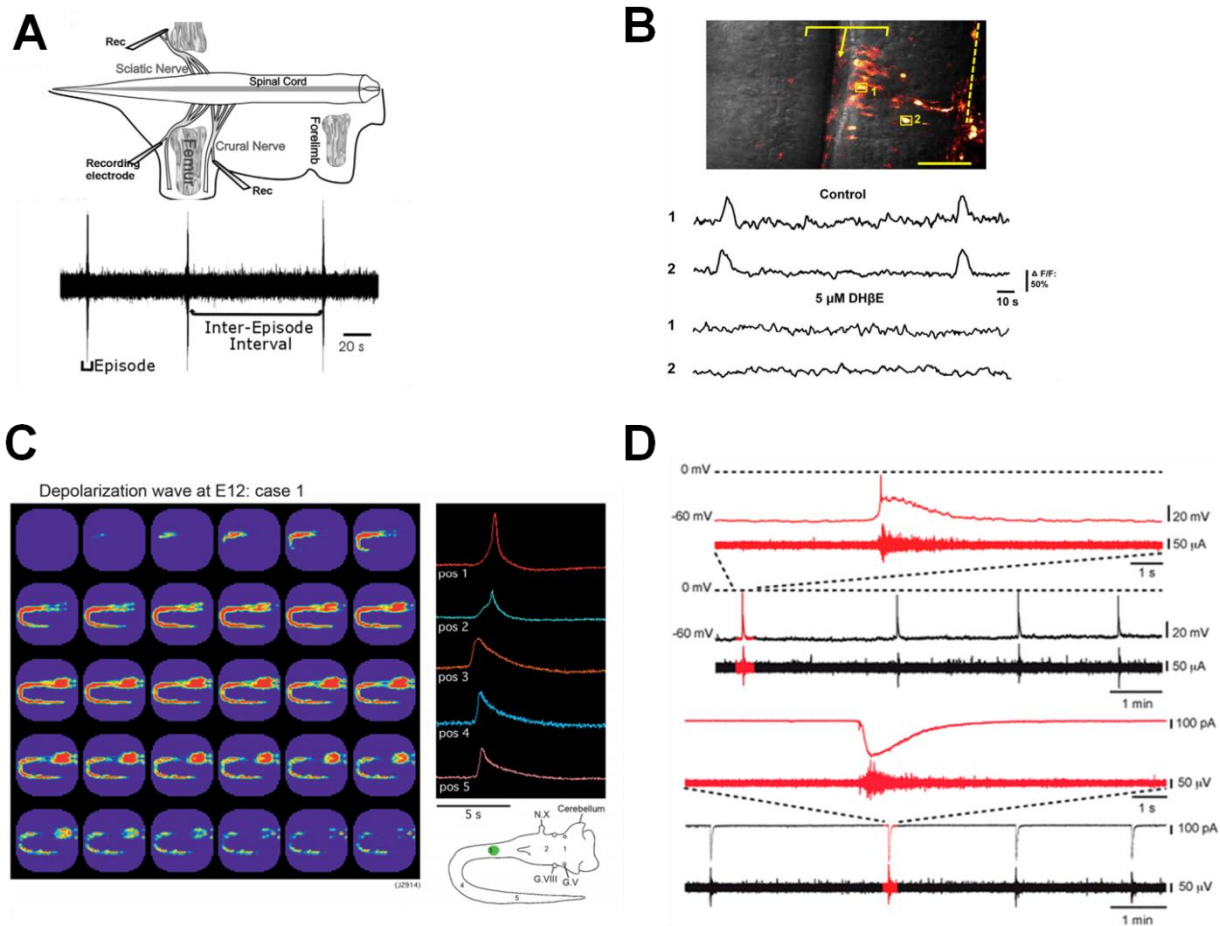


Figure 8 : SNA de la moelle épinière aux stades précoces du développement embryonnaire, enregistrée par différentes méthodes. A) Enregistrement extracellulaire des nerfs moteurs à E12,5 chez la souris. *Source* : Hanson and Landmesser 2003. **B)** Signaux d'imagerie calcique au stade 25 (~E4,5-E5) chez le poulet. *Source* : Wang et al. 2009). **C)** Signaux optiques *via* des indicateurs sensibles au voltage à E12,5 chez la souris. *Source* : Momose-Sato et al. 2012. **D)** Enregistrement en patch clamp d'un MN associé à un enregistrement extracellulaire d'une racine ventrale à E12,5 chez la souris. *Source* : Czarnecki et al. 2014.

2.2.2 Evolution de la neurotransmission impliquée dans la genèse de la SNA au cours du développement embryonnaire

Les études ayant porté sur la transmission chimique impliquée dans la génération de l'activité spontanée des circuits spinaux embryonnaires chez plusieurs espèces (poulet, rat et souris) ont abouti à un modèle dans lequel l'activation du circuit spinal peut être subdivisée en deux phases (Myers et al. 2005, Ladle et al. 2007).

Aux premiers stades embryonnaires lors de son apparition (E12,5-E14,5 chez la souris), l'activité spontanée est sous le contrôle d'une transmission chimique excitatrice portée majoritairement par l'ACh, la glycine et le GABA (Hanson and Landmesser 2003, Myers et al. 2005, Ren and Greer 2003, Milner and Landmesser 1999) et d'une transmission par couplage électrique (Hanson and Landmesser 2003, Milner and Landmesser 1999).

Aux stades embryonnaires plus tardifs (à partir de E14,5-E15,5 chez la souris), la transmission glutamatergique joue un rôle plus important qu'aux stades précoces, remplaçant progressivement l'ACh comme composante excitatrice (Myers et al. 2005, Ren and Greer 2003, Nishimaru et al. 1996, Chub and O'Donovan 1998). Parallèlement, le GABA et la glycine deviennent inhibiteurs, tendant ainsi à réduire l'activité spontanée (Myers et al. 2005, Momose-Sato et al. 2012). Chez l'embryon de souris, l'action du GABA et de la glycine est excitatrice avant E15,5 (Delpy et al. 2008).

2.2.3 Mécanismes sous-tendant la génération, la périodicité et la propagation de la SNA aux stades embryonnaires précoces

a) Génération des épisodes d'activité

Des expériences de blocage pharmacologique ont montré que la transmission cholinergique est impliquée dans la génération des épisodes et leur propagation. La libération d'ACh proviendrait des MNs, seule population de neurones exprimant la ChAT à l'apparition de la SNA (voir chapitre 1.3.1 b). Par ailleurs la stimulation antidromique des MNs est suffisante pour déclencher un épisode d'activité (Hanson and Landmesser 2003). Ces expériences ont permis de poser l'hypothèse selon laquelle les MNs seraient indispensables à la génération de la SNA. Les mécanismes de la libération de l'ACh par les MNs ne sont pas clairement établis. Le faible nombre de synapses fonctionnelles aux stades où la SNA apparaît, peut suggérer que l'ACh soit libérée de façon paracrine comme c'est le cas des MNs embryonnaires de xénope en culture avant la formation de la synapse neuromusculaire (Young and Poo 1983).

La transmission GABAergique module la durée et la fréquence de chaque épisode d'activité mais n'est pas indispensable à la genèse de la SNA. En effet il a été montré que l'application d'antagonistes des récepteurs GABAergiques provoque une diminution de la durée des épisodes (Branchereau et al. 2002), une diminution de l'amplitude des GICs dans les MNs (Czarnecki et al. 2014) et une diminution de la fréquence des épisodes d'activité (Milner

and Landmesser 1999, Momose-Sato et al. 2012, Ren and Greer 2003, Hanson and Landmesser 2003). La source de GABA n'a pas été identifiée. Elle pourrait provenir des INs localisés à proximité des MNs, premiers neurones à exprimer du GABA à partir de E11,5-E12,5 chez la souris (Allain et al. 2004). Dès le début de la SNA il existe des mécanismes de régulation de la libération de neurotransmetteur qui sont connus chez l'adulte. En 2014 le laboratoire a montré que la libération massive de GABA et de glutamate sur les MNs pendant un épisode d'activité dépend de l'activation de récepteurs nicotiniques présynaptiques (Czarnecki et al. 2014). Il a aussi été montré que la transmission cholinergique n'active pas les MNs entre eux.

Le réseau spinal responsable de la génération d'un épisode a été proposé comme étant un circuit local de connexions excitatrices entre les MNs et les INs GABAergiques (**figure 10**). Néanmoins bien que les MNs aient une place centrale dans le circuit sous-tendant la génération d'un épisode, ils n'ont pas d'activité pacemaker puisque leur activité est supprimée en l'absence de toute transmission chimique. Par ailleurs, il a été montré que les MNs ne génèrent que 1 à 3 PA superposés aux GDPs (Czarnecki et al. 2014). Ces résultats peuvent suggérer que l'activité des premiers INs GABAergiques pourrait jouer un rôle central au début de l'apparition de l'activité spontanée et que la libération d'ACh par les MNs agirait comme un régulateur en modulant le niveau d'excitabilité de ces INs.

Il a été montré à des stades plus tardifs du développement embryonnaire du réseau spinal ventral chez le poulet, que le déclenchement d'un épisode d'activité pouvait être médié par des connexions récurrentes entre les MNs et les interneurons-R, qui sont les homologues des cellules de Renshaw chez les mammifères (Wenner and O'Donovan 2001). Les auteurs suggèrent que certains MNs se dépolarisent spontanément localement, ce qui active les INs-R. En effet ils ont montré que les INs-R sont les premiers INs à être actifs lors d'un épisode d'activité (**figure 9**). Les INs-R activent ensuite le reste du réseau spinal *via* leurs connexions GABAergiques excitatrices.

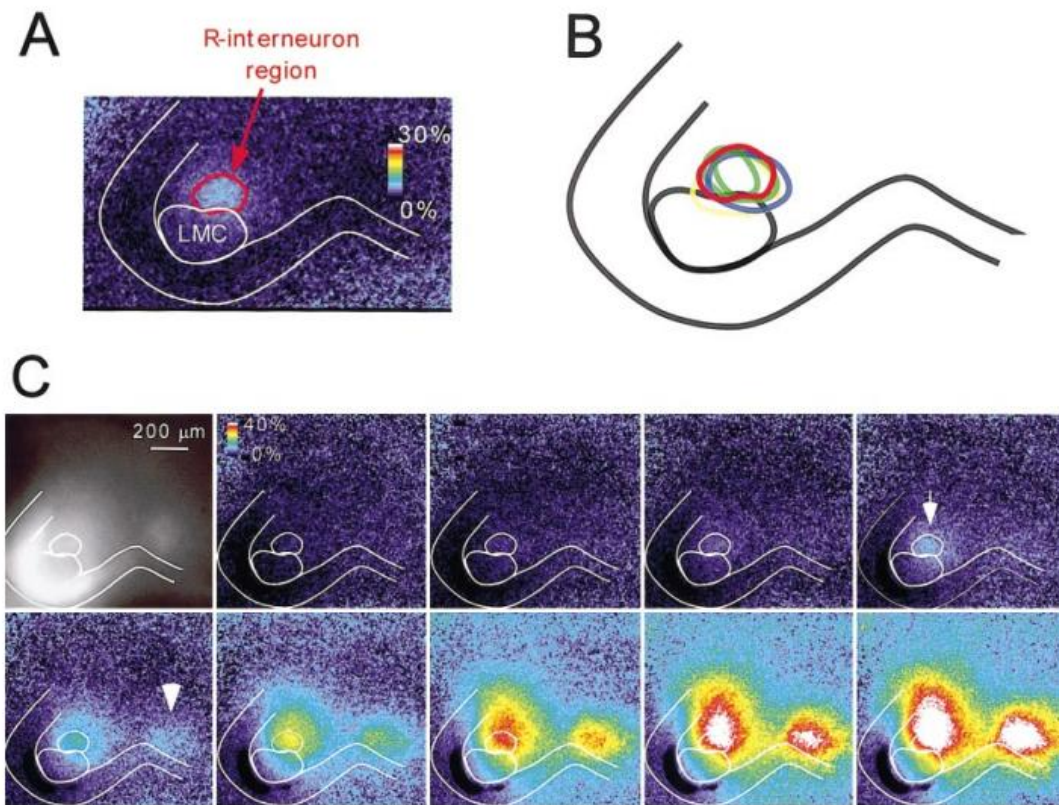


Figure 9 : La région des interneurones-R (homologues des cellules de Renshaw des mammifères) est la première à être activée lors d'un épisode d'activité spontanée, dans des coupes de moelle épinière d'embryon de poulet à E10. Les INs ont été remplis avec un indicateur calcique. La coupe de moelle épinière a été photographiée au début d'épisodes spontanés. A) Région des INs-R, localisée après un train de stimulation des MNs. B) Dans quatre épisodes spontanés (4 couleurs différentes), l'activité a commencé dans la région des INs-R. C) Séquence temporelle de l'activité au début d'un épisode. Adapté de Wenner and O'Donovan 2001.

b) La période des épisodes d'activité

Les mécanismes déterminants l'intervalle entre deux épisodes d'activité ne sont pas encore établis. Au fur et à mesure que le développement progresse, l'intervalle entre deux épisodes d'activité augmente (~ 2 min à E11,5-E12,5 à ~ 8 min à E14,5 chez la souris (Hanson and Landmesser 2003)).

Un modèle a été proposé par MJ. O' Donovan et ses collègues afin d'expliquer la période de la SNA dans les moelles épinières d'embryons de poulet à des stades plus tardifs du développement (E7-E12) (O'Donovan et al. 1998, Tabak et al. 2001, Wenner and O'Donovan 2001). Dans ce modèle, une dépression d'excitabilité du réseau spinal survient après un épisode d'activité : la membrane des neurones spinaux est transitoirement hyperpolarisée et

les potentiels synaptiques sont moins fréquents (Chub and O'Donovan 2001, Wenner and O'Donovan 2001). L'apparition d'un épisode pourrait soit être probabiliste, soit être déterminée par un seuil d'excitabilité que le réseau atteint. Toujours à des stades plus tardifs du développement chez le poulet, il a été montré que la durée d'un épisode et la durée de l'intervalle d'inactivité précédent cet épisode sont corrélés (Tabak et al. 2001). Ce modèle proposé chez le poulet indique l'existence d'une période réfractaire. Il a été proposé que la ré-accumulation des ions chlorure à la suite d'un épisode d'activité pourrait expliquer l'intervalle de silence avant que le réseau ne puisse générer un nouvel épisode (Chub and O'Donovan 2001).

Le modèle de dépression de l'activité spontanée semble également s'appliquer à la moelle épinière de la souris aux stades précoces du développement. En effet le réseau a besoin d'une période de récupération suffisante pour être de nouveau capable de générer un épisode d'activité spontanée ou évoqué (Hanson and Landmesser 2003). Cependant il n'a pas été rapporté de période réfractaire ni de mécanismes sous-jacents à ces stades précoces du développement chez la souris.

c) La propagation des épisodes d'activité le long de l'axe rostro-caudal

Lors de son apparition la SNA concerne tous les niveaux de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière (pour revue voir Momose-Sato and Sato 2013). Bien que la SNA spinale soit ainsi généralisée à toute la moelle épinière, celle-ci se propage le long de l'axe rostro-caudal. La vitesse de cette propagation est de l'ordre de 10 mm/s (Momose-Sato et al. 2012, Momose-Sato et al. 2007, Wang et al. 2009), une vitesse beaucoup trop lente pour être expliquée seulement par la conduction axonale, la transmission synaptique ou *via* des jonctions gap (Hanson and Landmesser 2003). Une libération paracrine des neurotransmetteurs a été proposée pour expliquer la propagation à grande échelle de ces épisodes d'activité.

Les neurotransmissions glycinergique et cholinergique ainsi qu'un couplage électrique ont été proposés pour expliquer la propagation de ces épisodes (Hanson and Landmesser 2003) (**figure 10**). Il a été démontré que la glycine, libérée de façon paracrine par les cellules de la glie radiaire, module la vitesse de propagation de l'activité spontanée (Scain et al. 2010).

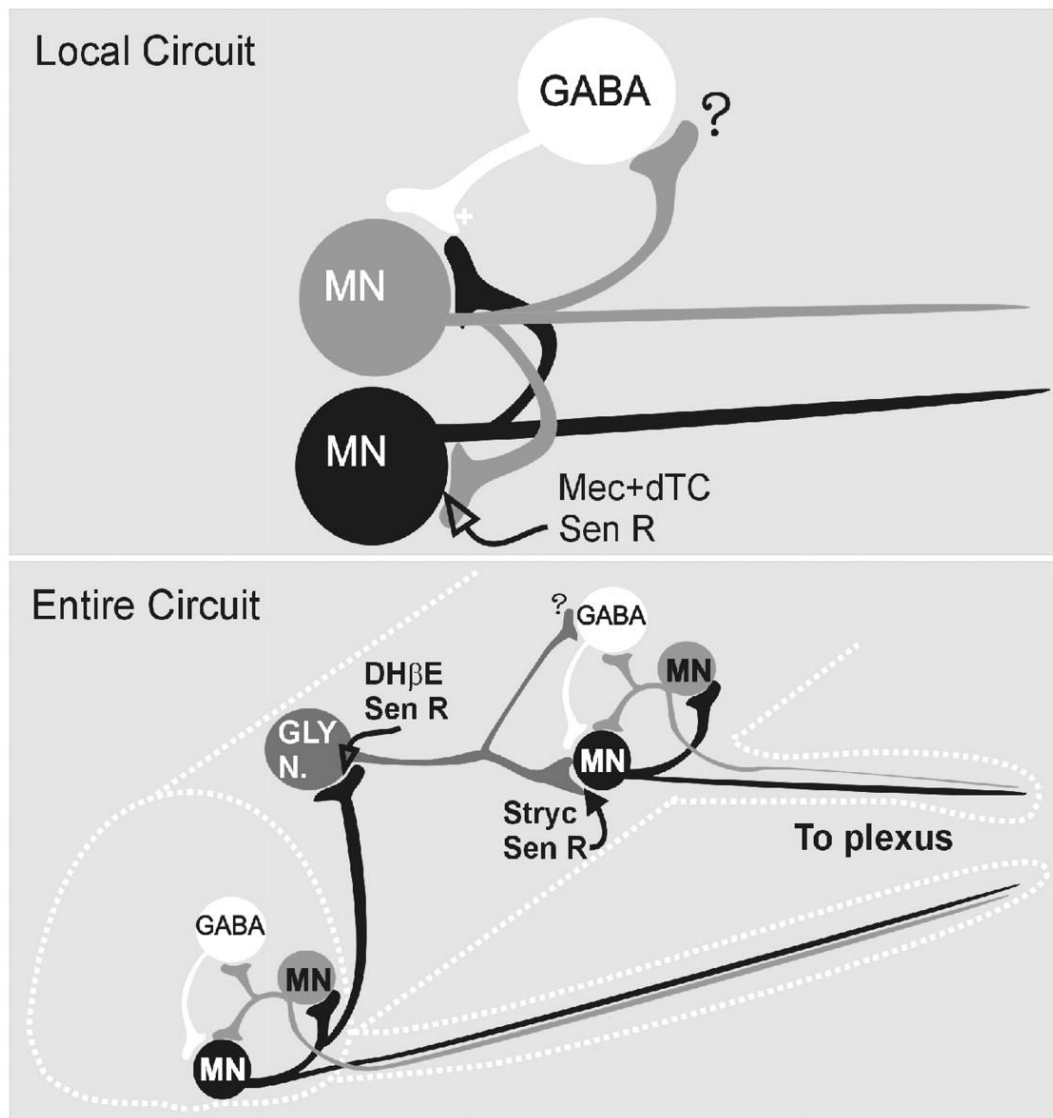


Figure 10 : Schéma proposé du circuit spinal sous-tendant la génération et propagation de la SNA de la moelle épinière d'embryon de souris à E12,5 :

En haut : le circuit local est constitué de connexions réciproques entre les neurones GABAergiques et les MNs et de connexions entre les MNs. *En bas* : l'activité locale rythmique se propage à d'autres régions de la moelle épinière par l'activation de neurones glycinergiques activés par les MNs. *Source* : Hanson and Landmesser 2003. Il est à noter que certains travaux (Czarnecki et al. 2014, Scain et al. 2010) ne sont pas en adéquation avec certains éléments de ce schéma : les MNs ne s'activent pas entre eux *via* la transmission cholinergique. Les MNs connecteraient les INs GABAergiques au niveau des corps cellulaires mais aussi au niveau des terminaisons présynaptiques. La source de glycine proviendrait des cellules de la glie radiaire.

Chapitre 3 : Développement des propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones embryonnaires de la moelle épinière

3.1 Maturation des profils de décharge intrinsèque des neurones spinaux

3.1.1 Pourquoi étudier les propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones au cours du développement ?

Le terme « excitabilité intrinsèque » se réfère à la capacité endogène d'un neurone à décharger un PA. L'excitabilité intrinsèque définit donc la façon et la facilité qu'un neurone aura pour transformer les signaux d'entrée synaptiques en une décharge de PA. Connaître les capacités et facilités qu'a un neurone à évoquer des PA permet de mieux comprendre son action et son rôle physiologique dans le réseau. Cependant, l'activité électrique des neurones au cours du développement embryonnaire n'est pas seulement liée à la transmission d'influx nerveux entre neurones. L'activité électrique d'un neurone en développement peut aussi jouer un rôle dans la régulation des processus de différenciation et maturation de ce neurone. En effet les flux calciques transitoires spontanés dans les neurones en développement régulent de nombreux processus cellulaires de maturation comme la spécification du neurotransmetteur, la croissance de l'arborisation dendritique, la croissance axonale (**figure 11**) et l'expression des canaux ioniques (pour revues voir Spitzer 2006, Rosenberg and Spitzer 2011).

Les capacités intrinsèques de décharge des neurones ne sont pas acquises dès le début de leur différenciation. Elles se mettent en place progressivement au cours du développement embryonnaire et postnatal, dépendant du développement morphologique du neurone et de l'expression progressive des différents canaux ioniques.

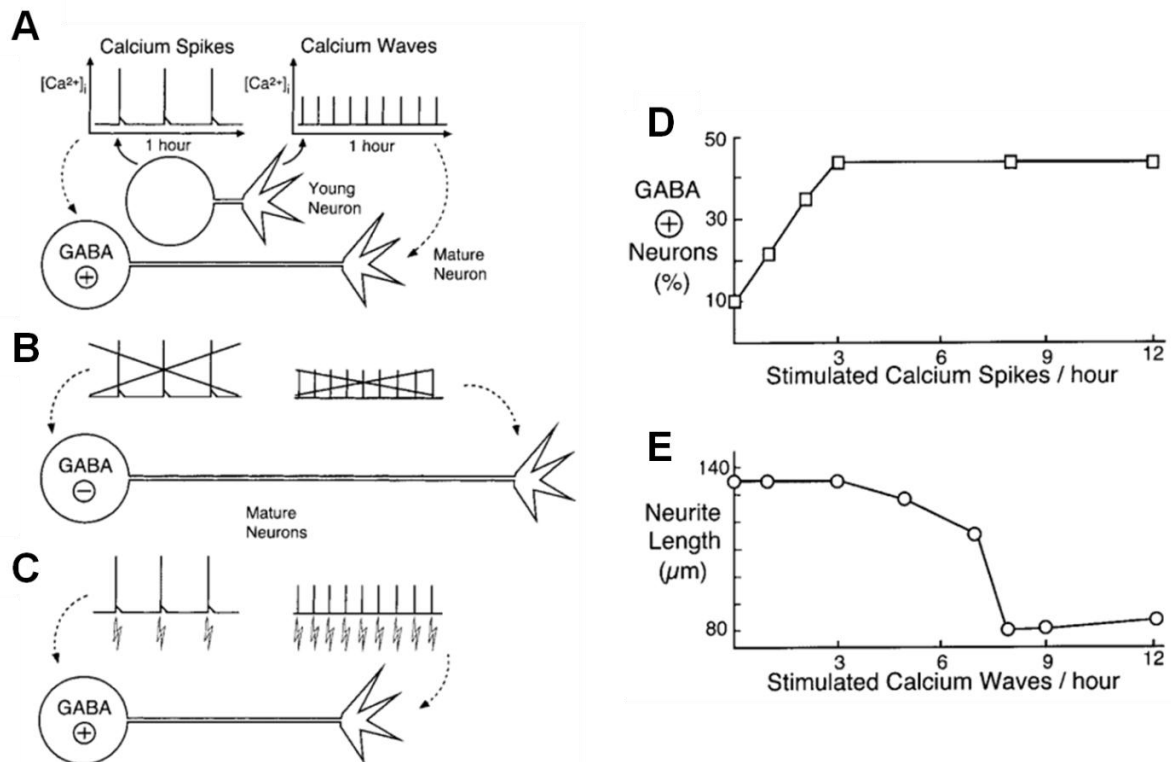


Figure 11 : Différenciation neuronale codée par les flux calciques transitoires spontanés dans les neurones spinaux d'embryons de xénope. **A)** Des flux transitoires calciques apparaissent spontanément à différentes fréquences dans les neurones spinaux embryonnaires de xénope. **B)** Le blocage de ces flux transitoires calciques pendant le développement dans un neurone immature mène à la suppression de l'expression de GABA et l'augmentation de la croissance des neurites. **C)** L'induction de flux transitoires calciques mène à l'expression du GABA et l'allongement normal des neurites. L'expression du GABA (**D**) et la croissance neuritique (**E**) dépendent de la fréquence des événements calciques spontanés. *Adapté de : Spitzer et al. 2000.*

3.1.2 Développement des profils de décharge intrinsèque des neurones spinaux

a) Exemple des neurones spinaux embryonnaires de xénope

Les travaux de Nicholas Spitzer et ses collaborateurs ont montré une séquence développementale de l'excitabilité intrinsèque de neurones spinaux sensoriels chez l'embryon de xénope en culture et *in vivo* (Spitzer and Lamborghini 1976, Spitzer and Baccaglini 1976, Baccaglini and Spitzer 1977) (**figure 12**). Jusque quelques heures après leur genèse, ces neurones restent inexcitables puis deviennent ensuite excitables, générant des longs PA nommés « plateau de PA » (Baccaglini and Spitzer 1977). La durée du PA diminue ensuite au cours du développement embryonnaire. L'évolution de la forme du PA est sous-tendue par une séquence temporelle précise de l'expression de courants ioniques au cours du

développement. Aux stades développementaux précoces, le plateau dépolarisant est dépendant des conductances calciques voltage-dépendantes (**figure 12A**). A des stades intermédiaires, le PA devient dépendant à la fois des conductances calciques voltage-dépendantes et des conductances sodiques voltage-dépendantes. Enfin à des stades développementaux tardifs le PA ne devient dépendant que des conductances sodiques voltage-dépendantes (**figure 12B**). Cette transition de « plateau de PA » à « PA court » dépend aussi de l'augmentation des courants hyperpolarisants potassiques voltage-dépendants de type retardé (Ribera and Spitzer 1989, O'Dowd et al. 1988).

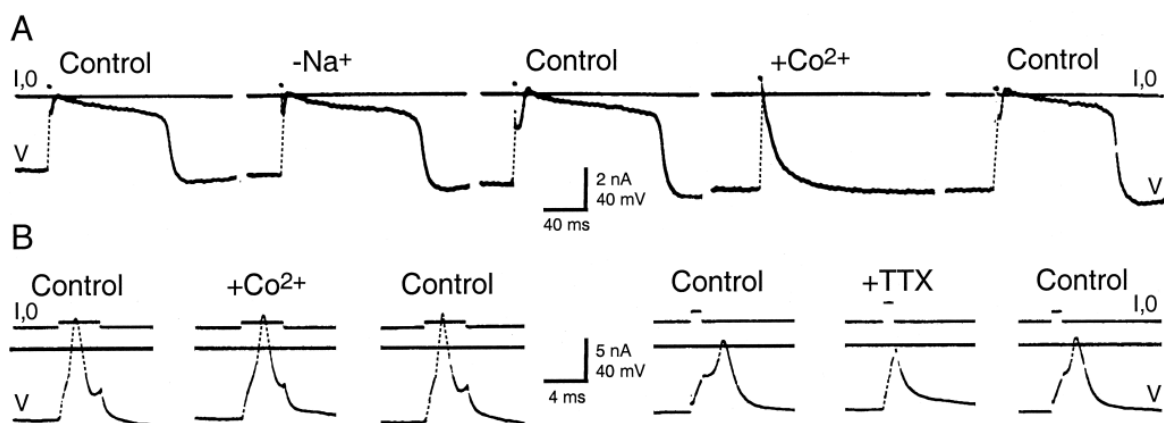


Figure 12 : Maturation du profil de décharge des neurones sensoriels spinaux d'embryon de xénope au cours du développement embryonnaire. Potentiel d'action en réponse à l'injection de courant dépolarisant à un stade embryonnaire précoce (**A**) et à un stade plus tardif (**B**). Au cours du développement embryonnaire, la durée du PA diminue. Le « long PA » (nommé « plateau de PA ») aux stades embryonnaires précoces est dépendant des courants calciques. Le « court PA » aux stades plus tardifs est dépendant des courants sodiques voltage-dépendants. *Source : Spitzer et al. 2000.*

b) Maturation des propriétés de décharge des motoneurones

Les propriétés électriques intrinsèques des MNs spinaux ont été étudiées dans différentes espèces (rat, poulet, souris) à différents âges embryonnaires et postnataux (pour revue voir Navarrette and Vrbová 1993). Les MNs sont excitables à E14 chez le rat (Ziskind-Conhaim 1988) et à E12,5 chez la souris (Le Bras et al. 2014). A ces stades embryonnaires précoces, la forme du PA (seuil de déclenchement, durée, pic) est très différente comparée aux stades néonataux. Il a été montré chez le rat qu'entre les stades embryonnaires et les stades néonataux, les caractéristiques du PA changent : son seuil de déclenchement s'hyperpolarise, son amplitude augmente et sa durée diminue (Gao and Ziskind-Conhaim 1998). A l'apparition

du PA dans les MNs, les conductances calciques voltage-dépendantes ne sont pas nécessaires pour déclencher le PA. Seules les conductances sodiques voltage-dépendantes sont nécessaires et suffisantes pour déclencher un PA. De plus, les MNs aux stades embryonnaires sont considérés comme immatures car ils ne sont pas capables de décharger de façon répétitive et continue (train de PA). Les MNs n'acquerraient la capacité à déclencher des trains de PA qu'à partir des stades néonataux (Durand et al. 2015, Fulton and Walton 1986) (**figure 13A**).

A partir des stades postnataux, certains MNs matures montrent des propriétés de décharge bistables : la décharge répétitive de PA, déclenchée par une dépolarisation, persiste une fois la dépolarisation initiale arrêtée. Cette bistabilité provient d'un état dépolarisé prolongé du potentiel de membrane connu sous le nom de « potentiel de plateau ». Ces propriétés de plateau résultent de l'activation de courants dépolarisants persistants (Perrier and Hounsgaard 2000). A noter que le terme « plateau » employé ici ne se réfère pas au même terme « plateau » chez le xénope. Dans les MNs bistables néonataux, des PA se superposent au plateau, tandis que dans les neurones spinaux embryonnaires chez le xénope, le plateau définit un « PA long ».

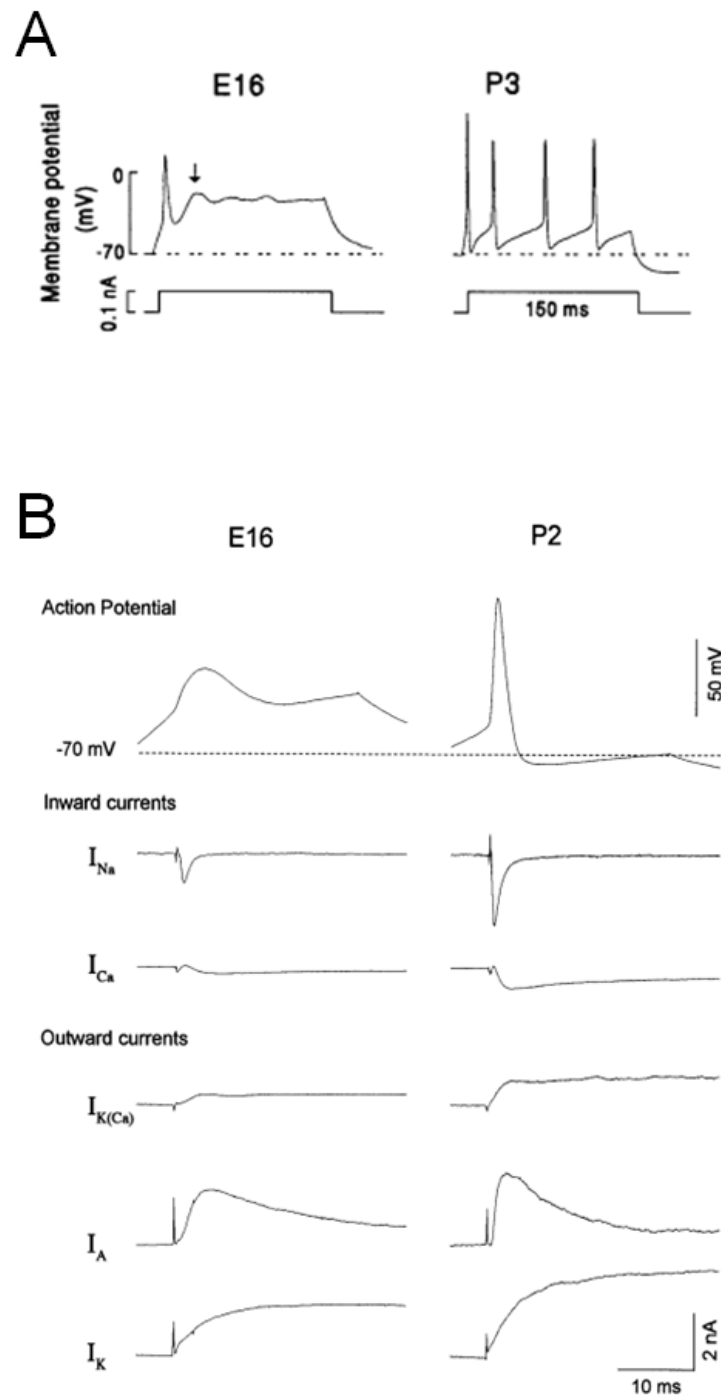


Figure 13 : Développement des propriétés de décharge et des courants ioniques dans les MNs embryonnaires et postnataux chez le rat. Adapté de : Gao and Ziskind-Conhaim 1998.

c) Maturation des propriétés de décharge des cellules de Renshaw

Le développement des propriétés de décharge des CRs au cours du développement embryonnaire n'a jamais été étudié. A ma connaissance, il n'existe aucune donnée sur les propriétés d'excitabilité intrinsèque des CRs aux stades embryonnaires. Aux stades néonataux

et chez l'adulte, les CRs peuvent décharger des PA de façon répétitive (Perry et al. 2015, Bikoff et al. 2016, Lamotte d'Incamps and Ascher 2008, Renshaw 1946, Eccles et al. 1954) (**figure 14**). A la suite d'une dépolarisation induite par la stimulation de MNs, les CRs déchargent un doublet initial de PA rapprochés suivi de quelques PA. A la suite d'une dépolarisation directe évoquée par un saut de courant dépolarisant, les CRs déchargent un doublet initial de PA rapprochés, suivi d'une décharge de PA continue et régulière. Il a été montré, que la décharge initiale du doublet de PA est dépendant du potentiel de membrane au repos (Lamotte d'Incamps and Ascher 2008).

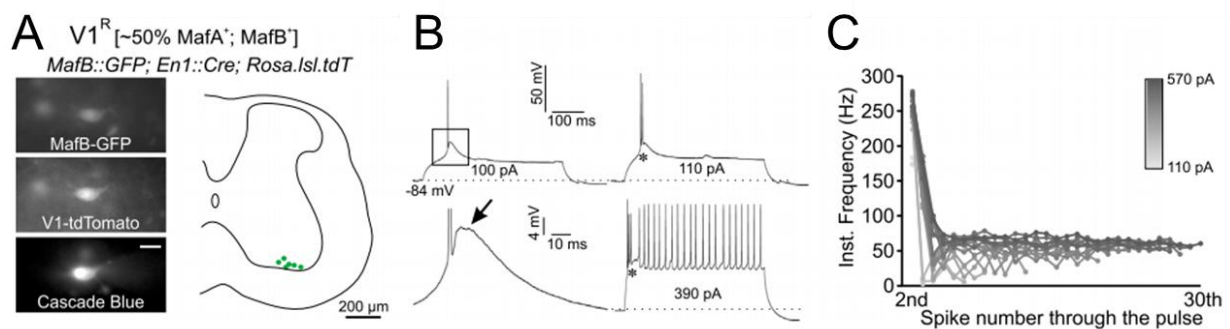


Figure 14 : Propriétés électrophysiologiques de décharge intrinsèque des cellules de Renshaw dans la moelle épinière de souris postnatale. A) Position des CRs (nommées les INs V1^R par les auteurs), identifiée par l'expression de MafB-GFP et de Engrailed-1. **B)** Variation du potentiel de membrane évoquée par l'injection de saut de courant dépolarisant. La décharge débute par un doublet de PA rapprochés (*) **C)** Fréquence instantanée de décharge. *Adapté de : Bikoff et al. 2016.*

3.2 Les canaux ioniques voltage-dépendants dans les neurones spinaux

3.2.1 Maturation des courants ioniques au cours du développement embryonnaire

Dans la population de neurones spinaux d'embryon de xénope, la maturation des courants ioniques calciques, sodiques et potassiques a été caractérisée durant les premières 24h de culture des neurones juste sortis de mitose (O'Dowd et al. 1988). Les courants calciques et les courants sodiques sont présents dès les premières heures. Après 24h en culture, la densité de courant calcique (ICa) n'est pas modifiée alors que celle du courant sodique transitoire (INaT) est multipliée par deux et celle du courant potassique voltage-dépendant à rectification

retardée (IKdr) est multipliée par trois. Il a aussi été décrit que le courant potassique transitoire voltage-dépendant de type A (IA) apparaît après le IKdr (Ribera and Spitzer 1990). La maturation de ces conductances ioniques contribue à la maturation de l'excitabilité intrinsèque de ces neurones durant cette même période, passant d'une décharge d'un plateau dépendant des conductances calciques à la décharge d'un PA dépendant des conductances sodiques (Spitzer and Lamborghini 1976).

Cette séquence temporelle de maturation des courants ioniques n'est pas la même dans tous les neurones. Par exemple, il a été montré dans des neurones spinaux embryonnaires de souris en culture que les courants potassiques voltage-dépendants apparaissent en premier (à E10), puis les courants sodiques transitoires voltage-dépendants (E11) et en dernier les courants calciques voltage-dépendants (E13) (Krieger and Sears 1988). Parmi les courants potassiques, le IKdr apparaît un jour plus tôt que le IA.

La maturation des courants ioniques voltage-dépendants a aussi été étudiée dans les MNs *in vitro* chez le rat, en comparant les stades embryonnaires et les stades néonataux (Gao and Ziskind-Conhaim 1998) (**figure 13B**). Si les courants INaT, IKdr, IA et ICa sont détectés à E15-E16, l'amplitude des courants ICa est trois fois plus petite que celle des courants INaT. L'amplitude de tous ces courants augmente durant tout le développement embryonnaire. Par ailleurs, l'évolution des courants ioniques voltage-dépendants sodiques et potassiques au cours du développement embryonnaire a été étudiée dans des MNs d'embryon de rat à E14 en culture (Alessandri-Haber et al. 1999). Les courants IKdr sont les premiers à être détectés, à E14. Puis les courants INaT et les courants IA sont détectés à E14 + 1 jour de culture. La maturation de ces conductances ioniques voltage-dépendantes contribue aux modifications de l'excitabilité intrinsèque des MNs, passant d'une décharge d'un seul PA à une décharge répétitive (**figure 13A**).

L'apparition et l'évolution des courants voltage-dépendants au cours du développement embryonnaire est similaire chez le poulet, avec la prédominance des courants INaT comparé aux courants ICa aux stades précoces et l'apparition du IKdr avant le IA (McCobb et al. 1989, McCobb et al. 1990).

Les changements des propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones proviennent en partie de l'apparition et l'augmentation progressive des courants voltage-dépendants sodiques, potassiques et calciques. Il est admis que l'augmentation de ces courants au cours du développement est due à une augmentation de l'expression des canaux voltage-dépendants. Néanmoins une étude récente suggère que cela pourrait aussi être dû à des modifications des

concentrations des ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} (Lindsly et al. 2017). Les auteurs montrent que chez le poulet la concentration intracellulaire de Na^+ dans les MNs spinaux embryonnaires augmente (entre E6 et E10) puis diminue (entre E10 et E16) révélant donc un pic transitoire de la concentration de Na^+ au cours du développement embryonnaire de ces neurones.

L'étude de la maturation des courants ioniques au cours du développement a permis de mettre en évidence l'implication, entre autres, des courants potassiques IKdr et IA dans l'excitabilité des neurones embryonnaires. De plus, des travaux récents ont montré que le courant sodique persistant (INaP) jouait également un rôle dans l'excitabilité des neurones embryonnaires et dans la genèse des premières activités spontanées du réseau spinal dans l'embryon de xénope (Tong et al., 2012). Au cours de mes travaux de thèse, une des questions à laquelle j'ai tenté de répondre a été de savoir si ces courants jouaient un rôle dans l'excitabilité des CRs et dans la genèse de la SNA dans la moelle épinière embryonnaire de souris. Je vais ainsi détailler dans les deux prochaines sous-parties, les caractéristiques biophysiques de l'ensemble de ces courants INaP, IKdr et IA.

3.2.2 Le courants sodique persistant

a) Caractéristiques biophysiques et composition moléculaire

Le INaP est un courant entrant dépolarisant qui s'inactive très lentement (**figure 15A**) comparé au courant INaT. Le INaP s'active à des potentiels moins dépolarisés que ceux pour lesquels le INaT s'active, conférant donc au INaP un rôle dans l'induction du PA. Sa présence a été mise en évidence dans de nombreux types de neurones de différentes structures nerveuses, musculaires ou cardiaques (pour revue voir Crill 1996).

La composition moléculaire des canaux sodiques voltage-dépendants évoquant un INaP a été longtemps étudiée mais reste encore en partie débattue aujourd'hui. Les canaux sodiques voltage-dépendants sont formés par une sous-unité principale α constituée de quatre domaines, chacun des domaines comporte six domaines transmembranaires. Chez les mammifères il existe neuf isoformes de la sous-unité α (Nav1.1 à Nav1.9). Les sous-unités Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5 et Nav1.6 sont exprimées dans le SNC ; les sous-unités Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 ont été mises en évidence dans le SNP ; la sous-unité Nav1.4 a été mise en évidence dans les muscles. Les sous-unités Nav1.1, Nav1.2, Nav1.6 sont

majoritairement retrouvées chez l'adulte tandis que la sous-unité Nav1.3 est retrouvée majoritairement chez l'embryon (Beckh et al. 1989, Schaller and Caldwell 2000, Felts et al. 1997). Différentes hypothèses quant à l'origine et spécificité moléculaire des canaux sodiques évoquant un INaP ont été formulées (Crill 1996) : (1) le INaP aurait les propriétés d'un courant de fenêtre, (2) le INaP serait évoqué par des sous-unités spécifiques, (3) le INaP serait évoqué par les mêmes sous-unités que celle évoquant le INaT mais résulterait de modifications et modulations de ces sous-unités. Aucun de ces mécanismes n'a été clairement exclu ou démontré à ce jour. Il a été montré que les différentes sous-unités α génèrent des INaP d'amplitudes plus ou moins grandes (Mantegazza et al. 2005). Le INaP peut être modulé *via* les sous-unités accessoires β associées à la sous-unité principale α du canal, ou encore *via* les signalisations intracellulaires des protéines G. D'un point de vue pharmacologique le riluzole, à faible concentration bloque spécifiquement le INaP (Urbani and Belluzzi 2000).

b) Rôle du INaP dans le réseau spinal

Le INaP attribue à un neurone la capacité à générer des PA de façon répétée. Cela a été montré dans les INs ventraux spinaux (**figure 15B**) et les MNs en postnatal et chez l'adulte (Lee and Heckman 2001, Theiss et al. 2007, Tazerart et al. 2008, Kuo et al. 2006, Harvey et al. 2006). Par exemple, les INs spinaux ventraux de rat postnataux ont quatre modes de décharge intrinsèque : un mode de décharge unique d'un PA, un mode de décharge initiale d'une bouffée de PA, un mode de décharge répétitive continue de PA et un mode bistable bouffée/décharge répétitive continue de PA. La réduction du INaP supprime le mode de décharge en bouffée, le mode de décharge répétitive continue et le mode bistable (Theiss et al. 2007). Il a aussi été montré que le INaP contribue à la bistabilité des MNs de rat néonatal en sous-tendant une décharge répétée sur un plateau de potentiel dépolarisé dépendant du Ca^{2+} (Bouhadfane et al. 2013).

Enfin, le INaP est fondamental dans la genèse du rythme locomoteur (**figure 15C**) et dans l'émergence d'activités pacemakers au sein du CPG spinal (Tazerart et al. 2007, Zhong et al. 2007, Tazerart et al. 2008).

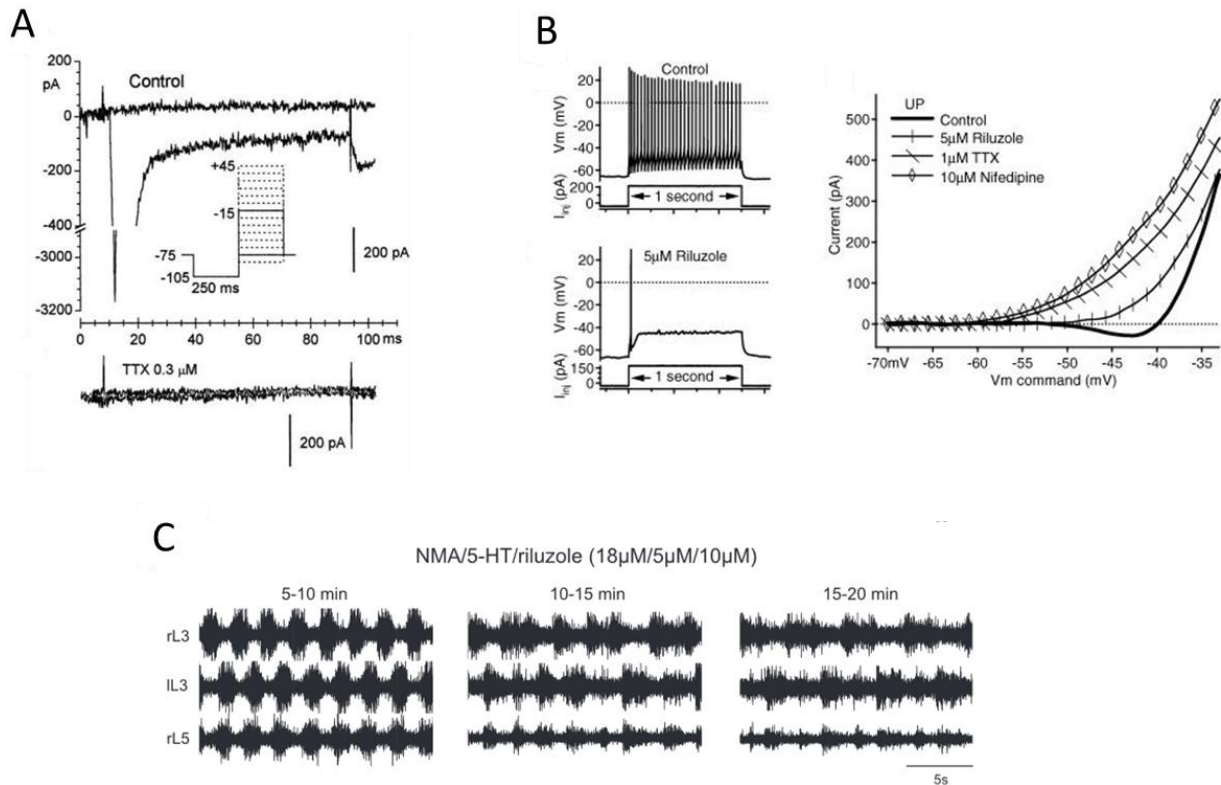


Figure 15 : Le courant sodique persistant contribue à la décharge répétitive des neurones spinaux et à l'activité du réseau spinal mature. A) Le courant sodique persistant (INaP) est un courant qui s'inactive très lentement. *Source* : Urbani and Belluzzi 2000. **B)** L'application de riluzole à 5 μ M, bloqueur spécifique du INaP, supprime le mode de décharge répétitive continue dans les INs spinaux ventraux chez le rat postnatal. *Source* : Theiss et al. 2007. **C)** Effets du riluzole sur l'activité de type locomotrice dans la moelle épinière de rat néonatal. *Source* : Tazerart et al. 2007.

3.2.3 Les courants potassiques des canaux voltage-dépendants de la famille Kv

Les canaux potassiques sont constitués de 4 sous-unités α associées pour former un pore. Chaque sous-unité α est constituée de six segments transmembranaires. Les canaux potassiques voltage-dépendants ont la particularité d'avoir un segment transmembranaire qui est sensible au potentiel. Des sous-unités auxiliaires β s'associent aux canaux voltage-dépendants et sont impliqués dans la régulation de l'activité du canal. Les sous-unités α des canaux potassiques voltage-dépendants de la famille Kv (Kv1 à Kv12) évoquent différents types de courants potassiques (IKv), qui se distinguent par leurs propriétés électrophysiologiques (seuil d'activation, cinétique d'activation et d'inactivation) (Coetzee et al. 1999, Alexander et al. 2017) (**figure 16**). Il existe notamment deux grands types de courants IKv :

- Le courant potassique à rectification retardée (IKdr), généré par des canaux qui s'ouvrent à des potentiels de membrane d'environ -30 à -10 mV et s'inactivent lentement avec une constante de temps de l'ordre de la centaine de millisecondes ou de la seconde. Les sous-unités α des sous-familles Kv2 et Kv3 (sauf Kv3.4) permettent de générer des courants potassiques de type IKdr. Les sous-unités α de la sous-famille Kv1 (sauf Kv1.4) génèrent des courants qui s'inactivent lentement mais qui s'activent à des potentiels moins dépolarisés. Les courants IKdr sont impliqués dans la repolarisation du PA.

- Le courant potassique transitoire de type A (IA), généré par des canaux qui s'ouvrent à des potentiels de membrane de l'ordre de -50 à -60 mV et s'inactivent rapidement avec une constante de temps de l'ordre de quelques millisecondes à dizaine de millisecondes. Pour lever l'inactivation de ces canaux, une repolarisation du potentiel de membrane à une valeur inférieure à -50 mV est nécessaire. Les sous-unités α de la sous-famille Kv4 ainsi que les sous-unités Kv1.4 et Kv3.4 génèrent un courant potassique de type IA. Les courants IA ont pour conséquence de retarder l'apparition du PA et de diminuer la fréquence des PA en ralentissant le retour au seuil d'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants.

La 4-aminopyridine (4-AP) et le tétraéthylammonium (TEA) sont les principaux bloqueurs des canaux potassiques voltage-dépendants.

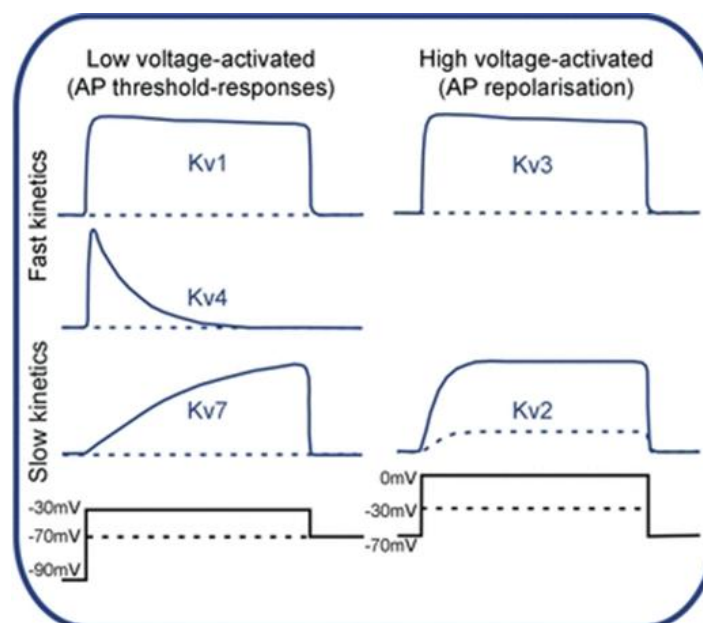


Figure 16 : Classification fonctionnelle des courants générés par les canaux potassiques voltage-dépendants de la famille Kv, en fonction de leurs propriétés biophysiques (dépendance du seuil d'activation au potentiel de membrane, cinétique d'activation et d'inactivation). *Source : Johnston et al.* 2010.

Objectifs de thèse

Une question importante à laquelle je me suis intéressée au cours de ma thèse, est de comprendre les mécanismes développementaux permettant aux neurones de devenir fonctionnels. Je me suis plus particulièrement intéressée aux mécanismes qui sous-tendent la SNA, générée dans la moelle épinière entre E12,5 et E14,5 et impliquée dans le développement des neurones spinaux. Si l'implication des MNs et des INs GABAergiques dans la genèse de la SNA, dès son apparition aux stades embryonnaires, a été clairement démontrée au moyen d'enregistrements extracellulaires chez plusieurs espèces (souris, rat, poulet), les mécanismes exactes à l'origine de l'activation de la SNA et les différents types d'INs GABAergiques impliqués restent inconnus. Chez le poulet, le circuit monosynaptique d'excitation récurrente que forment les MNs et les INs-R, homologues des CRs chez les mammifères, joue un rôle essentiel dans la genèse de la SNA. Un tel circuit composé des MNs et des CRs est-il impliqué dans la genèse de la SNA chez les mammifères ? Chez la souris, la fonctionnalité de la boucle monosynaptique que forment les CRs avec les MNs n'a été démontré qu'à des stades embryonnaires tardifs (E18,5) dans un réseau spinal qui ne génère plus la SNA. Des expériences d'immunohistochimie ont suggéré des connections entre les CRs et les MNs à E13-E15, mais la fonctionnalité de ces interactions chez la souris reste encore à démontrer. Par ailleurs, s'il existe des données sur le développement des propriétés de décharge des MNs au cours de leur maturation, les propriétés d'activation des CRs aux stades précoces du développement embryonnaire restent inconnues.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a pour but d'étudier le développement embryonnaire des propriétés de décharge des CRs et leur intégration dans le réseau spinal précoce.

Ce projet de thèse s'est ainsi articulé autour de trois axes principaux :

- Quelle est l'activité et les propriétés de décharge des CRs au moment du déclenchement de la SNA dans la moelle épinière d'embryon de souris à E12,5 ? Quelles conductances ioniques sont impliquées dans l'émergence de leur excitabilité à ce stade précoce ?
- Quelle est l'évolution de leur excitabilité au cours de la maturation du réseau spinal embryonnaire (E12,5-E16,5)

- Quelle est la connectivité des MNs avec les CRs et son implication dans la genèse de la SNA à son apparition (E12,5).

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé comme modèle la moelle épinière isolée d'embryons de souris entre E12,5 et E16,5. Nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp des CRs et des MNs couplés à des expériences pharmacologiques, optogénétiques et des études immunohistochimiques.

RESULTATS

PARTIE 1 :

L'excitabilité des cellules des Renshaw dépend du courant sodique persistant dans le réseau spinal embryonnaire précoce

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'un article publié dans *The Journal of Neuroscience* en 2018.

Problématique et résumé des résultats

L'activité neuronale endogène spontanée de la moelle épinière embryonnaire apparaît à E11,5-E12,5 chez la souris (Branchereau et al. 2002, Hanson and Landmesser 2003). Elle est caractérisée par des épisodes de bouffées de PA suivies de période de silence de 2-3 minutes. Enregistrée dans les MNs, elle est caractérisée par des GDPs « *Giant depolarizing potentials* », qui sont la résultante d'une libération massive de GABA, et dans une moindre mesure de glutamate et glycine (Czarnecki et al. 2014). Une libération prolongée de GABA nécessite une activité soutenue et synchronisée des INs GABAergiques. Cependant, les propriétés d'activation intrinsèque de ces INs n'est pas connu et l'enregistrement intracellulaire des neurones GABAergiques n'a jamais été réalisé au début de l'activité spontanée de la moelle épinière à E12,5. Dans ce réseau spinal encore immature, isolé du reste du SNC et des muscles, les INs GABAergiques sont en cours de maturation. Les CRs, sous-type d'INs V1 GABAergiques, sont parmi les premiers INs spinaux à être générés. Nous avons donc choisi de focaliser notre étude sur les CRs embryonnaires.

Nos travaux constituent la première étude de l'activité électrique des CRs enregistrées en patch clamp au début de l'activité spinale spontanée chez la souris.

Nous montrons que les CRs embryonnaires produisent du GABA à E12,5 et que les CRs forment leurs premiers contacts synaptiques sur les MNs. Nous mettons également en

évidence pour la première fois une libération paracrine de GABA à cet âge précoce, pouvant potentiellement provenir en partie des CRs.

Nous montrons que les CRs déclenchent aussi spontanément des GDPs, faisant de ces neurones un acteur potentiel dans la genèse de l'activité spontanée à E12,5. A contrario des GDPs dans les MNs qui n'évoquent qu'un à trois PA (Czarnecki et al. 2014), nous montrons que les GDPs dans les CRs peuvent évoquer des trains de PA ou des potentiels en plateau dépolarisants. En analysant leurs propriétés de décharge intrinsèque nous avons découvert que les CRs génèrent différents régimes de décharge évoqués par des sauts dépolarisants de courant que l'on a classé en quatre catégories : une décharge d'un ou deux PA (CRs à 1 PA), une décharge répétitive de PA (CRs à train de PA), une décharge de potentiels en plateau dépolarisants dépendante des canaux sodiques voltage-dépendants (CRs à plateau) et enfin une décharge mixte de PA et de potentiels en plateau (CRs mixtes).

La capacité des neurones à décharger de manière soutenue peut dépendre du courant sodique persistant (INaP) (Bouhadfane et al. 2013, Lee and Heckman 2001, Theiss et al. 2007). Nous avons ainsi voulu savoir si les propriétés de décharge intrinsèque des CRs embryonnaires dépendaient du INaP. Nous montrons en effet que la décharge intrinsèque des CRs sous la forme de « train de PA » ou « potentiels en plateau » dépend du INaP. Ces travaux constituent la première démonstration que le INaP est présent dans des neurones spinaux embryonnaires de mammifères et qu'il sous-tend la capacité d'un type d'IN GABAergique à décharger de façon soutenue dès les stades précoces du développement embryonnaire alors que le réseau spinal est en pleine maturation.

En plus du rôle du INaP au niveau cellulaire dans les propriétés d'excitabilité intrinsèque des neurones, des travaux ont démontré l'importance de ce courant à l'échelle du réseau, que ce soit dans la génération d'activité locomotrice du CPG de rongeur néonatal (Zhong et al. 2007, Tazerart et al. 2008), ou encore dans le comportement locomoteur du poisson zèbre au stade embryonnaire (Tong and McDermid 2012). Nous avons donc voulu savoir si le INaP était impliqué dans la genèse de l'activité spontanée globale du réseau spinal embryonnaire. Nos travaux démontrent que le blocage du INaP altère profondément cette activité spontanée en réduisant la durée des épisodes d'activité et en diminuant la fréquence des épisodes.

Persistent Sodium Current Drives Excitability of Immature Renshaw Cells in Early Embryonic Spinal Networks

Juliette Boeri,^{1,2*} Hervé Le Corrionc,^{1,2,3*} François-Xavier Lejeune,^{1,2} Barbara Le Bras,^{1,2} Christine Mouffle,^{1,2} Monara Kaelle S.C. Angelim,^{1,2} Jean-Marie Mangin,^{1,2}  Pascal Branchereau,^{4,5}  Pascal Legendre,^{1,2*} and  Antony Czarnecki^{1,2*}

¹INSERM, UMR_S 1130, CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine, 75005 Paris, France, ²Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06, UM CR18, 75005 Paris, France, ³University of Angers, 49000 Angers, France, ⁴University Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33615 Pessac, France, and ⁵CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33615 Pessac, France

Spontaneous network activity (SNA) emerges in the spinal cord (SC) before the formation of peripheral sensory inputs and central descending inputs. SNA is characterized by recurrent giant depolarizing potentials (GDPs). Because GDPs in motoneurons (MNs) are mainly evoked by prolonged release of GABA, they likely necessitate sustained firing of interneurons. To address this issue we analyzed, as a model, embryonic Renshaw cell (V1^R) activity at the onset of SNA (E12.5) in the embryonic mouse SC (both sexes). V1^R are one of the interneurons known to contact MNs, which are generated early in the embryonic SC. Here, we show that V1^R already produce GABA in E12.5 embryo, and that V1^R make synaptic-like contacts with MNs and have putative extrasynaptic release sites, while paracrine release of GABA occurs at this developmental stage. In addition, we discovered that V1^R are spontaneously active during SNA and can already generate several intrinsic activity patterns including repetitive-spiking and sodium-dependent plateau potential that rely on the presence of persistent sodium currents (I_{NaP}). This is the first demonstration that I_{NaP} is present in the embryonic SC and that this current can control intrinsic activation properties of newborn interneurons in the SC of mammalian embryos. Finally, we found that 5 μ M riluzole, which is known to block I_{NaP} , altered SNA by reducing episode duration and increasing inter-episode interval. Because SNA is essential for neuronal maturation, axon pathfinding, and synaptogenesis, the presence of I_{NaP} in embryonic SC neurons may play a role in the early development of mammalian locomotor networks.

Key words: development; excitability; mouse embryo; persistent sodium current; Renshaw cell; spontaneous network activity

Significance Statement

The developing spinal cord (SC) exhibits spontaneous network activity (SNA) involved in the building of nascent locomotor circuits in the embryo. Many studies suggest that SNA depends on the rhythmic release of GABA, yet intracellular recordings of GABAergic neurons have never been performed at the onset of SNA in the SC. We first discovered that embryonic Renshaw cells (V1^R) are GABAergic at E12.5 and spontaneously active during SNA. We uncover a new role for persistent sodium currents (I_{NaP}) in driving plateau potential in V1^R and in SNA patterning in the embryonic SC. Our study thus sheds light on a role for I_{NaP} in the excitability of V1^R and the developing SC.

Introduction

A remarkable feature of the developing CNS is its capacity to generate spontaneous network activity (SNA) at the end of neu-

ronal migration. SNA occurs in the absence of any external inputs and is not experience-driven or use-dependent (Moody, 1998; Feller, 1999). SNA has been described as playing an essential role in several areas of the developing CNS, including the neocortex, the thalamus, the hippocampus, the locus ceruleus, the retina,

Received Nov. 8, 2017; revised June 14, 2018; accepted June 29, 2018.

Author contributions: H.L.C., P.B., P.L., and A.C. designed research; J.B., H.L.C., F.-X.L., B.L.B., M.K.S.C.A., P.B., P.L., and A.C. performed research; C.M. contributed unpublished reagents/analytic tools; J.B., H.L.C., F.-X.L., J.-M.M., P.B., P.L., and A.C. analyzed data; J.B., H.L.C., J.-M.M., P.B., P.L., and A.C. wrote the paper.

This work was supported by FRM Grant DEQ20160334891, AFM Grant 18564, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Centre National de la Recherche Scientifique. We thank Elim Hong for helpful discussion. We thank Laure Lecoin and Julien Bouvier for assistance in MafB antibodies and Thomas Müller et Carmen Birchmeier for assistance in Foxd3 antibodies.

The authors declare no competing financial interests.

*J.B., H.L.C., P.L., and A.C. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to either Dr. Antony Czarnecki or Dr. Pascal Legendre, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche S1130, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8246, Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment B, Etage 2, Boîte postale 37, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France; E-mail: antonny.czarniecki@sorbonne-universite.fr or pascal.legendre@inserm.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3203-17.2018

Copyright © 2018 the authors 0270-6474/18/387667-16\$15.00/0

and the spinal cord (Landmesser and O'Donovan, 1984; Ben-Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998; Feller, 1999; Garaschuk et al., 2000; Gust et al., 2003; Corlew et al., 2004; Marder and Rehm, 2005; Myers et al., 2005; Gonzalez-Islas and Wenner, 2006; Hanson et al., 2008; Rockhill et al., 2009; Watt et al., 2009). SNA regulates the development of neural circuits by influencing synaptogenesis, neuronal maturation, axonal guidance and axonal pathfinding (Zhang and Poo, 2001; Hanson et al., 2008; Kirkby et al., 2013).

In the embryonic spinal cord (SC), SNA is characterized by long-lasting bursts of action potentials (APs) occurring every 2–4 min that can propagate along the cord (Hanson and Landmesser, 2003). SNA occurs at the onset of synaptogenesis at E12.5, before the emergence of functional neuromuscular junction and the formation of sensory and supraspinal inputs (Hanson and Landmesser, 2003). Bursts of APs recorded on ventral roots (Hanson and Landmesser, 2003) or in the whole SC (Yvert et al., 2004) are long-lasting episodes characterizing SNA in the embryonic SC. We previously showed that most individual motoneurons (MNs) only generate a single AP during each episode of SNA (Czarnecki et al., 2014) and we demonstrated that acetylcholine release could not directly synchronize MN firing during SNA as MNs do not express functional acetylcholine receptors (Czarnecki et al., 2014). Therefore, MNs must rely on other mechanisms to synchronize their firing during SNA. We have recently shown that MN activity occurring during SNA at the onset of synaptogenesis (E12.5) is generated by giant depolarizing potentials (GDPs) involving a massive and long-lasting release of GABA, as well as a moderate release of glutamate and glycine (Czarnecki et al., 2014). It is therefore likely that newborn GABAergic interneurons (INs) play an essential role in the generation of the sustained episodes of depolarization necessary to synchronize MN firing during SNA.

To gain insight into the excitability pattern of spinal GABAergic INs involved in the release of GABA during SNA, we used multiple approaches to examine the intrinsic activation properties of immature Renshaw cells ($V1^R$) in the lumbar SC. Renshaw cells are known to regulate MN activity in the adult through recurrent synaptic inhibition (Eccles et al., 1956) and play an important role in the regulation of SC activity at late developmental stages in the chicken embryo (Wenner and O'Donovan, 2001). $V1^R$ are the first V1 INs to be generated during neurogenesis in the mouse embryo (Benito-Gonzalez and Alvarez, 2012). From E9.5 to E12.5, $V1^R$ migrate toward their final location between MN columns and the ventrolateral funiculus (Benito-Gonzalez and Alvarez, 2012; Alvarez et al., 2013). Because glycine, unlike GABA, is nearly absent in SC INs of E12.5 mouse embryo (Allain et al., 2004, 2006; Scain et al., 2010), $V1^R$ are likely to be GABAergic neurons at the early developmental stage.

Here, we show that, like MNs, $V1^R$ display GDPs during SNA at E12.5. However, we discovered that, unlike MNs, most $V1^R$ are able to produce repetitive spiking or sodium-dependent plateau potentials in response to GDPs (Czarnecki et al., 2014). Remarkably, these sustained discharges depend on the presence of a persistent sodium current (I_{Nap}). In addition, we also demonstrate that I_{Nap} already has important functions at the onset of SNA. Inhibition of I_{Nap} alters SNA episode duration and inter-episode interval duration, which reveals that the ability of embryonic SC neurons to generate sustained discharge is required for a correct SNA pattern (Hanson and Landmesser, 2006).

Materials and Methods

Isolated spinal cord preparation. These experiments were performed in accordance with European Community guiding principles on the care and use of animals (86/609/CEE, CE Off J no. L358, 18 December, 1986), French decree no. 97/748 of October 19, 1987 (J Off République Française, 20 October, 1987, pp. 12245–12248) and recommendations from the CNRS. We used GAD67-eGFP knock-in mice to visualize putative GABAergic INs (Tamamaki et al., 2003). Briefly, a cDNA encoding enhanced GFP (eGFP) was targeted to the locus encoding the gene *Gad1*. GAD67 is a rate-limiting enzyme of GABA biosynthesis and is known to be a marker for GABAergic neurons (Le Corre et al., 2011). To obtain E12.5 GAD67-eGFP embryos, 8- to 12-week-old wild-type Swiss female mice were crossed with heterozygous GAD67-eGFP Swiss male mice. HB9-eGFP mouse embryos were used to visualize MNs (Wichterle et al., 2002). To obtain E12.5 transgenic HB9-eGFP embryos, 8- to 12-week-old wild-type Swiss female mice were crossed with heterozygous HB9-eGFP C57BL/6Jrj male mice.

Embryos (269) obtained from 152 pregnant mice were used. Isolated embryonic mouse SCs were obtained as previously described (Delpy et al., 2008; Scain et al., 2010). Briefly, pregnant mice were anesthetized by intramuscular injection of a mix of ketamine and xylazine and killed using a lethal dose of CO_2 . Embryos of either sex were removed and the SC was isolated from eGFP-positive embryos. Whole SCs were maintained in an artificial CSF (ACSF) containing 135 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 1 mM NaH_2PO_4 , 3 mM KCl, 11 mM glucose, 2 mM CaCl_2 , and 1 mM MgCl_2 (307 mosmol/kg H_2O), continuously bubbled with a 95% O_2 –5% CO_2 gas mixture.

Whole-cell recordings and analysis. The isolated SC was placed in a recording chamber and continuously perfused (2 ml/min) at room temperature (20–24°C) with the oxygenated ACSF described above. Whole-cell patch-clamp recordings of lumbar spinal $V1^R$ and MNs were performed under direct visualization using an infrared-sensitive CCD video camera.

In the SC of GAD67-eGFP mouse embryos, eGFP neurons were detected using UV light. MNs were identified by their size, their location in the ventral area of the SC parenchyma (Czarnecki et al., 2014) and by the lack of eGFP expression. These neurons localized in this SC area express the MN transcription factors *Islet1/2*, as shown in a previous study (Scain et al., 2010). Recorded eGFP interneurons were localized in the ventrolateral area of the SC at the marginal zone between motor columns and the ventral funiculus, which is the known location of developing $V1^R$ (Stam et al., 2012). To confirm $V1^R$ identity, recorded cells were filled with neurobiotin (0.5–1 mg/ml) and stained with an antibody directed against Foxd3. Foxd3 is a specific transcription factor of V1 INs (Dottori et al., 2001; Stam et al., 2012) and the hallmark of $V1^R$ localized in the ventrolateral area of the embryonic SC (Carr et al., 1998; Benito-Gonzalez and Alvarez, 2012).

Whole-cell patch-clamp electrodes were pulled from thick-wall borosilicate glass using a Brown-Flaming puller (Sutter Instrument). The tip of the electrode was fire-polished using a microforge (Narishige). Patch-clamp electrodes had resistances of 4–7 M Ω . The electrode was filled with a solution containing the following (in mM): 96.4 K methanesulfonate, 33.6 KCl, 4 MgCl_2 , 4 Na_2ATP , 0.3 Na_3GTP , 10 EGTA, and 10 HEPES, pH 7.2 (290 mOsm/kg- H_2O). Using these potassium methanesulfonate solutions, the equilibrium potential for chloride ions (Cl^-) $\approx$ –30 mV was close to the physiological values measured at E12.5 on spinal MNs (Delpy et al., 2008). The junction potential (6.6 mV) was systematically corrected offline. In some voltage-clamp experiments, the electrode contained the following: (in mM) 130 CsCl, 4 MgCl_2 , 4 Na_2ATP , 10 EGTA, and 10 HEPES, pH 7.2 (290 mOsm/kg- H_2O).

Signals were recorded using AxoPatch 200B or MultiClamp 700B amplifiers (Molecular Devices). Data were low-pass filtered (2 kHz), digitized (20 kHz) online using a Digidata 1440A interface, and acquired using PClamp 10.5 software (RRID:SCR_011323). Analyses were performed off-line using PClamp 10.5 software and AxoGraph X.1.6.4 (Molecular Devices; RRID:SCR_014284).

In voltage-clamp or current-clamp experiments, neurons were recorded at a holding potential (V_h) of –60 mV. Series resistance (10–20

Table 1. Primary antibodies

Primary antibody	Company	Reference	Host/isotype	Dilution
Anti-calbindin-D _{28k}	Swant, Switzerland	Swant, catalog #CB38; RRID:AB_2721225	Rabbit polyclonal	1:1500
Anti-FoxD3	Provided by C. Birchmeier, MDC Berlin, Germany	Storm, et al. (2009)	Guinea pig polyclonal	1:5000
Anti-MafB	Bethyl Laboratories	Bethyl, catalog #IHC-00351; RRID:AB_1279487	Rabbit polyclonal	1:1000
Anti-GABA	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich, catalog #A0310; RRID:AB_476667	Mouse monoclonal	1:800
Anti-synaptophysin	Synaptic Systems	Synaptic Systems, catalog #101 011; RRID:AB_887824	Mouse monoclonal	1:1500
Anti-GFP	Aves Labs	Aves Labs, catalog #GFP-1020; RRID:AB_10000240	Chicken polyclonal	1:1000

$M\Omega$) was monitored throughout the experiments and was 50–80% compensated. Data were discarded if series resistance varied by more than $\approx 30\%$ from the initial value. In current-clamp mode, V1^{R} intrinsic discharge patterns were elicited using depolarizing current steps (from 0 to ≈ 50 pA, 2–10 pA increments depending on the input resistance of the cell, 2 s) or depolarizing current triangular-ramp (from 0 to ≈ 50 pA, 5 pA increments, 20 s) with an 8 s interval to ensure that the membrane potential returned to baseline V_h . In voltage-clamp mode, whole-cell currents were elicited by a depolarizing voltage ramp. The 70 mV/s speed was chosen to elicit and measure persistent inward currents (I_{Nap} ; Huang and Trussell, 2008). Subtraction of the current evoked by the voltage ramp in the presence of 1 μM tetrodotoxin (TTX) to control voltage ramp-evoked current revealed I_{Nap} .

APs or plateau potentials were analyzed based on the following parameters during a 2 s current step: threshold potential, peak amplitude, half amplitude duration, rate of rise of events (by dividing the amplitude of the event by the duration from its onset to the peak; 2 s step width).

Boltzmann functions were used to describe I_{Nap} activation on current evoked by voltage ramp. For the fit current (20 kHz sampling 2 kHz filter):

$$G = G_{\text{MAX}} / (1 + \exp(-(V - V_{\text{HALF}})/k))$$

where G is conductance in nanosiemens, G_{MAX} is the maximal conductance, V is the potential in millivolts, V_{HALF} is the voltage for half-maximal activation in millivolts, and k is the slope factor in millivolts. Threshold for activation I_{Nap} was determined by eye from Boltzmann curves.

Extracellular recordings. In the same experimental conditions as for whole-cell recordings, spontaneous activity was recorded extracellularly from E12.5 SCs using glass electrodes. Extracellular electrodes were placed under visual control on the superficial part of the ventral horn at both the cervical and the lumbar levels. Targeted networks likely include MNs as well as surrounding INs (Czarnecki et al., 2014). Electrodes were connected to a high-gain AC amplifier (ISO-DAM8A-4 Bio-amplifier System, World Precision Instruments). Filtered (Filter cutoff frequency: 0.3–3 kHz) raw signals were integrated off-line and analyzed using Spike2 software (RRID:SCR_000903). Changes in burst duration and maximum instantaneous frequency were calculated from cervical and lumbar recordings.

Pharmacological agents. During patch-clamp recordings, drugs were applied using 0.5 mm diameter quartz tubing positioned 50 μm away from the recording area under direct visual control. The quartz tubing was connected using a manifold to six solenoid valves linked with six reservoirs. Solutions were gravity-fed into the quartz tubing. Drug application was controlled using a VC-8 valve controller (Warner Instruments). The following pharmacological agents were used: TTX (1 μM , Alomone Labs) and riluzole (5–10 μM ; Tocris Bioscience). Both were dissolved in the bath solution.

Immunohistochemistry. All primary antibodies used and their respective dilutions are listed in Table 1. E12.5 embryos were collected from pregnant females. Once dissected out of their yolk sac, these embryos were immediately immersion-fixed in phosphate buffer (PB; 0.12 M) with 4% paraformaldehyde (PFA; freshly prepared in PB, pH 7.4) for 1 h at 4°C. Embryos were then rinsed with PB and cryoprotected in PB-15% sucrose at 4°C for 24 h and then in PB-30% sucrose at 4°C for 24 h. Embryos were embedded in OCT medium (VWR) and quickly frozen. Serial sections 20 μm thick were collected onto slides using a cryostat. Immunostaining was processed on SC transverse sections and on whole SC postrecording to confirm IN identity. To reveal neurobiotin-labeled

cells, SCs were fixed for 1 h in 4% PFA and were then incubated in 0.12 M PB at 4°C until immunohistochemical studies. Tissues (embryo slices and whole SC) were thawed at room temperature, washed in PBS, incubated in NH_4Cl (50 mM) diluted in PBS for 20 min and then permeabilized for 30 min in a blocking solution (10% goat serum in PBS) with 0.2% Triton X-100 and then for 48 h at 4°C with the primary antibodies, which were diluted in the 0.2% Triton X-100 blocking solution. Slices or whole SCs were then washed in PBS and incubated for 2 h at RT in the secondary antibodies (diluted at 1/1000 in the 0.2% Triton X-100 blocking solution): AlexaFluor 405 (ThermoFisher Scientific, catalog #A-31556; RRID:AB_221605) or 647 goat anti-rabbit (ThermoFisher Scientific, catalog #A-21244; RRID:AB_2535812); AlexaFluor 594 goat anti-guinea pig (ThermoFisher Scientific, catalog #A-11076; RRID:AB_2534120); AlexaFluor 649 donkey anti-guinea pig (Jackson ImmunoResearch, catalog #706-605-148; RRID:AB_2340476); AlexaFluor 594 goat anti-mouse (ThermoFisher Scientific, catalog #A-11005; RRID:AB_2534073); AlexaFluor 488 goat anti-chicken (ThermoFisher Scientific, catalog #A-11039; RRID:AB_2534096), and streptavidin-conjugated AlexaFluor 405 (1:1000; ThermoFisher Scientific, catalog #S32351). After washing in PBS, slides or whole SCs were dried and mounted in Mowiol medium (Millipore).

Confocal microscopy and image analysis. Preparations were analyzed using a Leica SP5 confocal microscope. Immunostaining was observed using a 40 $\times$ oil-immersion objective with a numerical aperture of 1.25, as well as with a 63 $\times$ oil-immersion objective with a numerical aperture of 1.32 and a 4 $\times$ digital zoom magnification. Serial optical sections were obtained with a Z-step of 1 μm (40 $\times$) and 0.2–0.3 μm (63 $\times$). Images (1024 $\times$ 1024; 12-bit color scale) were stored using Leica software LAS-AF and analyzed using ImageJ 1.5 software (Wright Cell Imaging Facility; RRID:SCR_008488). Colocalization of synaptophysin staining with calbindin staining, eGFP staining (MNs, HB9eGFP mouse embryos), or neurobiotin staining was assessed in three axes using a single confocal slice and x and y orthogonal views of the stack (ImageJ 1.5).

Sniffer recordings. To make a “sniffer” electrode (Young and Poo, 1983) for GABA, an outside-out patch was pulled from a transfected HEK293 cell line expressing the GABA_A subunits $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ (kindly provided by Michel Partiseti, Sanofi Advantis R&D LGCR/LIT, France). This GABA_A is highly specific for GABA and is characterized by slow desensitization, which makes it a good sensor for GABA paracrine release (Barberis et al., 2007). As a control, the electrode was first positioned outside the SC to verify any GABA contamination in the recording medium. The electrode was then pushed inside the SC and positioned within the motoneuronal area and the ventral funiculi. Outside-out patch-clamp electrodes (5–10 $M\Omega$) were pulled from thick-wall borosilicate glass, fire-polished, and filled with (in mM): CsCl 130, MgCl₂ 4, Na₂ATP 4, EGTA 10, HEPES 10, pH 7.2 (290 mOsm/kg-H₂O). Single-channel currents were recorded using an AxoPatch 200B amplifier (Molecular Devices). Recordings were filtered at 10 kHz, sampled at 50 kHz, and stored on a PC computer. Membrane potential was held at -50 mV throughout the experiment. Analysis of the sniffer currents was performed using AxoGraph X.1.6.4 software.

Human embryonic kidney 293 cells (HEK293) were maintained in a 95% air–5% CO₂ humidified incubator, at 35°C, in DMEM supplemented with 0.11 g/L sodium pyruvate, 6 g/L D-glucose, 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (all from Invitrogen). Cells were passaged every 5–6 d (up to maximum 20 times). For electrophysiological recordings, cells were seeded onto glass coverslips coated with poly-L-ornithine (0.1 mg/ml).

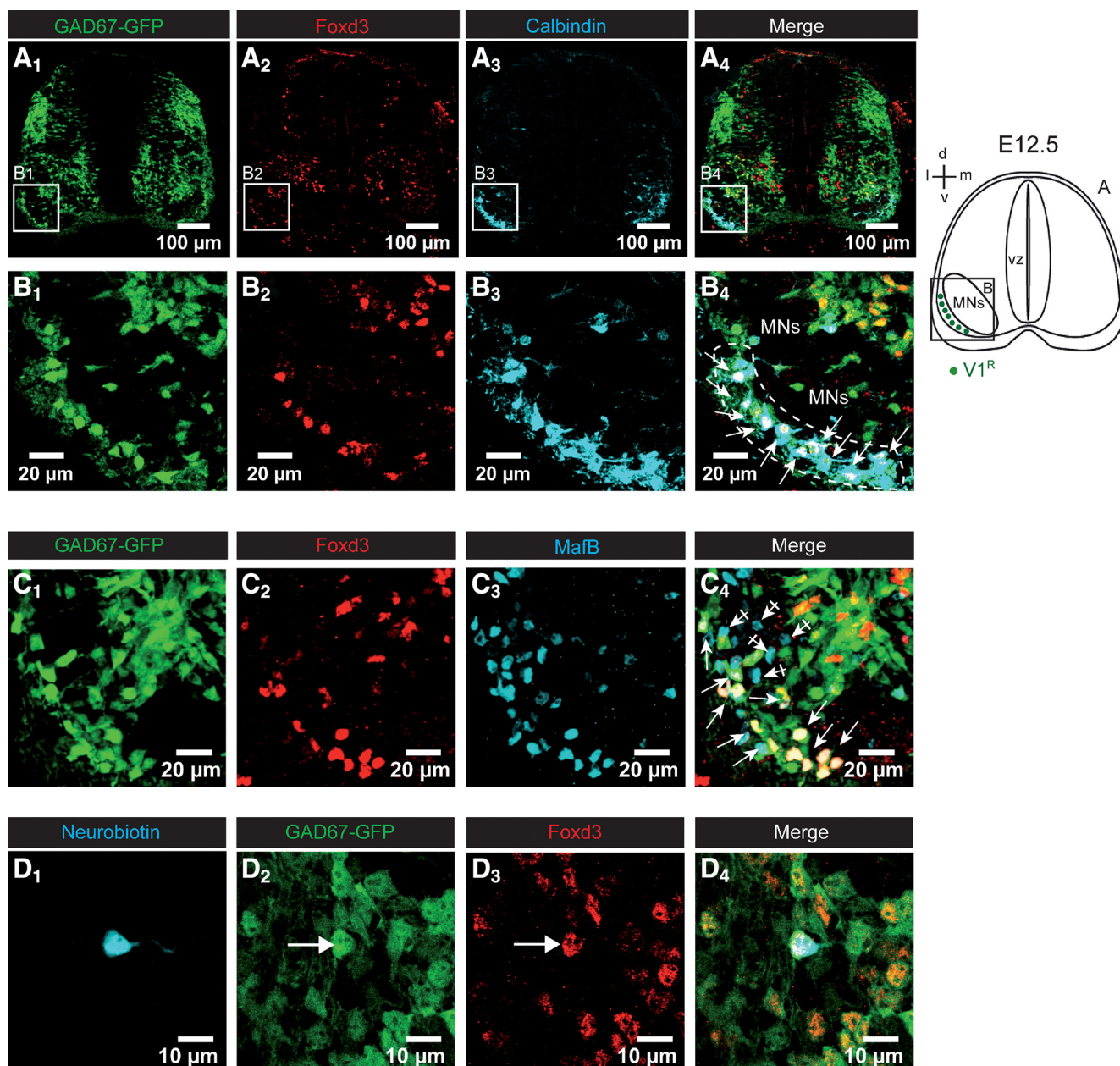


Figure 1. $V1^R$ identification in the lumbar spinal cord of E12.5 embryos. **A**, Coronal slice of the lumbar spinal cord of E12.5 GAD67-eGFP mouse embryo showing the distribution of eGFP neurons (**A1**), FoxD3 (**A2**), and calbindin (**A3**)-immunoreactive neurons. **A4**, Superimposed images showing the colocalization of eGFP, FoxD3 immunostaining, and calbindin immunostaining. **B**, Enlarged images from **A** showing that eGFP neurons localized in the ventrolateral area of the spinal cord (**B1**) are FoxD3-immunoreactive (**B2**), most of them being calbindin-immunoreactive (**B3–B4**). **C**, Coronal slice of the ventrolateral part of the lumbar spinal cord of E12.5 GAD67-eGFP mouse embryo showing the distribution of eGFP neurons (**C1**), FoxD3 (**C2**), and MafB (**C3**)-immunoreactive neurons. **C4**, Superimposed images showing the colocalization of eGFP FoxD3 immunostaining and MafB immunostaining. Note that all FoxD3-immunoreactive neurons localized in the marginal zone of the ventrolateral area are also MafB-positive, indicating that they are $V1^R$ neurons. **D1**, Example of a neuron filled with neurobiotin during the recording at the lumbar level of an embryonic spinal cord open book preparation of GAD67-eGFP mice at E12.5. This eGFP neuron (**D2**) was immunoreactive to FoxD3 antibody (**D3**) as shown in the merged images (**D4**). Each image corresponds to a single confocal section.

Statistics. All values were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical significance was assessed by the nonparametric Kruskal–Wallis test with Dunn's posttests, Mann–Whitney test and Wilcoxon matched pairs test (GraphPad Prism 5.0 Software). Significance was determined as $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, or $***p < 0.001$.

Results

$V1^R$ are identified with calbindin, Foxd3, and MafB at the onset of SNA

In the present study, we used GAD67-(eGFP knock-in mice (Tamamaki et al., 2003) to visualize putative GABAergic INs (Figs. 1A1, B1, C1). $V1^R$ can be unambiguously identified by their

characteristic position in the ventral horn both in the adult (Geiman et al., 2000) and in the embryo (Sapir et al., 2004; Stam et al., 2012). Most $V1^R$ were localized between the ventral border of MN columns and the ventral funiculi. To identify $V1^R$ in the lumbar SC of E12.5 GAD67eGFP embryos, we first performed immunostaining using anti-calbindin, anti-Foxd3 and anti-MafB antibodies (Fig. 1). Calbindin is a calcium-binding protein exclusively expressed by $V1^R$ when looking in the ventrolateral area of the SC between the MN columns and the funiculus (Stam et al., 2012). The forkhead transcription factor Foxd3 controls the early phase of $V1^R$ differentiation, whereas MafB is required to

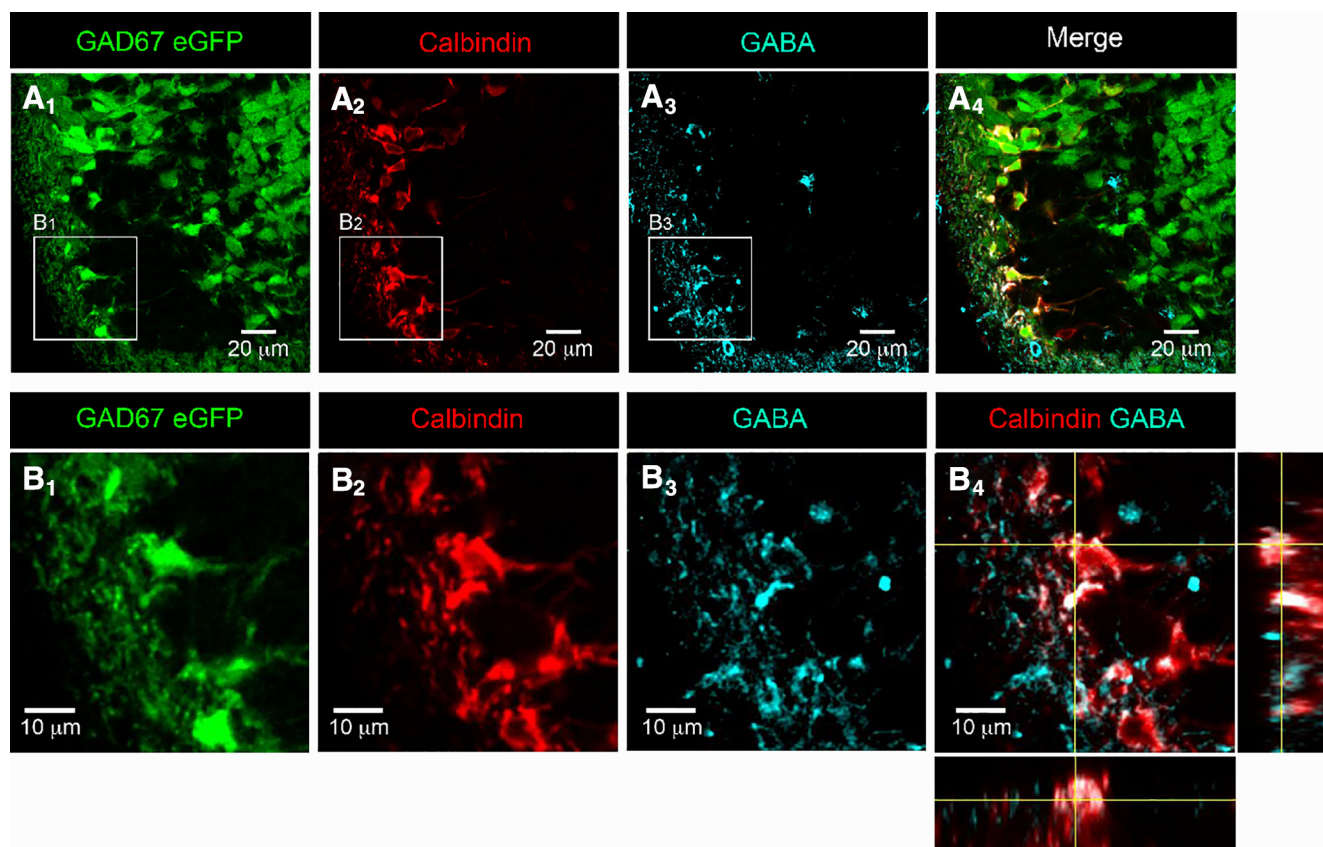


Figure 2. $V1^R$ already produce GABA in the lumbar spinal cord of E12.5 embryos. **A**, Single confocal sections of coronal slice of the lumbar spinal cord of E12.5 GAD67-eGFP mouse embryo showing the distribution of eGFP neurons (**A1**), calbindin (**A2**), and GABA (**A3**)-immunoreactive neurons. **A4**, Superimposed images showing the colocalization of eGFP, calbindin immunostaining, and GABA immunostaining. **B1–B3**, Enlarged images from **A1**, **A2**, and **A3** showing eGFP neurons (**B1**), calbindin-immunoreactive neurons (**B2**), and GABA-immunoreactive neurons (**B3**) in the ventrolateral area of the spinal cord. **B4**, Superimposed images showing the colocalization of calbindin immunostaining and GABA immunostaining with z projections within a stack. Note the colocalization of calbindin immunostaining and GABA immunostaining in the three axes, indicating that $V1^R$ already produce GABA at E12.5.

maintain $V1^R$ at later developmental stages, and both are therefore expressed at E12.5 in $V1^R$ (Stam et al., 2012). At E12.5 INs located in the ventrolateral marginal zone between the motor columns and the ventral funiculi express Foxd3 (Figs. 1A2,B2,C2) and calbindin (Figs. 1A3,B3), as previously described (Benito-Gonzalez et al., 2012; Stam et al., 2012). Foxd3⁺ INs were also observed in neurons positioned dorsally to the motor columns (Figs. 1A2,B2). However, these INs were not stained by calbindin antibody, hence this population of INs was not included in our study. In the $V1^R$ area, double immunostaining (Figs. 1A4,B4) indicated that $81.7 \pm 15.0\%$ of Foxd3⁺ INs localized in the ventral marginal zone were also immunoreactive to calbindin at E12.5 ($n = 4$ embryos, 2 sections/embryo). To ensure that all Foxd3⁺ INs localized in the area are $V1^R$, we performed double immunostaining using anti-Foxd3 and anti-MafB antibodies (Figs. 1C). We found that 100% of Foxd3⁺ eGFP⁺ INs localized in the ventral marginal zone were also immunoreactive to anti-MafB antibody ($n = 4$ embryos, 2 sections/embryo), thus confirming their $V1^R$ fate (Fig. 1C4). It should also be noted that at this developmental stage we detected MafB⁺ eGFP[−] neurons localized within the motor columns (Figs. 1C1,C3) that are likely MNs (Stam et al., 2012). Therefore, we used Foxd3 immunostaining to confirm that the recorded IN belonged to the $V1^R$ population (Figs. 1D1–D4). Whereas Calbindin is a good marker for $V1^R$, it was not used to identify recorded $V1^R$ because of cytoplasm-calbindin dilution complications during whole-cell

recording (Müller et al., 2005) caused by the high nucleus/cytoplasm volume ratio in embryonic neurons.

$V1^R$ already produce GABA at E12.5

As calbindin is localized within the cytoplasm of $V1^R$, we used calbindin immunostaining to visualize $V1^R$ morphology (Stam et al., 2012). Calbindin⁺ neurons ($96.6 \pm 7.2\%$) in the ventrolateral marginal zone were also eGFP⁺ in E12.5 GAD67eGFP knock-in mouse embryos ($n = 4$ embryos, 2 sections/embryo), which could suggest that most $V1^R$ are likely to produce GABA at this developmental stage. To determine to what extent $V1^R$ already produce GABA at E12.5, we performed double immunostaining using anti-calbindin and anti-GABA antibodies (Figs. 2A, B). We found that $90.1 \pm 10.5\%$ ($n = 8$ embryos, 2 sections/embryo) of calbindin⁺ INs localized in the ventrolateral marginal zone (Figs. 2A2,B2) were also immunoreactive to GABA antibody (Figs. 2A3,A4,B3,B4), suggesting that $V1^R$ already produced enough GABA to be detected by immunohistochemistry at E12.5.

It is important to note that many eGFP⁺ GABA[−] INs were detected within the ventral parenchyma at E12.5, as previously observed (Allain et al., 2004). This could result from the production of the GAD67 splice variant GAD25. At early developmental stages, GAD1 first encodes the truncated 25 kDa leader (GAD25) without GAD enzymatic activity and then the enzymatically active protein GAD44 (for review, see Le Corronc et al., 2011). These two GAD isoforms are downregulated

during neuronal differentiation concomitantly with upregulation of GAD67 expression.

Synaptic-like contacts are detected between V1^{R} and MNs at the onset of SNA

At E12.5, V1^{R} axons are localized in ventral funiculi and extend for a few segments without forming collateral branches entering the motor columns (Alvarez et al., 2013). The first evidence for collateral V1^{R} axons innervating the soma of lumbar MNs was found at E15.5 only while synaptic-like connections from MNs onto the V1^{R} cell body were already observed at E12.5 (Alvarez et al., 2013). Accordingly, it was proposed that MNs can control V1^{R} activity at E12.5 while V1^{R} are unable to control MN activity at this time point (Alvarez et al., 2013). However, it should be noted that synaptophysin staining was found mainly in the ventral funiculus at E12.5 (Fig. 3A1; Alvarez et al., 2013; Czarnecki et al., 2014), where IN axonal projections and MN dendrite-like processes were observed (Czarnecki et al., 2014). Accordingly, we hypothesized that V1^{R} already make some synaptic-like contacts with MN projections within the ventral funiculus.

To address this issue we first performed multiple immunostaining using anti-synaptophysin antibody (putative release site), anti-calbindin antibody (V1^{R}) and anti-eGFP antibody on coronal sections of the SC HB9eGFP mouse embryos to visualize MNs (Figs. 3A2–A4, B1–B3). As shown in Figure 3B3, many calbindin⁺ fibers were opposed to MN neurites (eGFP staining) within the ventral funiculus. We found 21.7 ± 8.4 synaptophysin⁺ punctates within calbindin⁺ fibers opposed to MN neurites per hemi section in coronal slices ($n = 9$; 5 embryos; Figs. 3B1–B3, insets, arrow). Conversely, synaptophysin punctates were also found in MN fibers (eGFP⁺) opposed to calbindin⁺ fibers (Figs. 3B1–B3, inset, arrowhead), which indicate the presence of MN putative release sites opposed to V1^{R} within the ventral funiculus. We also found synaptophysin punctates within calbindin⁺ fibers that were not opposed to MN neurites (Figs. 3B1–B3, barred arrow). This may indicate the presence of nonsynaptic release sites and/or that V1^{R} can make contact with fibers of neurons other than MNs. To further confirm the presence of V1^{R} synaptic-like contacts on MNs, we performed multiple immunostaining using anti-synaptophysin antibody (putative release site) and anti-eGFP antibody on isolated SC after patch-clamp injection of neurobiotin in V1^{R} (Figs. 3C). Recorded INs (eGFP-negative) in eGFP HB9 embryos were identified as V1^{R} using Foxd3 immunostaining (Fig. 3C1, inset). We found 3–5 putative release sites per V1^{R} ($n = 4$ cells) that were opposed to MN fibers within the ventral funiculus (Figs. 3C1–C4). We did not find any release site within the V1^{R} axonal growth cone (data not shown).

Paracrine release of GABA occurred in the SC of E12.5 mouse embryos

Paracrine release of GABA may occur from nonsynaptic release sites and/or may reflect neurotransmitter spillover of GABA from immature synapses (Safiulina and Cherubini, 2009). Therefore, we hypothesized that GABA release can occur at this developmental stage. To detect the presence of GABA paracrine release, we used the sniffer technique (Scain et al., 2010). Outside-out patches from HEK cells expressing the GABA_{A} subunits $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ were used as a sniffer to detect the presence of GABA in the extracellular space (Fig. 4A1). When inserting the sniffer electrode in the vicinity of MNs, we did not detect any GABA_{A} activity, thus indicating that basal GABA concentration is below the detection threshold of the sniffer patch (data not shown). The possibility of

evoking GABA release, and hence GABA_{A} activation, by inducing a global cell membrane depolarization was tested using bath application of 30 mM KCl (Scain et al., 2010; Czarnecki et al., 2014). Increasing $[\text{K}^+]_{\text{o}}$ evoked a significant GABA_{A} activation in the sniffer patch ($n = 9$), indicating that GABA can be released in the extracellular space in response to cell membrane depolarization (Fig. 4A1). We estimated the concentration of released GABA around MNs by comparing the peak amplitude of the sniffer response evoked by KCl application to sniffer responses evoked by exogenous application of 3, 10, and 30 μM GABA onto the same outside-out patch ($n = 9$). We found that the GABA concentration accounting for GABA_{A} activity evoked by KCl application was close to 3 μM (Fig. 4A2). Although the estimated concentration of nonsynaptic release of GABA was relatively low, the exogenous application of 3 μM GABA in the presence of 1 μM TTX was sufficient to evoke a 20.6 ± 6.1 mV MN depolarization ($V_{\text{h}} = -60$ mV; $\text{ECl} = -30$ mV; $n = 7$; Figs. 4B2).

V1^{R} exhibit heterogeneous excitability patterns at the onset of SNA

Spontaneous or evoked V1^{R} activity was assessed using whole-cell current-clamp recordings and the open-book SC preparation (Scain et al., 2010). To determine the identity of recorded INs, GAD67eGFP neurons were filled with neurobiotin (≈ 1 mg/ml) in combination with *post hoc* Foxd3 staining (Figs. 1D). At E12.5, V1^{R} had a whole-cell capacitance of 13.7 ± 3.8 pF ($n = 192$) and an input resistance of 1242 ± 620 M Ω ($n = 192$). Spontaneous activity recorded in 37 V1^{R} was characterized by recurrent GDPs (Fig. 5), occurring every 3.7 ± 2.4 min ($n = 30$), similar to what has been observed in MNs (~ 3 min; Czarnecki et al., 2014). Interestingly, in 21.6% ($n = 8/37$) of the recorded V1^{R} , GDPs evoked long-lasting depolarizing plateau potentials (Fig. 5A), whereas 37.8% ($n = 14/37$) of the recorded V1^{R} had the ability to spike repetitively during GDPs (Fig. 5B). Plateau potentials had an absolute amplitude of 53.4 ± 11.5 mV ($n = 8$) and a half-amplitude duration ranging from 0.12 to 0.86 s (0.44 ± 0.22 s; $n = 8$). In 16.2% ($n = 6/37$) of the recorded V1^{R} , GDPs evoked a single spike or a doublet (Fig. 5C), while the remaining 24.3% ($n = 9/37$) of the recorded V1^{R} did not spike during GDPs (data not shown). These data show that V1^{R} can generate various spontaneous activity patterns and raise the question of their intrinsic activation properties.

To analyze the intrinsic activation properties of embryonic V1^{R} , we depolarized the cells from a holding potential of -60 mV using 2 s step current pulses or 20 s depolarizing current ramps. At E12.5, all V1^{R} were excitable ($n = 165$), but depolarizing current injections triggered various and complex excitability patterns (Fig. 6). 28.7% ($n = 47/165$) of the analyzed V1^{R} were able to generate 1–3 APs in response to suprathreshold depolarizing steps (Fig. 6A). When a depolarizing ramp was applied, only fast membrane potential oscillations of small amplitude were observed. We called these V1^{R} , SS- V1^{R} (“single” spiking V1^{R}). In contrast, 21.2% ($n = 36/165$) of the recorded V1^{R} were able to generate long-lasting events defined as plateau potentials in response to depolarizing current pulses and in response to depolarizing current ramps. These plateau potentials were all-or-none events (Fig. 6B). They can be evoked by long depolarizing pulses (2 s; Fig. 6B) and short depolarizing current pulses (Fig. 6F2). They had a half amplitude duration of ≈ 700 ms and an absolute peak amplitude of ≈ 3 mV (Table 2). Remarkably, these plateau potentials were sodium-dependent events as they were fully blocked by the application of 1 μM TTX (Fig. 6F1). Unlike SS- V1^{R} , these V1^{R} can generate repetitive plateau potentials when

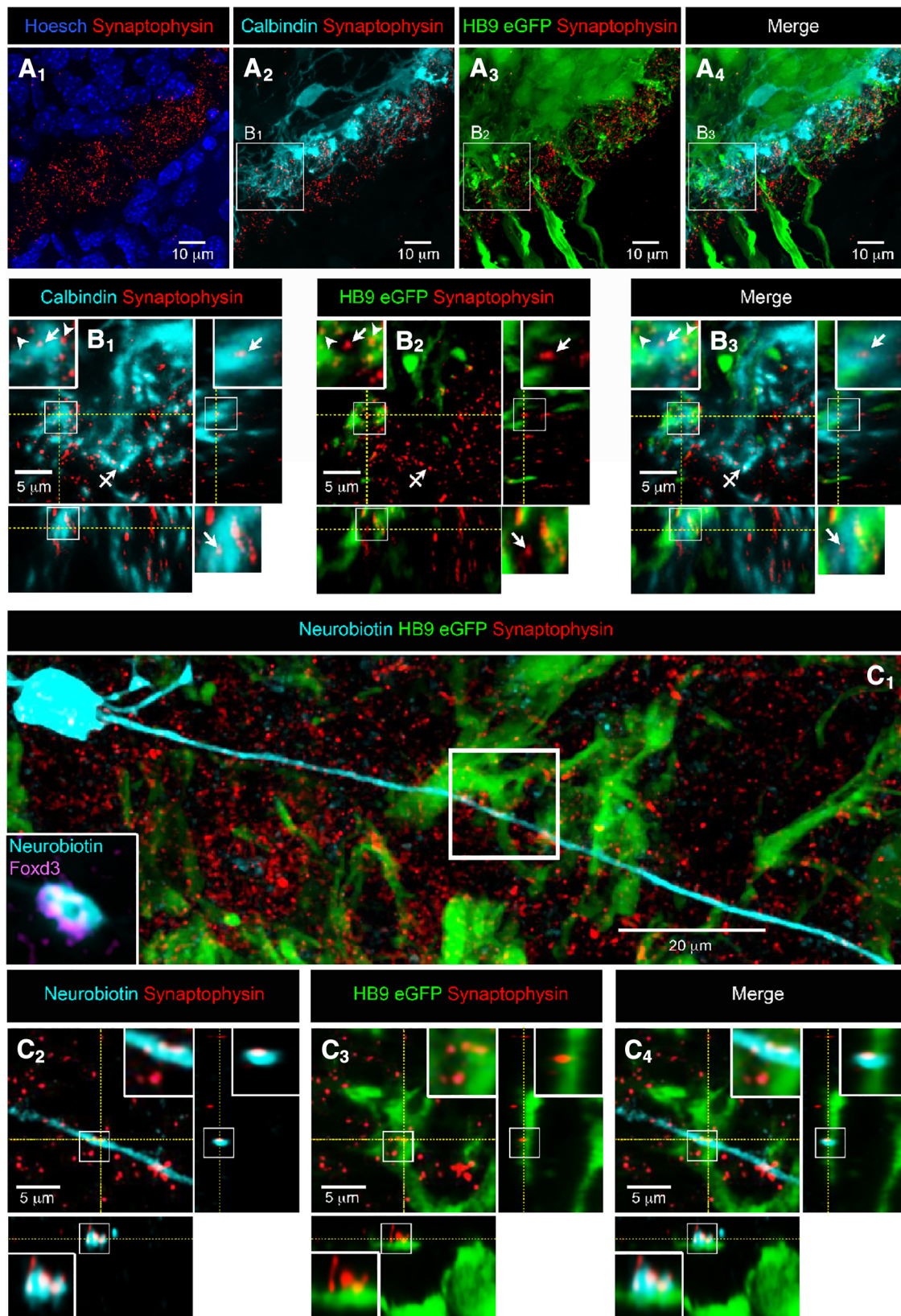


Figure 3. $V1^R$ make synaptic-like contacts with motoneurons (HB9-eGFP) at E12.5. **A**, Coronal slice of the lumbar spinal cord of E12.5 HB9-eGFP mouse embryo with cell nucleus staining (HOESCH) and synaptophysin immunostaining (**A1**). **A1**, Note that synaptophysin immunostaining is mainly restricted in the ventral funiculus. **A2**, Calbindin staining showing the distribution of $V1^R$ neurite extensions and synaptophysin immunostaining. **A3**, eGFP immunostaining showing the distribution of MN neurite extensions and synaptophysin immunostaining. Antibody against GFP was used to visualize MN morphology better (Czarnecki et al., 2014). **A4**, Superimposition of eGFP fluorescence, calbindin immunostaining and synaptophysin immunostaining (**A1–A4** are confocal stacks). **B**, Single confocal sections with z projections of enlarged images from **A2** to **A4** showing the colocalization of synaptophysin punctates with calbindin immunostaining opposed to eGFP immunostaining (**B1–B3**; enlarged images in boxes). **B2**, Note that a synaptophysin punctate colocalized with calbindin immunostaining (**B1**, arrow) did not colocalize with eGFP immunostaining (**B2**, arrow). Note that synaptophysin punctate colocalized with eGFP immunostaining (**B1**, arrowheads) did not colocalize with calbindin immunostaining (*Figure legend continues.*)

depolarized by a suprathreshold depolarizing current ramp (Fig. 6B). We called these $V1^R$, PP- $V1^R$ (plateau potential $V1^R$). A third group of $V1^R$ (41.5%; $n = 68/165$) was identified based on their ability to generate repetitive AP firing in response to suprathreshold depolarizing current steps or to depolarizing current ramps. In these cells, APs had a half amplitude duration ≈ 13 ms (Table 2). We called these $V1^R$, RS- $V1^R$ (repetitive spiking $V1^R$; Fig. 6C). Finally, a fourth group of cells (8.5%; $n = 14/165$) was determined according to their ability to generate both APs and plateau potential-like events (Fig. 6D). We called these $V1^R$, ME- $V1^R$ (mixed event $V1^R$). SS- $V1^R$ are unlikely to be dying neurons. Developmental cell death of $V1$ INs occurs after E14.5 in mouse embryos (Prasad et al., 2008) and SS- $V1^R$ passive electrical properties did not differ from those of more active $V1^R$ (Table 2).

Considering that the different types of intrinsic activation pattern may reflect a continuum between a single spike and a plateau potential, we chose to focus our study on the three clear patterns of intrinsic activation, SS- $V1^R$, RS- $V1^R$ and PP- $V1^R$, and to not study the mixed regime in depth. Table 2 summarizes passive and active intrinsic electrical properties of recorded SS- $V1^R$, RS- $V1^R$ and PP- $V1^R$. Note that the difference in intrinsic excitability in these different classes of $V1^R$ is not due to difference in their membrane resistance ($p > 0.1$).

These results reveal that $V1^R$ can have different regimes of activity in the embryonic SC at the onset of synaptogenesis and SNA (E12.5; Scain et al., 2010; Czarnecki et al., 2014).

Sustained discharge in embryonic $V1^R$ depends on persistent sodium current

A key element in neurons, which exhibit sustained discharges, is the expression of subthreshold slow-inactivating inward currents. Among these inward currents, the TTX-sensitive persistent inward current (I_{Nap}) plays a fundamental role in controlling sustained discharge in INs and MNs in the SC at postnatal developmental stages (Lee and Heckman,

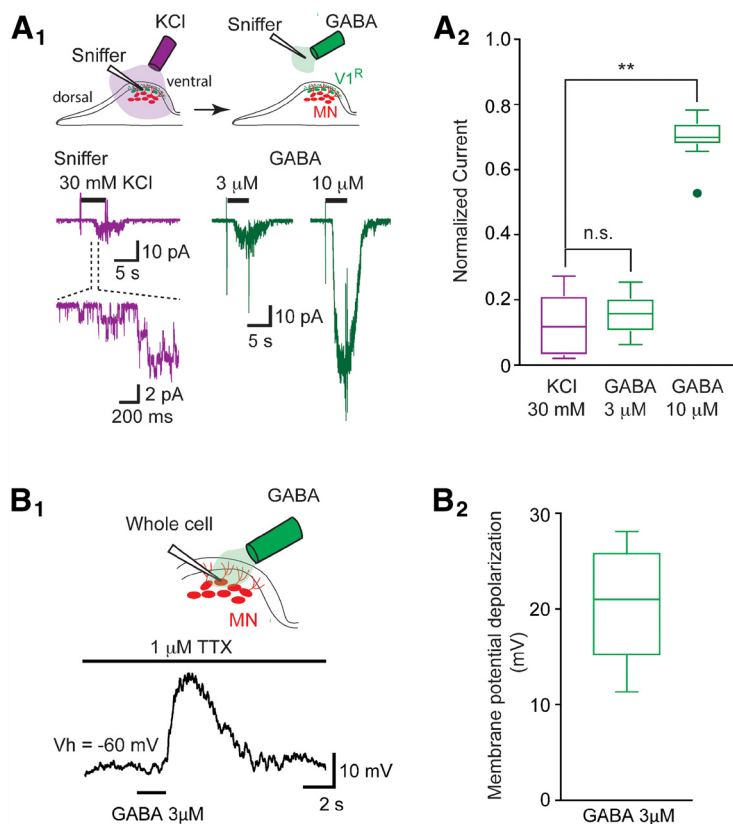


Figure 4. Paracrine release of GABA detected by a sniffer outside-out patch. **A1**, Top drawing shows the location of the outside-out sniffer to detect paracrine release of GABA (left) and to obtain outside-out currents in response to GABA application (left). Bottom traces (purple): example of outside-out sniffer current evoked by the application of 30 mM KCl when the sniffer electrode was positioned in the dorsal area of the SC close to motor columns. Enlarged trace shows single-channel currents at the onset of the sniffer current. Right traces (green) show outside-out current evoked by the application of 3 and 10 μM GABA to a sniffer patch positioned outside the spinal cord. Purple and green traces are from the same outside-out patch. **A2**, Box plots of normalized maximum outside-out current evoked by KCl application (purple left) and by the application of 3 or 10 μM GABA (green right) on the same outside-out sniffer patch ($n = 9$). Amplitudes of the outside-out currents evoked by the application of 30 mM KCl, 3 or 10 μM GABA, were normalized to the amplitude of the outside-out currents evoked by the application of 30 μM GABA (data not shown). Note that the normalized amplitude of the outside-out current evoked by 30 mM KCl application (0.118 ± 0.097) was not significantly different ($p > 0.9$) from the normalized amplitude of the outside-out current evoked by the application of 3 μM GABA (0.152 ± 0.062). Normalized amplitudes of the outside-out currents evoked by the application of 30 mM KCl or of 3 μM GABA were significantly different (KCl: $p = 0.0029$; 3 μM GABA: $p = 0.00665$) from the normalized amplitude of the outside-out currents evoked by the application of 10 μM GABA (0.697 ± 0.073). ** $p < 0.01$. **B1**, Example of motoneuron membrane potential depolarization evoked by the application of 3 μM GABA in the presence of 1 μM TTX (current-clamp recording: $V_h = -60$ mV; $E_{\text{Cl}} = -30$ mV). **B2**, The application of 3 μM GABA evoked a depolarizing response of 20.6 ± 6.1 mV ($n = 7$).

1998; Kuo et al., 2006; Theiss et al., 2007; Ziskind-Conhaim et al., 2008).

To determine whether I_{Nap} is already expressed by $V1^R$ in E12.5 mouse embryo, we made whole-cell voltage-clamp recordings. In this set of experiments, the electrodes were filled with a Cs-based intracellular solution to minimize contamination of the recorded current by potassium currents. A test pulse from -100 to -20 mV evoked TTX-sensitive sodium currents: a large amplitude transient current (I_{NaT}) followed by a smaller amplitude current persisting over 0.5 s was also fully blocked by TTX (Fig. 7A1, inset), which indicates the presence of I_{Nap} . This also indicates that sodium-independent voltage-gated inward currents were not detected at this developmental stage. To characterize I_{Nap} better, we used a slow voltage ramp (70 mV/s) from -100 to $+20$ mV designed to inactivate transient currents (Huang and Trussell, 2008). Subtraction of the trace after TTX application revealed the I_{Nap} on the I - V curve (Fig.

(Figure legend continued.) **(B2, arrowhead)**. Barred arrow **(B1)** shows a colocalization of calbindin and synaptophysin immunostaining not opposed to eGFP immunostaining. **B4**, superimposed images **(B1–B3)** with z projections showing calbindin immunostaining and eGFP appositions. **C1**, Confocal stacks showing neurobiotin-injected Foxd3-immunoreactive $V1^R$, HB9-eGFP immunostaining and synaptophysin immunostaining in an SC open book preparation. **C2–C4**, Single confocal sections with z projections of enlarged images from **C1** (white box) showing the colocalization of synaptophysin punctates with neurobiotin staining (**C2**), the apposition of the same synaptophysin punctates to eGFP (**C3**) and the apposition of neurobiotin staining containing synaptophysin punctates to eGFP (**C4**; enlarged image in boxes in **C2–C4**), indicating the presence of a $V1^R$ synaptic-like contact on an MN neurite.

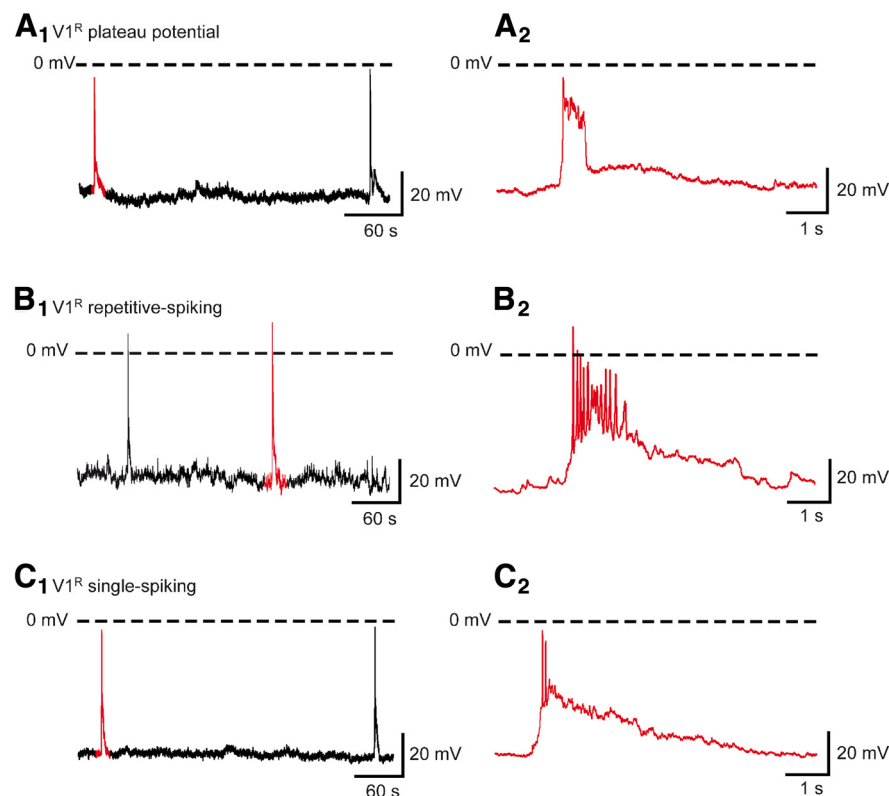


Figure 5. V1^{R} display plateau potential, repetitive firing or generate a single AP during episodes of SNA in E12.5 spinal cord. Examples of spontaneous activities recorded in V1^{R} being characterized by GDPs displaying plateau potential (**A**), repetitive firing (**B**), or a single AP (**C**) activity ($V_h = -60$ mV). Recordings shown in **A–C** are from different cells.

7A1). I_{Nap} was observed in all recorded V1^{R} . We further investigated the activation properties of the I_{Nap} . The Boltzmann fit of the voltage dependence of the I_{Nap} generated by voltage ramps revealed a V_{half} of -22.9 ± 5.7 mV and a slope factor (k) of 7.0 ± 1.8 mV in V1^{R} ($n = 8$; Fig. 7A2). In V1^{R} , the I_{Nap} activated at $V_h = -67.4 \pm 6.2$ mV ($n = 8$) and the mean persistent sodium conductance density (g_{Nap} /pF) was 41.8 ± 22.7 pS/pF ($n = 12$; Fig. 7B).

To further confirm that this persistent inward current truly reflects the presence of I_{Nap} , we tested the effect of a low concentration of riluzole ($5 \mu\text{M}$), which is known to block I_{Nap} (Urbani and Belluzzi, 2000). Indeed, $5 \mu\text{M}$ riluzole suppressed $81.5 \pm 14.6\%$ ($n = 15$; $p = 0.0005$) of the I_{Nap} in V1^{R} (Fig. 7C), whereas at this low concentration riluzole only slightly reduced the peak amplitude of I_{NaT} (see red arrows in Fig. 7A1, inset). We confirmed on MNs that this low concentration had a minimal effect on the sodium-dependent AP, which was not the case when riluzole concentration was increased to $10 \mu\text{M}$ (Figs. 8A, B1–B3). AP amplitude was significantly reduced to $83.2 \pm 12.6\%$ of control in the presence of $5 \mu\text{M}$ riluzole ($n = 7$; $p = 0.008$), but was reduced to $67.5 \pm 17.0\%$ of control when riluzole concentration was increased to $10 \mu\text{M}$ ($n = 7$, $p = 0.0078$). AP threshold potential was significantly reduced in the presence of $10 \mu\text{M}$ riluzole ($p = 0.0156$) and AP half-width was significantly reduced in the presence of $5 \mu\text{M}$ ($p = 0.0313$) and $10 \mu\text{M}$ riluzole ($p = 0.0313$). We then reasoned that the lack of repetitive spiking or plateau potential activity observed in some V1^{R} might depend on a reduced level of I_{Nap} . To test this hypothesis, we compared the presence of I_{Nap} in V1^{R} that cannot generate repetitive spiking (SS- V1^{R}) with V1^{R} that can generate repetitive spiking (RS- V1^{R}) and with V1^{R} generating plateau potentials (PP- V1^{R}). We developed a voltage-

and current-clamp recording protocol in a given neuron allowing us to associate the amplitude of the I_{Nap} with the excitability pattern in each type of spinal neuron (K-methanesulfonate intracellular solution; Fig. 9A1–A4). The same voltage ramp (70 mV/s) was used as described above. The I_{Nap} current was revealed by subtracting ramp-evoked current in the presence of $1 \mu\text{M}$ TTX from controls. In these conditions, SS- V1^{R} had a significantly lower g_{Nap} density (22.1 ± 12.6 pS/pF, $n = 13$) compared with RS- V1^{R} (57.8 ± 17.4 pS/pF, $n = 7$) and to PP- V1^{R} (70.6 ± 34.0 pS/pF, $n = 11$; $p < 0.0001$; Fig. 9A4). These results highlight a direct relationship between the strength of I_{Nap} and the ability of V1^{R} to sustain repetitive spiking and plateau potential activity.

To determine whether I_{Nap} is required for repetitive spiking in embryonic V1^{R} , we assessed the effect of riluzole on V1^{R} that can sustain AP firing or plateau potential activity. The application of $5 \mu\text{M}$ riluzole turned all RS- V1^{R} into SS- V1^{R} ($n = 10$; Fig. 9B). In the presence of $5 \mu\text{M}$ riluzole, the depolarizing current step failed to trigger more than a doublet in these cells. $5 \mu\text{M}$ riluzole did not significantly change the AP threshold (-37.2 ± 3.2 mV vs -36.8 ± 6.0 mV with $5 \mu\text{M}$ riluzole, $n = 10$, $p = 0.70$). In all PP- V1^{R} , riluzole prevented the plateau potential activity ($n = 7$; Fig. 9C). Increasing the amplitude of the injected current failed to evoke any AP, indicating that PP- V1^{R} were turned into nonexcitable neurons when I_{Nap} was blocked.

Altogether, these results indicate that I_{Nap} already plays an important role in V1^{R} intrinsic activation properties at this early embryonic developmental stage of SC neuronal networks.

Blocking persistent sodium current alters SNA pattern and SNA propagation along the cord

Synchronous activation of MNs and INs was proposed to drive episodes of activity during SNA (Hanson and Landmesser, 2003; Czarnecki et al., 2014). If intrinsic activation properties of the few INs that produce GABA including V1^{R} , rely on the I_{Nap} , we expected that blocking I_{Nap} would alter episodes of activity during SNA in a manner similar to that observed in the presence of GABA_A antagonists (Hanson and Landmesser, 2003; Czarnecki et al., 2014). Blocking GABA neurotransmission during SNA evoked an increase in inter-episode interval, but had little effect on the duration of episode of activity and on their propagation along the cord (Hanson and Landmesser, 2003). In addition, we previously showed that blocking GABA neurotransmission decreased the amplitude of spontaneous giant inward currents (sGICs) recorded in MNs during SNA (Czarnecki et al., 2014).

To determine the involvement of I_{Nap} in SNA, we first tested the effect of $5 \mu\text{M}$ riluzole on the spontaneous activity of MNs using whole-cell voltage-clamp recordings. In control conditions, sGICs occurred every 4 min (4.0 ± 0.8 min, $n = 9$), had mean amplitude of 291 ± 200 pA ($n = 9$) and a half-width of 0.6 ± 0.3 s ($V_h = -60$ mV; $\text{ECl} = 3$ mV; Fig. 10A1–A2). The time

course of the effect of riluzole on sGIC occurrence was variable among MNs. In one of nine recorded MNs, riluzole abolished GIC activity in <10 min. In other MNs, one to two GICs could still be observed during the 20–30 min application of riluzole. (Fig. 10A2). During this transitory period, riluzole significantly reduced the amplitude of GICs ($30.8 \pm 32.7\%$ reduction; $n = 8$; $p = 0.039$; Fig. 10B1) and the half-duration of GICs ($44.0 \pm 27.2\%$ reduction; $n = 8$; $p = 0.0078$; Fig. 10B2). To assess the effect of riluzole on SNA, we made long-lasting extracellular recordings of SC activity using two electrodes positioned on the cervical and lumbar superficial part of the ventral horn of the SC at E12.5 (Czarnecki et al., 2014; Fig. 10C1).

These recordings allowed us to monitor SC neuron activity related to GIC activity recorded in MNs (Czarnecki et al., 2014). We found that a 30–40 min application of $5 \mu\text{M}$ riluzole significantly increased the inter-episode interval from 4.18 ± 1.93 min in control conditions to 12.34 ± 9.08 min in the presence of riluzole ($p < 0.001$, $n = 12$ paired SCs; $196.3 \pm 203\%$ increase; Fig. 10C2,C3), revealing a strong involvement of the I_{Nap} current in the rhythmicity of early SC network activity. We therefore analyzed individual bursts of AP exhibited by the cervical (C) and lumbar (L) SC networks in the presence of riluzole. We found that the duration of bursts (both C and L), compared before (2.31 ± 0.89 s) and after the riluzole application (1.44 ± 0.7 s), was significantly reduced ($36.5 \pm 18.3\%$ reduction; $n = 22$; $p < 0.001$; Fig. 10C4). In addition, the instantaneous AP frequency within a burst at both the cervical level (C level) and the lumbar level (L level) was significantly reduced by $25.3 \pm 11.9\%$ ($p < 0.001$) in the presence of riluzole (112.4 ± 39.6 Hz in control conditions and 83.3 ± 34.4 Hz with riluzole, $n = 22$; Fig. 10C5). We also observed a reduction in the speed of propagation of SNA episodes between the C level and L level of the SC in the presence of riluzole. Propagation of SNA along the cord was investigated by analysis of the time needed for a burst of AP recorded at the C level to reach L level (distance between the 2 recording levels ≈ 4 mm; Yvert et al., 2004). We found that the C–L time was significantly increased ($p < 0.001$) from 1.56 ± 0.42 s in control conditions to 2.42 ± 0.77 s in the presence of riluzole ($56.3 \pm 36.1\%$ increase; $n = 10$; Fig. 10C6).

Riluzole had a stronger effect on SNA than previously observed in the presence of GABA_AR antagonists (Hanson and Landmesser, 2003; Czarnecki et al., 2014). Targeted networks during extracellular recordings likely include MNs as well as surrounding INs (Hanson and Landmesser, 2003; Czarnecki et al., 2014) including $V1^{\text{R}}$ GABAergic INs. Because most GABAergic $V1^{\text{R}}$ are able to generate repetitive firing in response to GDP, which is not the case for MNs (Czarnecki et al., 2014), this apparent discrepancy could be explained if blocking GABA neurotransmission does not strongly alter GABAergic INs firing, just as riluzole does. We cannot, however, exclude that I_{Nap} is also

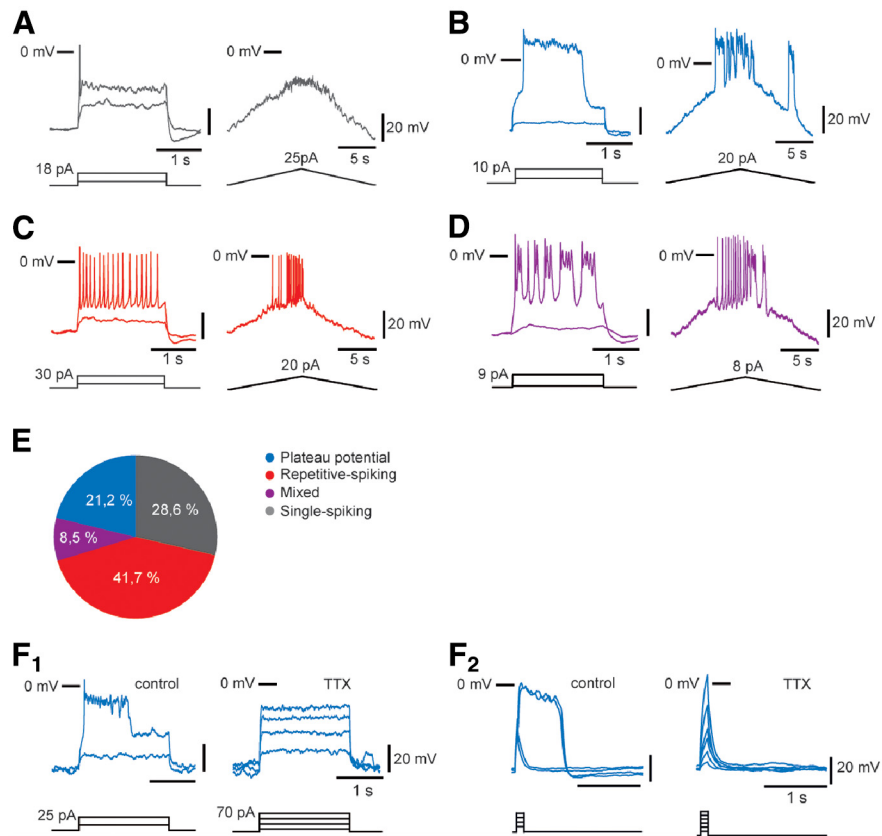


Figure 6. $V1^{\text{R}}$ display different excitability patterns in E12.5 embryonic spinal cords. Excitability patterns were analyzed using depolarizing current step (2 s) and depolarizing current ramp (20 s). **A–D**, Representative traces of voltage responses showing single-spiking activity (**A**), plateau potential activity (**B**), repetitive AP firing (**C**), and mixed repetitive-spiking/plateau potential activity (**D**). **E**, Proportions of $V1^{\text{R}}$ subtypes according to the observed discharge patterns. 28.6% of $V1^{\text{R}}$ could not sustain repetitive spiking, 41.7% were repetitive-spiking $V1^{\text{R}}$, 8.5% were mixed $V1^{\text{R}}$, 21.2% were plateau potential $V1^{\text{R}}$ ($n = 164$). **F**, Plateau potentials are blocked by TTX ($1 \mu\text{M}$) application ($n = 5/5$; **F1**, **F2**). **F2**, Plateau potentials are evoked by short (100 ms) pulses of depolarizing current.

Table 2. Intrinsic functional properties of $V1^{\text{R}}$

	SS- $V1^{\text{R}}$	RS- $V1^{\text{R}}$	PP- $V1^{\text{R}}$
Whole cell capacitance, pF	13.3 ± 2.8 $N = 82$	15.3 ± 4.5 $N = 60$	12.4 ± 3.6 $N = 50$
Input resistance, M Ω	1298 ± 682 $N = 82$	1156 ± 616 $N = 60$	1254 ± 508 $N = 50$
Threshold, mV	-34.1 ± 3.3 $N = 46$	-33.6 ± 4.9 $N = 53$	-35.9 ± 6.0 $N = 36$
Peak amplitude, mV	-6.8 ± 6.1 $N = 46$	3.2 ± 6.7 $N = 53$	3.4 ± 10.3 $N = 36$
Half-width, ms	11.2 ± 8.2 $N = 46$	12.8 ± 6.9 $N = 53$	705.7 ± 631.7 $N = 36$
Rate of rise, mV/ms	8.4 ± 3.8 $N = 27$	13.4 ± 9.4 $N = 27$	6.2 ± 3.7 $N = 19$

SS- $V1^{\text{R}}$, Single-spiking Renshaw cells; RS- $V1^{\text{R}}$, repetitive-spiking Renshaw cells; PP- $V1^{\text{R}}$, plateau potential Renshaw cells. Threshold values represent the averaged AP threshold for single-spiking $V1^{\text{R}}$ and repetitive spiking $V1^{\text{R}}$ and the averaged plateau potential threshold for plateau potential $V1^{\text{R}}$. Peak amplitude values represent the averaged peak amplitude of the AP for single-spiking $V1^{\text{R}}$, the averaged peak amplitude of the first AP in a train for repetitive spiking $V1^{\text{R}}$ and the averaged peak amplitude of plateau potentials for plateau potential $V1^{\text{R}}$. Half-width values represent the averaged half width of the AP for single-spiking $V1^{\text{R}}$, the averaged half-width of the first AP in a train for repetitive spiking $V1^{\text{R}}$ and the averaged half width of plateau potentials for plateau potential $V1^{\text{R}}$. Rate of rise values represent the averaged rate of rise of the AP for single-spiking $V1^{\text{R}}$, the average rate of rise of the first AP in a train for repetitive spiking $V1^{\text{R}}$ and the average rate of rise of plateau potentials for plateau potential $V1^{\text{R}}$. Values are expressed as mean $\pm$ SD. Input resistance of SS- $V1^{\text{R}}$, input resistance of RS- $V1^{\text{R}}$, and input resistance of PP- $V1^{\text{R}}$ were not significantly different ($p = 0.17$).

present in neurons other than $V1^{\text{R}}$ in the SC at E12.5. Anyhow, these results indicate that I_{Nap} plays an important role in SNA at the onset of synaptogenesis (E12.5) by regulating neuron excitability in the mouse embryonic SC.

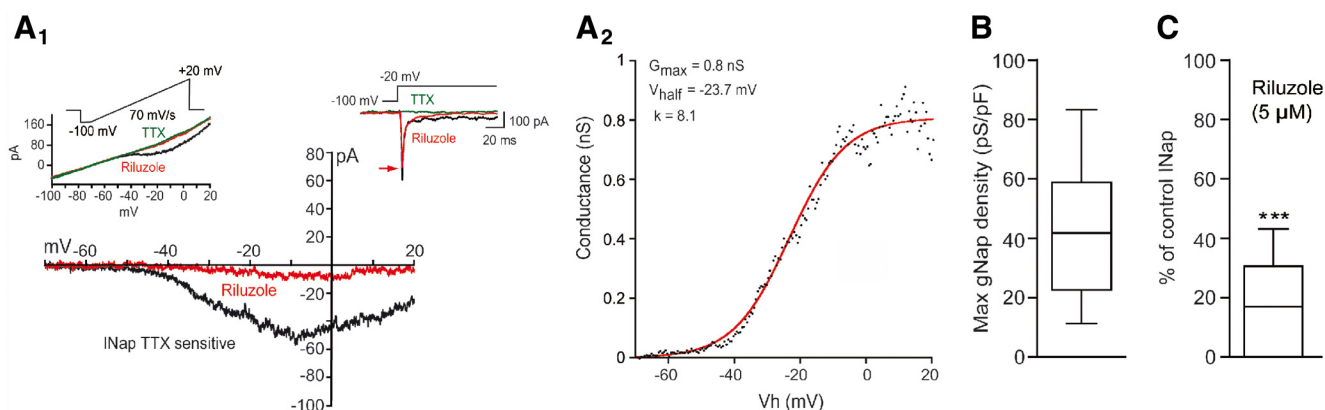


Figure 7. I_{Nap} is already expressed in $V1^R$. **A1**, Representative trace of I_{Nap} evoked by a slow depolarizing voltage ramp in a $V1^R$ (CsCl intracellular solution). I_{Nap} (black trace) was isolated by subtracting the current elicited by a voltage ramp (70 mV/s) in the presence of TTX (inset, green trace) from the control current (inset, black trace). TTX-sensitive current was blocked by 5 μM riluzole (red trace). Left, Inset shows the protocol to generate voltage-dependent slow inward currents in control conditions (black), after 5 μM riluzole application (red) or 1 μM TTX application (green). Right, Inset shows the current evoked by a depolarizing voltage step from -100 to 20 mV in the absence and in the presence of 5 μM riluzole. **A2**, Voltage dependence of I_{Nap} conductance calculated from the trace shown in **A1**. The activation curve was obtained by transforming the current evoked by a depolarizing voltage ramp from -100 to 20 mV (70 mV/s) using the following equation: $G_{\text{Nap}} = -I_{\text{Nap}}/[(V_h) + E_{\text{Na}} +]$ where V_h is the holding potential at time t during a depolarizing voltage ramp and $E_{\text{Na}} +$ is the equilibrium potential for sodium ($E_{\text{Na}} + = 60$ mV). The G_{Nap}/V_h curve was fitted with a Boltzmann function (see Materials and Methods), where V_{half} is the V_h value for I_{Nap} half activation, k the slope factor of the curve and G_{max} the maximum conductance. **B**, Box plot showing G_{max} density in $V1^R$ ($n = 12$). **C**, Box plots showing the variation of the percentage I_{Nap} block by 5 μM riluzole in $V1^R$.

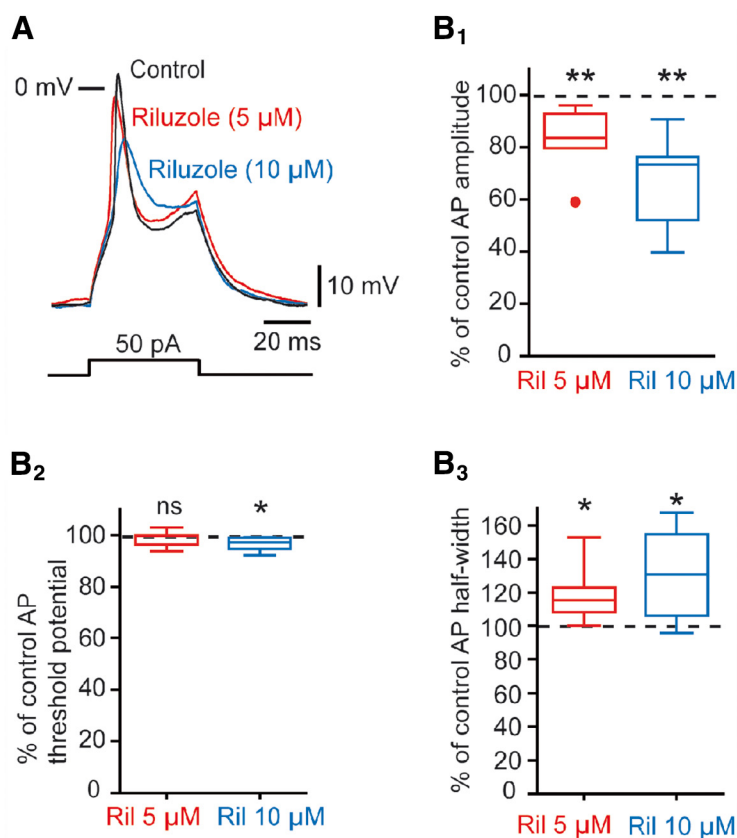


Figure 8. Effect of 5 and 10 μM riluzole on APs. **A**, Effect of 5 μM (red trace) and 10 μM (blue trace) riluzole on the AP evoked by a depolarizing current step in an MN. **B1**, Box plot showing the percentage changes in AP amplitude (% control) in the presence of 5 μM riluzole and 10 μM riluzole. **B2**, Box plot showing the percentage changes in AP threshold (% control) in the presence of 5 and 10 μM riluzole. **B3**, Box plot showing the percentage changes in AP half-width (% control) in the presence of 5 and 10 μM riluzole. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

Discussion

How excitability of neurons evolves during SC development was extensively studied at developmental stages at which central pattern generators are already functional. At these developmental

stages (P0–P5), I_{Nap} is present in MNs and in SC INs (Tazerart et al., 2007; Zhong et al., 2007) and is required to generate fictive locomotion (Zhong et al., 2007). Here, we show that $V1^R$ already expresses I_{Nap} at the onset of synaptogenesis in the embryonic (E12.5) SC (Scaini et al., 2010). Our results reveal that I_{Nap} already closely controls the $V1^R$ excitability pattern. In addition, we found that low concentrations of riluzole, an I_{Nap} blocker, dramatically altered the SC SNA pattern, suggesting that I_{Nap} is already expressed by neurons in the mammalian embryonic SC well before the control of muscle contraction by MNs (Sanes and Lichtman, 1999).

$V1^R$ display different excitability patterns at the onset of SNA

Repetitive firing of presynaptic neurons is required for long-lasting neurotransmitter-dependent episodes, as GDPs observed in MNs at E12.5. Previous studies have examined the development of passive and active membrane properties of MNs and INs in late embryonic and newborn rats or mice (Ziskind-Conhaim, 1988; Gao and Ziskind-Conhaim, 1998; Vinay et al., 2000; Theiss et al., 2007; Perry et al., 2015; Bikoff et al., 2016), but there is no information about the excitability of INs at early mammalian embryonic developmental stages when SNA first arises. We found that a majority of $V1^R$ ($\approx 60\%$) can already generate repetitive AP firing or

long-lasting sodium-dependent plateau potentials at the onset of SNA, indicating that these cells are already active at this early embryonic developmental stage. Our analysis revealed a strong heterogeneity in $V1^R$ excitability pattern, which can be separated

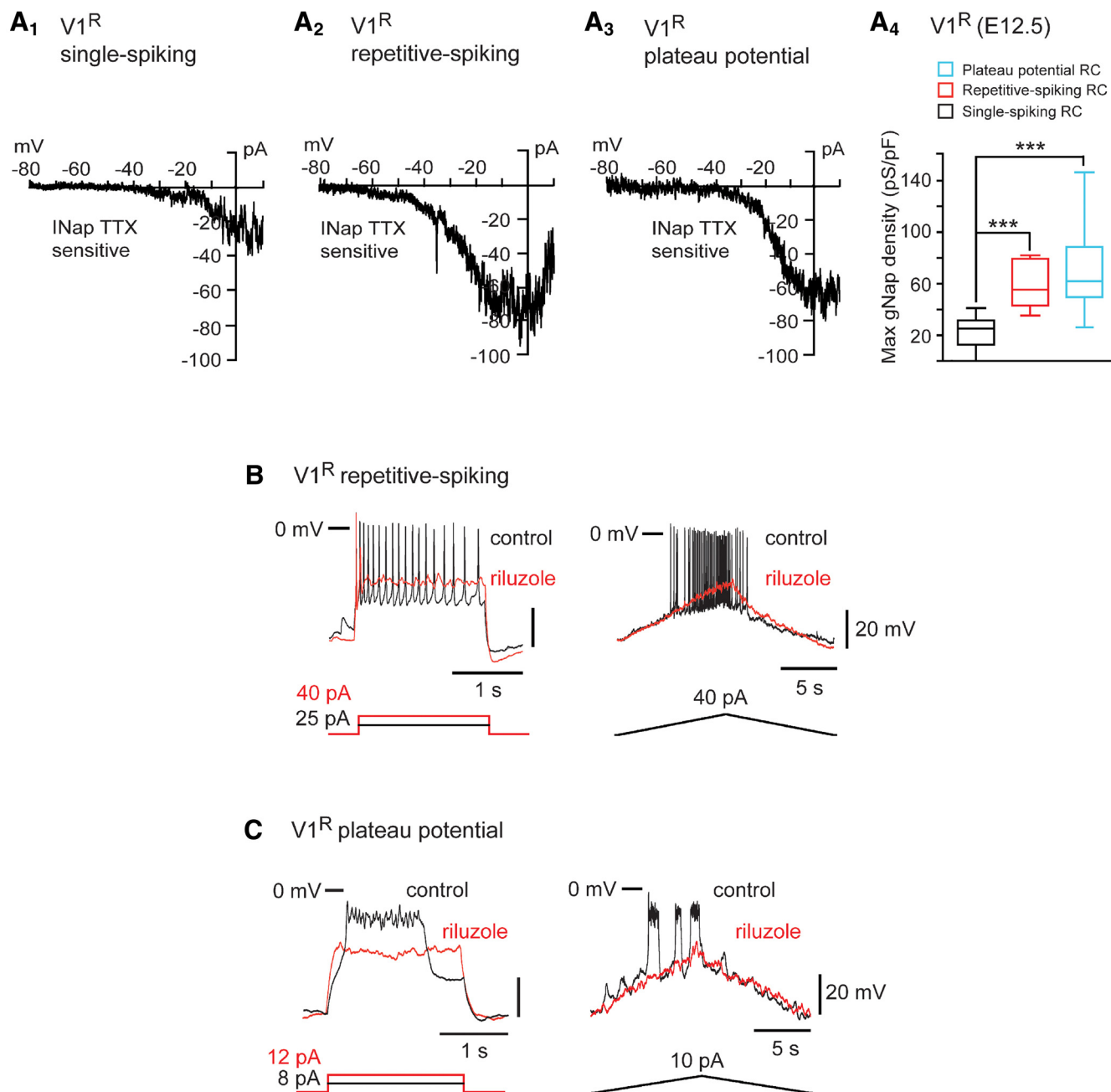


Figure 9. Sustained discharge in embryonic $V1^R$ depends on I_{Nap} . **A**, Representative traces of I_{Nap} recorded in $V1^R$ that cannot sustain repetitive spiking (SS- $V1^R$; **A1**), in a repetitive-spiking $V1^R$ (RS- $V1^R$; **A2**) and in a plateau potential $V1^R$ (PP- $V1^R$; **A3**). I_{Nap} was isolated by subtracting the current elicited by a slow voltage ramp (−100 to +20 mV; 70 mV/s) in the presence of 1 μM TTX from the current evoked in the absence of TTX. **A4**, Box plots showing G_{max} density in SS- $V1^R$ ($n = 13$), RS- $V1^R$ ($n = 8$) and PP- $V1^R$ ($n = 11$). Note that G_{max} density is significantly lower in SS- $V1^R$ ($p < 0.01$). **B**, Representative traces showing the effect of riluzole application (5 μM) on the intrinsic activity pattern evoked by suprathreshold current steps (left traces) or a suprathreshold current ramp (right traces) in an RS- $V1^R$. Note that riluzole blocks repetitive spiking ($n = 10/10$). **C**, Representative traces showing the effect of riluzole application on plateau potential evoked by suprathreshold current steps (left traces) or by a suprathreshold current ramp (right traces) in a $V1^R$. Note that riluzole blocks plateau potential activity ($n = 7/7$). *** $p < 0.001$.

into different independent classes, but such functional diversity is unlikely to persist in the adult. In the adult, $V1^R$ were found to generate two different excitability patterns only, a prominent low-threshold depolarization and burst firing followed by continuous firing dependent on V_h (Perry et al., 2015; Bikoff et al., 2016). It is therefore likely that the functional heterogeneity we observed at E12.5 reflects an immature form of $V1^R$ excitability (Perry et al., 2015; Bikoff et al., 2016). Sodium-dependent plateau potentials were also observed in ipsilateral caudal SC INs of zebrafish embryos at the appearance of functional neuromuscular junctions and then disappeared at more mature stages (Tong and McDearmid, 2012).

I_{Nap} already regulate excitability patterns of $V1^R$ at early developmental stages

In this study, we reveal the presence of I_{Nap} in neurons of mammalian embryos at the onset of SNA. Persistent inward currents (PICs) are present in many types of neurons. PICs can be calcium- and/or sodium-dependent depending on the neuron subtypes. We did not find any evidence for a significant calcium component in recorded PICs in $V1^R$ at E12.5. Indeed, the PIC was fully blocked by TTX in $V1^R$, which contrasts with what is known about more mature spinal neurons like MNs (Hounsgaard and Kiehn, 1989; Bui et al., 2006; Carlin et al.,

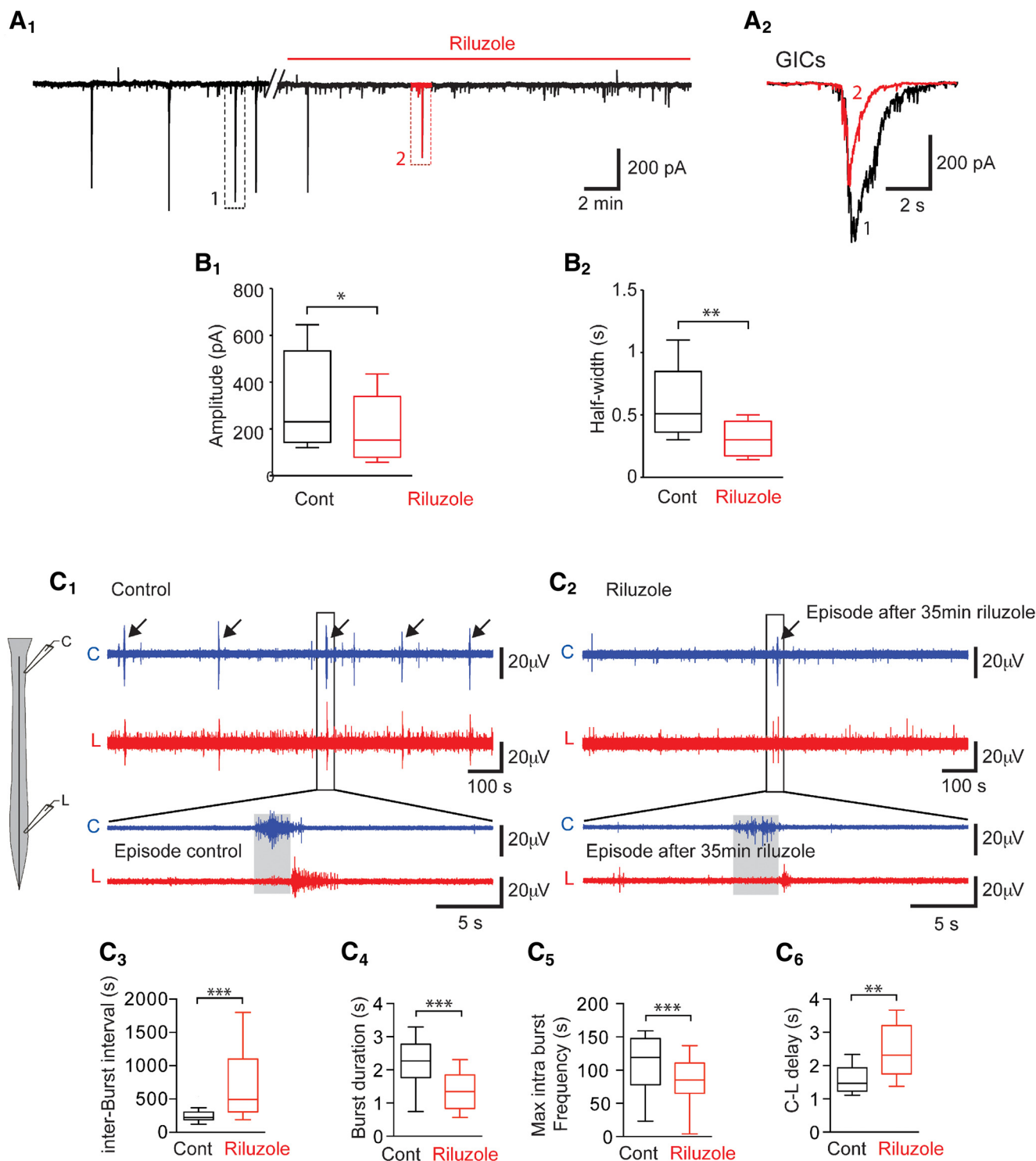


Figure 10. Riluzole dramatically decreases the frequency and duration of episodes of SNA in E12.5 embryonic spinal cord. **A₁**, Application of $5 \mu\text{M}$ riluzole inhibits spontaneous GIC activity in MNs (voltage-clamp recordings; $V_h = -60 \text{ mV}$; $\text{ECI} = -30 \text{ mV}$). **A₂**, Enlarged trace from **A₁** showing GIC before (1, black) and at the onset of riluzole application (2, red). Note that the amplitude and the duration of GICs were decreased on riluzole application. **B₁**, Box plots showing the amplitude of the GIC in a control and on riluzole application ($n = 8$). Note that the amplitude ($p < 0.05$) and the duration ($p < 0.01$) of GICs were significantly reduced in the presence of riluzole. **B₂**, Box plots showing half amplitude durations of the GIC in control and on riluzole application ($n = 8$). Note that the amplitude ($p < 0.05$) and the duration ($p < 0.01$) of GICs were significantly reduced in the presence of riluzole. **C**, SNA recorded at the cervical (C) and lumbar (L) levels (see schematic drawing on the left) in extracellular configuration before (**C₁**) and after $5 \mu\text{M}$ riluzole (**C₂**). Note that one episode still occurred 35 min after riluzole application. **C₃–C₆**, Box plots illustrating interburst interval, burst duration, intraburst spike frequency, and cervical-lumbar delay of episode propagation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2009). Accordingly, we concluded that immature V1^{R} at the onset of SNA generate a pure sodium-dependent PIC. I_{Nap} recorded in V1^{R} of the mouse embryo has an activation onset ($\approx -65 \text{ mV}$) similar to that of I_{Nap} at postnatal developmental stages in the rat

and mouse SC (Kuo et al., 2006; Tazerart et al., 2007; Theiss et al., 2007; Tazerart et al., 2008; Dai and Jordan, 2010). The Boltzmann constant of activation calculated for I_{Nap} in V1^{R} ($\approx 7 \text{ mV}$) is in the range of the values known for I_{Nap} in INs and MNs ($\approx 6 \text{ mV}$) of

neonatal rats (Bouhadfane et al., 2013) or in the calyx of Held (≈ 8 mV; Huang and Trussell, 2008). Small differences in the voltage dependency of I_{Nap} activation may reflect differences in sodium channel α -subunit and/or β -subunit combination expression (Isom et al., 1994; Qu et al., 2001).

I_{Nap} likely has diverse functions and plays an important function in locomotor pattern generation in neonatal rats (Tazerart, S. et al., 2007). In neonate SC, I_{Nap} is present in both INs and MNs (Kuo et al., 2006; Tazerart et al., 2007) and is known to generate pacemaker activities in central pattern generator INs (Tazerart et al., 2008). Remarkably, I_{Nap} also contributes to lumbar MN activity related to plateau potential in rat neonates (Bouhadfane et al., 2013). However, while in neonate MNs, I_{Nap} is essential for self-sustained firing only during calcium-dependent plateau potential depolarization (Carlin et al., 2009; Bouhadfane et al., 2013), plateau potential activity in $V1^R$ at E12.5 is fully I_{Nap} -dependent.

Does I_{Nap} already participate in SC activity at the onset of neuronal network formation?

I_{Nap} plays a crucial role in the regulation of locomotor pattern generation in rat neonates (Tazerart et al., 2007; Zhong et al., 2007; Bouhadfane et al., 2013) and in the SC of the zebrafish embryo during the cooling stage (Tong and McDermid, 2012). Here, we demonstrated that a low concentration of riluzole dramatically reduced the amplitude and the duration of GICs recorded on MNs and strongly altered SC activity (extracellular recordings) at the onset of SNA.

In our experiments, we used a concentration of riluzole that has a minimal effect on the sodium AP waveform (Fig. 6). However, beside its effect on I_{Nap} , riluzole is known to inhibit the release of glutamate (Ch  ramy et al., 1992), to inhibit AMPA receptor activation (Albo et al., 2004), GABA_A and glycine receptor activation (Mohammadi et al., 2001) and to block several voltage-gated channels including calcium channels (Huang et al., 1997; Ahn et al., 2006). With the exception of AMPA receptor inhibition (Albo et al., 2004), these side effects of riluzole occur at concentrations $\geq 10 \mu\text{M}$ (Ch  ramy et al., 1992; Huang et al., 1997; Mohammadi et al., 2001; Ahn et al., 2006). Because the inhibition of glutamate neurotransmission did not alter SNA in the mouse embryonic SC at E12.5 (Czarnecki et al., 2014), it is unlikely that the alteration of SNA we observed in the presence of $5 \mu\text{M}$ riluzole is caused by the inhibition of glutamatergic synaptic activity (Albo et al., 2004). Accordingly, we propose that I_{Nap} already regulates the SNA pattern at the onset of synaptogenesis in mammalian embryos before the formation of the locomotor SC network and of functional neuromuscular junctions. However, we cannot exclude that spinal neurons other than $V1^R$ exhibit I_{Nap} -dependent sustain discharge at this developmental stage.

Because $V1^R$ already produce GABA at E12.5 and make synaptic-like contacts with MNs while MNs make synaptic-like contacts with $V1^R$ (see also (Alvarez et al., 2013)), it is likely that $V1^R$ participate in early SC SNA. Although correlative, our data reinforce the hypothesis that a primitive $V1^R$ -MN recurrent-like circuit may exist at the onset of synaptogenesis in the mouse embryo. This primitive $V1^R$ -MN recurrent circuit differs in several ways from the adult RC-MN recurrent circuits. Evoked MN spiking did not trigger a recurrent synaptic response at E12.5 (Le Bras et al., 2014), which suggests that although $V1^R$ projects on MNs and vice versa, it is unlikely that $V1^R$ projecting on MNs receive inputs from these MNs and vice versa. It is also unlikely that MN release sites apposed on $V1^R$ are mixed glutamatergic

and cholinergic inputs as observed at postnatal stages (Nishimaru et al., 2005; Lamotte d'Incamps et al., 2017). Glutamatergic vesicular transporters were not observed within MNs at E12.5 (Czarnecki et al., 2014). But we cannot completely exclude that some immature motor axon synapses on $V1^R$ already release aspartate, as suggested in the adult (Richards et al., 2014). However, contrary to what is observed for GABAergic and cholinergic networks, the spontaneous activation of glutamate receptors had a minor role only in the generation of SNA episodes at E12.5 (Czarnecki et al., 2014).

We clearly show that paracrine release of GABA can occur in the embryonic SC, which may explain the smooth shape of GABAergic-dependent GDPs observed in MNs during SNA (Czarnecki et al., 2014). Since $V1^R$ are GABAergic at this embryonic age and possess putative release sites, $V1^R$ may be one of the sources for the paracrine release of GABA we observed. Accordingly, we propose that $V1^R$ -MN interactions occur through synaptic and paracrine release and participate in the synchronization of neuronal assembly required for the generation of the propagating waves of activity characterizing SC SNA at E12.5 (Momose-Sato and Sato, 2013).

Conclusions

Together, our findings demonstrate that I_{Nap} is already present in developing SC neurons at an early developmental stage and governs $V1^R$ excitability. I_{Nap} plays an important role in the regulation of locomotor pattern generation at postnatal developmental stages in rodents (Tazerart et al., 2008). Because the application of a low concentration of riluzole altered SNA, we propose that I_{Nap} contributes to the patterning of embryonic SC activity at the onset of synaptogenesis. Accordingly, the capacity of SC neurons to generate sustained firing must be crucial for correct embryonic SC patterned activity at the onset of synaptogenesis, which is required for the correct development of MN projections toward their peripheral targets (Hanson and Landmesser, 2006).

References

- Ahn HS, Kim SE, Jang HJ, Kim MJ, Rhie DJ, Yoon SH, Jo YH, Kim MS, Sung KW, Hahn SJ (2006) Interaction of riluzole with the closed inactivated state of Kv4.3 channels. *J Pharmacol Exp Ther* 319:323–331. [CrossRef Medline](#)
- Albo F, Pieri M, Zona C (2004) Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *J Neurosci Res* 78: 200–207. [CrossRef Medline](#)
- Allain AE, Ba  ri A, Meyrand P, Branchereau P (2004) Ontogenic changes of the GABAergic system in the embryonic mouse spinal cord. *Brain Res* 1000:134–147. [CrossRef Medline](#)
- Allain AE, Ba  ri A, Meyrand P, Branchereau P (2006) Expression of the glycinergic system during the course of embryonic development in the mouse spinal cord and its co-localization with GABA immunoreactivity. *J Comp Neurol* 496:832–846. [CrossRef Medline](#)
- Alvarez FJ, Benito-Gonzalez A, Siembab VC (2013) Principles of interneuron development learned from Renshaw cells and the motoneuron recurrent inhibitory circuit. *Ann N Y Acad Sci* 1279:22–31. [CrossRef Medline](#)
- Barberis A, Mozrzymas JW, Ortinski PI, Vicini S (2007) Desensitization and binding properties determine distinct $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ and $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ GABA(A) receptor-channel kinetic behavior. *Eur J Neurosci* 25:2726–2740. [CrossRef Medline](#)
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303–325. [CrossRef Medline](#)
- Benito-Gonzalez A, Alvarez FJ (2012) Renshaw cells and ia inhibitory interneurons are generated at different times from p1 progenitors and differentiate shortly after exiting the cell cycle. *J Neurosci* 32:1156–1170. [CrossRef Medline](#)
- Bikoff JB, Gabitto MI, Rivard AF, Drobnac E, Machado TA, Miri A, Brenner-Morton S, Famojire E, Diaz C, Alvarez FJ, Mentis GZ, Jessell TM (2016)

- Spinal inhibitory interneuron diversity delineates variant motor microcircuits. *Cell* 165:207–219. [CrossRef Medline](#)
- Bouhadjfane M, Tazerart S, Moqrich A, Vinay L, Brocard F (2013) Sodium-mediated plateau potentials in lumbar motoneurons of neonatal rats. *J Neurosci* 33:15626–15641. [CrossRef Medline](#)
- 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. *J Neurophysiol* 95:225–241. [CrossRef Medline](#)
- 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. *J Neurosci* 29:5343–5353. [CrossRef Medline](#)
- Carr PA, Alvarez FJ, Leman EA, Fyffe RE (1998) Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells. *Neuroreport* 9:2657–2661. [CrossRef Medline](#)
- Chéramy A, Barbeito L, Godeheu G, Glowinski J (1992) Riluzole inhibits the release of glutamate in the caudate nucleus of the cat *in vivo*. *Neurosci Lett* 147:209–212. [CrossRef Medline](#)
- Corlew R, Bosma MM, Moody WJ (2004) Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J Physiol* 560:377–390. [CrossRef Medline](#)
- Czarnecki A, Le Corronc H, Rigato C, Le Bras B, Couraud F, Scain AL, Allain AE, Mouffle C, Bullier E, Mangin JM, Branchereau P, Legendre P (2014) Acetylcholine controls GABA-, glutamate-, and glycine-dependent giant depolarizing potentials that govern spontaneous motoneuron activity at the onset of synaptogenesis in the mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci* 34:6389–6404. [CrossRef Medline](#)
- Dai Y, Jordan LM (2010) Multiple patterns and components of persistent inward current with serotonergic modulation in locomotor activity-related neurons in cfos-EGFP mice. *J Neurophysiol* 103:1712–1727. [CrossRef Medline](#)
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P (2008) NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* 586:1059–1075. [CrossRef Medline](#)
- Dottori M, Gross MK, Labosky P, Goulding M (2001) The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* 128:4127–4138. [Medline](#)
- Eccles JC, Fatt P, Landgren S (1956) The inhibitory pathway to motoneurons. *Progr Neurobiol* 2:72–82. [Medline](#)
- Feller MB (1999) Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22:653–656. [CrossRef Medline](#)
- Gao BX, Ziskind-Conhaim L (1998) Development of ionic currents underlying changes in action potential waveforms in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 80:3047–3061. [CrossRef Medline](#)
- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 507:219–236. [CrossRef Medline](#)
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3:452–459. [CrossRef Medline](#)
- Geiman EJ, Knox MC, Alvarez FJ (2000) Postnatal maturation of gephyrin/glycine receptor clusters on developing Renshaw cells. *J Comp Neurol* 426:130–142. [CrossRef Medline](#)
- Gonzalez-Islas C, Wenner P (2006) Spontaneous network activity in the embryonic spinal cord regulates AMPAergic and GABAergic synaptic strength. *Neuron* 49:563–575. [CrossRef Medline](#)
- Gust J, Wright JJ, Pratt EB, Bosma MM (2003) Development of synchronized activity of cranial motor neurons in the segmented embryonic mouse hindbrain. *J Physiol* 550:123–133. [CrossRef Medline](#)
- Hanson MG, Landmesser LT (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23:587–600. [CrossRef Medline](#)
- Hanson MG, Landmesser LT (2006) Increasing the frequency of spontaneous rhythmic activity disrupts pool-specific axon fasciculation and pathfinding of embryonic spinal motoneurons. *J Neurosci* 26:12769–12780. [CrossRef Medline](#)
- Hanson MG, Milner LD, Landmesser LT (2008) Spontaneous rhythmic activity in early chick spinal cord influences distinct motor axon pathfinding decisions. *Brain Res Rev* 57:77–85. [CrossRef Medline](#)
- Hounsgaard J, Kiehn O (1989) Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* 414:265–282. [CrossRef Medline](#)
- Huang CS, Song JH, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T (1997) Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1280–1290. [Medline](#)
- Huang H, Trussell LO (2008) Control of presynaptic function by a persistent $Na(+)$ current. *Neuron* 60:975–979. [CrossRef Medline](#)
- Isom LL, De Jongh KS, Catterall WA (1994) Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* 12:1183–1194. [CrossRef Medline](#)
- Kirkby LA, Sack GS, Firl A, Feller MB (2013) A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron* 80:1129–1144. [CrossRef Medline](#)
- Kuo JJ, Lee RH, Zhang L, Heckman CJ (2006) Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. *J Physiol* 574:819–834. [CrossRef Medline](#)
- Lamotte d'Incamps B, Bhumbra GS, Foster JD, Beato M, Ascher P (2017) Segregation of glutamatergic and cholinergic transmission at the mixed motoneuron Renshaw cell synapse. *Scientific reports* 7:4037. [CrossRef Medline](#)
- Landmesser LT, O'Donovan MJ (1984) Activation patterns of embryonic chick hind limb muscles recorded *in ovo* and in an isolated spinal cord preparation. *J Physiol* 347:189–204. [CrossRef Medline](#)
- Le Bras B, Fréal A, Czarnecki A, Legendre P, Bullier E, Komada M, Brophy PJ, Davenne M, Couraud F (2014) *In vivo* assembly of the axon initial segment in motor neurons. *Brain Struct Funct* 219:1433–1450. [CrossRef Medline](#)
- Le Corronc H, Rigo JM, Branchereau P, Legendre P (2011) GABA(A) receptor and glycine receptor activation by paracrine/autocrine release of endogenous agonists: more than a simple communication pathway. *Mol Neurobiol* 44:28–52. [CrossRef Medline](#)
- Lee RH, Heckman CJ (1998) Bistability in spinal motoneurons *in vivo*: systematic variations in persistent inward currents. *J Neurophysiol* 80:583–593. [CrossRef Medline](#)
- Marder E, Rehm KJ (2005) Development of central pattern generating circuits. *Curr Opin Neurobiol* 15:86–93. [CrossRef Medline](#)
- Mohammadi B, Krampfl K, Moschref H, Dengler R, Bufler J (2001) Interaction of the neuroprotective drug riluzole with GABA(A) and glycine receptor channels. *Eur J Pharmacol* 415:135–140. [CrossRef Medline](#)
- Momose-Sato Y, Sato K (2013) Optical imaging of the spontaneous depolarization wave in the mouse embryo: origins and pharmacological nature. *Ann N Y Acad Sci* 1279:60–70. [CrossRef Medline](#)
- Moody WJ (1998) Control of spontaneous activity during development. *J Neurobiol* 37:97–109. [CrossRef Medline](#)
- Müller A, Kukley M, Stausberg P, Beck H, Müller W, Dietrich D (2005) Endogenous Ca^{2+} buffer concentration and Ca^{2+} microdomains in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25:558–565. [CrossRef Medline](#)
- Myers CP, Lewcock JW, Hanson MG, Gosgnach S, Aimone JB, Gage FH, Lee KF, Landmesser LT, Pfaff SL (2005) Cholinergic input is required during embryonic development to mediate proper assembly of spinal locomotor circuits. *Neuron* 46:37–49. [CrossRef Medline](#)
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5245–5249. [CrossRef Medline](#)
- Perry S, Gezelius H, Larhammar M, Hilscher MM, Lamotte d'Incamps B, Leao KE, Kullander K (2015) Firing properties of Renshaw cells defined by ChRNA2 are modulated by hyperpolarizing and small conductance ion currents *ih* and *ISK*. *Eur J Neurosci* 41:889–900. [CrossRef Medline](#)
- Prasad T, Wang X, Gray PA, Weiner JA (2008) A differential developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: insights from genetic analyses of the protocadherin-gamma gene cluster. *Development* 135:4153–4164. [CrossRef Medline](#)
- Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano PS, Silos-Santiago I, Catterall WA, Scheuer T (2001) Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$ subunits. *Mol Cell Neurosci* 18:570–580. [CrossRef Medline](#)
- Richards DS, Griffith RW, Romer SH, Alvarez FJ (2014) Motor axon synapses on Renshaw cells contain higher levels of aspartate than glutamate. *PLoS One* 9:e97240. [CrossRef Medline](#)
- Rockhill W, Kirkman JL, Bosma MM (2009) Spontaneous activity in the developing mouse midbrain driven by an external pacemaker. *Dev Neurobiol* 69:689–704. [CrossRef Medline](#)

- Safiulina VF, Cherubini E (2009) At immature mossy fibers-CA3 connections, activation of presynaptic GABA(B) receptors by endogenously released GABA contributes to synapses silencing. *Front Cell Neurosci* 3:1. [CrossRef Medline](#)
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389–442. [CrossRef Medline](#)
- Sapir T, Geiman 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. *J Neurosci* 24:1255–1264. [CrossRef Medline](#)
- Scain AL, Le Corrionc H, Allain AE, Muller E, Rigo JM, Meyrand P, Branchereau P, Legendre P (2010) Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* 30:390–403. [CrossRef Medline](#)
- Stam FJ, Hendricks TJ, Zhang J, Geiman EJ, Francius C, Labosky PA, Clotman F, Goulding M (2012) Renshaw cell interneuron specialization is controlled by a temporally restricted transcription factor program. *Development* 139:179–190. [CrossRef Medline](#)
- Storm R, Cholewa-Waclaw J, Reuter K, Bröhl D, Sieber M, Treier M, Müller T, Birchmeier C (2009) The bHLH transcription factor Olig3 marks the dorsal neuroepithelium of the hindbrain and is essential for the development of brainstem nuclei. *Development* 136:295–305. [CrossRef Medline](#)
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60–79. [CrossRef Medline](#)
- Tazerart S, Viemari JC, Darbon P, Vinay L, Brocard F (2007) Contribution of persistent sodium current to locomotor pattern generation in neonatal rats. *J Neurophysiol* 98:613–628. [CrossRef Medline](#)
- 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. *J Neurosci* 28:8577–8589. [CrossRef Medline](#)
- Theiss RD, Kuo JJ, Heckman CJ (2007) Persistent inward currents in rat ventral horn neurones. *J Physiol* 580:507–522. [CrossRef Medline](#)
- Tong H, McDermid JR (2012) Pacemaker and plateau potentials shape output of a developing locomotor network. *Curr Biol* 22:2285–2293. [CrossRef Medline](#)
- Urbani A, Belluzzi O (2000) Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci* 12:3567–3574. [CrossRef Medline](#)
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F (2000) Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull* 53:635–647. [CrossRef Medline](#)
- Watt AJ, Cuntz H, Mori M, Nusser Z, Sjöström PJ, Häusser M (2009) Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat Neurosci* 12:463–473. [CrossRef Medline](#)
- Wenner P, O'Donovan MJ (2001) Mechanisms that initiate spontaneous network activity in the developing chick spinal cord. *J Neurophysiol* 86:1481–1498. [CrossRef Medline](#)
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110:385–397. [CrossRef Medline](#)
- Young SH, Poo MM (1983) Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature* 305:634–637. [CrossRef Medline](#)
- Yvert B, Branchereau P, Meyrand P (2004) Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur within a specific developmental time window. *J Neurophysiol* 91:2101–2109. [CrossRef Medline](#)
- Zhang LI, Poo MM (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4:1207–1214. [CrossRef Medline](#)
- Zhong G, Masino MA, Harris-Warrick RM (2007) Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord. *J Neurosci* 27:4507–4518. [CrossRef Medline](#)
- Ziskind-Conhaim L (1988) Electrical properties of motoneurons in the spinal cord of rat embryos. *Dev Biol* 128:21–29. [CrossRef Medline](#)
- 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. *J Neurophysiol* 100:2254–2264. [CrossRef Medline](#)

PARTIE 2 :

Développement des propriétés d'excitabilité intrinsèques des cellules des Renshaw embryonnaires

Les résultats présentés dans cette partie feront l'objet d'un article.

Problématique

Nous avons montré dans la première partie que les CRs lombaires d'embryons de souris à E12,5 évoquent différents types d'activité spontanée et présentent une diversité de profils d'excitabilité intrinsèque en réponse en l'injection de courant dépolarisant. Certaines CRs ont un mode de décharge intrinsèque de un ou deux PA au maximum (CRs à 1 PA), d'autres CRs déchargent des PA de façon répétitive (CRs à train de PA), d'autres CRs évoquent des potentiels dépolarisants en plateau dépendants des canaux sodiques TTX-sensibles (CRs à plateau) et enfin d'autres CRs évoquent à la fois des PA et des potentiels en plateau (CRs mixtes). Aux stades néonataux et chez l'adulte, les CRs déchargent des PA de façon répétitive (en postnatal : Perry et al. 2015, Bikoff et al. 2016, Lamotte d'Incamps and Ascher 2008 ; chez l'adulte : Renshaw 1946, Eccles et al. 1954). Les CRs à E12,5 ont donc des profils de décharge intrinsèque différents comparés aux CRs matures. Ces données posent donc la question de l'évolution de l'excitabilité intrinsèque des CRs au cours du développement embryonnaire. La diversité des profils d'excitabilité des CRs à E12,5 illustre-elle une immaturité dans leurs propriétés biophysiques ? Les travaux de Nicholas Spitzer et ses collaborateurs ont montré que les neurones spinaux immatures évoquent de longs PA (d'une durée moyenne d'environ 200 ms), appelés plateaux de PA, à des stades embryonnaires précoces chez le xénope (Spitzer and Lamborghini 1976, Spitzer and Baccaglini 1976, Baccaglini and Spitzer 1977). La durée du PA diminue ensuite durant le développement embryonnaire, signe de maturation des neurones embryonnaires spinaux. La décharge de potentiels en plateau par les CRs est-elle aussi une forme immature d'excitabilité intrinsèque ?

Les résultats des travaux présentés ici ont pour objectif d'étudier l'évolution des propriétés d'excitabilité intrinsèque des CRs au cours du développement embryonnaire. Les propriétés d'excitabilité très variées des CRs immatures évoluent-elles directement vers le mode de décharge à « train de PA » évoqué par les CRs matures ? Le but de ce travail est d'identifier les stades auxquels ces changements ont lieu au cours du développement embryonnaire ainsi que les mécanismes à l'origine de ces changements d'excitabilité. Nous avons montré dans la première partie que la décharge soutenue des CRs à E12,5 (potentiels en plateau et/ou train de PA) dépend de la densité de INaP. Nous n'avons cependant pas trouvé de différence de densité du INaP entre les CRs à train de PA et les CRs à plateau. Ces résultats posent donc la question de savoir quelles sont les conductances ioniques qui sous-tendent cette différence d'excitabilité entre les CRs à train de PA et les CRs à plateau, ces mêmes conductances ioniques pouvant expliquer également l'évolution du mode de décharge des CRs au cours du développement.

Matériels et méthodes

Dissection des moelles épinières embryonnaires de souris :

Nous avons utilisé la lignée de souris knock in GAD67-GFP (hétérozygotes, mâles et femelles sur fond swiss) pour visualiser les INs potentiellement GABAergiques. Pour obtenir des embryons GAD67-GFP, des souris femelles swiss sauvages (Laboratoires Janvier) ont été croisées avec des souris mâles swiss hétérozygotes GAD67-GFP. Les souris femelles gestantes de 12,5 à 16,5 jours sont euthanasiées (par asphyxie au gaz carbonique) et les embryons sont récupérés. Bien que la date d'accouplement soit connue, l'âge des embryons présente une imprécision de 0,5 jour puisque les souris sont mises à accoupler la nuit (entre ~ 18h et 9h).

Pour mener à bien cette étude, 260 embryons ont été utilisés sans distinction mâle ou femelle (137 embryons E12,5 ; 39 embryons E13,5 ; 75 embryons E14,5 et 9 embryons E16,5). Les embryons GFP positifs sont sélectionnés par fluorescence de la GFP et placés dans une solution physiologique dite extracellulaire (ACSF) à 32°C composée de (en mM) : 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 Glucose, 125 NaCl, 3 KCl et 1 NaH₂PO₄ et oxygénée avec 95% O₂-5% CO₂ (~ 310 mOsmol/kg H₂O, pH = 7,4). Le prélèvement de la moelle épinière se fait dans la même solution ACSF, sous une loupe binoculaire selon la même technique que celle décrite auparavant (Delpy et al. 2008). Jusqu'aux stades E14,5 la moelle épinière est

disséquée en étant directement détachée de la future colonne vertébrale. Pour les stades E15,5 et E16,5, la moelle épinière est d'abord prélevée avec les vertèbres autour et c'est dans un second temps que les vertèbres sont coupées pour dégager la moelle épinière. Après dissection les moelles épinières sont laissées à incuber pendant 30 minutes-1 heure dans la solution ACSF oxygénée à 32°C.

Enregistrements électrophysiologiques en patch clamp :

La moelle épinière entière disséquée est ouverte selon la technique du livre ouvert (Delpy et al. 2008), placée dans une chambre d'enregistrement et maintenue par une grille. La face ventrale est positionnée vers le haut ce qui permet d'avoir accès facilement aux CRs et MNs. La chambre est placée sous un microscope optique. Elle est continuellement perfusée pendant l'enregistrement par la solution ACSF oxygénée décrite ci-dessus, à la température ambiante (20-26°C). L'activité électrique des neurones (CRs et MNs) est enregistrée au niveau lombaire, par la technique du patch clamp en configuration cellule entière. Les CRs sont détectées par leur fluorescence GFP dans la zone ventro-latérale aux MNs (sous le funiculus et au-dessus des MNs les superficiels dans la préparation de moelle épinière entière en livre ouvert). Pour confirmer leur identité à chaque âge embryonnaire étudié (E12,5 à E16,5), les cellules sont remplies de neurobiotine (diluée dans le milieu intracellulaire à 0,5-1 mg/ml) et révélées en immunohistochimie avec le marquage du facteur de transcription Foxd3. Foxd3 est spécifique des INs V1 (Dottori et al. 2001, Stam et al. 2012). Les neurones GAD67-GFP, localisés dans la zone spécifique enregistrée (cf ci-dessus), exprimant Foxd3, appartiennent à la classe des CRs (Benito-Gonzalez and Alvarez 2012) (et voir l'article de la partie 1 des résultats). Les MNs sont identifiés par leur localisation ventrale, leur forme, leur absence de fluorescence GFP et leur capacitance membranaire. *A priori* (mais non vérifié) les MNs enregistrés appartiennent à la colonne motrice latérale (LMC).

Les pipettes d'enregistrement sont fabriquées à partir de tubes de verre de borosilicate à paroi épaisse (diamètre externe de 1,5 mm et interne de 0,86 mm, Harvard Apparatus, France). Elles sont étirées avec une étireuse P-87 (Sutter Instrument Co, USA) et la pointe des pipettes est polie au moyen d'une microforge (MF-830, Narishige, Japon). Les pipettes ont une résistance finale comprise entre 4 et 7 MΩ. Les pipettes de patch sont remplies d'une solution dite intracellulaire composée de (en mM) : 96,4 KMeS (potassium méthanesulfonate), 33,6 KCl, 4 MgCl₂, 4 (Na⁺)₂-ATP, 0,3 (Na⁺)₃-GTP, 10 Hepes, 10 EGTA (~ 290 mOsmol/kg-H₂O, pH = 7,2). Avec la composition des solutions extracellulaire et

intracellulaire, le potentiel de jonction calculé est de $\sim 6,6$ mV. Il n'a pas été corrigé pendant les enregistrements ni pris en compte dans les valeurs d'analyse.

Les signaux sont enregistrés à l'aide d'un amplificateur Multiclamp 700B (Molecular devices, USA). L'acquisition des signaux (fréquence d'échantillonnage de 20 kHz, filtre 2 kHz) est effectuée à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique Digidata 1440A et du logiciel PClamp 10.5 (Molecular devices). Durant les expériences, la résistance d'accès (8 à 25 M Ω) est régulièrement contrôlée. Seules les cellules dont la résistance d'accès, leur résistance membranaire et leur potentiel de membrane au repos sont stables au cours de l'expérience sont gardées. La résistance série est compensée électroniquement à 50-70 % pour les protocoles en potentiel imposé. Le potentiel de membrane au repos est maintenu à -60 mV. Les données sont analysées par les logiciels PClamp 10.5 et Axograph 1.4.5 (Axograph, Australia).

Protocoles de stimulation :

Les profils de décharge intrinsèque des neurones ont été analysés en courant imposé à partir d'un potentiel de membrane de -60 mV, en appliquant soit des impulsions rectangulaires de courant dépolarisant d'intensité croissante (de 0 à ~ 50 pA, incrément de 2-10 pA, durée de 2 s), soit des rampes linéaires symétriques de courant dépolarisant (de 0 à ~ 50 pA, incrément de 5 ou 10 pA, durée de 20 s). L'intensité des impulsions et rampes de courant a été ajustée en fonction de la résistance d'entrée du neurone.

Le INaP a été évoqué par une rampe linéaire de potentiel dépolarisant (de -100 mV à + 20 mV ; durée de 1,7 s ; 70 mV/s). Une pente de 70 mV/s a été choisie car c'est la valeur minimale pour inactiver les courants transitoires tout en préservant les courants persistants. Le INaP a été obtenu en soustrayant les courants évoqués par la rampe de potentiel en présence de 1 μ M de TTX à celle en contrôle.

Les courants potassiques voltage-dépendants totaux (IKv total) ont été évoqués, en présence de TTX, par des impulsions rectangulaires de potentiel dépolarisant (de -60 mV à + 40 mV, incréments de 10 mV, durée de 1 s) précédées d'une impulsion de potentiel hyperpolarisant à -100 mV (durée de 130 ms). Pour s'affranchir des courants potassiques transitoires voltage-dépendants qui s'activent à bas seuil (courants IA) et isoler les courants potassiques voltage-dépendants qui s'activent à plus haut seuil et s'inactivent lentement (courants IKdr), les impulsions de potentiel dépolarisant étaient précédées d'une première

impulsion de potentiel amenant le potentiel membranaire à -40 mV (durée de 500 ms). Pour un potentiel imposé donné, le courant IA est obtenu par soustraction du courant obtenu avec la pré-impulsion à -40 mV à celui obtenu sans cette pré-impulsion ($IA = IK_v \text{ total} - IK_{dr}$). Le courant de fuite a été éliminé en soustrayant une trace contrôle au courant évoqué à un potentiel dépolarisant donné (P). Cette trace contrôle est la moyenne des traces évoquées par des sauts de potentiels hyperpolarisants ($N = 4$) à l'échelle (P/N) (protocole de soustraction des courants de fuite P/N sur pCLAMP 10).

Pharmacologie :

Les différents agents pharmacologiques sont appliqués dans le bain par un système d'application constitué d'un tube de quartz de 0,5 mm de diamètre positionné au voisinage de la région de la moelle épinière où l'on enregistre. Ce tube est connecté à des réservoirs remplis avec les différentes solutions. L'application est commandée par des vannes piézoélectriques. Les différentes drogues utilisées sont : tétrodotoxine (TTX, 1 μ M, Alomone ou Abcam), riluzole (5 μ M, Tocris Bioscience), 4-aminopyridine (4-AP, 300 ou 600 μ M, Sigma-Aldrich). Les drogues sont diluées dans le milieu extracellulaire.

Immunohistochimie :

Nous avons réalisé des immunomarquages sur des moelles épinières entières ouvertes. Directement après leur dissection ou après les enregistrements en patch clamp, elles sont fixées dans une solution de PBS 1X contenant 4 % de paraformaldehyde (PFA) pendant 30 min à température ambiante et ensuite rincées et placées dans une solution de PBS à 4°C jusqu'à l'immunohistochimie. Elles sont rincées dans une solution de PBS (trois lavages de 5 minutes) puis mises dans une solution de NH_4Cl (50 mM) dilué dans du PBS, pendant 20 minutes. Elles sont de nouveau rincées dans du PBS (trois lavages de 5 minutes) puis perméabilisées et saturées dans une solution de triton (0,2 %) et de sérum de chèvre (0,25 %) dilués dans du PBS, pendant 30 minutes. Les moelles épinières sont ensuite mises à incuber avec les anticorps primaires (dilués dans la solution de PBS-triton-sérum de chèvre) pendant 48h à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont : anti-foxd3 (cochon d'inde polyclonal, donné par C. Birchmeier et T. Müller, dilution 1/5000) et anti-caspase 3 activée (lapin polyclonal, Cell signaling référence D175, dilution 1/1000). Les moelles épinières sont rincées dans la solution de PBS-triton-sérum de chèvre (3 lavages de 10 minutes) puis mises à incuber en présence d'anticorps secondaires (ThermoFisher, dilués au 1/1000 dans la solution de PBS-triton-sérum de chèvre) pendant 2h à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés

sont : anti-IgG de cochon d'inde fait chez la chèvre couplé au fluorochrome Alexa594 et anti-IgG de lapin fait chez la chèvre couplé au fluorochrome Alexa647. La streptavidine couplée au fluorochrome Alexa405 (dilution 1/1000, ThermoFisher) et le Hoechst (1/1000) ont aussi été utilisés. Les moelles épinières sont enfin rincées dans du PBS (trois lavages de 5 minutes). Elles sont étalées sur lame et montées avec du Mowiol (Millipore) entre lame et lamelle.

Microscopie confocale et analyse d'images :

Les préparations ont été observées avec un microscope confocal (Leica SP5), avec un objectif à huile 40X ou 63X. L'acquisition des images a été faite par des coupes optiques sériées de différentes épaisseurs en fonction de l'objectif utilisé ($z = 1 \mu\text{m}$ au 40X ; $z = 0,2-0,3 \mu\text{m}$ au 63X). Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ 1.5 (N.I.H., USA).

Statistiques :

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. La significativité des résultats a été évaluée en utilisant des tests statistiques non paramétriques appariés (test de Wilcoxon) ou non appariés (test de Mann et Whitney ou test Kruskal-Wallis) avec le logiciel GraphPad Prism 5.0. La différence entre deux valeurs est significative lorsque $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***). Les graphiques, à part ceux représentant des pourcentages, sont représentés en « *box and whiskers* » de type Tukey (distribution selon les quartiles, la ligne centrale représentant la médiane).

Résultats

L'excitabilité intrinsèque des CRs embryonnaires régresse entre E12,5 et E14,5

Pour étudier l'évolution de l'excitabilité intrinsèque des CRs au cours du développement embryonnaire entre E12,5 et E14,5 chez la souris, nous avons enregistré par la technique de patch clamp les CRs, dans des moelles épinières entières isolées d'embryon à E13,5 et à E14,5 ouvertes selon la technique « du livre ouvert » (voir l'article de la partie 1 des résultats). Les CRs ont été identifiées dans des moelles épinières d'embryons GAD67-GFP par l'expression du facteur de transcription Foxd3 (voir l'article de la partie 1 des résultats) (**figure 1A**). Les CRs ont une capacitance membranaire de $13,9 \pm 2,5 \text{ pF}$ à E13,5 ($n = 32$) et

de $18,7 \pm 2,9$ pF à E14,5 ($n = 57$, significativement plus grande qu'à E13,5 ; $p < 0,0001$), une résistance membranaire de 1209 ± 474 M Ω à E13,5 ($n = 32$) et de 1139 ± 435 M Ω à E14,5 ($n = 57$, non significativement différente comparé à E13,5 ; $p = 0,4448$), et un potentiel membranaire au repos de $-52,1 \pm 10,1$ mV à E13,5 ($n = 27$) et de $-54,9 \pm 9,7$ mV à E14,5 ($n = 24$, non significativement différent comparé à E13,5 ; $p = 0,3123$). Le profil de décharge intrinsèque des CRs a été examiné par l'injection d'une série d'impulsion de courants dépolarisants et l'enregistrement de la variation évoquée du potentiel de membrane des CRs (**figure 1B et C**). Ce protocole effectué sur les CRs à E12,5 nous a permis dans le chapitre précédent de montrer qu'elles présentaient différents profils de décharge intrinsèque classés en quatre modes décharge : « 1 ou 2 PA », « train de PA », « potentiels en plateau » et « mixte ». A E12,5, une majorité d'entre elles (71,3 %) évoquent un mode de décharge soutenu à savoir des trains de PA (41,2 %), des potentiels en plateau (21,8 %) ou un régime « mixte » (8,5 %) (voir l'article de la partie 1 des résultats). Les données à E13,5 ont été obtenues sur 32 CRs et celles à E14,5 sur 57 CRs. A E13,5 les CRs évoquent soit 1 ou 2 PA (81,3 %) soit un train de PA (9,4 %) soit une décharge mixte (9,4 %) (**figure 1B et D**). A E14,5 les CRs évoquent soit 1 ou 2 PA (91,2 %) soit un train de PA (8,8 %) (**figure 1C et D**).

Nos résultats indiquent donc qu'à E14,5, les CRs n'évoquent plus de potentiel en plateau. La suppression de cette capacité semble progressive puisqu'à E13,5, quelques CRs évoquent encore des potentiels en plateau, mais selon un mode de décharge « mixte ». Le mode de décharge « mixte » disparaît donc un jour après le mode de décharge « potentiels en plateau ». Par ailleurs, nos résultats indiquent que le pourcentage de CRs au mode de décharge « train de PA » diminue entre E12,5 et E14,5. De façon étonnante l'excitabilité intrinsèque des CRs embryonnaires n'augmente pas au cours du développement mais régresse entre E12,5 et E14,5. En effet, la quasi-totalité des CRs ne sont plus capables de décharger des PA de façon répétitive ou des potentiels en plateau à E14,5.

La diminution de l'excitabilité intrinsèque des CRs est transitoire et indépendante des phénomènes d'apoptose.

Il est connu que les CRs déchargent des PA de façon répétitive en postnatal et chez l'adulte (Perry et al. 2015, Bikoff et al. 2016, Nishimaru et al. 2006). La diminution de l'excitabilité des CRs au cours du développement ne peut donc être que transitoire. Nous avons donc voulu savoir à quel stade la capacité de décharger des trains de PA réapparaissait durant la

maturation des CRs. Nous avons enregistré les CRs à E16,5, l'identité des CRs a été confirmée par un marquage Foxd3 (**figure 2A**). Nous avons réalisé les mêmes protocoles d'injection de courant dépolarisant et enregistré les variations évoquées du potentiel de membrane des CRs (**figure 2B**). Les données proviennent de 28 CRs. A E16,5, 32,1 % des CRs ont un mode de décharge intrinsèque « 1 ou 2 PA » et 67,9 % des CRs déchargent selon un mode de décharge intrinsèque « train de PA ». A E16,5 le nombre de CRs ayant la capacité de décharger des PA de façon répétitive est multiplié par 7 comparé à E14,5. L'ensemble des résultats confirme que dans notre modèle la diminution d'excitabilité intrinsèque des CRs observée à E14,5 n'est effectivement que transitoire et que dès le stade E16,5, la capacité des CRs à évoquer une activité soutenue réapparaît.

Pour s'assurer que la diminution transitoire de l'excitabilité intrinsèque des CRs et de l'amplitude des PA entre E12,5 et E14,5 ne relève pas d'une dégradation du réseau spinal lors de la préparation des moelles isolées à E14,5, nous avons analysé l'excitabilité intrinsèque des MNs aux mêmes stades développementaux entre E12,5 et E14,5 (**figure 3**). Les données proviennent de 90 MNs à E12,5, 13 MN à E13,5 et 36 MNs à E14,5. Cette étude montre que les MNs sont également capables d'évoquer une activité soutenue (« train de PA ») en réponse à l'injection de courant dépolarisant dès E12,5. Les MNs présentent deux modes de décharge intrinsèque : soit « 1 ou 2 PA » soit un « train de PA » (**figure 3A et B**). Le pourcentage de MNs à 1 ou 2 PA diminue entre E12,5 et E14,5 (61,1 % à E12,5 ; 46,2 % à E13,5 et 16,7 % à E14,5) (**figure 3C**). A l'inverse, le pourcentage de MNs à train de PA augmente entre E12,5 et E14,5 (38,9 % à E12,5 ; 53,8 % à E13,5 et 83,3 % à E14,5) (**figure 3C**). Les MNs n'évoquent en revanche jamais de « potentiel en plateau » comme les CRs. Ces résultats indiquent donc, qu'à l'inverse des CRs, l'excitabilité intrinsèque des MNs augmente au cours du développement entre E12,5 et E14,5, suivant un schéma plus « classique » de la maturation de l'excitabilité intrinsèque des neurones au cours du développement. La régression transitoire de l'excitabilité des CRs à E13,5-E14,5 ne semble donc pas être due à une dégradation générale de l'excitabilité du réseau.

Un neurone dont l'excitabilité intrinsèque disparaît, peut être un neurone en voie d'apoptose. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que la mort cellulaire par apoptose est un processus développemental normal (Oppenheim 1991). Par exemple, dans la moelle épinière embryonnaire, les MNs sont normalement produits en excès et près de 70 % déclenchent une mort cellulaire naturelle par apoptose aux stades embryonnaires (à partir de E11,5 jusqu'à E18,5 chez la souris) (Yamamoto and Henderson 1999, Lance-Jones 1982).

Bien que moins analysé, il a aussi été reporté une période d'apoptose des INs spinaux mais à partir de stades embryonnaires plus tardifs (Lawson et al. 1997, Prasad et al. 2008) (à partir de E14,5 chez la souris). Il n'existe pas d'étude ayant analysé l'apoptose dans les CRs embryonnaires. Nous avons donc voulu savoir si la diminution de l'excitabilité intrinsèque des CRs à E14,5 était associée ou non à un processus d'apoptose. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons réalisé un marquage de la caspase-3 activée, marqueur des cellules en apoptose et un marquage Foxd3 sur des moelles épinières GAD67-GFP entières à E14,5. Parmi les INs GAD67-GFP Foxd3 positifs, nous n'observons aucun marquage caspase-3 activée (n = 6 moelles épinières, **figure 4**).

Un autre moyen d'évaluer un processus de mort cellulaire est de visualiser la morphologie des cellules. Pour cela nous avons comparé la morphologie des CRs à E12,5 et à E14,5. Nous avons imagé et reconstitué la morphologie de CRs remplies avec de la neurobiotine après enregistrement en patch clamp à E12,5 (**figure 5A1**, n = 21 cellules) et à E14,5 (**figure 5A2**, n = 6 cellules). A E12,5, les CRs possèdent majoritairement un seul neurite, *à priori* axone, (76 %, n = 16/21), les autres CRs possédant deux axones (n = 5/21) (**figure 5B**). L'axone principal (le plus long dans le cas de deux axones) mesure $0,46 \pm 0,14$ mm et s'étend exclusivement dans une direction caudo-rostrale (n = 21/21). L'axone secondaire est plus court, mesurant $0,27 \pm 0,10$ mm et s'étend soit en direction caudo-rostrale (n = 3/5) soit en direction rostro-caudale (n = 2/5) (**figure 5C et D**). A E14,5, les CRs possèdent deux ou trois axones (**figure 5B**). L'axone principal mesure $0,96 \pm 0,30$ mm et s'étend exclusivement en direction caudo-rostrale. L'axone principal à E14,5 est plus long comparé à E12,5 (p = 0,0005). Le ou les axones secondaires à E14,5 mesurent $0,58 \pm 0,32$ mm et s'étendent majoritairement en direction rostrale-caudale (n = 5/6) (**figure 5C et D**). Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par d'autres chercheurs montrant que les CRs étendent leur(s) axone(s) en directions rostrale et caudale à E13,5 (Sapir et al. 2004). Nos résultats indiquent que la morphologie des CRs se développe classiquement entre E12,5 et E14,5 avec un allongement de l'axone et un développement des dendrites (non montré).

Ces résultats indiquent donc que les CRs à E14,5 n'ont pas déclenché de signalisation intracellulaire de mort cellulaire.

Les potentiels en plateau sont associés à des faibles amplitudes du courant potassique à rectification retardée (IKdr).

Nous avons précédemment montré que la capacité des CRs à évoquer une activité soutenue sous la forme de train de PA ou de potentiels en plateau à E12,5 dépendait de l'expression d'une conductance sodique persistante voltage-dépendante (gNaP) (article de la partie 1 des résultats). Nous avons ainsi fait l'hypothèse que l'excitabilité intrinsèque des CRs qui n'évoquent que un PA à E14,5 serait associée à une faible conductance gNaP. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la conductance gNaP dans le groupe très majoritaire des CRs qui n'évoquent que un PA à E14,5 (**figure 6F**). La densité de conductance gNaP est plus faible dans ces CRs ($8,3 \pm 8,9$ pS/pF, $n = 19$) comparé aux CRs qui évoquent à E12,5 des trains de PA ($57,8 \pm 17,4$ pS/pF, $n = 7$, $p = 0,0001$) et des potentiels en plateau ($70,6 \pm 34,0$ pS/pF, $n = 11$, $p < 0,0001$). Cette conductance est même plus faible dans ces CRs comparé aux CRs qui évoquent 1 PA à E12,5 ($22,1 \pm 12,6$ pS/pF, $n = 13$, $p = 0,0041$).

Nous avons précédemment montré à E12,5 (article de la partie 1 des résultats) que les deux modes de décharge intrinsèque « train de PA » et « potentiels en plateau » n'étaient pas associés à une différence d'amplitude de la conductance gNaP dans ces deux types de CRs. Les courants générés par les canaux potassiques voltage-dépendants (IKv) jouent un rôle essentiel dans la phase de repolarisation des PA et potentiel en plateau. Ces courants potassiques IKv pourraient expliquer cette différence du mode de décharge des CRs. Pour étudier les IKv dans les CRs à E12,5 et E14,5, nous avons enregistré les courants évoqués par une série d'impulsions de potentiel imposé, en présence de $1 \mu\text{M}$ TTX pour supprimer les courants sodiques entrants (**figure 6A à D**). Nous avons utilisé deux protocoles classiquement utilisés pour évoquer les courants IKv. Un premier protocole consiste à imposer différents potentiels dépolarisants incrémentés de 10 mV de -60 mV à + 40 mV à partir d'un potentiel membranaire initial imposé à -100 mV, ce qui permet d'activer tous les courants IKv. Un deuxième protocole consiste à imposer les mêmes impulsions de potentiel précédées d'un premier saut de potentiel à -40 mV pendant 500 ms, pour inactiver tous les courants potassiques transitoires dont le seuil d'activation est inférieur ou égal à -40 mV et démasquer les courants potassiques à inactivation lente et/ou à haut seuil d'activation, appelés IKdr. En soustrayant les réponses évoquées par le deuxième protocole aux réponses évoquées par le premier protocole, autrement dit en soustrayant le IKdr au IKv, nous obtenons les traces correspondants aux courants potassiques transitoires à bas seuil d'activation, appelés IA. Cette série d'expériences n'a pas eu pour but de faire une analyse exhaustive des propriétés de ces courants IKdr et IA mais de déterminer si leur intensité varie dans les CRs selon leur mode de décharge intrinsèque. Les potentiels en plateau étant des signaux dépolarisants plus longs que

les PA, notre hypothèse est que la capacité d'une CR à décharger des potentiels en plateau provient d'une capacité plus faible à repolariser son potentiel membranaire, dû à des intensités de courants potassiques plus faibles.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons mesuré les densités de conductance gKdr et gA évoquées par un saut de potentiel à + 40 mV (**figure 6E₁ et 6E₂ respectivement**). A E12,5, les CRs à plateau ont une densité de conductance gKdr de $161,7 \pm 113,9$ pS/pF ($n = 10$) significativement plus faible comparé aux CRs à train de PA qui ont une densité de gKdr de $380,8 \pm 169,9$ pS/pF ($n = 9$, $p = 0,0041$) et aux CRs à 1 PA qui ont une densité de gKdr de $396,5 \pm 118,6$ pS/pF ($n = 22$, $p = 0,0001$). Les CRs à train ont une densité de gKdr non significativement différente comparé aux CRs à 1 PA ($380,8 \pm 169,9$ pS/pF, $n = 9$ versus $396,5 \pm 118,6$ pS/pF, $n = 22$; $p = 0,5864$). A E12,5, les CRs à plateau ont une densité de conductance gA de $132,7 \pm 103,6$ pS/pF ($n = 9$) significativement plus faible comparé aux CRs à train qui ont une densité de gA de $364,9 \pm 207,0$ pS/pF ($n = 7$, $p = 0,0052$) et aux CRs à 1 PA qui ont une densité de gA de $540,3 \pm 208,4$ pS/pF ($n = 13$, $p = 0,0001$). Les CRs à train ont une densité de gA significativement plus faible comparé aux CRs à 1 PA ($364,9 \pm 207,0$ pS/pF, $n = 7$ versus $540,3 \pm 208,4$ pS/pF, $n = 13$; $p = 0,0197$). A E14,5, les CRs à 1 PA ont des conductances gKdr et gA respectivement de $499,7 \pm 161,1$ pS/pF ($n = 18$) et de $515,4 \pm 205,4$ pS/pF ($n = 15$) significativement plus faibles comparé aux CRs à plateau à E12,5 ($p < 0,0001$) mais similaires comparé aux CRs à train ($p = 0,0679$) et aux CRs à 1 PA ($p = 0,0519$). Ces résultats indiquent donc que le mode de décharge intrinsèque « potentiels en plateau » est associé à des amplitudes de IKv plus faibles comparé aux autres modes de décharge. De plus, nos résultats montrent que les courants IKv augmentent entre E12,5 et E14,5.

L'ensemble de nos résultats indiquent donc que les trois modes de décharge intrinsèque des CRs dépendent d'une part de gNaP qui confèrent aux CRs la capacité d'évoquer des activités soutenues de type « train de PA » et « potentiels en plateau » et d'autre part de gKdr ou gA qui favorisent la repolarisation du potentiel de membrane et ainsi limiteraient la capacité des CRs à évoquer des potentiels en plateau. Les modes de décharge des CRs à E12,5 et E14,5 pourrait donc être déterminé par une balance entre l'amplitude des conductances entrantes sodiques de type gNaP et les conductances sortantes potassiques de type gKdr et/ou gA.

Le rapport des conductances gNaP/gKdr détermine le profil d'excitabilité intrinsèque des CRs à E12,5 et E14,5

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons mesuré les courants INaP, IKdr et IA exprimés dans une même cellule pour déterminer les rapports des conductances gNaP/gKdr et gNaP/gA dans les CRs en fonction de leur mode de décharge et de l'âge (**figure 7**). A E12,5 les CRs à plateau ont un rapport gNaP/gKdr de $0,41 \pm 0,16$ ($n = 5$) significativement plus élevé comparé aux CRs à train qui ont un rapport gNaP/gKdr de $0,16 \pm 0,07$ ($n = 7$, $p = 0,0101$) et aux CRs à 1 PA qui ont un rapport gNaP/gKdr de $0,05 \pm 0,05$ ($n = 7$, $p = 0,0057$). Les CRs à train ont un rapport gNaP/gKdr significativement plus élevé comparé aux CRs à 1 PA ($0,16 \pm 0,07$, $n = 7$ versus $0,05 \pm 0,05$, $n = 7$; $p = 0,0072$). A E12,5 les CRs à plateau ont un rapport gNaP/gA de $0,52 \pm 0,33$ ($n = 5$) significativement plus élevé comparé aux CRs à train qui ont un rapport gNaP/gKA de $0,20 \pm 0,10$ ($n = 6$, $p = 0,0173$) et aux CRs à 1 PA qui ont un rapport gNaP/gKA de $0,03 \pm 0,03$ ($n = 6$, $p = 0,0080$). Les CRs à train ont un rapport gNaP/gA significativement plus élevé comparé aux CRs à 1 PA ($0,20 \pm 0,10$, $n = 6$ versus $0,03 \pm 0,03$, $n = 6$; $p = 0,0050$). A E14,5, les CRs à 1 PA ont un rapport gNaP/gKdr de $0,01 \pm 0,01$ ($n = 10$) qui n'est pas significativement différent de celui des CRs au même mode de décharge intrinsèque à E12,5 ($0,05 \pm 0,05$, $n = 7$, $p = 0,0809$). De même, les CRs à 1 PA à E14,5 ont un rapport gNaP/gA de $0,02 \pm 0,02$ ($n = 10$) qui n'est pas significativement différent de celui des CRs au même mode de décharge à E12,5 ($0,03 \pm 0,03$, $n = 6$, $p = 0,4036$). Ces données révèlent donc que les différents modes de décharge intrinsèque des CRs embryonnaires sont corrélés à différentes gammes de rapports gNaP/gKdr et gNaP/gA.

Nos résultats suggèrent que les CRs qui expriment des courants potassiques de grande amplitude ne peuvent générer des potentiels en plateau. Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'une diminution de l'amplitude des courants potassiques dans les CRs à 1 PA et les CRs à train de PA devraient conférer à ces CRs la capacité d'évoquer des potentiels en plateau. Il est peu probable que les courants potassiques transitoires de type IA jouent un rôle déterminant dans la capacité des CRs à décharger des PA ou des trains de PA en limitant le déclenchement de potentiels en plateau, du fait de leur cinétique de désensibilisation. Nous avons donc fait l'hypothèse que le courant IKdr lorsqu'il est fortement exprimé favoriserait les modes de décharge « 1-2 PA » et « train de PA » au dépend du mode de décharge « potentiel en plateau » et que le blocage spécifique de ce courant pourrait favoriser le déclenchement de potentiel en plateau dans les CRs.

Nous avons utilisé la 4-aminopyridine (4-AP), bloqueur des canaux potassiques. A E12,5, l'application de 300 μ M de 4-AP réduit significativement la densité de gKdr de $67,4 \pm 8,1$ % ($n = 8$, $p = 0,0078$) dans les CRs à 1 PA (**figure 8A et B**) et de $68,8 \pm 9,4$ % ($n = 8$, $p = 0,0078$) dans les CRs à train (**figure 8B**). En présence de 300 μ M de 4-AP, la densité de gKdr restante dans les CRs à 1 PA est de $123,1 \pm 38,1$ pS/pF ($n = 8$) et celle dans les CRs à train est de $86,0 \pm 42,6$ pS/pF ($n = 8$). Elles ne diffèrent pas significativement de celles mesurées en contrôle dans les CRs à plateau ($161,7 \pm 113,9$ pS/pF, $p = 0,5726$ et $p = 0,1220$ respectivement). Nous avons donc choisi la concentration de 300 μ M de 4-AP qui permet de mimer le profil d'expression des conductances gKdr dans les CRs à plateau. L'application de 300 μ M de 4-AP ne modifie pas significativement la densité de gA ni dans les CRs à 1 PA ($491,4 \pm 121,5$ en contrôle versus $547,7 \pm 123,5$ en présence de 4-AP ; $n = 5$, $p = 0,0625$, **figure 8C et D**) ni dans les CRs à train ($308,5 \pm 256,7$ en contrôle versus $288,1 \pm 271,4$ en présence de 4-AP, $n = 6$, $p = 0,6875$, **figure 8D**). La 4-AP nous permet donc de bloquer le IKdr sans altérer le IA.

Nous avons donc testé l'effet de l'application de 4-AP à 300 μ M sur l'excitabilité intrinsèque des CRs à 1 PA ou des CRs à train de PA en contrôle (**figure 8E**). Dans les CRs à 1 PA, l'application de 300 μ M de 4-AP convertit leur mode de décharge intrinsèque initial en « potentiels en plateau » ($n = 4/9$), « mixte » ($n = 3/9$) ou « train de PA » ($n = 2/9$) (**figure 8E₁ et E₂**). Dans les CRs à train de PA, l'application de 300 μ M de 4-AP convertit leur mode de décharge intrinsèque initial en « potentiels en plateau » ($n = 10/14$), « mixte » ($n = 2/14$) ou ne modifie pas le mode de décharge ($n = 2/14$) (**figure 8E₃**). A E12,5, la majorité des potentiels en plateau évoqués en présence de 4-AP, sont bloqués par la TTX ($n = 6/8$) confirmant la dépendance sodique des potentiels en plateaux dans les CRs.

Ces résultats montrent que la réduction de gKdr permet à une CR, dans la grande majorité des cas, d'acquérir la capacité de décharger des potentiels en plateau. Néanmoins la réduction de gKdr convertit davantage de CRs à train de PA en CRs à plateau (71,4 %) que de CRs à 1 PA en CRs à plateau (44,4 %). Nous avons précédemment montré que l'amplitude de gKdr ne diffère pas entre les CRs à 1 PA et les CRs à train de PA. La réduction de l'amplitude absolue de gKdr ne permet donc pas d'expliquer seule, pourquoi un plus grand nombre de CRs à train, que de CRs à 1 PA est converti en CRs à plateau en présence de 4-AP. Ce résultat est en faveur de notre hypothèse selon laquelle le mode de décharge des CRs dépend également des conductances gNaP et ainsi du rapport gNaP/gKdr. En effet le rapport gNaP/gKdr dans les CRs à train de PA, plus élevé en conditions contrôles comparé aux CRs à 1 PA, atteindra plus

facilement en présence de 4-AP les valeurs de ce rapport mesurées dans les CRs à plateau.

Pour confirmer notre hypothèse, nous avons analysé l'effet de la diminution progressive de g_{Kdr} . Si notre hypothèse est vraie, la diminution progressive de g_{Kdr} , menant à une augmentation progressive du rapport g_{NaP}/g_{Kdr} , devrait permettre de révéler un continuum entre les modes de décharge intrinsèque « 1 ou 2 PA », « train de PA », « mixte » et « potentiels en plateau ». Nous avons testé l'effet de l'application de concentrations croissantes de 4-AP dans une même CR, au mode de décharge « 1 ou 2 PA » en contrôle. L'application de 3, 10, 30, 100 et 300 μM de 4-AP modifie successivement le profil d'excitabilité intrinsèque des CRs (**figure 8F**). L'évolution du mode de décharge « 1 ou 2 PA » des CRs vers les autres modes de décharge est variable selon les CRs. Dans la plupart des CRs ($n = 6/8$) le mode de décharge « 1 ou 2 PA » est converti successivement au moins en deux modes de décharge distincts selon la concentration de 4-AP utilisée (« train de PA » puis « mixte » et/ou « mixte » puis « potentiels en plateau »).

Nous avons réalisé la même série d'expériences à E14,5. L'application de 300 μM de 4-AP dans les CRs à 1 PA réduit significativement la densité de g_{Kdr} de 43,3 % ($505,3 \pm 158,5$ en contrôle, $n = 19$ versus $286,6 \pm 86,8$ en présence 4-AP, $n = 6$; $p = 0,0031$, **figure 9B**) et ne modifie pas significativement la densité de g_A ($535,9 \pm 212,3$ en contrôle, $n = 16$ versus $542,6 \pm 108,3$ en présence 4-AP, $n = 6$; $p = 0,6318$) (**figure 9D**). Cependant, en présence de 300 μM de 4-AP, la densité de g_{Kdr} restante ($286,6 \pm 86,8$ pS/pF, $n = 6$) reste significativement plus élevée que celle mesurée dans les CRs à plateau à E12,5 ($161,7 \pm 113,9$, $n = 10$; $p = 0,0312$). Nous avons donc choisi d'augmenter la concentration de 4-AP à 600 μM . A cette concentration, l'application de 4-AP réduit significativement la densité de g_{Kdr} de 59,2 $\pm$ 6,1 % ($n = 8$, $p = 0,0078$, **figure 9A et B**) sans modifier la densité de g_A ($516,3 \pm 191,4$ en contrôle versus $570,5 \pm 221,7$ en présence 4-AP, $n = 7$; $p = 0,1563$, **figure 9B et D**). En présence de 600 μM de 4-AP, la densité de g_{Kdr} restante ($192,1 \pm 48,8$ pS/pF, $n = 8$) ne diffère pas significativement de celle mesurée dans les CRs à plateau à E12,5 ($161,7 \pm 113,9$ pS/pF, $n = 10$; $p = 0,3599$).

L'application de 600 μM de 4-AP modifie le profil d'excitabilité intrinsèque de toutes les CRs à E14,5, convertissant leur mode de décharge initialement de « 1 seul PA » en un mode de décharge « train de PA » ($n = 2/8$), « mixte » ($n = 4/8$), ou « potentiels en plateau » ($n = 2/8$) (**figure 9E**). La capacité de décharger des PA de façon répétitive, induite en présence de 4-AP, est supprimée par l'application de TTX ($n = 6/6$, **figure 9E₁**). On notera qu'à E14,5

certaines potentiels en plateau ($n = 4/6$, **figure 9E₃**) ne sont pas totalement bloqués par la TTX ce qui suggère l'implication d'autres conductances entrantes dans les potentiels en plateau à cet âge. Ce résultat indique que les CRs à E14,5 gardent la capacité d'évoquer un train de PA et des potentiels en plateau, mais cette capacité est physiologiquement empêchée par la forte amplitude des courants IKv à E14,5.

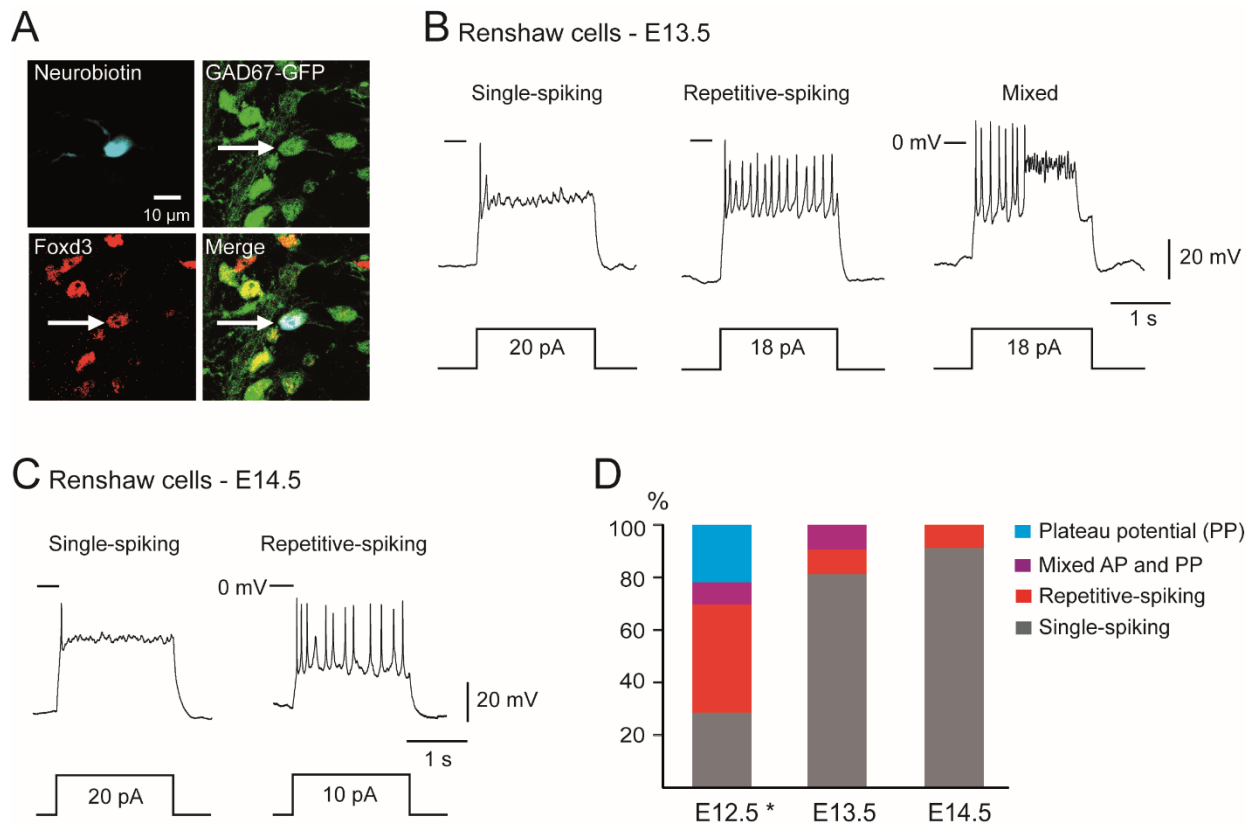
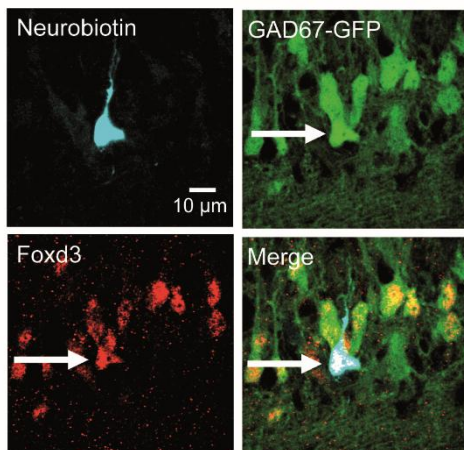
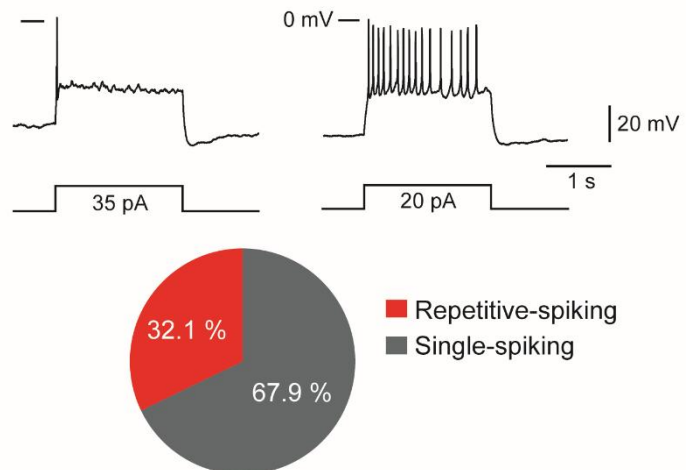


Figure 1 : Profils de décharge intrinsèque évoquée dans les cellules de Renshaw à E13,5 et E14,5 et évolution de leur incidence entre E12,5 et E14,5 :

A) Confirmation de l'identité CR des neurones enregistrés en patch clamp : exemple d'un neurone rempli de neurobiotine lors de l'enregistrement en patch clamp, localisé ventro-latéralement aux MNs, au niveau lombaire d'une moelle épinière entière ouverte d'embryon de souris GAD67-GFP. Ce neurone GFP positif est positif pour l'immunomarquage de Foxd3. **B)** Traces représentatives de la variation du potentiel de membrane évoquée par un saut de courant dépolarisant dans les CRs lombaires à E13,5, illustrant une CR au mode de décharge intrinsèque « 1 ou 2 PA », une CR au mode de décharge « train de PA » et une autre CR au mode de décharge « mixte » (PA et potentiels en plateau). **C)** Traces représentatives de la variation du potentiel de membrane évoquée par un saut de courant dépolarisant dans les CRs lombaires à E14,5, illustrant une CR au mode de décharge « 1 ou 2 PA » et une autre CR au mode de décharge « train de PA ». **D)** Evolution des proportions des modes de décharge dans les CRs à E12,5*, E13,5 (n = 32) et E14,5 (n = 57). * Les données à E12,5 sont extraites de l'article de la partie 1 des résultats.

A Renshaw cells - E16.5

B Renshaw cells - E16.5

Figure 2 : Profils de décharge intrinsèque évoquée dans les cellules de Renshaw à E16,5 :

A) Confirmation de l'identité CR des neurones enregistrés en patch clamp à E16,5 : exemple d'un neurone rempli de neurobiotine lors de l'enregistrement en patch clamp, localisé ventro-latéralement aux MNs, au niveau lombaire d'une moelle épinière entière ouverte d'embryon de souris GAD67-GFP. Ce neurone GFP positif est positif pour l'immunomarquage de Foxd3. **B)** Traces représentatives de la variation du potentiel de membrane évoquée par un saut de courant dépolarisant dans les CRs lombaires à E16,5 illustrant une CR au mode de décharge « 1 ou 2 PA » et une autre CR au mode de décharge en « train de PA ». En dessous les proportions des modes de décharge dans les CRs à E16,5 (n = 28).

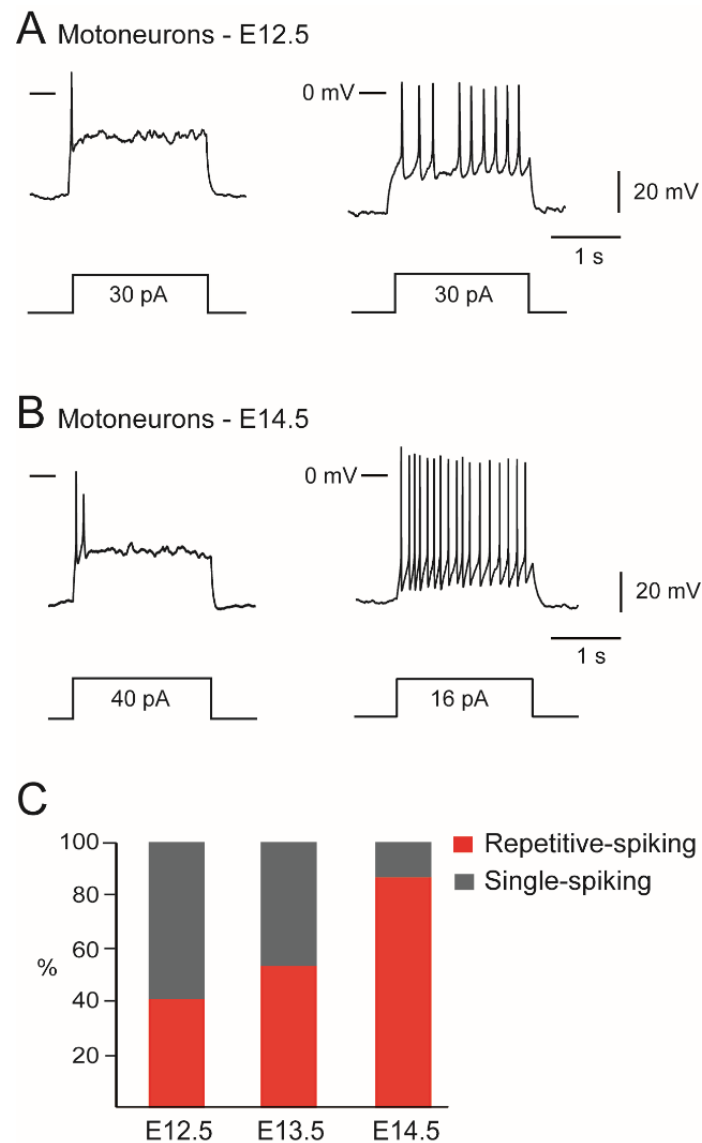


Figure 3 : Profils de décharge intrinsèque évoquée dans les motoneurones et évolution de leur incidence entre E12,5 et E14,5 :

Traces représentatives de la variation du potentiel de membrane évoquée par un saut de courant dépolarisant dans les MNs lombaires à E12,5 (**A**) et à E14,5 (**B**) illustrant à chaque âge un MN au mode de décharge intrinsèque « 1 ou 2 PA » et un autre MN au mode de décharge « train de PA ». **C**) Evolution des proportions des modes de décharge dans les MNs à E12,5 (n = 90), E13,5 (n = 13) et E14,5 (n = 36).

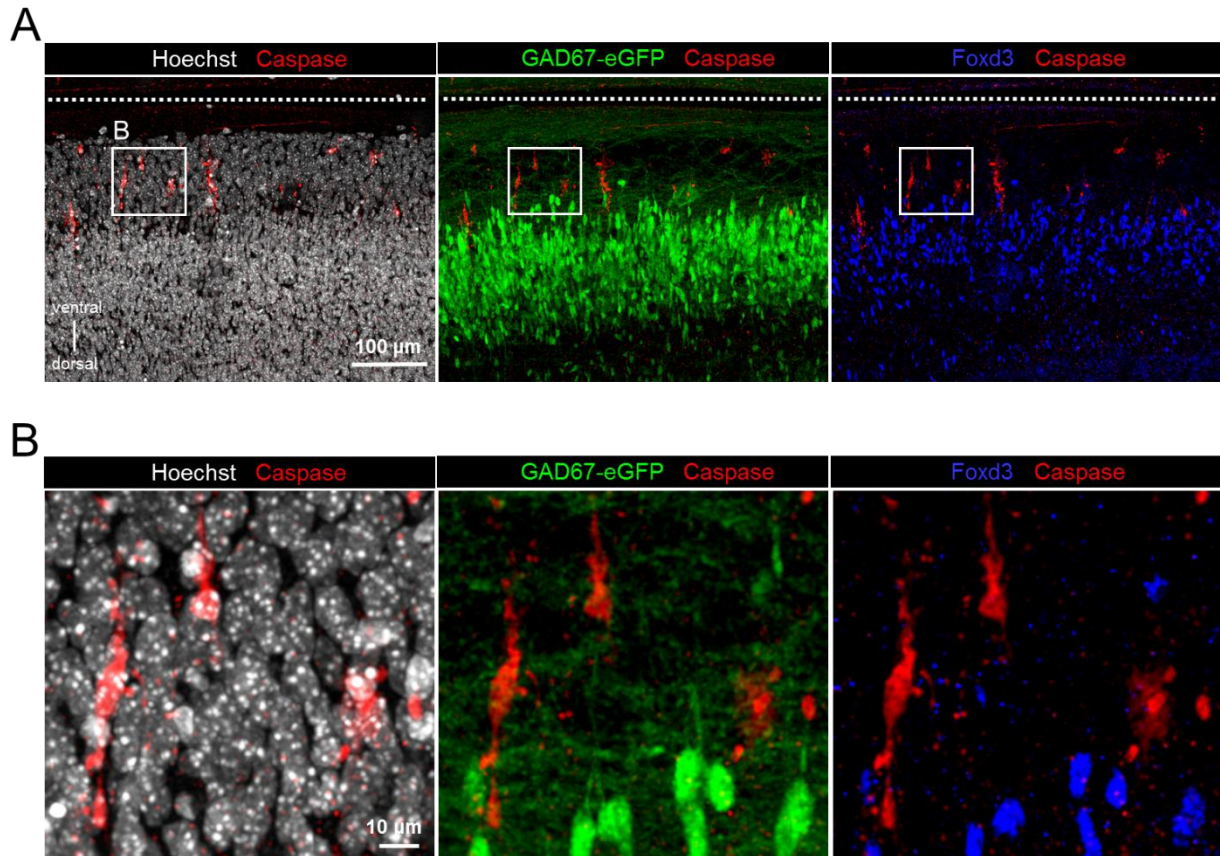


Figure 4 : Evaluation de la mort cellulaire par apoptose dans les cellules de Renshaw à E14,5 :

A) Immunomarquage de la caspase-3-activée sur moelle entière ouverte isolée d'embryon de souris GAD67-GFP à E14,5 en région lombaire. La ligne en pointillée représente la ligne médiane. Les images correspondent à la superposition de 10 sections confocales (1 μm en Z) acquises à l'objectif 40X zoom 1, montrant le marquage de la caspase-3 activée avec successivement, le marquage des noyaux (Hoechst), le marquage des neurones GAD67-GFP, ou le marquage de Foxd3. Aucun marquage de la caspase-3 activée n'a été détecté dans les neurones GAD67-GFP⁺ et/ou Foxd3⁺ (n = 6 moelles épinière). **B)** Grossissement des images en A d'une région ventro-latérale de la moelle épinière révélant l'absence de colocalisation du marquage de la caspase-3 activée avec celui de la GFP et de Foxd3.

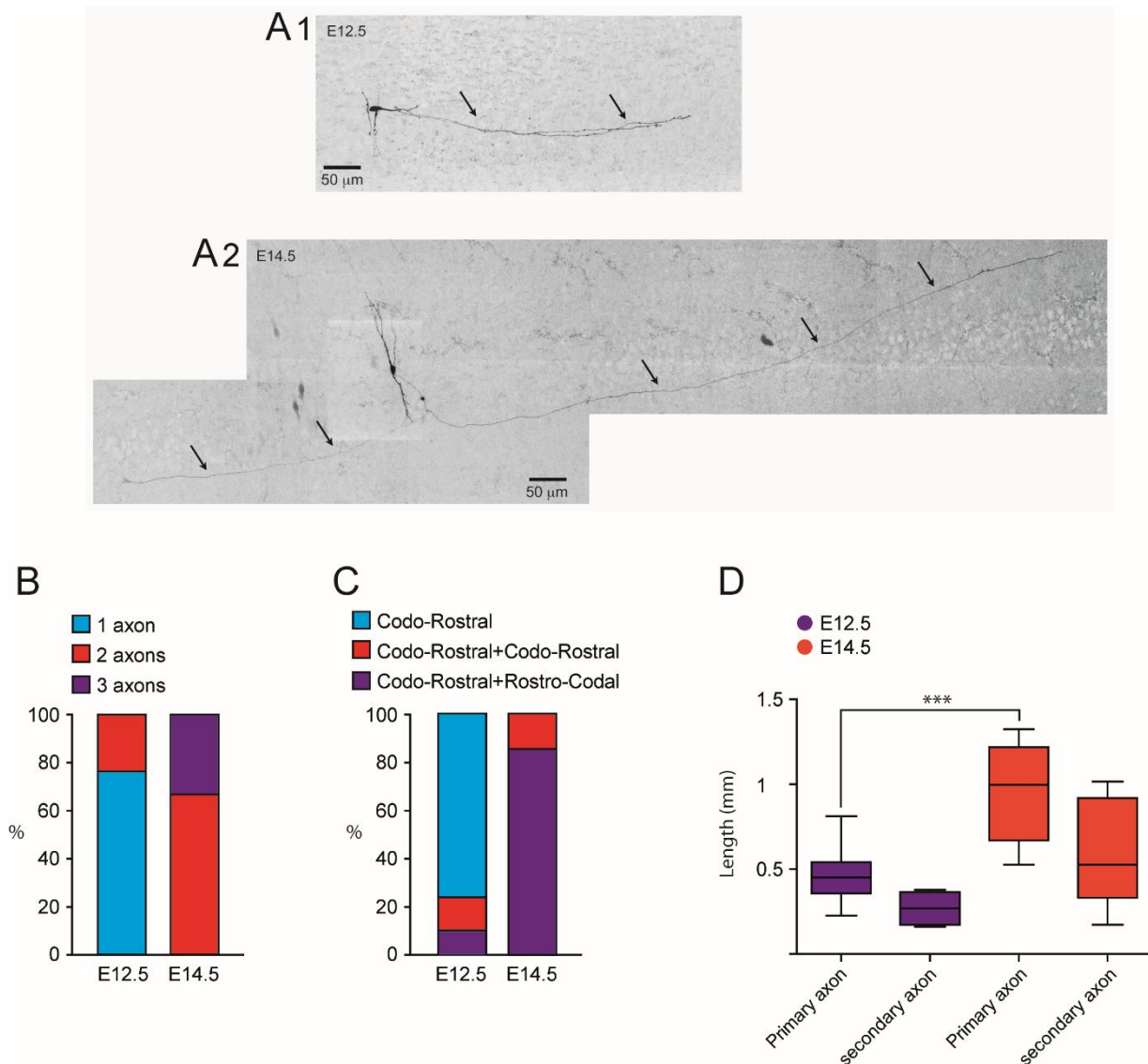


Figure 5 : Morphologie des cellules de Renshaw à E12,5 et à E14,5 :

A) Morphologie représentative d'une CR à E12,5 (**A1**) et d'une CR à E14,5 (**A2**) injectées avec de la neurobiotine. Les images correspondent à une reconstruction mosaïque de la superposition de sections confocales à l'objectif 63X zoom 1 (0,2-0,3 μm en Z). **B)** Distribution du nombre d'axone des CRs à E12,5 (n = 21 CRs) et à E14,5 (n = 6 CRs). **C)** Distribution de la direction de(s) axone(s). **D)** Distribution de la longueur de(s) axone(s) des CRs à E12,5 et E14,5. L'axone primaire est désigné comme le plus long des axones.

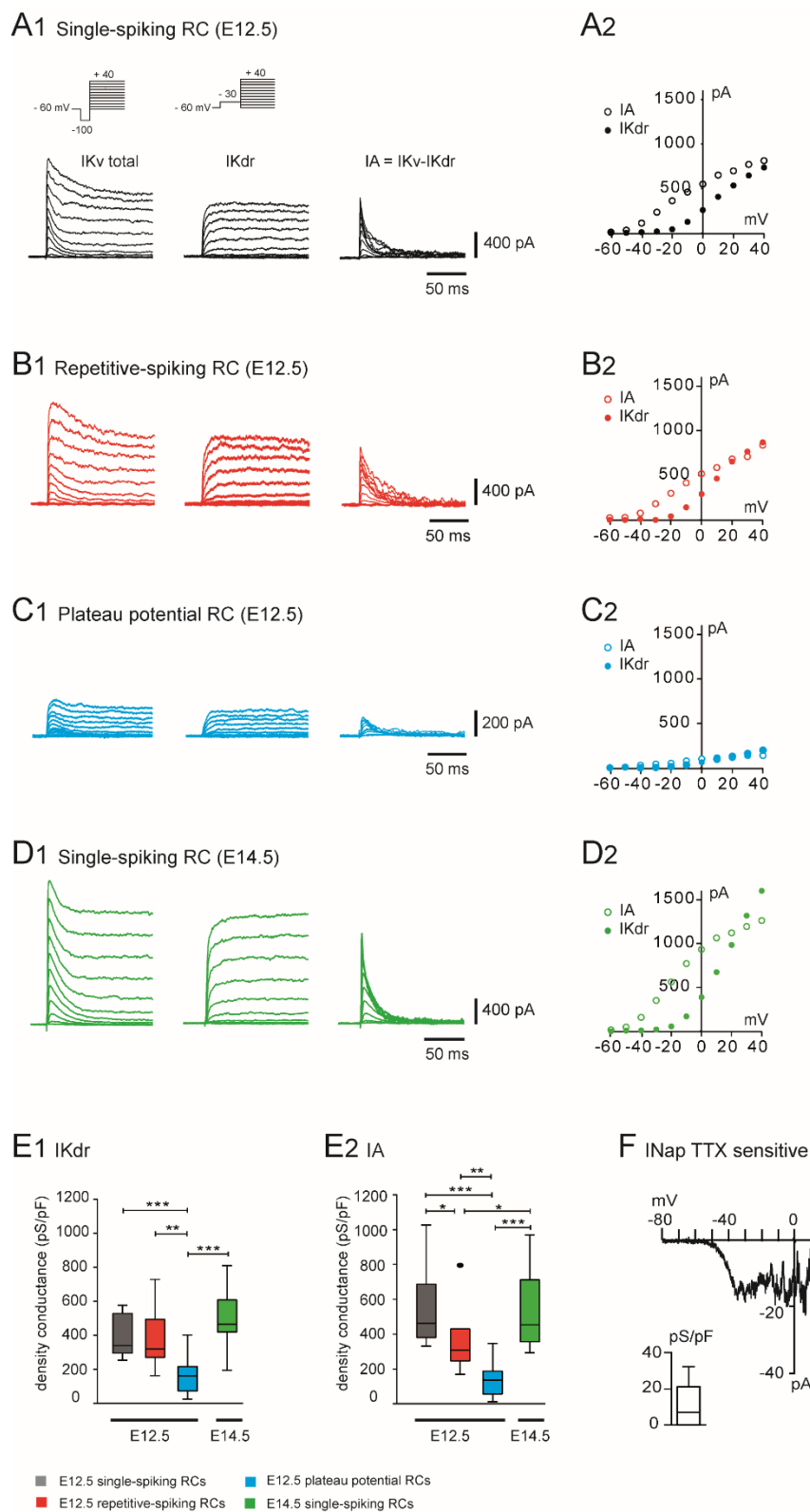


Figure 6 : Evolution des courants potassiques voltage-dépendants dans les cellules de Renshaw entre E12,5 et E14,5 :

A-D) Exemples de traces représentatives des courants potassiques voltage-dépendants et les courbes I/V d'activation correspondante à chaque trace, dans les CRs selon l'âge embryonnaire et le mode de

décharge intrinsèque des CRs : **(A)** CR à 1 PA à E12,5 ; **(B)** CR à train de PA à E12,5 ; **(C)** CR à plateau à E12,5 et **(D)** CR à 1 PA à E14,5. Les courants potassiques totaux IK_v (*traces de gauche*) ont été évoqués par une série d'impulsions du potentiel de membrane (-60 à + 40 mV) à partir d'un potentiel de membrane imposé de départ de -100 mV, en présence de TTX. Les courants potassiques voltage-dépendants à rectification retardée (IK_{dr}) (*traces du milieu*) ont été évoqués par la même série d'impulsions du potentiel de membrane mais précédées d'une première impulsion amenant le potentiel de membrane à -40 mV pendant 500 ms, en présence de TTX. Les courants potassiques transitoires voltage-dépendants de type A (IA) (*traces de droite*) ont été obtenus par soustraction du courant IK_{dr} au courant IK_v évoqué à chaque potentiel de membrane imposé. **E)** Densités des conductances gK_{dr} (**E1**) et gA (**E2**) dans les CRs à E12,5 selon leur mode de décharge et dans les CRs à E14,5. gK_{dr} et gA ont été déterminées en mesurant l'amplitude du courant IK_{dr} au potentiel de membrane imposé de + 40 mV et en prenant un potentiel d'inversion des canaux potassiques à $E_{inv} = E_{eq}(K^+) = -96$ mV. **F)** Trace représentative du courant sodique persistant ($INaP$) dans une CR à 1 PA à E14,5. Le $INaP$ a été isolé en soustrayant le courant évoqué par une rampe lente de potentiel dépolarisant (-100 à + 20 mV, 70 mV/s) en présence de TTX au courant évoqué en absence de TTX. En dessous la distribution des densités de $gNaP$ ($n = 19$). $gNaP$ a été déterminée en mesurant l'amplitude maximale du courant $INaP$ et en prenant un potentiel d'inversion des canaux sodiques $E_{inv} = E_{eq}(Na^+) = +60$ mV.

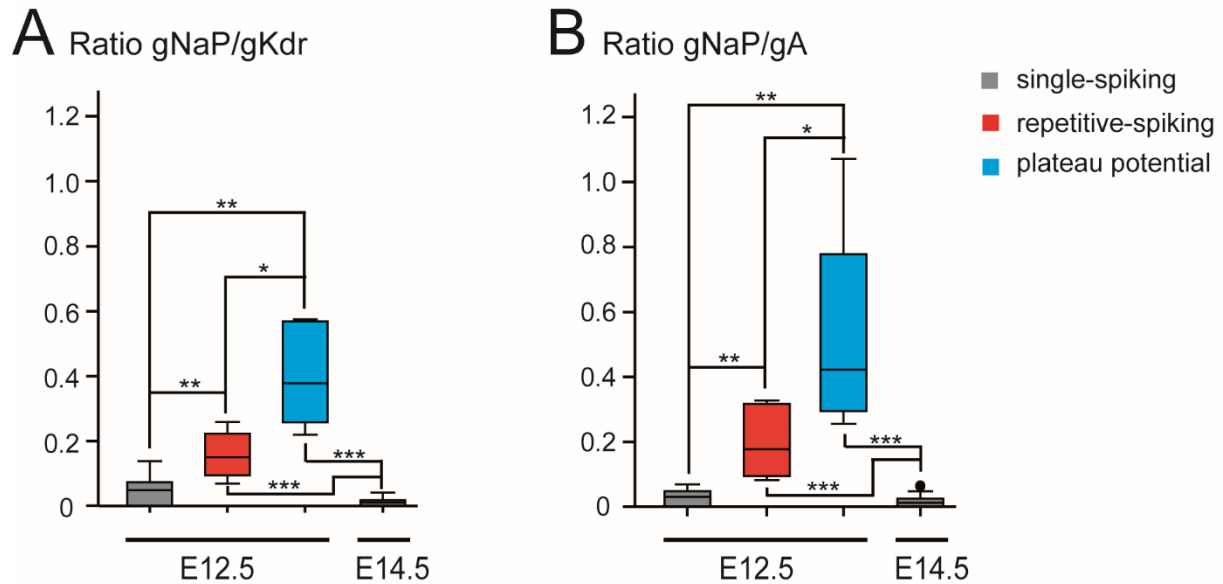


Figure 7 : Les modes de décharge intrinsèque des cellules de Renshaw à E12,5 et E14,5 sont corrélés à différentes amplitudes des rapports gNaP/gKdr et gNaP/gA :

Distribution des rapports gNaP/gKdr (**A**) et gNaP/gA (**B**) dans les CRs selon l'âge embryonnaire et le mode de décharge intrinsèque. Les rapports ont été calculés en déterminant les conductances gNaP, gKdr et gA dans la même cellule ($n = 7$ ou 6 CRs à 1 PA à E12,5 pour gNaP/gKdr et gNaP/gA respectivement ; $n = 7$ ou 6 CRs à train de PA à E12,5 pour gNaP/gKdr et gNaP/gA respectivement ; $n = 5$ CRs à plateau à E12,5 ; $n = 10$ CRs à 1 PA à E14,5). gKdr et gA ont été déterminées en mesurant l'amplitude du courant IKdr au potentiel de membrane imposé de $+40$ mV et en prenant un potentiel d'inversion des canaux potassiques à $E_{inv} = E_{eq}(K^+) = -96$ mV. gNaP a été déterminée en mesurant l'amplitude maximale du courant INaP et en prenant un potentiel d'inversion des canaux sodiques $E_{inv} = E_{eq}(Na^+) = +60$ mV.

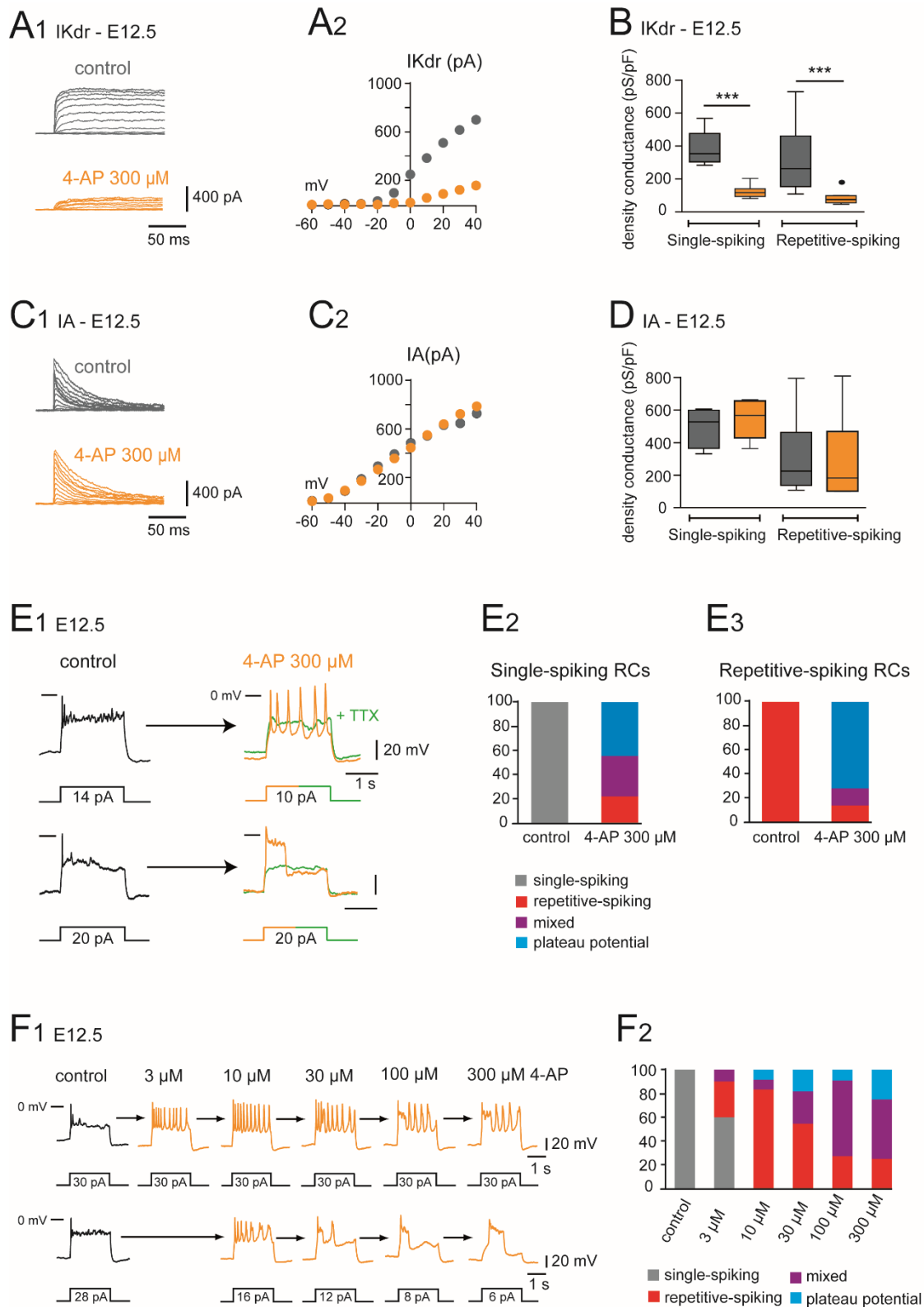


Figure 8 : Effet de l'application de 4-AP sur le profil de décharge intrinsèque des cellules de Renshaw à E12,5 :

A-D) Effet de la 4-aminopyridine (4-AP) sur les courants potassiques IKdr et IA. **A et C)** Exemples de traces représentatives des courants potassiques IKdr et IA et les courbes I/V d'activation

correspondante, en contrôle (gris) et après application de 300 μM de 4-AP (orange). Les traces proviennent d'enregistrement dans une CR à 1 PA. **B et D)** Densités des conductances g_{Kdr} et g_{A} avant (gris) et après application de 300 μM de 4-AP (orange) dans des CRs à 1 PA et des CRs à train de PA (g_{Kdr} : $n = 8$ CRs à 1 PA et $n = 8$ CRs à train ; g_{A} : $n = 5$ CRs à 1 PA et $n = 6$ CRs à train). Les conductances ont été déterminées en mesurant l'amplitude du courant au potentiel imposé de + 40 mV et en prenant un potentiel d'inversion des canaux potassiques $E_{\text{inv}} = E_{\text{eq}}(\text{K}^+) = -96$ mV. **E)** Effet de l'application de 4-AP à 300 μM sur l'excitabilité intrinsèque des CRs à E12,5 dont le mode de décharge intrinsèque en contrôle est « 1 ou 2 PA » ou « train de PA ». **E1)** Exemple de traces dans deux CRs différentes (contrôle en noir, 4-AP en orange et TTX en vert). **E2-E3)** Pourcentages d'incidence des modes de décharge « 1 ou 2 PA », « train de PA », « mixte » et « potentiel en plateau » après application de 300 μM de 4-AP dans des CRs dont le mode de décharge intrinsèque en contrôle était soit **(E2)** « 1 ou 2 PA » ($n = 9$ CRs) soit **(E3)** « train de PA » ($n = 14$ CRs). **F)** Effet de l'application de concentrations croissantes de 4-AP (3, 10, 30, 100 et 300 μM) sur l'excitabilité intrinsèque des CRs à E12,5 dont le mode de décharge en contrôle était « 1 ou 2 PA ». **F1)** Deux exemples de traces provenant de deux CRs différentes. **F2)** Pourcentages d'incidence des modes de décharge « 1 ou 2 PA », « train de PA », « mixte » et « potentiel en plateau » après application de concentrations croissantes de 4-AP dans les CRs à 1 PA ($n = 8$).

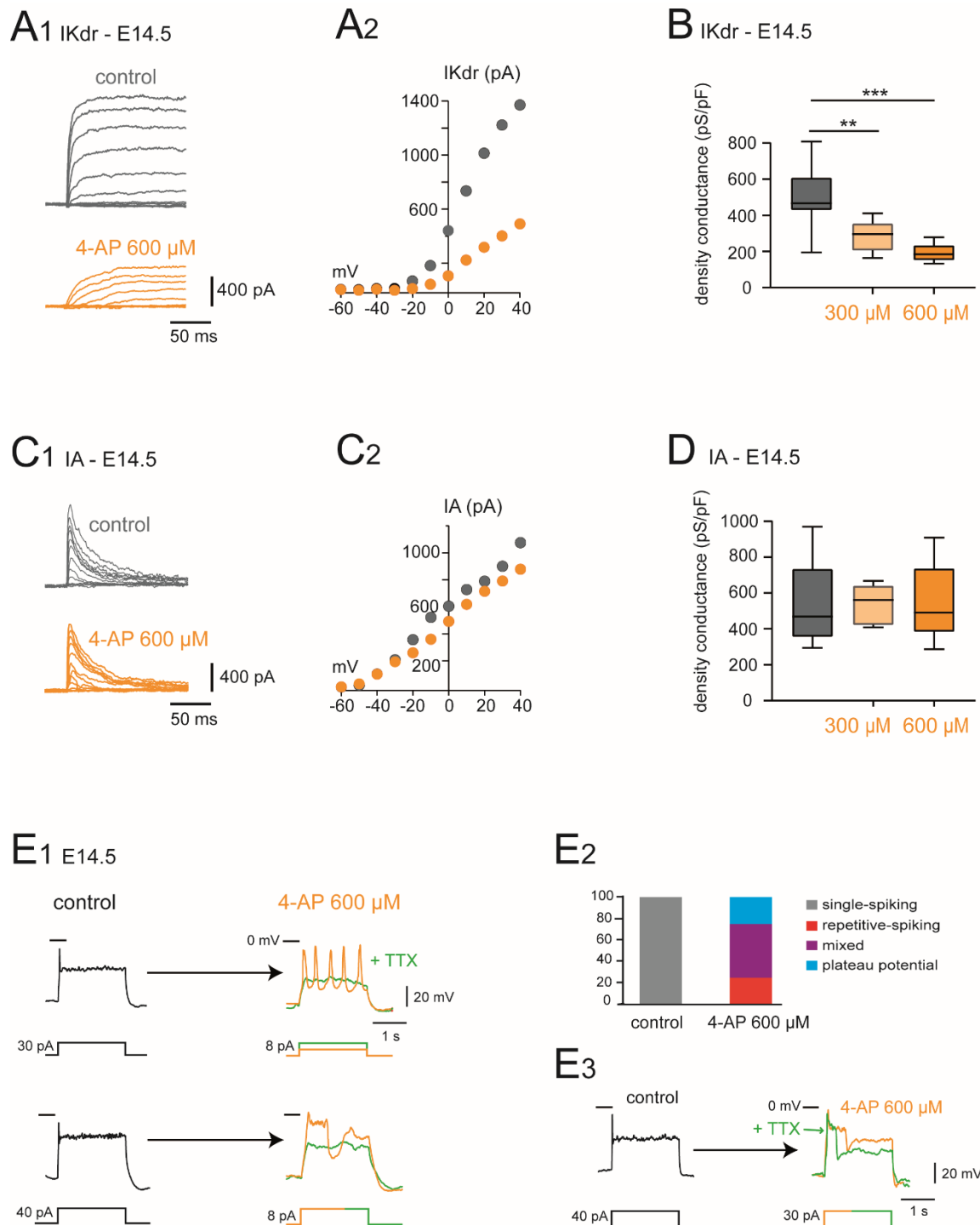


Figure 9 : Effet de l'application de 4-AP sur le profil de décharge intrinsèque des cellules de Renshaw à E14,5 :

A-D) Effet de la 4-aminopyridine (4-AP) sur les courants potassiques IKdr et IA. **A et C)** Exemples de traces représentatives des courants potassiques IKdr et IA et les courbes I/V d'activation correspondante, avant (gris) et après application de 600 μ M de 4-AP (orange) dans une CR à E14,5 au mode de décharge « 1 seul PA ». **B et D)** Densités des conductances gKdr et gA en contrôle (gris), en présence de 300 μ M de 4-AP (orange clair) et en présence de 600 μ M de 4-AP (orange) dans des CRs

à 1 PA à E14,5 (gKdr : n = 19 contrôle, n = 6 en 4-AP à 300 μ M et n = 8 en 4-AP à 600 μ M ; gA : n = 16 contrôle, n = 6 en 4-AP à 300 μ M et n = 7 en 4-AP à 600 μ M). Les conductances ont été déterminées en mesurant l'amplitude du courant au potentiel imposé de + 40 mV et en prenant un potentiel d'inversion des canaux potassiques $E_{inv} = E_{eq}(K^+) = -96$ mV. **E)** Effet de l'application de 600 μ M de 4-AP sur l'excitabilité intrinsèque des CRs à E14,5 dont le mode de décharge intrinsèque en contrôle était « 1 ou 2 PA ». **E1)** Exemple de traces dans deux CRs différentes (contrôle en noir, 4-AP en orange et TTX en vert). Notez qu'en présence de 4-AP + TTX, la capacité à décharger des PA de façon répétitive est supprimée dans 100 % des cas (n = 6/6 CRs). Par contre la capacité à décharger des « potentiels en plateau » est soit supprimée (n = 2/6) soit persiste (**E3**, n = 4/6 CRs). **E2)** Pourcentages d'incidence des modes de décharge « 1 ou 2 PA », « train de PA », « mixte » et « potentiel en plateau » après application de 600 μ M de 4-AP dans les CRs à 1 PA (n = 8).

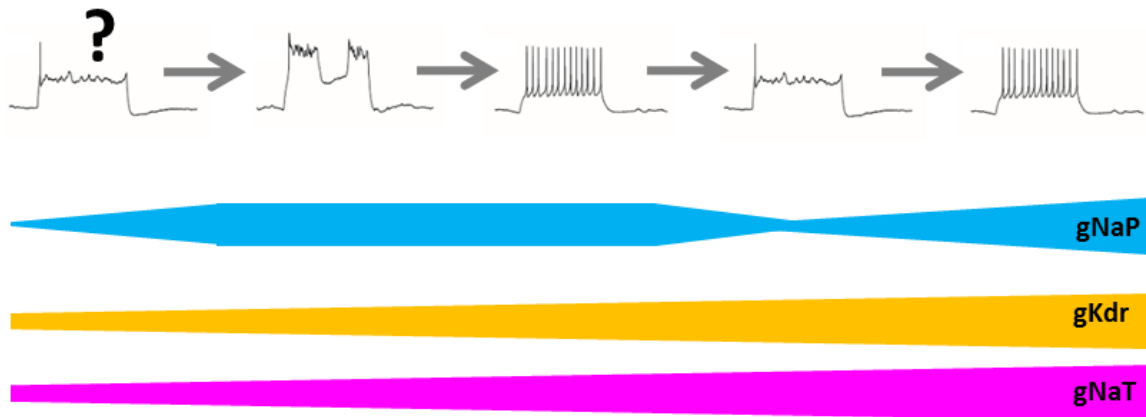
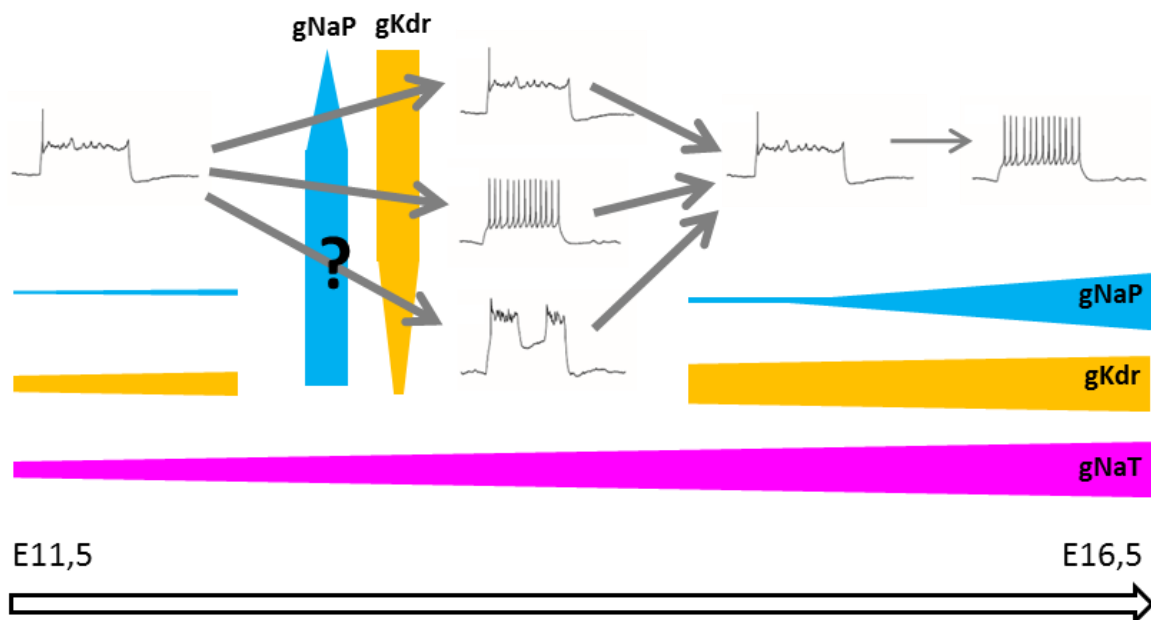
Modèle 1**Modèle 2**

Figure 10 : Modèles de l'évolution du profil de décharge intrinsèque des cellules de Renshaw en lien avec la maturation des conductances ioniques au cours du développement embryonnaire chez la souris :

Modèle 1 : L'excitabilité intrinsèque de toutes les CRs évoluerait selon une seule et même séquence développementale. **Modèle 2 :** Il existerait une hétérogénéité de séquences développementales dans l'évolution de l'excitabilité intrinsèque des CRs. **gNaT** = conductance sodique voltage-dépendante transitoire, **gNaP** = conductance sodique voltage-dépendante persistante, **gKdr** = conductance potassique voltage-dépendante retardée.

Conclusion et discussion

Dans cette deuxième partie de notre travail nous montrons qu'entre E12,5 et E14,5, le pourcentage de CRs capables de décharger des PA de façon répétitive diminue et que la capacité des CRs à décharger des potentiels en plateau disparaît, les CR ne pouvant plus générer en majorité qu'un seul PA à E14,5. Dans la mesure où à E16,5, le pourcentage de CRs capables de décharger répétitivement des PA augmente, nous pouvons affirmer que cette diminution de leur excitabilité n'est que transitoire au cours du développement. Ce processus étant indépendant des phénomènes d'apoptose.

Nous avons précédemment montré que les CRs à E12,5 présentent trois modes principaux de décharge intrinsèque : « 1 ou 2 PA », « train de PA » et « potentiels en plateau ». Nous avons également montré que la conductance g_{NaP} permet aux CRs de déclencher des trains de PA et des potentiels en plateau. Nous montrons dans cette deuxième partie que la conductance g_{Kdr} réprime le déclenchement de potentiel en plateau ce qui explique l'origine de la différence entre ces deux modes de décharge : « train de PA » et « potentiel en plateau ». Ces résultats nous permettent de mettre en évidence une corrélation entre les différents modes de décharge intrinsèque des CRs embryonnaires à E12,5-E14,5 et le rapport des conductances g_{NaP}/g_{Kdr} .

Des modélisations informatiques, dans le cadre d'une collaboration avec Claude Meunier, sont actuellement en cours pour déterminer dans quelle mesure la variation du rapport g_{NaP}/g_{Kdr} suffit à expliquer les différences dans les profils de décharge observés à E12,5 dans les CRs et leur évolution au cours du développement. Nos résultats expérimentaux ont dû être focalisés sur l'analyse des rapports g_{NaP}/g_{Kdr} dans les trois groupes principaux de CRs à E12,5. En effet, les CRs mixtes étant peu représentées, nous n'avons pas déterminé le rapport g_{NaP}/g_{Kdr} dans ces CRs. De plus, les expériences pharmacologiques ne nous ont pas permis de tester toutes les conditions du rapport g_{NaP}/g_{Kdr} . Par des modélisations informatiques, nous souhaitons d'une part vérifier l'existence d'un continuum entre les différents profils de décharge intrinsèque en faisant varier de manière très précise l'une ou l'autre des conductances g_{NaP} et g_{Kdr} . D'autre part, nous souhaitons déterminer si les trois modes de décharge principaux refléteraient des états stables d'excitabilité tandis que le mode de décharge « mixte » refléterait un état instable ou de bistabilité, qui justifierait le plus faible pourcentage de CRs mixtes.

Exemples de neurones dont l'excitabilité intrinsèque diminue au cours du développement

Le développement de l'excitabilité des CRs de souris dépendant d'une variation du rapport g_{NaP}/g_{Kdr} n'avait jamais encore été décrit. En effet, chez le xénope la séquence développementale de l'excitabilité va d'une activité en plateau vers une activité en train mais dans ce cas l'activité en plateau est générée par une conductance calcique ce qui n'est pas le cas pour les CRs chez la souris. Par ailleurs il a été reporté que des neurones spinaux d'embryon de xénope en culture cellulaire déchargeant répétitivement des PA ont leur excitabilité qui diminue à J+1 de culture (fréquence de décharge qui diminue ou bien décharge d'un seul PA) (Ribera and Spitzer 1990). Les auteurs ont corrélé cette diminution de l'excitabilité à l'expression de courants potassiques IA se développant et s'exprimant dans tous les neurones au cours des deux premiers jours de maturation. Une diminution de l'excitabilité intrinsèque au cours du développement a aussi été décrite dans les neurones du noyau laminaris du système auditif (Gao and Lu 2008), mais dans ce cas la perte d'excitabilité est irréversible. Aux stades précoces du développement embryonnaire ces neurones peuvent générer de multiples PA en réponse à l'injection d'un saut de courant. A des stades plus tardifs ils perdent cette capacité pour ne déclencher qu'un seul PA, profil de décharge qu'ils conservent jusqu'à l'âge adulte. Les auteurs ont suggéré que l'augmentation du courant potassique voltage-dépendant à inactivation lente aux stades tardifs du développement embryonnaire dans ces neurones serait le principal facteur qui détermine ce profil de décharge d'un PA unique dans ces neurones (Gao and Lu 2008).

Les courants calciques ne semblent pas impliqués dans les modes de décharge des CRs à E12,5 mais pourraient l'être dans les CRs à E14,5

A E12,5 les rampes de potentiel dépolarisant n'évoquent pas de courant persistant de nature calcique et la décharge de train de PA ou de potentiel en plateau (en condition contrôle ou en condition 4-AP) est totalement supprimée par l'application de TTX. Ces résultats indiquent que les courants calciques ne sont pas impliqués dans ces différents modes de décharge, contrairement à ce qui a été observé chez le xénope au début de l'apparition de l'excitabilité de neurones spinaux (Spitzer and Lamborghini 1976, Spitzer and Baccaglini 1976, Baccaglini and Spitzer 1977). Ces résultats renforcent l'idée que les courants sodiques persistants voltage-dépendants jouent un rôle prépondérant dans la genèse des différents

modes de décharge dans les CRs chez la souris. Il est donc possible que la séquence développementale généralement décrite dans les neurones spinaux des amphibiens (courants calciques puis courants sodiques) (Barish 1986, O'Dowd et al. 1988) ne soit pas valable pour le développement initial des propriétés d'excitabilité intrinsèque des CRs chez la souris.

Les courants calciques pourraient être davantage présents dans les CRs à E14,5. En effet lorsque l'on induit la capacité d'évoquer des potentiels en plateau par l'application de 4-AP, certains ne sont pas totalement bloqués par l'application de TTX, indiquant la présence d'un courant entrant non sodique, une composante probablement dépendante des courants calciques. Nous testerons l'effet de l'application de nifédipine ou nickel, bloqueur des canaux calciques sur ces potentiels en plateaux pour tester cette hypothèse.

Que les propriétés d'excitabilité intrinsèque sous-tendant la première activité neuronale soient purement dépendante des courants sodiques voltage-dépendants n'est pas une particularité des CRs. En effet à E12,5 les propriétés de décharge intrinsèque des MNs, dont certains sont déjà capables de générer des trains de PA, sont dépendantes des courants sodiques voltage-dépendants (la TTX bloquant complètement la décharge des PA). Par ailleurs les MNs aux stades précoces du développement embryonnaire chez le rat, expriment une petite densité de courants calciques voltage-dépendants comparé à celle des courants sodiques voltage-dépendants, et seuls les courants sodiques sont nécessaires et suffisants pour déclencher un PA (Gao and Ziskind-Conhaim 1998). Cette prédominance initiale des courants sodiques comparé aux courants calciques au début du développement embryonnaire est aussi observée dans les MNs d'embryon de poulet (McCobb et al. 1989, McCobb et al. 1990). Ainsi, nos résultats concernant les CRs embryonnaires de souris, renforcent l'idée que la maturation des courants voltages-dépendants sous-tendant l'excitabilité intrinsèque initiale des neurones spinaux embryonnaires suit des séquences développementales différentes selon les espèces avec d'un côté une séquence « courants calciques puis courants sodiques » chez les amphibiens et d'un autre côté « courants sodiques puis courants calciques » chez les rongeurs et les oiseaux.

Maturation du profil de décharge intrinsèque des CRs corrélée à la maturation des conductances ioniques au cours du développement embryonnaire chez la souris

Si les courants sodiques persistants $INaP$ et les courants potassiques retardés $IKdr$ jouent un rôle essentiel dans la régulation du mode de décharge des CRs embryonnaires, c'est le rapport dynamique des charges $INaP/IKdr$ qui déterminera précisément les différents modes de décharge. Bien que les courants potassiques transitoires de type IA soient présents dans les CRs et suivent un profil d'expression similaire aux courants $IKdr$ au cours du développement, il est peu probable qu'ils puissent jouer un rôle déterminant dans le mode de décharge des CRs à E12,5 du fait de leur cinétique de désensibilisation. Cela devra néanmoins être confirmé par des expériences pharmacologiques dans lesquelles les courants IA seront spécifiquement bloqués ou, si ce n'est pas possible, par les expériences de modélisation informatique.

Les différents modes de décharge des CRs embryonnaires reflètent très certainement une séquence développementale de l'excitabilité intrinsèque impliquant seulement trois types de conductances aux stades embryonnaires précoces : les conductances sodiques transitoires $gNaT$, les conductances sodiques persistantes $gNaP$ et les conductances potassiques retardées $gKdr$. D'après nos données expérimentales, cette séquence développementale est à la fois plus complexe et plus simple que la séquence généralement admise qui va de la génération d'un seul PA à la génération d'un train de PA. Elle est plus complexe dans la mesure où les CRs présentent au début de leur développement une activité hétérogène avec plusieurs modes de décharge possibles puis « régresse » pour ne produire qu'un seul PA avant d'être capable à nouveau de générer des trains de PA. Elle est plus simple que celle généralement décrite car elle n'implique que trois conductances ioniques et en particulier le rapport $gNaP/gKdr$, qui détermine le mode de décharge des CRs à E12,5.

Nous pouvons envisager deux modèles de la maturation de l'excitabilité intrinsèque des CRs au cours du développement embryonnaire chez la souris (**figure 10**). Dans un premier modèle, toutes les CRs verraient leur excitabilité intrinsèque évoluer selon une seule et même séquence développementale. Dans ce modèle, le mode de décharge « 1 seul PA » apparaîtrait en premier, puis serait suivi par le mode de décharge « potentiel en plateau » dès que $gNaP$ apparaît, qui serait ensuite suivi par le mode de décharge « train de PA », lui-même suivi par le mode de décharge « 1 seul PA » pour aboutir à la réapparition du mode de décharge mature « train de PA » aux stades plus tardifs du développement. Cette séquence développementale

impliquerait des changements du rapport g_{NaP}/g_{Kdr} au cours du développement initial des propriétés d'excitabilité des CRs. Dans ce modèle les conductances g_{NaT} apparaissent en même temps que les conductances g_{Kdr} , et avant les conductances g_{NaP} . Les travaux de Nicholas Spitzer et ses collègues effectués chez le xénope, ont montré que le premier profil d'excitabilité intrinsèque de neurones spinaux embryonnaires consiste en un « long PA », appelé aussi « plateau de PA » mais qui dans ce cas est dépendant des conductances calciques (Spitzer and Lamborghini 1976, Spitzer and Baccaglini 1976, Baccaglini and Spitzer 1977). Au fur et à mesure du développement, la durée du PA diminue, les conductances sodiques augmentent et la capacité à décharger répétitivement des PA apparaît (Ribera and Spitzer 1990). En se basant sur ces travaux, nous pourrions envisager une variante du modèle 1 dans laquelle le premier mode de décharge des CRs serait non pas caractérisé par un PA mais directement par des potentiels en plateau. Dans cette variante, les conductances sodiques g_{NaT} et g_{NaP} apparaîtraient simultanément, suivi des conductances potassiques g_{Kdr} . Pour déterminer la séquence initiale (1 PA puis potentiel en plateau ou directement potentiel en plateau) il faudrait enregistrer des CRs avant E12,5.

Le deuxième modèle suppose l'existence d'une hétérogénéité fonctionnelle dès le début du développement des propriétés d'excitabilité intrinsèque des CRs. Dans ce modèle, tous les modes de décharge apparaissent d'emblée suivant les cellules. Ce deuxième modèle présuppose que les conductances g_{NaP} et g_{Kdr} apparaissent en même temps que les conductances g_{NaT} mais qu'il existe une variabilité du rapport g_{NaP}/g_{Kdr} d'une cellule à l'autre. Ainsi (i) certaines CRs présenteraient un mode de décharge initial « potentiels en plateau », suivi d'un mode de décharge « 1 seul PA », pour aboutir au mode de décharge mature « train de PA ». Cette séquence développementale correspond à celle décrite dans les neurones spinaux embryonnaires de xénope. (ii) D'autres CRs présenteraient une évolution linéaire classique de leur excitabilité intrinsèque, débutant par un mode de décharge « 1 seul PA » pour aboutir à l'apparition du mode de décharge mature « train de PA ». (iii) Enfin, d'autres CRs auraient un mode de décharge initial « 1 seul PA », suivi d'un mode de décharge « train de PA », suivi d'une régression transitoire du niveau d'excitabilité (mode de décharge « 1 seul PA ») pour aboutir à la réapparition du mode de décharge « train de PA » aux stades plus tardifs du développement.

Pour déterminer le modèle le plus plausible, il faudrait d'un point de vue expérimental pouvoir suivre l'évolution des propriétés d'excitabilité d'un neurone au cours de son développement.

PARTIE 3

Contrôle cholinergique de l'activité spontanée aux stades précoces du développement embryonnaire

Ces résultats, préliminaires, font partie d'un projet qui a pour but d'étudier le contrôle cholinergique de l'activité spontanée aux stades précoces du développement embryonnaire.

Problématique

La SNA de la moelle épinière se caractérise dans les MNs à E12,5 par des larges dépolarisations (GDPs) (Czarnecki et al. 2014). Ces GDPs sont induits par des courants entrants de grande amplitude (GICs pour « *giant inward currents* ») évoqués par la libération massive de GABA et dans une moindre mesure de glutamate et de glycine. La libération de ces neurotransmetteurs est au moins en partie contrôlée par la transmission cholinergique *via* des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nACh) pré et postsynaptiques. Cependant on ne sait ni comment l'ACh est libérée par les MNs ni comment elle contrôle l'activité des INs au cours de la SNA. Nous souhaitons maintenant étudier les mécanismes qui sous-tendent le contrôle cholinergique de la libération des neurotransmetteurs responsables des GDPs sur les MNs. Les MNs recevant une forte transmission GABAergique, nous nous intéressons ici au contrôle cholinergique de la libération de GABA. Parmi les sources potentielles de GABA, nous avons choisi les CRs. A E12,5 les CRs produisent déjà du GABA et forment des premiers contacts sur les MNs (voir l'article de la partie 1 des résultats). Elles sont aussi activées pendant la SNA, dépolarisées par des GDPs dont la fréquence d'apparition est similaire à celle des GDPs dans les MNs (voir l'article de la partie 1 des résultats).

Dans ce projet, les CRs représentent non seulement un objet d'étude en soit pour étudier leur activité pendant la SNA mais aussi un modèle pour étudier le contrôle cholinergique des INs GABAergiques. Les axes suivis dans ce projet sont les suivants : la caractérisation du mode de libération de l'ACh, la détermination de l'effet de la libération d'ACh sur l'activité des CRs et la détermination de l'arrangement spatial des interactions MNs-CRs. Pour adresser ces questions, nous avons utilisé les techniques optogénétiques pour induire spécifiquement la

libération d'ACh. Comme présenté en introduction, à E12,5 la source d'ACh provient très probablement uniquement des MNs. Les MNs seront activés par la stimulation optogénétique dans des embryons à E12,5 issus d'une lignée de souris ChAT-ChR2-EYFP, dans laquelle l'expression de la *channelrhodopsine-2* (ChR2) est sous le contrôle du promoteur de la choline acétyltransférase (ChAT), enzyme de synthèse de l'ACh.

Pour nous permettre de considérer la CR comme un modèle pour étudier le contrôle cholinergique de la libération de GABA sur les MNs, nous avons d'abord dû caractériser les types de transmission qui induisent la génération des GICs/GDPs dans les CRs. Est-ce-que les CRs reçoivent une transmission cholinergique alors que ce n'est pas le cas pour les MNs (Czarnecki et al. 2014), autrement dit est-ce que l'activité des CRs est directement régulée par l'ACh ?

Nous avons ensuite évalué le modèle des souris ChAT-ChR2-EYFP. En effet ce modèle n'a jamais été utilisé pour étudier la moelle épinière aux stades embryonnaires.

Je présente également quelques résultats sur la propagation des épisodes d'activité spontanés et sur la périodicité de l'apparition de ces épisodes d'activité.

Matériels et méthodes

Animaux

Nous avons utilisé la lignée de souris knock-in GAD67-GFP et la lignée de souris ChAT-ChR2-EYFP. La lignée de souris ChAT-ChR2-EYFP a été obtenue chez les laboratoires Jackson (B6.Cg-Tg(Chat-COP4*H134R/EYFP,Slc18a3)6Gfng/J) (Zhao et al. 2011). Brièvement les souris ChAT-ChR2-EYFP ont l'expression de la protéine ChR2 fusionnée à la EYFP sous le contrôle du promoteur du gène codant la ChAT. La séquence codant la protéine fusion ChR2-EYFP a été insérée dans la région codant la ChAT dans un chromosome artificiel bactérien (BAC) par recombinaison homologue. A noter que ce BAC contient également le gène codant le transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT), car il est sous le contrôle du promoteur du gène codant la ChAT. La séquence du gène VACHT n'est pas interrompue par l'insertion. Il a été montré que la lignée de souris ChAT-ChR2-EYFP a une expression de VACHT augmentée dans l'hippocampe et le tronc cérébral (Kolisnyk et al. 2013). Cette lignée de souris ChAT-ChR2-EYFP permet ainsi de dépolariser

spécifiquement les neurones cholinergiques par une stimulation lumineuse bleue de 450-490 nm de longueur d'onde.

Pour obtenir les embryons transgéniques ChAT-ChR2-EYFP à E12,5, des souris femelles swiss sauvages (Laboratoire Janvier) ont été croisées avec des mâles C57BL/6Jrj hétérozygotes pour ChAT-ChR2-EYFP. Les mâles ChAT-ChR2-EYFP sont maintenus sur fond C57BL/6Jrj en accouplant ces mâles avec des femelles C57BL/6Jrj sauvages (Laboratoire Janvier). L'expression de la fluorescence EYFP n'étant pas détectable sur les embryons entiers, ce sont des moelles épinières isolées positives pour la EYFP qui ont été sélectionnées (microscope optique à épifluorescence ; objectif 10X). Les moelles épinières sont disséquées selon la même technique et dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (voir matériels et méthodes des parties 1 et 2 des résultats).

Pour rappel la solution physiologique extracellulaire (ACSF) utilisée est composée de (en mM) : 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 Glucose, 125 NaCl, 3 KCl et 1 NaH₂PO₄ et oxygénée avec 95% O₂-5% CO₂ (~ 310 mOsmol/kg H₂O, pH = 7.4).

Stimulation optogénétique :

Pour activer les rhodopsines nous avons utilisé une fibre optique (diamètre 200 µm, ThorLabs, référence CFM12L20) placée latéralement au voisinage de la moelle épinière, perpendiculairement à l'axe rostro-caudal de la moelle épinière (**figure 6A**). La fibre optique a été placée soit au niveau cervical-brachial soit au niveau lombaire. La fibre optique est reliée à une source de lumière (diode) (ThorLabs) délivrant une lumière bleue. L'émission de lumière est contrôlée par ordinateur *via* le logiciel pClamp 10.5. Nous n'avons pas évalué l'aire et la puissance d'illumination.

Enregistrements électrophysiologiques en patch clamp :

Les CRs et MNs sont identifiés et leur activité électrique est enregistrée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (voir matériels et méthodes des parties 1 et 2 des résultats). Pour les expériences d'optogénétique, nous avons enregistré soit des MNs soit des INs ventraux. L'identité CR n'a pas été confirmée. Dans certaines séries d'expériences, nous avons enregistré sans distinction des MNs et des INs ventraux, dans ce cas on regroupera sous le terme de « neurones ventraux ».

Les pipettes de patch sont remplies d'une solution dite intracellulaire composée de (en mM) : 96,4 KMeS, 33,6 KCl, 4 MgCl₂, 4 (Na⁺)₂-ATP, 0,3 (Na⁺)₃-GTP, 10 Hepes, 10 EGTA (~ 290 mOsmol/kg-H₂O, pH = 7,2). Avec ce milieu intracellulaire, le potentiel d'équilibre des cations (E_{cations}) est ~ 2 mV et le potentiel d'équilibre des ions chlorure (Cl⁻) est ~ -30 mV, proche des valeurs physiologiques mesurées dans les MNs spinaux à E12,5 (Delpy et al. 2008). Avec la composition des solutions extracellulaire et intracellulaire, le potentiel de jonction calculé est de ~ 6,6 mV. Il n'a été corrigé pendant les enregistrements et n'a été pris en compte dans les valeurs d'analyse.

Pour discriminer la composante cationique et la composante anionique des GICs des CRs, nous avons utilisé un milieu intra-pipette composé de (mM) : 5 CsCl, 125 CsMeS (césium méthanesulfonate), 4 MgCl₂, 4 (Na⁺)₂-ATP, 0,3 (Na⁺)₃-GTP, 10 Hepes, 10 EGTA (~ 290 mOsmol/kg-H₂O, pH = 7,2). Avec ce milieu intracellulaire, E_{cations} est ~ 2 mV et Cl⁻ est ~ -60 mV. Avec la composition des solutions extracellulaire et intracellulaire, le potentiel de jonction calculé est de ~ 8 mV. Il n'a été corrigé pendant les enregistrements et n'a été pris en compte dans les valeurs d'analyse.

Pharmacologie :

Les différentes drogues utilisées sont : gabazine (3 µM, Tocris Bioscience), mécamylamine (50 µM, Tocris Bioscience), d-tubocurarine (dTC, 10 µM, Tocris Biosciences), dihydro-β-erythroidine hydrobromide (DHβE, 5 µM, Tocris Biosciences), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 20 µM, Tocris Biosciences), acide DL-2-amino-5-phosphonopentanoïque (DL-APV ou DL-AP5, 200 µM, Tocris Biosciences), strychnine (3 µM, Sigma-Aldrich), tétródotoxine (TTX, 1 µM, Alomone ou Abcam), acétylcholine (ACh, 30 ou 100 µM, Sigma-Aldrich). Les drogues sont diluées dans le milieu extracellulaire et sont appliquées au voisinage de la région de la moelle épinière où l'on enregistre.

Immunohistochimie :

Nous avons réalisé des immunomarquages sur moelle épinière entière. Les protocoles pour obtenir les coupes d'embryon et les protocoles d'immunohistochimie sont les mêmes que ceux décrits précédemment (voir matériels et méthodes des parties 1 et 2 des résultats).

Les anticorps primaires utilisés sont : anti-Islet 1/2 (souris monoclonal IgG1 et IgG2b, Hybridoma bank clones 39.4 D5 et 40.2 D6, dilution 1/200 pour la forme culot ou 1/100 pour la forme surnageant) et anti-GFP (lapin, Life Technology référence A11122, dilution 1/1000). Les anticorps secondaires (ThermoFisher, dilution 1/1000) utilisés sont : anti-IgG1 et anti-IgG2b de souris faits chez la chèvre couplé au fluorochrome Alexa594 et anti-IgG de lapin fait chez la chèvre couplé au fluorochrome Alexa647. Nous avons aussi utilisé du Hoechst (1/1000).

La microscopie confocale et l'analyse d'images ont été faites selon les mêmes techniques que précédemment (voir matériels et méthodes des parties 1 et 2 des résultats).

Statistiques : (voir matériels et méthodes des parties 1 et 2 des résultats).

Résultats

La SNA dans les CRs à E12,5 est générée par une transmission majoritairement cholinergique et dans un moindre mesure glutamatergique et GABAergique

Comme nous l'avons montré précédemment, les CRs lombaires présentent une activité spontanée rythmique caractérisée en courant imposé par des GDPs apparaissant toutes les $3,7 \pm 2,4$ minutes ($n = 30$), d'une amplitude de $25,6 \pm 8,7$ mV ($n = 29$) et d'une durée à la demi-amplitude de $1,88 \pm 0,86$ s ($n = 29$) (**figure 1A**). En potentiel imposé, la SNA dans les CRs se caractérise par des GICs apparaissant toutes les $3,5 \pm 1,5$ minutes ($n = 47$). Ils ont une amplitude de $31,7 \pm 21,9$ pA ($n = 48$) et une durée à la demi-amplitude de $1,30 \pm 0,59$ s ($n = 48$) (**figure 1B**). Des courants à cinétique rapide probablement synaptiques se superposent à ces GICs. Comme cela a été montré dans les MNs (Antonny Czarnecki et al. 2014), les GICs dans les CRs pourraient résulter de l'activation de récepteurs évoquée par la libération de neurotransmetteurs. Pour déterminer si ces GICs sont évoqués par des conductances cationiques et/ou anioniques, nous avons effectué des enregistrements avec une solution intracellulaire permettant d'obtenir un potentiel d'équilibre pour les ions chlorure égal à -60 mV et un potentiel d'équilibre pour les cations de 2 mV (voir matériels et méthodes).

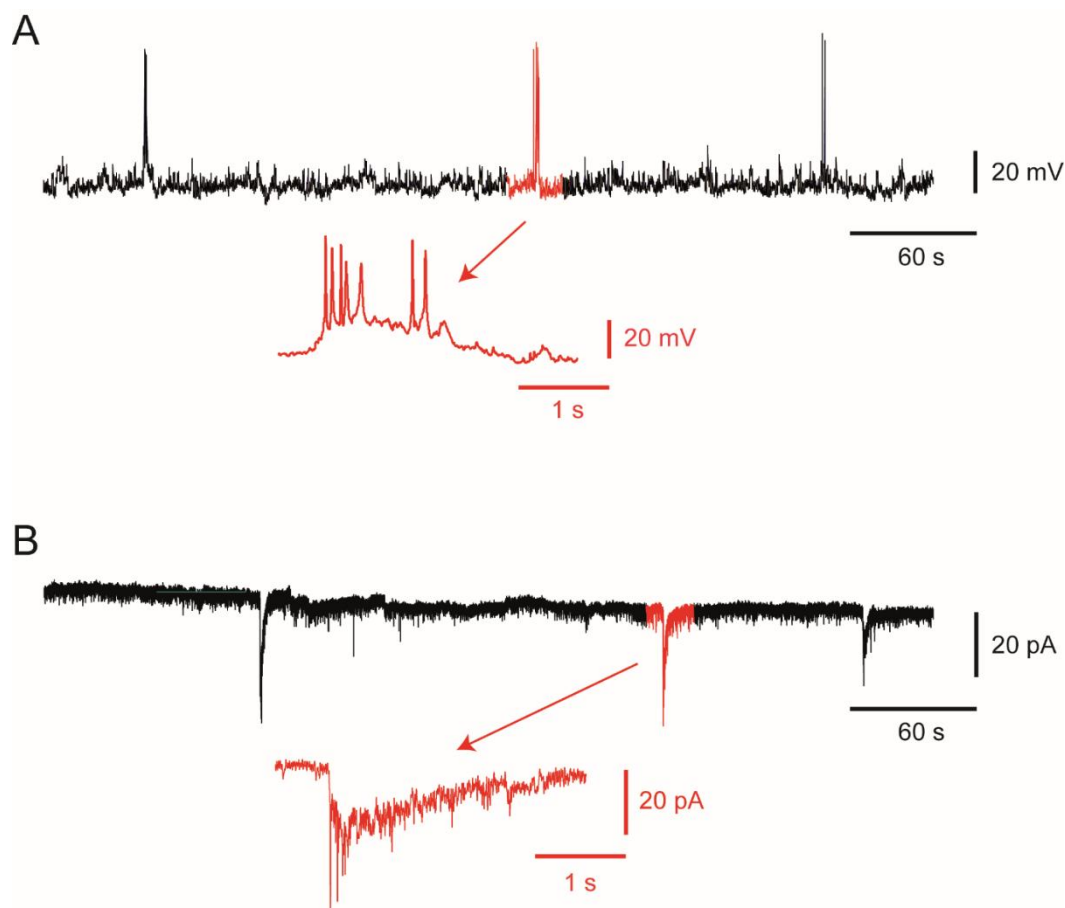


Figure 1 : Activité électrique spontanée des CRs situées au niveau lombaire de la moelle épinière embryonnaire entière isolée d'embryon de souris GAD67-GFP à E12,5 :

A) Exemple d'enregistrement en patch clamp, configuration cellulaire entière, en courant imposé ($V_h = -60$ mV). L'activité enregistrée dans les CRs est caractérisée par des GDPs. **B)** Exemple d'enregistrement en patch clamp, configuration cellulaire entière, en potentiel imposé ($V_h = -60$ mV). L'activité enregistrée dans les CRs est caractérisée par des GICs. Les traces en A et B proviennent de l'enregistrement de deux CRs distinctes.

Quand le potentiel membranaire est maintenu à -60 mV au niveau du potentiel d'équilibre des ions chlorure, toutes les CRs génèrent des GICs ($n = 36/36$) (**figure 2A**). Ces GICs ont une amplitude de $29,3 \pm 18,7$ pA et une durée à la demi-amplitude de $1,01 \pm 0,39$ s. Afin de déterminer la nature de la composante cationique sous-tendant les GICs, nous avons testé l'effet de l'APV ($200 \mu\text{M}$) et du CNQX ($20 \mu\text{M}$), des antagonistes spécifiques pour les récepteurs glutamatergiques ionotropiques NMDA et AMPA/kainate. Les GICs ne sont pas supprimés en présence d'APV et CNQX dans 5 des 6 cellules enregistrées (**figure 2A**). Leur amplitude n'est pas significativement diminuée ($45,2 \pm 30,1$ pA en présence d'APV et CNQX versus $58,5 \pm 23,1$ pA en contrôle, $n = 6$, $p = 0,3125$) et leur durée à la demi-

amplitude non plus ($0,97 \pm 0,51$ s en présence d'APV et CNQX versus $0,97 \pm 0,52$ s en contrôle, $n = 6$, $p = 1,0$) (**figure 2A**). Par contre les courants rapides superposés aux GICs sont supprimés. Ces résultats nous indiquent que la composante cationique principale des GICs n'est pas due à une transmission glutamatergique ionotropique, mais que quelques synapses glutamatergiques projetant sur les CRs sont activées pendant un épisode (GIC).

Quand le potentiel membranaire est maintenu à 0 mV et que les cations sont à l'équilibre, on observe dans la majorité des CRs ($n = 20/30$) aucun courant lent spontané (**figure 2B1**), indiquant l'absence de composante anionique chlorure des GICs. Ce résultat suggère, dans la majorité des CRs, l'absence de transmission GABAergique ou glycinergique les activant directement lors de la SNA. Néanmoins, dans une minorité de CRs ($n = 10/30$) nous avons observé des GICs (**figure 2B2**). Ces GICs ont une amplitude de $37,0 \pm 41,6$ pA et une durée à la demi-amplitude de $1,05 \pm 0,70$ s. Afin de déterminer la nature de la composante anionique sous-tendant ces GICs, nous avons testé l'effet de la gabazine ($3 \mu\text{M}$), un antagoniste des récepteurs GABA_A (**figure 2B2**). En moyenne, l'amplitude des GICs enregistrés à 0 mV est significativement diminuée ($14,7 \pm 18,7$ pA en présence de gabazine versus $47,5 \pm 46,4$ pA en contrôle, $n = 7$, $p = 0,0156$) et leur durée à la demi-amplitude est aussi significativement diminuée ($0,50 \pm 0,52$ s en présence de gabazine versus $1,21 \pm 0,79$ en contrôle, $n = 7$, $p = 0,0469$). Cependant il existe une hétérogénéité dans la population de CRs produisant des GICs sensibles à la gabazine. Si la gabazine supprime complètement les GICs dans 3 CRs ($n = 3/7$), pour les autres CRs l'effet de la gabazine varie considérablement allant de 20 à 80 % de diminution de l'amplitude des GICs.

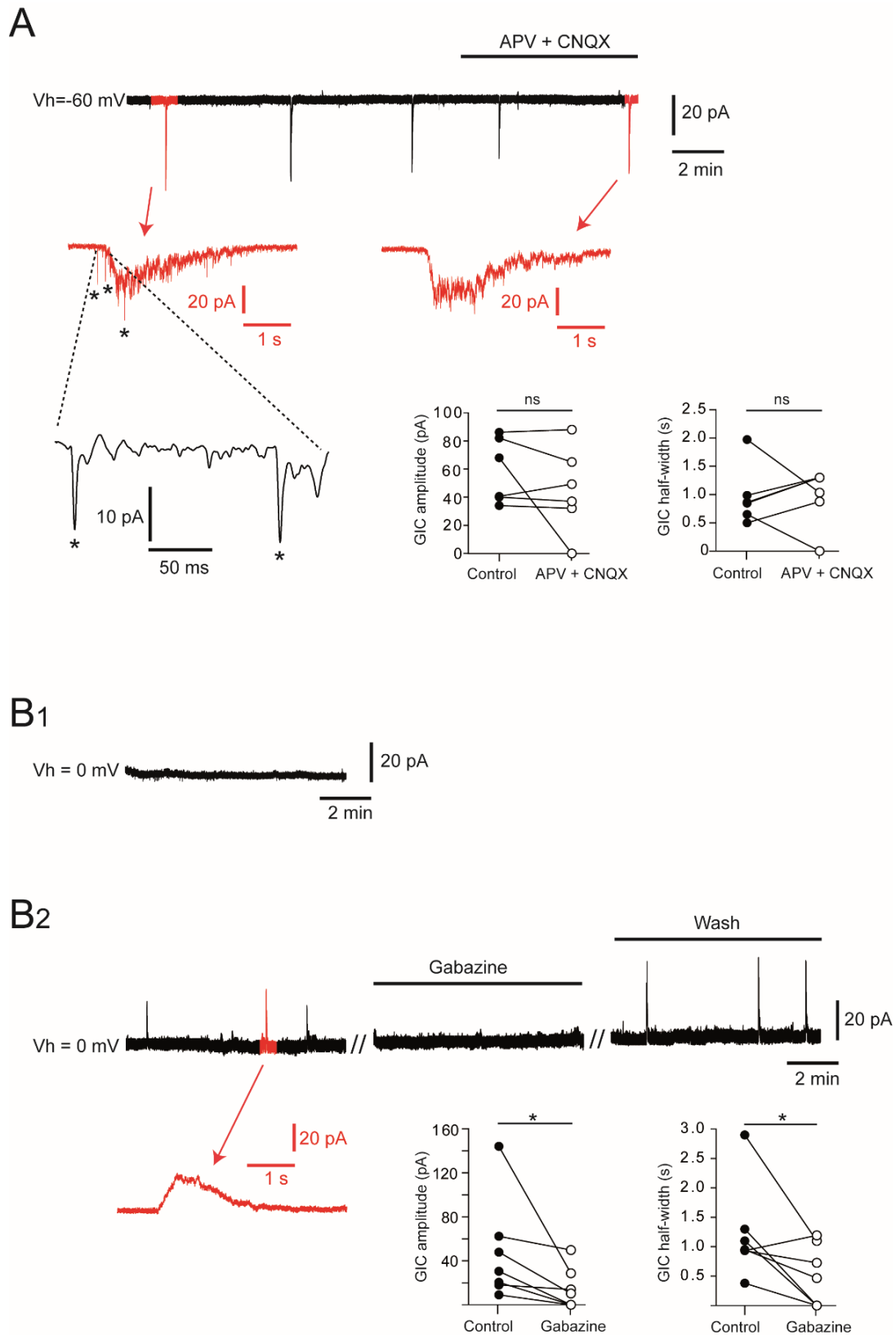


Figure 2 : Les GICs enregistrés dans les CRs, au niveau lombaire, sont majoritairement dus à un courant cationique non glutamatergique :

A) Enregistrement des GICs au potentiel imposé $V_h = -60$ mV, avec $ECI^- = -60$ mV et $E_{cations} = 2$ mV. Maintenir le potentiel à -60 mV révèle des courants cationiques dans 100 % des CRs ($n = 36/36$). Exemple de trace en contrôle puis en présence de $200 \mu M$ d'APV et de $20 \mu M$ de CNQX. Les GICs ne

sont pas supprimés en présence d'APV et CNQX ($n = 5/6$), à l'exception d'une cellule dans laquelle les GICs ont été supprimés. Notez que les courants rapides superposés aux GICs (*) sont par contre supprimés en présence d'APV et CNQX. Distribution de l'amplitude et de la durée à la demi-amplitude des GICs à $V_h = -60$ mV en contrôle et en présence d'APV et CNQX ($n = 6$). **B**) Enregistrement des GICs au potentiel imposé $V_h = 0$ mV, avec $E_{Cl^-} = -60$ mV et $E_{cations} = 2$ mV. Maintenir le potentiel à 0 mV ne révèle aucun courant lent spontané (**B1**, $n = 20/30$) ou révèle des courants anioniques chlorure (**B2**, $n = 10/30$). **B2**) Exemple de trace montrant des GICs en contrôle puis en présence de 3 μ M de gabazine. Distribution de l'amplitude et de la durée à la demi-amplitude des GICs à $V_h = 0$ mV en contrôle et en présence de gabazine ($n = 7$).

En 2014 le laboratoire a montré que la libération massive de GABA sur les MNs pendant un épisode d'activité est régulée par des récepteurs nicotiniques présynaptiques et postsynaptiques activés par la libération d'ACh (Czarnecki et al. 2014). En présence de mécamylamine (50 μ M) et de d-turbocurarine (dTC, 10 μ M), des antagonistes non sélectifs des récepteurs nicotiniques, la SNA dans les CRs est supprimée ($n = 3/3$ en potentiel imposé, **figure 3A** et $n = 2/2$ en courant imposé). Cela pourrait suggérer que les GICs sont principalement de nature cationique dans la majorité des CRs et probablement cholinergique. Pour déterminer si les CRs ont des récepteurs fonctionnels à l'ACh, nous avons testé l'effet de l'application d'ACh en absence de toute activité évoquée du réseau global en présence de TTX, de gabazine, de strychnine, d'APV et de CNQX. L'application d'ACh (100 μ M), évoque, en potentiel imposé, un large courant entrant d'une amplitude de $46,2 \pm 24,5$ pA ($n = 6$), qui est bloqué par la mécamylamine et dTC (**figure 3B**). Ce résultat montre que les CRs expriment des nAChRs fonctionnels. Le laboratoire avait auparavant montré que le contrôle cholinergique de la libération de GABA et glutamate se fait *via* des récepteurs nicotiniques présynaptiques DH β E-sensibles et des récepteurs nicotiniques postsynaptiques en partie DH β E-insensibles (Czarnecki et al. 2014). L'application de DH β E (5 μ M), un antagoniste sélectif des récepteurs nicotiniques contenant les sous-unités $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ ou $\alpha 3\beta 2$, diminue significativement les courants TTX-insensibles évoqués par l'ACh (30 μ M) de 60 ± 12 % ($n = 9$, $p = 0,0039$, **figure 3C**). Le courant restant est totalement bloqué par l'ajout de mécamylamine et dTC. Ce résultat montre que les CRs expriment des nAChRs fonctionnels à la fois DH β E-insensibles et DH β E-sensibles.

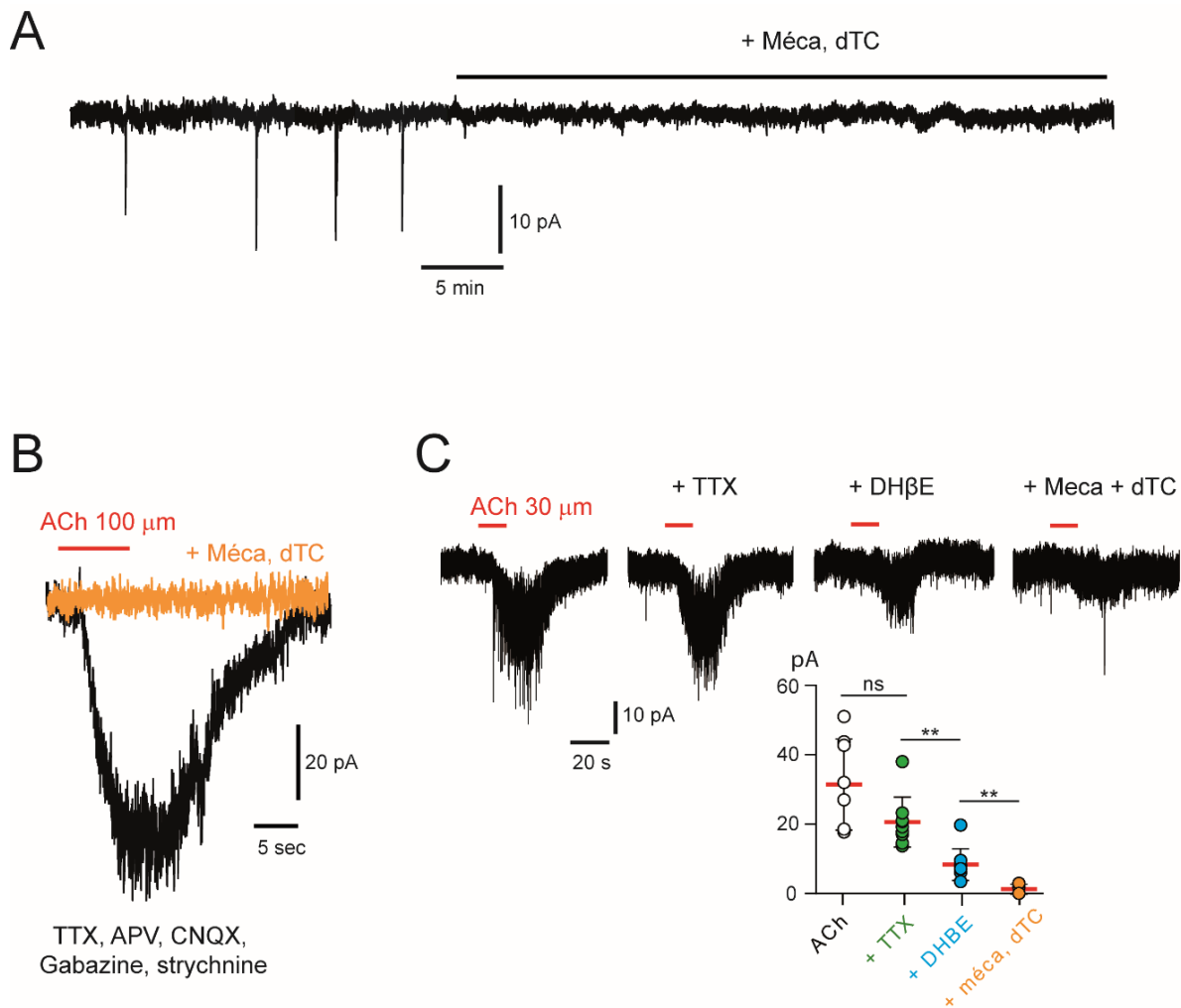


Figure 3 : Les GICs enregistrés dans les CRs, au niveau lombaire, dépendent de l'activation de récepteurs nicotiniques sur les CRs :

A) Enregistrement des GICs spontanés ($V_h = -60$ mV) en condition contrôle puis en présence de 50 μ M de mécamylamine et de 10 μ M de dTC. **B)** Application d'ACh en présence de TTX, APV, CNQX, gabazine et strychnine. L'ACh évoque un courant entrant bloqué par la mécamylamine et la dTC. **C)** Courant évoqué par l'application d'ACh, puis en présence de TTX, puis avec l'ajout de 5 μ M de DH β E puis avec l'ajout de mécamylamine et dTC.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité des CRs est principalement due à l'activation de récepteurs nicotiniques, par l'ACh provenant des MNs. Cependant comme les antagonistes cholinergiques nicotiniques suppriment la SNA spinale (Hanson and Landmesser 2003, Czarnecki et al. 2014), il est prévu de confirmer ces résultats en appliquant ces antagonistes sur les courants évoqués par des stimulations optogénétiques des MNs dans le segment où se trouve la CR enregistrée, en présence de gabazine, de strychnine, d'APV et de CNQX.

La stimulation optogénétique des motoneurones de la moelle épinière à E12,5 permet le déclenchement d'un épisode d'activité qui se propage le long de l'axe rostro-caudal

La lignée de souris ChAT-ChR2-EYFP n'a jamais été utilisée pour des études sur la moelle épinière chez l'embryon. Nous avons donc tout d'abord évalué le modèle chez l'embryon de souris à E12,5 *via* une approche immunohistochimique et une approche électrophysiologique.

L'immunomarquage des facteurs de transcription Islet 1 et 2, spécifiques des MNs dans la région ventrale de la moelle épinière montre un marquage membranaire de la EYFP dans la zone des noyaux Islet 1 et 2 positifs (**figure 4A**). Il n'y a pas de marquage de la EYFP en dehors de la zone des MNs. L'expression de la channelrhodopsine-2 (ChR2) semble donc spécifique des MNs.

Des études ont montré que les souris ChAT-ChR2-EYFP ont une surexpression du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine dans l'hippocampe, le cortex et la moelle épinière de souris adultes (Kolisnyk et al. 2013, Sugita et al. 2016). Elles ont aussi montré une libération d'ACh plus importante au niveau de la jonction neuromusculaire (Sugita et al. 2016). Un tonus cholinergique plus élevé pourrait mener à des différences de SNA du réseau spinal. Nous avons donc analysé la SNA dans les embryons de souris ChAT-ChR2-EYFP. Enregistrée en patch clamp dans les neurones ventraux (MNs et INs), la fréquence des épisodes de SNA est de $5,0 \pm 2,6$ min ($n = 15$) ce qui est comparable à ce qui est observé chez les souris sauvages et dans la lignée GAD67-eGFP. L'étude de la SNA dans la lignée de souris transgéniques ChAT-ChR2-EYFP comparé aux souris sauvages ne pose donc pas de problème.

La stimulation optogénétique évoque dans les MNs stimulés un courant d'une amplitude de $5,1 \pm 3,9$ pA ($n = 22$) et une dépolarisation d'une amplitude de $5,1 \pm 4,9$ mV ($n = 20$) (**figure 4B et C**). Dans les INs ventraux la stimulation optogénétique n'évoque significativement pas de courant ($0,5 \pm 0,8$ pA, $n = 8$, **figure 4C**). La stimulation optogénétique évoque la génération d'un PA dans 20 % des MNs ($n = 4/20$). Ce résultat suggère que l'expression de la rhodopsine n'est pas suffisante à E12,5 pour exciter tous les MNs. Selon le niveau spinal dans lequel on stimule et enregistre, l'amplitude du courant évoqué dans les MNs est significativement plus faible au niveau lombaire comparé au niveau cervical-brachial ($2,6 \pm 2,2$ pA, $n = 10$ au niveau lombaire versus $7,2 \pm 3,8$ pA, $n = 12$ au niveau cervical-brachial, $p = 0,0012$, **figure 4D**). L'amplitude de la dépolarisation induite par une stimulation

optogénétique au niveau lombaire est aussi significativement plus faible comparé à celle induite par une stimulation optogénétique au niveau cervical-brachial ($3,1 \pm 4,6$ mV, $n = 9$ au niveau lombaire versus $6,7 \pm 4,8$ mV, $n = 11$ au niveau cervical-brachial, $p = 0,0396$, **figure 4D**). Dans la mesure où il existe un gradient rostro-caudal de la maturation des populations neuronales en particulier de l'expression des neurotransmetteurs (Allain et al. 2006), nos données renforcent l'idée qu'au stade embryonnaire, l'expression de la ChAT est sans doute limitante pour permettre une expression suffisante de la rhodopsine afin d'exciter tous les MNs.

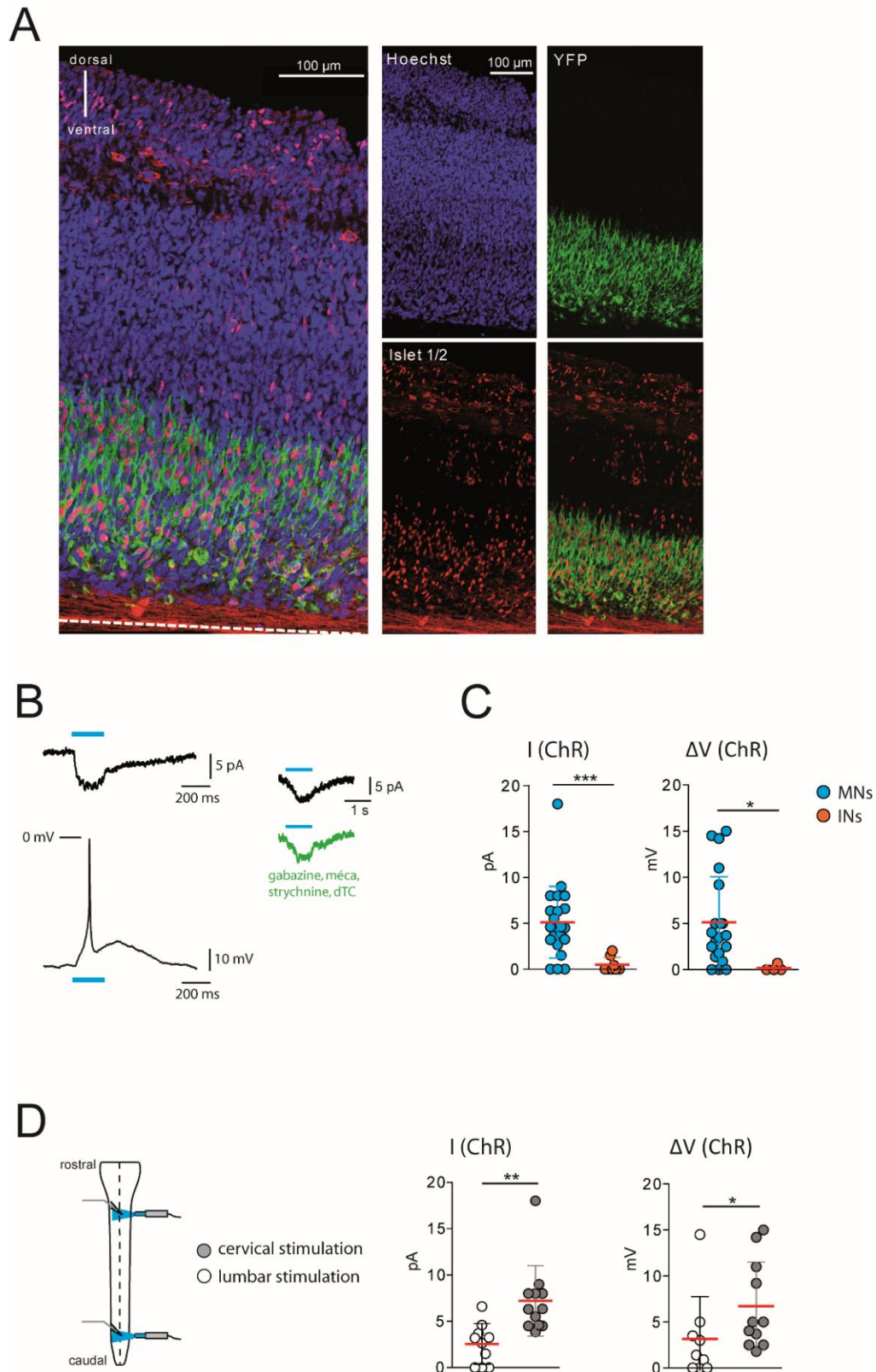


Figure 4 : La stimulation optogénétique de la moelle épinière d'embryon de souris ChAT-ChR2-EYFP à E12,5 permet de stimuler les MNs :

A) Vue générale d'une section de moelle épinière au niveau cervical-brachial, ouverte selon la technique du « livre ouvert » d'embryon de souris ChAT-ChR2-EYFP à E12,5, avec un immunomarquage des noyaux (Hoechst), des facteurs de transcription Islet1/2 pour marquer les MNs

en ventral, et de la YFP. **B)** *A gauche* : traces du courant et de la dépolarisation évoquée par une stimulation optogénétique dans un MN. *A droite* : traces du courant évoqué par la stimulation optogénétique avant (noir) et après application de gabazine, mécamylamine, dTC et strychnine (vert) dans un MN. **C)** Distribution du courant évoqué par la channelrhodopsine I(ChR) et de la dépolarisation induite $\Delta V(\text{ChR})$ dans les MNs et des INs ventraux. **D)** Distribution du courant I(ChR) et de la dépolarisation $\Delta V(\text{ChR})$ évoqués par une stimulation optogénétique localisée soit au niveau cervical-brachial soit au niveau lombaire.

Les travaux de Lynn Landmesser et ses collaborateurs ont montré que l'activation spécifique locale de MNs (par stimulation électrique d'un nerf) évoque un épisode d'activité à E12,5 (Hanson and Landmesser 2003). Nous avons tout d'abord confirmé si l'activation des MNs, par stimulation optogénétique, permet aussi de déclencher un épisode d'activité du réseau spinal.

Nous avons tout d'abord enregistré des neurones ventraux (MNs et INs) au niveau lombaire et stimulé la moelle épinière au niveau lombaire. La stimulation optogénétique au niveau lombaire déclenche un épisode d'activité dans seulement 14,3 % des neurones ventraux ($n = 2/14$ neurones évoquent un GIC et/ou un GDP). Nous avons ensuite enregistré des neurones ventraux au niveau cervical-brachial et stimulé la moelle épinière au niveau cervical-brachial. Dans ce cas, la stimulation optogénétique au niveau cervical-brachial déclenche un épisode d'activité dans 93,75 % des neurones ventraux enregistrés ($n = 15/16$ neurones évoquent un GIC et/ou un GDP) (**figure 5**). Nous appellerons « oGICs » et « oGDPs », les GICs et GDPs évoqués à la suite de la stimulation optogénétique des MNs. Les oGICs ont une amplitude et une durée à la demi-amplitude qui ne sont pas significativement différentes de celles des GICs spontanés ($p = 0,3575$ pour l'amplitude et $p = 0,9515$ pour la durée, $n = 14$, **figure 5A**). Les oGDPs ont une amplitude et une durée à la demi-amplitude qui ne sont pas non plus significativement différentes de celles des GDPs spontanés ($p = 0,25$ pour l'amplitude et $p = 0,6353$ pour la durée, $n = 9$, **figure 5B**).

Ces résultats montrent que la stimulation optogénétique des MNs de la moelle épinière à E12,5 permet le déclenchement d'un épisode d'activité, similaire aux épisodes spontanés de la SNA.

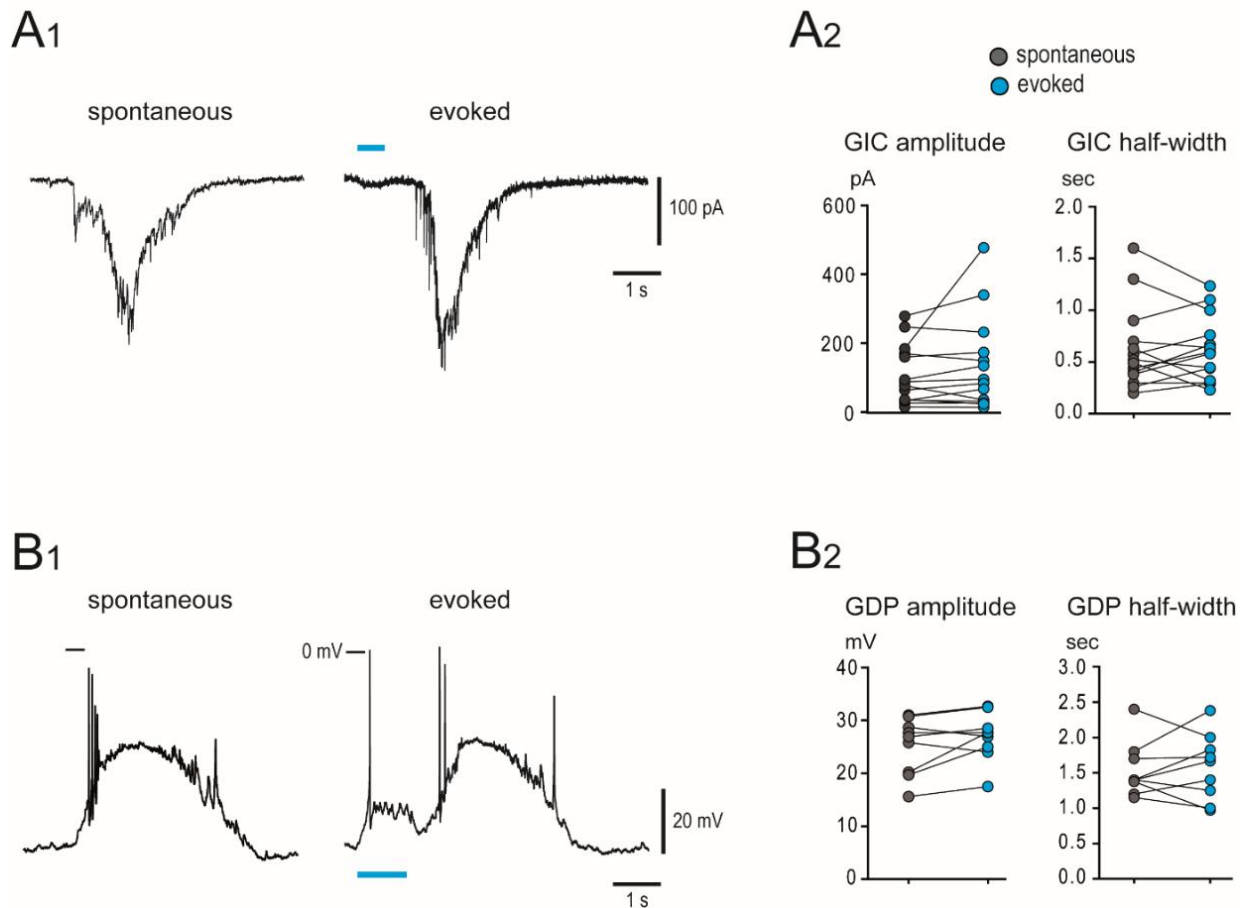


Figure 5 : La stimulation optogénétique des MNs de la moelle épinière d'embryon de souris ChAT-ChR2-EYFP à E12,5 déclenche un épisode d'activité du réseau spinal, semblable aux épisodes spontanés :

A1) Exemple d'un GIC spontané et d'un GIC évoqué à la suite d'une stimulation optogénétique (oGIC dans le texte). La trace provient de l'enregistrement d'un MN, dans la région cervicale-brachiale ($V_h = -60$ mV). **A2)** Distribution de l'amplitude et de la durée à la demi-amplitude des GICs spontanés et des oGICs ($n = 14$ neurones ventraux). **B1)** Exemple d'un GDP spontané et d'un GDP évoqué à la suite d'une stimulation optogénétique (oGDP dans le texte). La trace provient de l'enregistrement d'un MN, dans la région cervicale-brachiale. **B2)** Distribution de l'amplitude et de la durée à la demi-amplitude des GDPs spontanés et des oGDPs ($n = 9$ neurones ventraux).

Les travaux de Lynn Landmesser et ses collaborateurs ont montré qu'un épisode généré par l'activation locale de MNs se propage controlatéralement au niveau du même segment spinal (Hanson and Landmesser 2003). Nous avons voulu savoir si un épisode évoqué par une stimulation optogénétique locale de MNs pouvait déclencher un épisode capable de se propager aux autres segments spinaux. Autrement dit, est-ce que la stimulation locale de MNs permet de déclencher une vague d'activité dans toute la moelle épinière par propagation rostro-caudale de l'épisode d'activité évoqué localement ? Pour répondre à cette question,

nous avons stimulé optogénétiquement les MNs au niveau cervical-brachial et enregistré des neurones ventraux (MNs ou INs) au niveau lombaire (**figure 6A2**). Dans 100 % des cas, la stimulation optogénétique au niveau cervical-brachial évoque un épisode d'activité au niveau lombaire ($n = 7/7$ des neurones ventraux lombaires évoquent un oGIC et/ou oGDP).

Lorsque l'on stimule au niveau cervical-brachial et que l'on enregistre la réponse évoquée au niveau cervical-brachial, les épisodes d'activité sont évoqués avec un délai de $1,12 \pm 0,49$ s après le début de la stimulation ($n = 15$) (**figure 6A1 et B**). Lorsque que l'on stimule en cervical-brachial et que l'on enregistre la réponse évoquée au niveau lombaire, les épisodes d'activité sont évoqués avec un délai de $2,37 \pm 0,62$ s après le début de la stimulation ($n = 7$) (**figure 6A2 et B**). A la suite d'une stimulation optogénétique en cervical-brachial, il y a donc un délai de $\sim 1,2$ secondes entre l'épisode d'activité évoqué enregistré en cervical-brachial et celui enregistré en lombaire. La distance entre le niveau cervical-brachial et le niveau lombaire étant de ~ 8 mm, nous avons estimé la vitesse de propagation des épisodes à environ 7 mm/s, ce qui est en adéquation avec les données déjà publiées (Momose-Sato et al. 2012, Nakayama et al. 1999, Wang et al. 2009).

Les travaux de Lynn Landmesser et ses collaborateurs ont précédemment montré que l'activation spécifique locale de MNs est suffisante pour évoquer à E12,5 un épisode d'activité locale qui se propage à l'autre côté de la moelle épinière au niveau du même segment (Hanson and Landmesser 2003). Nos résultats montrent pour la première fois que l'activation d'un groupe de MNs est suffisante pour déclencher une vague d'activité qui se caractérise par la génération d'un épisode d'activité qui se propage le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière. Cette étude a permis de valider un modèle qui permet à la fois de stimuler spécifiquement les MNs tout en gardant la facilité d'accès pour enregistrer en patch clamp différentes populations de cellules (MNs, CRs, oligodendrocytes, microglies) (Scain et al. 2010, Rigato et al. 2012, Czarnecki et al. 2014, Osterstock et al. 2018).

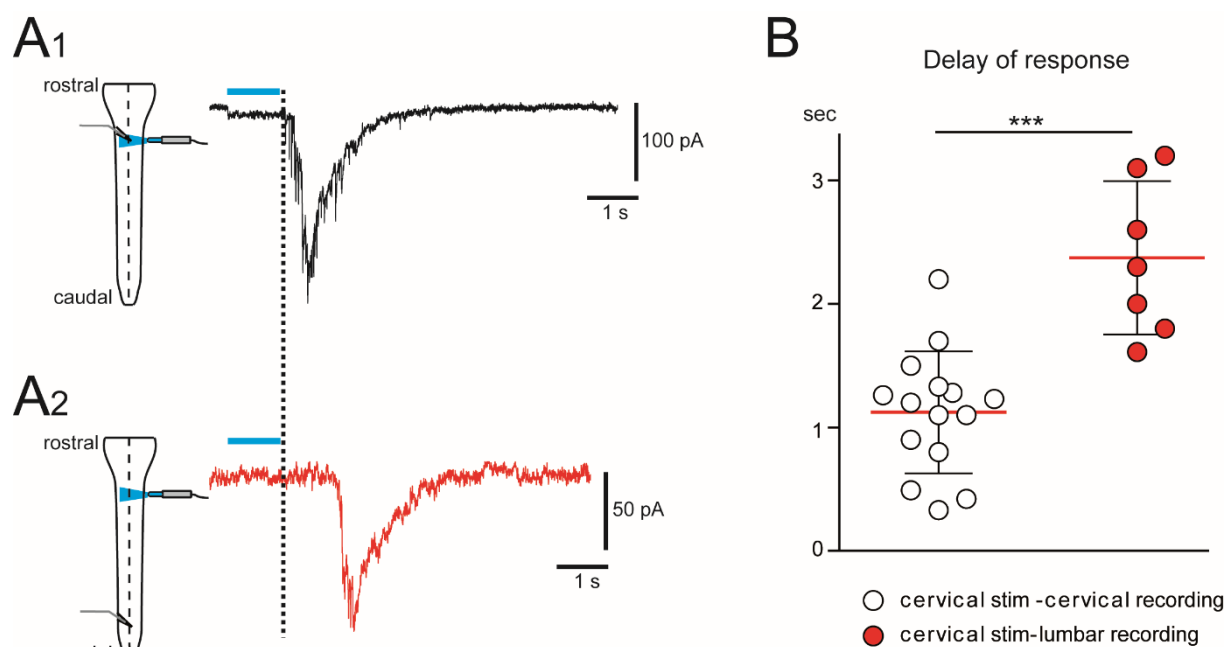


Figure 6 : La stimulation optogénétique des MNs de la moelle épinière d'embryon de souris ChAT-ChR2-EYFP à E12,5 déclenche un épisode d'activité du réseau spinal qui se propage le long de l'axe rostro-caudal :

A) Exemple de oGICs évoqués à la suite d'une stimulation optogénétique au niveau cervical-brachial, enregistré dans un MN situé au niveau cervical-brachial (**A1**) ou dans un MN situé au niveau lombaire (**A2**) **B)** Distribution du délai minimal de déclenchement d'un épisode d'activité dans les neurones ventraux (MNs ou INs), enregistrés soit au niveau lombaire (n = 7) soit au niveau cervical-brachial (n = 15), avec une stimulation optogénétique au niveau cervical-brachial.

Période réfractaire de l'activité du réseau spinal à E12,5 à la suite de la stimulation optogénétique des MNs

Les mécanismes qui déterminent l'intervalle entre deux épisodes d'activité du réseau spinal ne sont pas encore clairement établis. Cet intervalle est de l'ordre de ~ 2 minutes à E12,5 chez la souris. Les données publiées qui ont référencé cet intervalle montrent une grande variabilité pour une cellule donnée allant de ~ 1 à ~ 5 minutes (Yvert et al. 2004, Hanson and Landmesser 2003, Scain et al. 2010, Momose-Sato et al. 2012, Czarnecki et al. 2014). L'apparition d'un épisode d'activité pourrait soit être probabiliste, soit être déterminée par un seuil d'excitabilité et de synchronisation des neurones spinaux. Un modèle a été proposé par Michael J. O' Donovan et ses collaborateurs basés sur des travaux de la SNA de la moelle épinière dans l'embryon de poulet à des stades plus tardifs du développement

embryonnaire (O'Donovan et al. 1998, Tabak et al. 2001, Wenner and O'Donovan 2001). Ce modèle indique l'existence d'une période réfractaire durant laquelle un épisode d'activité ne peut pas être déclenché. Cette période réfractaire correspond à une dépression d'excitabilité du réseau spinal après un épisode d'activité. Elle serait due d'après cet auteur à une re-répartition des ions chlorure de part et d'autre de la membrane lors d'un épisode. Ce modèle pourrait aussi s'appliquer à la moelle épinière de souris à des stades plus précoces du développement. Cependant l'existence d'une période réfractaire gouvernant la durée de l'intervalle entre deux épisodes pendant la SNA n'a pas été exploré chez l'embryon de souris au début de la synaptogenèse (E12,5).

Nous avons effectué des séries de cinq stimulations optogénétiques des MNs, chaque stimulation était séparée de la suivante par un intervalle de temps que nous avons fait varier pour chaque série (10, 30, 60, 100, 140 et 200 secondes). Nous avons enregistré les réponses évoquées en courant et potentiel imposé dans les MNs (**figure 7A**). Nous avons analysé l'incidence du déclenchement d'un épisode d'activité (oGIC ou oGDP) sur les suivants (**figure 7B**). Tout d'abord nous avons analysé l'incidence du déclenchement d'un épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation (**figure 7B1**). Pour un intervalle de temps entre la 1^{ère} et la 2^{ème} stimulation inférieur à 60 secondes, aucun MN n'évoque d'épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation ($n = 0/9$). Pour un intervalle de 60 secondes, seul un MN a évoqué un épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation ($n = 1/10$). Pour un intervalle de 100 secondes, 55 % des MNs ont évoqué un épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation ($n = 6/11$). Pour un intervalle de 140 secondes, 88 % des MNs ont évoqué un épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation ($n = 7/8$). Enfin, pour un intervalle de 200 secondes, 100 % des MNs ont évoqué un épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation ($n = 5/5$). En moyenne l'intervalle de temps minimal nécessaire pour qu'un MN évoque un épisode d'activité à la suite de la 2^{ème} stimulation est de 109 ± 27 secondes ($n = 9$). Ces résultats indiquent l'existence d'une période réfractaire absolue de l'activité évoquée du réseau spinal, pendant laquelle un nouvel épisode d'activité ne peut pas être déclenché.

Passé cet intervalle de temps nécessaire pour permettre au réseau spinal d'évoquer un deuxième épisode, nous pouvons nous demander si l'excitabilité du réseau spinal est remise à son état initial, autrement dit si la récupération de l'excitabilité du réseau est totale ou non pendant cette période d'inactivité. Pour déterminer cela, nous avons analysé l'incidence du déclenchement d'un épisode d'activité à la suite du précédent épisode évoqué (**figure 7B2**). Le précédent épisode peut être le 2^{ème}, le 3^{ème} ou le 4^{ème} selon les cellules. Pour un intervalle

de temps de 60 secondes, seul un MN a évoqué un épisode d'activité à la suite du précédent épisode d'activité ($n = 1/5$). Pour un intervalle de 100 secondes, 40 % des MNs ont évoqué un nouvel épisode d'activité à la suite du précédent ($n = 4/10$). Pour un intervalle de 140 secondes, 71 % des MNs ont évoqué un nouvel épisode d'activité à la suite du précédent ($n = 5/7$). Enfin, pour un intervalle de 200 secondes, 80 % des MNs ont évoqué un nouvel épisode d'activité à la suite du précédent ($n = 4/5$). Les pourcentages de MNs évoquant un épisode d'activité à la suite du précédent épisode évoqué sont plus faibles que les pourcentages de MNs évoquant un épisode à la suite de la 2^{ème} stimulation (**figure 7B1 versus 7B2**). Ces données suggèrent un épuisement progressif de l'excitabilité du réseau spinal qui serait dépendant de l'intervalle entre deux épisodes. Cet épuisement se traduit par une augmentation du nombre d'échecs quand l'intervalle diminue (**figure 7C**), ce qui laisserait supposer l'existence d'un seuil de déclenchement des épisodes qui ne peut plus être atteint si le réseau s'épuise même partiellement.

Pour évaluer ce possible épuisement, nous avons analysé deux paramètres (**figure 7D**) : le délai de déclenchement d'un épisode évoqué (mesuré à partir du début de la stimulation) et l'amplitude de l'épisode évoqué soit en potentiel imposé (amplitude du oGIC) soit en courant imposé (amplitude du oGDP). Pour les séries d'intervalle de temps de 100 et 140 secondes, les 2^{ème} aux 5^{ème} épisodes évoqués sont en moyenne déclenchés avec un délai significativement plus élevé comparé au 1^{er} épisode évoqué. Pour la série d'intervalle de 200 secondes, les 2^{ème} aux 5^{ème} épisodes sont évoqués après un délai non significativement différent comparé au 1^{er} épisode évoqué. Bien que les données concernant l'amplitude du oGIC et celle du oGDP soient à confirmer (le nombre de cellules enregistrées est insuffisant), les 2^{ème} aux 5^{ème} épisodes évoqués ne semblent pas avoir une amplitude significativement différente comparé au 1^{er} épisode évoqué, quel que soit l'intervalle de temps.

Ces résultats indiquent que le réseau spinal a besoin d'un intervalle de temps minimal pour être de nouveau capable de déclencher un épisode d'activité suite à l'activation des MNs. De plus, l'intervalle de temps entre deux épisodes serait déterminé par le niveau d'excitabilité du réseau spinal alors que l'amplitude d'un épisode qui reflète la synchronisation d'un ensemble de neurones au niveau local ne serait pas affectée. Ces résultats montrent qu'il existe probablement un seuil pour le déclenchement d'un épisode. Celui-ci serait un événement « tout-ou-rien » une fois le seuil de déclenchement atteint. L'intervalle entre les épisodes d'activités lors de la SNA de la moelle épinière à E12,5 pourrait ainsi être conditionné par la présence d'une période réfractaire dont le mécanisme reste à déterminer.

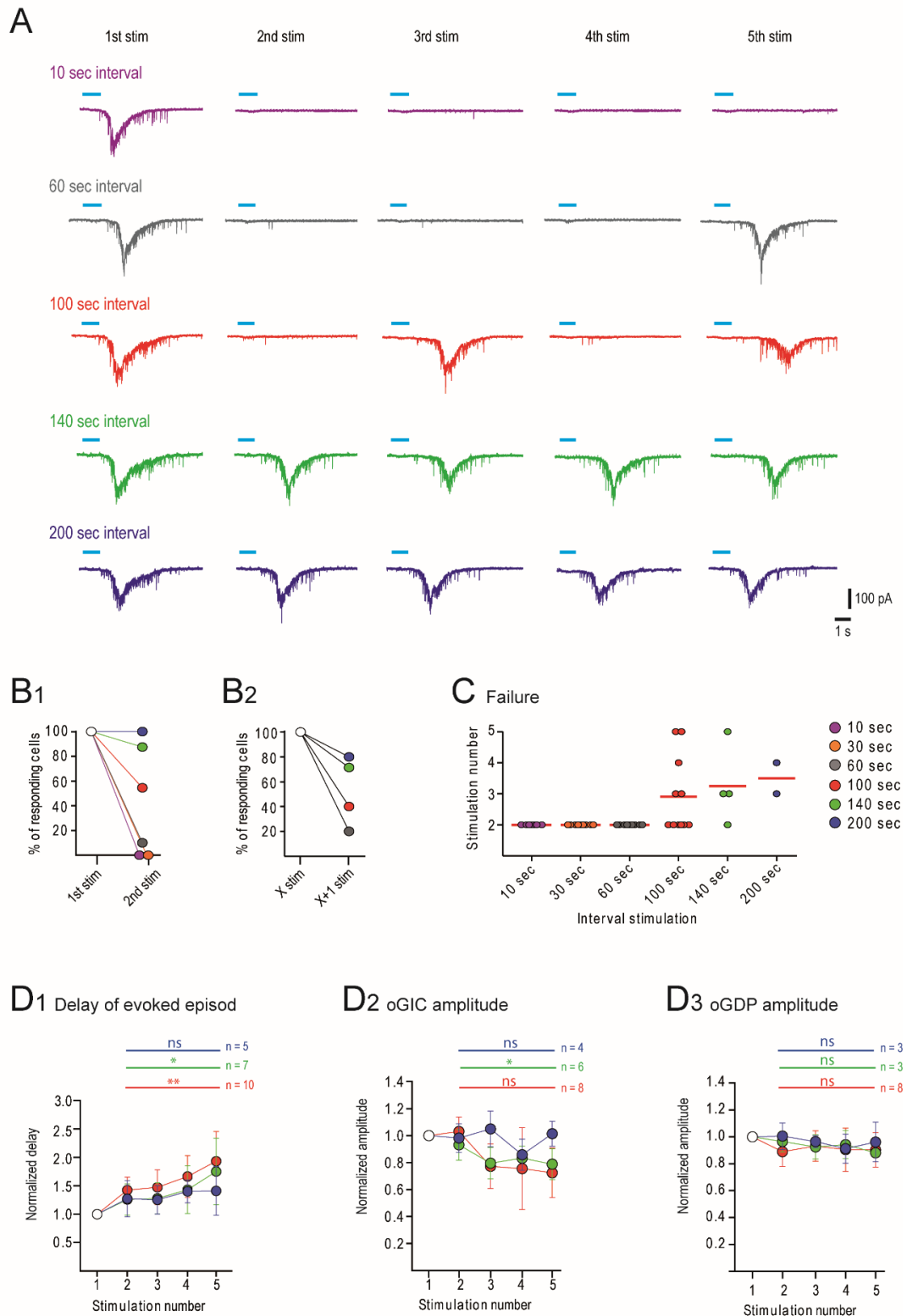


Figure 7 : Période réfractaire de l'activité du réseau spinal à E12,5 à la suite de la stimulation optogénétique des MNs :

A) Exemple des réponses évoquées en potentiel imposé à la suite de séries de cinq stimulations optogénétiques. Chaque série est déterminée selon l'intervalle de temps entre deux stimulations consécutives (10, 60, 100, 140 ou 200 secondes). La trace provient d'un enregistrement d'un MN, au niveau cervical-brachial, avec une stimulation optogénétique au niveau cervical-brachial. **B1)**

Proportions de MNs évoquant un épisode d'activité (oGIC ou oGDP) suite à la 2^{ème} stimulation, séparée de la 1^{ère} stimulation par un intervalle de temps variable (10, 30, 60, 100, 140 et 200 secondes). **B2)** Proportions de MNs évoquant un épisode d'activité (oGIC ou oGDP) suite à la X+1^{ème} stimulation, avec X la précédente stimulation ayant réussi à évoquer un épisode d'activité. **C)** Distribution du premier échec selon l'intervalle de temps entre deux stimulations consécutives. Un échec est défini par l'absence d'épisode d'activité évoqué par la stimulation. Chaque point représente une cellule. **D1)** Distribution du délai d'apparition de l'épisode d'activité évoqué (oGIC ou oGDP) dans les MNs. Le délai a été mesuré entre le début de la stimulation optogénétique et le début de l'épisode. Les délais ont été normalisés au délai de l'épisode évoqué par la 1^{ère} stimulation de chaque série d'intervalle. Par exemple :
$$\frac{\Delta T (2\text{ème à } 5\text{ème stimulation, série d'intervalle de } 100 \text{ sec})}{\Delta T (1\text{ère stimulation, série d'intervalle } 100 \text{ sec})}$$
. **D2)**

Distribution de l'amplitude du oGIC évoqué à chaque stimulation optogénétique pour les différentes séries d'intervalles. L'amplitude du oGIC a été normalisée à celle du oGIC évoqué par la 1^{ère} stimulation de chaque série d'intervalle. **D3)** Distribution de l'amplitude du oGDP évoqué à chaque stimulation optogénétique pour les différentes séries d'intervalles. L'amplitude du oGDP a été normalisée à celle du oGDP évoqué par la 1^{ère} stimulation de chaque série d'intervalle. Les tests statistiques ont été faits entre 1 (rapport pour la 1^{ère} stimulation) et la moyenne des rapports pour les stimulations 2 à 5.

Conclusion et discussion

Les résultats présentés dans cette troisième partie ont eu pour objectif d'évaluer la CR comme modèle pour étudier le contrôle cholinergique de leur activité spontanée et d'évaluer le modèle de moelle épinière ChAT-ChR2-EYFP aux stades embryonnaires en vue d'étudier les modalités de ce contrôle cholinergique.

L'activité spontanée des CRs lombaires est sous le contrôle d'une neurotransmission probablement cholinergique nicotinique.

Nous montrons que les GDPs des CRs à E12,5 sont générés majoritairement par l'activation de récepteurs-canaux cationiques et pour certaines cellules en partie par l'activation de récepteurs-canaux anioniques. Nous montrons que la composante lente cationique des courants responsables des GDPs n'est pas due à l'activation de récepteurs glutamatergiques ionotropiques NMDA et AMPA/kaïnate. Dans la mesure où l'application d'antagonistes des nAChRs (mécamylamine et dTC) supprime les GDPs dans les CRs (nos résultats), mais aussi la SNA dans l'ensemble du réseau spinal à E12,5 (Hanson and Landmesser 2003, Czarnecki et al. 2014), nous ne pouvons exclure un effet réseau et ainsi affirmer avec certitude qu'une activation cholinergique directe est à l'origine des GDPs dans

les CRs. Néanmoins le laboratoire avait montré que la libération de GABA par les INs pendant un épisode d'activité est régulée par des nAChRs présynaptiques et postsynaptiques (Czarnecki et al. 2014). Par ailleurs d'autres chercheurs ont indiqué que les MNs forment des premières interactions avec les CRs à E12,5 (Alvarez et al. 2013). Nous avons observé des marquages de synaptophysine dans les fibres des MNs Hb9-GFP⁺, apposés à des fibres des CRs calbindine⁺ (article de la partie 1 des résultats), renforçant l'hypothèse de la présence de synapses fonctionnelles des MNs sur les CRs. Enfin, dans cette troisième partie, nous montrons que les CRs ont des nAChRs fonctionnels.

L'ensemble de ces résultats suggère que les GDPs dans les CRs dépendent majoritairement d'une neurotransmission directe cholinergique, *via* l'activation de récepteurs nAChRs, activés par la libération d'ACh par les MNs. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle une boucle d'activation récurrente entre les MNs et les CRs serait impliquée dans la genèse de la SNA à E12.5. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Le double enregistrement d'éventuelles paires MN-CR en combinant une approche optogénétique pour déclencher la libération d'ACh par les MNs et une approche pharmacologique par l'utilisation d'antagonistes nicotiques, GABAergiques et glutamatergiques devrait nous permettre de mettre en évidence cette boucle récurrente dans le réseau spinal.

Par ailleurs, l'absence de courant à cinétique rapide de type synaptique à l'exclusion de quelques courants synaptiques glutamatergiques, la cinétique lente (plusieurs secondes) des GICs dans les CRs et le faible nombre de synapses fonctionnelles identifiées par les immunomarquages de synaptophysine (article de la partie 1 des résultats), suggèrerait l'existence d'une libération paracrine de l'ACh comme cela a été montré chez le xénope, pour les MNs embryonnaires avant la formation des jonctions neuromusculaires (Young and Poo 1983, Sun and Poo 1987). Des expériences utilisant la technique du sniffer devrait permettre de détecter les mécanismes synaptiques et/ou paracrine de la libération de l'ACh par les MNs.

Les MNs sont-ils les chefs d'orchestre déclenchant la SNA dans la moelle épinière à E12,5 ?

De nombreux travaux ont montré que la neurotransmission cholinergique par l'activation de récepteurs nAChRs est indispensable à la genèse de la SNA aux premiers stades

embryonnaires, à E12,5-E14,5 chez la souris (Hanson and Landmesser 2003, Myers et al. 2005, Ren and Greer 2003, Milner and Landmesser 1999). Les travaux de Lynn T. Landmesser et ses collaborateurs ont montré qu'à E12,5 l'activation locale d'un groupe de MNs par stimulation électrique d'un nerf suffit au déclenchement d'un épisode d'activité, se propageant en contralatéral au sein d'un même segment (Hanson and Landmesser 2003). Nous montrons ici que l'activation locale de la libération d'ACh par les MNs peut déclencher une vague d'activité, qui propage le long de la moelle épinière à la même vitesse que la SNA. Ces expériences ne nous permettent pas d'affirmer que les MNs sont responsables du déclenchement de la SNA *in vivo* mais ils montrent que la libération expérimentale d'ACh est suffisante pour la déclencher.

L'intervalle entre les épisodes de la SNA dans la moelle épinière à E12,5 est due à une période réfractaire

Quelques travaux ont mis en évidence l'existence d'une période réfractaire de la SNA spinale correspondant à une dépression d'excitabilité du réseau spinal, dû à la re-répartition des ions chlorure lors d'un épisode d'activité, dans l'embryon de poulet à des stades plus tardifs du développement embryonnaire (O'Donovan et al. 1998, Tabak et al. 2001, Wenner and O'Donovan 2001). Cependant, il n'a jamais été rapporté de période réfractaire pour la SNA dans la moelle épinière aux stades embryonnaires plus précoces, chez la souris. Des travaux préliminaires dans le laboratoire ont montré qu'une re-répartition des ions chlorure était peu probable chez la souris.

Nos résultats montrent qu'après un épisode d'activité évoqué par la stimulation optogénétique des MNs, il existe une période réfractaire de ~ 1-2 minutes pendant laquelle une nouvelle stimulation a une faible probabilité de déclencher un épisode d'activité. Lorsque nous stimulons plusieurs fois avec un intervalle de temps entre chaque stimulation suffisamment long pour permettre le déclenchement d'un épisode d'activité évoqué par une nouvelle stimulation, le réseau ne déclenche pas toujours un épisode d'activité évoqué par la stimulation suivante. De plus, le délai du déclenchement de l'épisode d'activité évoqué augmente au fur et à mesure qu'on répète les stimulations tandis que l'amplitude de l'épisode d'activité (GIC ou GDP) ne semble pas changer. L'augmentation du délai est d'autant plus grande que l'intervalle entre les stimulations est petit. Ces résultats pourraient refléter le

temps nécessaire pour qu'une ou plusieurs composantes du réseau puissent retrouver un niveau d'excitabilité suffisant. Cela pourrait être dû à l'épuisement du mécanisme de libération d'un ou plusieurs neurotransmetteurs et/ou être la conséquence d'une désensibilisation transitoire de récepteurs postsynaptiques. Il est peu probable que le système GABAergique soit impliqué. En effet les GICs générés sur les MNs sont principalement de nature GABAergique et nous n'avons pas observé de diminution de leur amplitude lorsque l'on réduisait l'intervalle entre deux stimulations. En effet, la diminution de l'intervalle entre deux stimulations affecte plus la probabilité de déclencher un épisode que l'intensité de l'épisode lui-même quand il peut être déclenché. Il s'agirait alors plutôt d'un effet seuil impliquant un neurotransmetteur chargé de favoriser la synchronisation des INs qui produiront un GDP sur les MNs. Il pourrait s'agir de l'ACh. Des expériences seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse en utilisant par exemple la stimulation optogénétique et la technique du sniffer pour mesurer la libération d'ACh. Nous projetons aussi d'enregistrer directement les courants cholinergiques sur les CRs évoqués par la stimulation optogénétique des MNs et d'étudier l'évolution de leur amplitude suite à des stimulations répétées de fréquence variable.

Cependant nos résultats proviennent de l'activité évoquée du réseau spinal, et ne nous permettent pas de dire si cette période réfractaire est impliquée lors de l'activité spontanée. Néanmoins l'hypothèse que le niveau d'excitabilité du réseau spinal varie au cours de la SNA pourrait expliquer la variabilité de l'intervalle entre deux épisodes d'activité spontanée allant de 2 à 5 minutes pendant les enregistrements (Yvert et al. 2004, Hanson and Landmesser 2003, Scain et al. 2010, Momose-Sato et al. 2012, Czarnecki et al. 2014). Dans ce cas le niveau d'excitabilité du réseau serait le facteur déterminant de la périodicité des épisodes, une « période réfractaire » jouant le rôle de régulateur garantissant ainsi « l'auto-stabilité » du système.

*DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES*

Les principaux résultats ont été discutés dans chacune des trois parties des résultats. Dans cette partie de discussion générale et de perspectives, je discuterais de questions plus larges soulevées par l'ensemble des résultats des travaux de ma thèse.

L'hétérogénéité des capacités de décharge intrinsèque des CRs à E12,5 a-t-elle une implication fonctionnelle ?

Nous avons décrit différents profils de décharge intrinsèque des CRs lombaires à E12,5 que l'on a classé en quatre modes de décharge : « 1 ou 2 PA », « train de PA », « potentiels en plateau » et « mixte ». Cette hétérogénéité d'excitabilité intrinsèque est-elle simplement le résultat d'une séquence développementale des propriétés d'activation ou reflète-t-elle une hétérogénéité physiologique fonctionnelle des CRs ? L'analyse de l'activité spontanée des CRs a révélé que l'hétérogénéité de leurs propriétés d'excitabilité intrinsèque se retrouve dans l'activité spontanée qu'elles génèrent (GDPs). Selon les CRs, les GDPs évoquent soit « 0 à 2 PA », soit « des multiples PA » soit des « potentiels en plateau » soit à la fois des PA et des « potentiels en plateau » en adéquation totale avec leur mode de décharge évoqué. Il est très probable que les CRs évoquant des « potentiels en plateau » ou « des multiples PA » superposés aux GDPs libèrent davantage de GABA que les CRs évoquant « 0 à 2 PA » superposés au GDP. Il serait ainsi intéressant de déterminer si l'hétérogénéité d'excitabilité des CRs au niveau lombaire est retrouvée ou non à tous les niveaux spinaux et si l'hétérogénéité d'excitabilité des CRs est corrélée à une hétérogénéité de leur connectivité au reste du réseau, de leur morphologie et de leurs propriétés physiologique.

Dans le réseau spinal mature, les MNs projettent sur les CRs *via* leurs collatérales et les CRs projettent sur ces mêmes MNs ou sur des MNs synergistes, formant ainsi des circuits d'inhibition récurrente. Les études de caractérisation anatomique et physiologique de ces connexions ont décrit la présence d'inhibition récurrente aux différents niveaux spinaux, cervicaux (Lipski et al. 1985, Brink and Suzuki 1987), thoraciques (Kirkwood et al. 1981, Saywell et al. 2013), lombaires (Renshaw 1946, Eccles et al. 1954) et sacrés (Jankowska et al. 1978). Néanmoins, il existe différents degrés d'inhibition récurrente. Par exemple, les MNs innervant les muscles des membres distaux reçoivent moins d'inhibition récurrente comparé aux MNs innervant les muscles des membres proximaux (Illert and Wietelmann 1989, McCurdy and Hamm 1992). Par ailleurs les CRs ne reçoivent pas de connexion synaptique provenant de tous les pools de MNs (Bikoff et al. 2016). De plus, selon le type de fibres

musculaires innervées, le degré de connectivité des CRs avec les MNs est variable. Les MNs des unités motrices à contraction lente reçoivent moins d'inhibition récurrente que les MNs des unités motrices à contraction rapide (pour revue voir Hultborn 2006). Ainsi il existe dans le réseau spinal mature, des microcircuits d'inhibition récurrente qui suivent une architecture et une fonctionnalité physiologique précise.

Comment et quand ces microcircuits s'établissent-ils au cours du développement et selon quels critères ? Dans cet axe de recherche, il est pertinent d'enregistrer les CRs au cours du développement embryonnaire pour étudier la mise en place de leur connectivité avec les MNs. En considérant nos résultats, nous pourrions imaginer que l'hétérogénéité de l'excitabilité des CRs immatures à E12,5 joue un rôle dans l'établissement de la spécificité des connexions récurrentes avec les MNs. Les CRs générant à E12,5 des GDPs sur lesquels sont superposés des « potentiels en plateau » ou « de multiples PA », libérant très probablement davantage de GABA que les CRs générant des GDPs sur lesquels sont superposés seulement « 0 à 2 PA », pourraient intégrer des microcircuits d'inhibition récurrente spécifique avec MNs innervant certains types de muscles (proximaux par exemple). Dans cette même logique, on peut imaginer que les CRs générant à E12,5 des GDPs sur lesquels sont superposés « 0 à 2 PA », connecteraient les MNs innervant les muscles des membres distaux.

Par ailleurs nous pourrions imaginer un lien entre l'excitabilité des CRs embryonnaires, leur croissance axonale, l'architecture et le degré des connexions des CRs avec les MNs. Dans le réseau spinal mature, les travaux de John Carew Eccles et ses collègues ont montré que le degré d'inhibition récurrente au sein d'un même noyau moteur suit un « principe de proximité » : l'intensité d'inhibition récurrente est la plus élevée lorsque les MNs activant les CRs qui les inhibent sont au même niveau spinal, puis diminue avec la distance (Eccles et al. 1961, Hamm et al. 1987). La croissance neuritique est inversement proportionnelle aux niveaux d'activité calcique spontané (Gu and Spitzer 1995, Gomez and Spitzer 1999). Nous pourrions ainsi imaginer que les axones des CRs générant des « potentiels en plateau » ou « train de PA » projettent à des distances relativement faibles et formeraient donc des circuits d'inhibition récurrente locaux comparés aux axones des CRs embryonnaires générant « 0 à 2 PA » qui projetteraient à plus grande distance formant ainsi les circuits d'inhibition récurrente à plus grande distance.

Quelle est l'implication de la diminution d'excitabilité intrinsèque des CRs dans leur propre maturation ?

A l'échelle cellulaire, il n'est pas surprenant d'observer des modifications d'excitabilité intrinsèque des neurones au cours du développement. En effet les caractéristiques d'excitabilité des neurones matures ne sont pas acquises dès le début de leur différenciation. Elles se mettent progressivement en place au cours du développement embryonnaire et postnatal, dépendant de l'expression progressive des différents canaux ioniques, de leur distribution et du développement de la morphologie des neurones. Inversement, les processus cellulaires de maturation des neurones comme l'expression des canaux ioniques ou encore la croissance axonale sont dépendants de l'activité électrique des neurones (Spitzer 2006). Chez le xénope, la croissance neuritique de neurones spinaux embryonnaires est inversement proportionnelle aux niveaux d'activité calcique spontanée (Gu and Spitzer 1995, Gomez and Spitzer 1999). Un tel processus développemental n'a pas été décrit chez le mammifère. Nos résultats montrent que les capacités d'excitabilité intrinsèque des CRs lombaires diminuent transitoirement entre E12,5 et E14,5 chez la souris. Parallèlement nous montrons un allongement de l'axone et l'apparition d'un deuxième axone dans la totalité des CRs entre E12,5 et E14,5. Nous pourrions imaginer que le processus et les mécanismes de la croissance neuritique, inversement proportionnelle aux niveaux d'activité calcique chez le xénope puisse aussi être observé chez la souris. La croissance axonale des CRs dépendrait de la diminution de leur excitabilité entre E12,5 et E14,5. Pour tester cette hypothèse il faudrait empêcher la diminution transitoire d'excitabilité des CRs et observer en parallèle leur morphologie à E14,5.

S'il est naturellement envisageable que la diminution d'excitabilité des CRs soit liée à des processus de mort cellulaire, (il existe une mort développementale des INs V1 aux stades embryonnaires (Lawson et al. 1997, Prasad et al. 2008), nous montrons qu'aucune CR n'a déclenché de signalisation intracellulaire d'apoptose à E14,5 (résultats de la partie 2).

Quelle est l'implication de la diminution d'excitabilité intrinsèque des CRs dans l'évolution de la SNA du réseau spinal ventral ?

A l'échelle du réseau, l'architecture du réseau spinal est largement modifiée entre E12,5 et E14,5, avec l'arrivée des afférences sérotoninergiques (Ballion et al. 2002), la mort

développementale des MNs (Yamamoto and Henderson 1999), l'augmentation de l'expression du GABA et de la glycine (Allain et al. 2004, Allain et al. 2006), l'augmentation du nombre de synapses (Scain et al. 2010), etc. Parallèlement, le patron de la SNA générée par le réseau spinal se modifie à partir de E14,5 (Hanson and Landmesser 2003, Yvert et al. 2004, Momose-Sato et al. 2012). A E14,5, la SNA devient moins synchronisée et plus spécialisée dans différentes zones de la moelle épinière, les épisodes d'activité sont plus longs et moins fréquents (Yvert et al. 2004, Momose-Sato et al. 2012, Hanson and Landmesser 2003). Entre E14,5 et E16,5, l'action du GABA et de la glycine devient inhibitrice (Branchereau et al. 2002, Delpy et al. 2008). Ainsi, l'âge embryonnaire ~ E14,5 semble être un stade développemental charnière dans la maturation du réseau spinal (Ladle et al. 2007, Myers et al. 2005).

A l'échelle cellulaire, aucune modification d'excitabilité de population neuronale n'avait encore été mise en évidence à ces stades. Nous montrons pour la première fois des modifications d'excitabilité au cours du développement à l'échelle d'une population neuronale. A travers leurs propriétés d'excitabilité intrinsèque, si les CRs pourraient être impliquées dans la production de la SNA à E12,5, il est moins probable qu'elles y participent activement à E14,5. Néanmoins nous ne pouvons pas répondre à cette question et l'utilisation d'une lignée de souris *knock-out* pour les CRs (n'existant pas à ce jour) serait un outil intéressant pour étudier cela.

La boucle d'activation récurrente CR-MN est-elle fonctionnelle à E12,5 ?

Malgré l'importance de la connectivité entre les CRs et les MNs dans le réseau spinal mature, peu d'informations existent concernant l'établissement de cette connectivité au cours du développement embryonnaire (pour revue voir Alvarez et al. 2013).

Chez le poulet, le circuit des INs-R (homologues des CRs chez le mammifère) avec les MNs se forme à E7 chez le poulet (Xu et al. 2005). Puis une réorganisation de cette connectivité a lieu entre E8 et E15, définie par un changement de la force de certaines connexions et du nombre de connexions (Xu et al. 2007). Si les projections des collatérales des MNs sur les CRs sont limitées à un même segment, les projections des CRs sur les MNs sont soit au sein du même segment que le MN qui connecte la CR (boucle intra-segmentaire) soit dans d'autres segments dans le sens rostral ou caudal (boucle inter-segmentaire). Le gradient de force des projections rostro-caudales des CRs sur les MNs, décrit et énoncé sous

le « principe de proximité » par John Carew Eccles et ses collaborateurs basé sur des travaux chez le chat adulte (Eccles et al. 1961, Hamm et al. 1987), est présent dès les stades embryonnaires chez le poulet. Si ce gradient est conservé au cours du développement embryonnaire, les connexions intra-segmentaires des CRs sur les MNs sont renforcées, alors que celles inter-segmentaires sont diminuées (Xu et al. 2007).

Chez la souris, il existe moins d'informations sur la mise en place et le développement de la connectivité entre les CRs et les MNs. Le circuit fonctionnel de connectivité récurrente entre les CRs et les MNs n'a été mis en évidence qu'à partir de E18,5 (Sapir et al. 2004). Ce circuit fonctionnel a été montré par l'enregistrement d'un potentiel disynaptique dans le MN évoqué par la stimulation antidromique de la racine ventrale. Néanmoins d'autres chercheurs ont décrit, par des immunomarquages, que les premières interactions des MNs sur les CRs s'établissent autour de E13 et que les connexions des CRs sur les MNs s'établissent autour de E15 (Alvarez et al. 2013).

Le laboratoire a précédemment montré que l'activité spontanée des MNs dépend d'une transmission GABAergique directe, celle-ci étant contrôlée par l'activation de nAChRs postsynaptiques activés par l'ACh (Czarnecki et al. 2014). Les travaux effectués au cours de ma thèse constituent les premières données sur l'excitabilité des CRs embryonnaires, enregistrées en patch clamp. Nous montrons qu'à E12,5, les CRs expriment du GABA (article de la partie 1 des résultats) et qu'elles reçoivent très probablement une transmission cholinergique *via* l'activation de nAChRs par l'ACh libérée par les MNs (partie 3 des résultats). Cependant si quelques potentiels contacts synaptiques entre les CRs et les MNs et vice-versa ont été détectés à E12,5, nous avons aussi montré qu'une libération paracrine de GABA est évoquée (article de la partie 1 des résultats).

A ces stades embryonnaires précoces, dans un environnement d'interactions très probablement non spécifiques entre neurones, où le nombre de synapses, faible à E12,5, augmente ensuite fortement (Scain et al. 2010, Vaughn et al. 1974), et où des mécanismes de libération non synaptique de neurotransmetteurs ont été mis en évidence à E12,5 pour la glycine (Scain et al. 2010) et le GABA (article de la partie 1 des résultats), nous proposons que la boucle CR-MN soit déjà fonctionnelle à E12,5, mais sous une forme immature constituée en partie d'une connectivité non synaptique. Avec les techniques de stimulation optogénétique des MNs, nous projetons (i) de déterminer l'architecture de cette boucle CR-MN à E12,5 et (ii) de déterminer les modes de transmission (paracrine/synaptique) cholinergique et GABAergique.

L'ensemble des résultats de ma thèse montrent que les CRs sont des cellules aux propriétés d'activation complexes dès les stades les plus précoces du développement embryonnaires et suggèrent que celles-ci pourraient jouer un rôle important dans le développement des réseaux moteurs dès le début de la synaptogénèse spinale.

Bibliographie

- Abadie V, Champagnat J, Fortin G. 2000. "Branchiomotor Activities in Mouse Embryo." *Neuroreport* 11(1):141–45.
- Alessandri-Haber N, Paillart C, Arsac C, Gola M, Couraud F, Crest M. 1999. "Specific Distribution of Sodium Channels in Axons of Rat Embryo Spinal Motoneurons." *The Journal of Physiology* 518(Pt 1):203–14.
- Alexander SP, Striessnig J, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA, CGTP Collaborators. 2017. "THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Voltage-Gated Ion Channels." *British Journal of Pharmacology* 174:S160–94.
- Allain A-E, Bairi A, Meyrand P, Branchereau P. 2004. "Ontogenic Changes of the GABAergic System in the Embryonic Mouse Spinal Cord." *Brain Research* 1000(1–2):134–47.
- Allain A-E, Bairi A, Meyrand P, Branchereau P. 2006. "Expression of the Glycinergic System during the Course of Embryonic Development in the Mouse Spinal Cord and Its Co-Localization with GABA Immunoreactivity." *The Journal of Comparative Neurology* 496(6):832–46.
- Allene C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R. 2008. "Sequential Generation of Two Distinct Synapse-Driven Network Patterns in Developing Neocortex." *Journal of Neuroscience* 28(48):12851–63.
- Alvarez FJ, Benito-Gonzalez A, Siembab VC. 2013. "Principles of Interneuron Development Learned from Renshaw Cells and the Motoneuron Recurrent Inhibitory Circuit." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1279:22–31.
- Alvarez FJ and Fyffe RE. 2007. "The Continuing Case for the Renshaw Cell." *The Journal of Physiology* 584(Pt 1):31–45.
- Arai Y, Mentis GZ, Wu JY, O'Donovan MJ. 2007. "Ventrolateral Origin of Each Cycle of Rhythmic Activity Generated by the Spinal Cord of the Chick Embryo." *PloS One* 2(5):e417.
- 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(4):659–74.
- Baccaglini PI and Spitzer NC. 1977. "Developmental Changes in the Inward Current of the Action Potential of Rohon-Beard Neurones." *The Journal of Physiology* 271(1):93–117.

- 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 Research. Developmental Brain Research* 137(1):81–88.
- 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." *The Journal of Comparative Neurology* 229(3):329–46.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Misgeld T, Sanes JR. 2005. "Transgenic Labeling of the Corticospinal Tract for Monitoring Axonal Responses to Spinal Cord Injury." *Nature Medicine* 11(12):1355–60.
- Barish ME. 1986. "Differentiation of Voltage-Gated Potassium Current and Modulation of Excitability in Cultured Amphibian Spinal Neurones." *The Journal of Physiology* 375:229–50.
- Beckh S, Noda M, Lübbert H, Numa S. 1989. "Differential Regulation of Three Sodium Channel Messenger RNAs in the Rat Central Nervous System during Development." *The EMBO Journal* 8(12):3611–16.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. 1989. "Giant Synaptic Potentials in Immature Rat CA3 Hippocampal Neurones." *The Journal of Physiology* 416:303–25.
- Benito-Gonzalez A and Alvarez FJ. 2012. "Renshaw Cells and Ia Inhibitory Interneurons Are Generated at Different Times from P1 Progenitors and Differentiate Shortly after Exiting the Cell Cycle." *Journal of Neuroscience* 32(4):1156–70.
- Bikoff JB, Gabitto MI, Rivard AF, Drobac E, Machado TA, Miri A, Brenner-Morton S, Famojure E, Diaz C, Alvarez FJ, Mentis GZ, Jessell TM. 2016. "Spinal Inhibitory Interneuron Diversity Delineates Variant Motor Microcircuits." *Cell* 165(1):207–19.
- Bittman KS, Panzer JA, Balice-Gordon RJ. 2004. "Patterns of Cell-Cell Coupling in Embryonic Spinal Cord Studied via Ballistic Delivery of Gap-Junction-Permeable Dyes." *Journal of Comparative Neurology* 477(3):273–85.
- Blankenship AG and Feller MB. 2010. "Mechanisms Underlying Spontaneous Patterned Activity in Developing Neural Circuits." *Nature Reviews. Neuroscience* 11(1):18–29.
- Bonanomi D and Pfaff SL. 2010. "Motor Axon Pathfinding." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(3):a001735–a001735.

- Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC. 2004. "Activity-Dependent Homeostatic Specification of Transmitter Expression in Embryonic Neurons." *Nature* 429(6991):523–30.
- 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(47):18553–65.
- Bosma MM. 2017. "Regulation of Spontaneous Propagating Waves in the Embryonic Mouse Brainstem." *Frontiers in Neural Circuits* 10:110.
- Bosma MM. 2010. "Timing and Mechanism of a Window of Spontaneous Activity in Embryonic Mouse Hindbrain Development." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1198(1):182–91.
- Bouhadfane M, Tazerart S, Moqrich A, Vinay L, Brocard F. 2013. "Sodium-Mediated Plateau Potentials in Lumbar Motoneurons of Neonatal Rats." *The Journal of Neuroscience* 33(39):15626–41.
- Branchereau P, Morin D, Bonnot A, Ballion B, Chapron J, Viala D. 2000. "Development of Lumbar Rhythmic Networks: From Embryonic to Neonate Locomotor-like Patterns in the Mouse." *Brain Research Bulletin* 53(5):711–18.
- Branchereau P, Chapron J, Meyrand P. 2002. "Descending 5-Hydroxytryptamine Raphe Inputs Repress the Expression of Serotonergic Neurons and Slow the Maturation of Inhibitory Systems in Mouse Embryonic Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience* : 22(7):2598–2606.
- Le Bras B, Freal A, Czarnecki A, Legendre P, Bullier E, Komada M, Brophy PJ, Davenne M, Couraud F. 2014. "In Vivo Assembly of the Axon Initial Segment in Motor Neurons." *Brain Structure & Function* 219(4):1433–50.
- Brink EE and Suzuki I. 1987. "Recurrent Inhibitory Connexions among Neck Motoneurons in the Cat." *The Journal of Physiology* 383:301–26.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J. 1999. "Homeobox Gene Nkx2.2 and Specification of Neuronal Identity by Graded Sonic Hedgehog Signalling." *Nature* 398(6728):622–27.
- Briscoe J and Ericson J. 1999. "The Specification of Neuronal Identity by Graded Sonic Hedgehog Signalling." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10(3):353–62.
- Carry MR, Morita M, Nornes HO. 1983. "Morphogenesis of Motor Endplates along the Proximodistal Axis of the Mouse Hindlimb." *The Anatomical Record* 207(3):473–85.

- Chen HH and Frank E. 1999. "Development and Specification of Muscle Sensory Neurons." *Current Opinion in Neurobiology* 9(4):405–9.
- Cho HH, Cargnin F, Kim Y, Lee B, Kwon RJ, Nam H, Shen R, Barnes AP, Lee JW, Lee S, Lee SK. 2014. "Isl1 Directly Controls a Cholinergic Neuronal Identity in the Developing Forebrain and Spinal Cord by Forming Cell Type-Specific Complexes" *PLoS Genetics* 10(4):e1004280.
- Chub N. and O'Donovan MJ. 1998. "Blockade and Recovery of Spontaneous Rhythmic Activity after Application of Neurotransmitter Antagonists to Spinal Networks of the Chick Embryo." *The Journal of Neuroscience*: 18(1):294–306.
- Chub N and O'Donovan MJ. 2001. "Post-Episode Depression of GABAergic Transmission in Spinal Neurons of the Chick Embryo." *Journal of Neurophysiology* 85(5):2166–76.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. 1999. "Molecular Diversity of K⁺ Channels." *Annals of the New York Academy of Sciences* 868:233–85.
- Crépel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. 2007. "A Parturition-Associated Nonsynaptic Coherent Activity Pattern in the Developing Hippocampus." *Neuron* 54(1):105–20.
- Crill WE. 1996. "Persistent Sodium Current in Mammalian Central Neurons." *Annual Review of Physiology* 58(1):349–62.
- Czarnecki A, Le Corrionc H, Rigato C, Le Bras B, Couraud F, Scain AL, Allain AE, Mouffle C, Bullier E, Mangin JM, Branchereau P, Legendre P. 2014. "Acetylcholine Controls GABA-, Glutamate-, and Glycine-Dependent Giant Depolarizing Potentials That Govern Spontaneous Motoneuron Activity at the Onset of Synaptogenesis in the Mouse Embryonic Spinal Cord." *Journal of Neuroscience* 34(18):6389–6404.
- Dasen JS and Jessell TM. 2009. "Chapter Six Hox Networks and the Origins of Motor Neuron Diversity." Pp. 169–200 in *Current topics in developmental biology*. Vol. 88.
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P. 2008. "NKCC1 Cotransporter Inactivation Underlies Embryonic Development of Chloride-Mediated Inhibition in Mouse Spinal Motoneuron." *The Journal of Physiology* 586(4):1059–75.
- Dottori M, Gross MK, Labosky P, Goulding M. 2001. "The Winged-Helix Transcription Factor *Foxd3* Suppresses Interneuron Differentiation and Promotes Neural Crest Cell Fate." *Development* 128(21):4127–38.

- Durand J, Filipchuk A, Pambo-Pambo A, Amendola J, Borisovna Kulagina I, Guéritaud JP. 2015. “Developing Electrical Properties of Postnatal Mouse Lumbar Motoneurons.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:349.
- Eccles JC, R. Eccles RM, A. Iggo A, Ito M. 1961. “Distribution of Recurrent Inhibition among Motoneurons.” *The Journal of Physiology* 159:479–99.
- 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(3):524–62.
- Enjin A, Rabe N, Nakanishi ST, Vallstedt A, Gezelius H, Memic F, Lind M, Hjalt T, Tourtellotte WG, Bruder C, Eichele G, Whelan PJ, Kullander K. 2010. “Identification of Novel Spinal Cholinergic Genetic Subtypes Disclose Chodl and Pitx2 as Markers for Fast Motor Neurons and Partition Cells.” *The Journal of Comparative Neurology* 518(12):2284–2304.
- Felts PA, Yokoyama S, Dib-Hajj S, Black JA, Waxman SG. 1997. “Sodium Channel Alpha-Subunit MRNAs I, II, III, NaG, Na6 and HNE (PN1): Different Expression Patterns in Developing Rat Nervous System.” *Brain Research. Molecular Brain Research* 45(1):71–82.
- Fortin G, Kato F, Lumsden A, Champagnat J. 1995. “Rhythm Generation in the Segmented Hindbrain of Chick Embryos.” *The Journal of Physiology* 486 (Pt 3)(Pt 3):735–44.
- Francius C. 2007. “ETUDE FONCTIONNELLE DU GENE GATA2 AU COURS DE LA NEUROGENESE DANS LA MOELLE EPINIERE VENTRALE EMBRYONNAIRE.” Thèse.
- Francius C and Clotman F. 2014. “Generating Spinal Motor Neuron Diversity: A Long Quest for Neuronal Identity.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(5):813–29.
- Fulton BP and Walton K. 1986. “Electrophysiological Properties of Neonatal Rat Motoneurons Studied in Vitro.” *The Journal of Physiology* 370:651–78.
- Gao BX and Ziskind-Conhaim L. 1998. “Development of Ionic Currents Underlying Changes in Action Potential Waveforms in Rat Spinal Motoneurons.” *Journal of Neurophysiology* 80(6):3047–61.
- Gao H and Lu Y. 2008. “Early Development of Intrinsic and Synaptic Properties of Chicken Nucleus Laminaris Neurons.” *Neuroscience* 153(1):131–43.
- Gomez TM and Spitzer NC. 1999. “In Vivo Regulation of Axon Extension and Pathfinding by Growth-Cone Calcium Transients.” *Nature* 397(6717):350–55.

- Gonzalez-Islas C and Wenner P. 2006. "Spontaneous Network Activity in the Embryonic Spinal Cord Regulates AMPAergic and GABAergic Synaptic Strength." *Neuron* 49(4):563–75.
- Gu X, Olson EC, Spitzer NC. 1994. "Spontaneous Neuronal Calcium Spikes and Waves during Early Differentiation." *The Journal of Neuroscience* 14(11 Pt 1):6325–35.
- Gu X and Spitzer NC. 1995. "Distinct Aspects of Neuronal Differentiation Encoded by Frequency of Spontaneous Ca²⁺ Transients." *Nature* 375(6534):784–87.
- Hamburger V and Balaban M. 1963. "Observations and Experiments on Spontaneous Rhythmical Behavior in the Chick Embryo." *Developmental Biology* 6:533–45.
- Hamm TM, Sasaki S, Stuart DG, Windhorst U, Yuan CS. 1987. "Distribution of Single-Axon Recurrent Inhibitory Post-Synaptic Potentials in a Single Spinal Motor Nucleus in the Cat." *The Journal of Physiology* 388:653–64.
- Hanson MG and Landmesser LT. 2003. "Characterization of the Circuits That Generate Spontaneous Episodes of Activity in the Early Embryonic Mouse Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience* 23(2):587–600.
- Hanson MG and Landmesser LT. 2004. "Normal Patterns of Spontaneous Activity Are Required for Correct Motor Axon Guidance and the Expression of Specific Guidance Molecules." *Neuron* 43(5):687–701.
- Hanson MG, Milner LD, Landmesser LT. 2008. "Spontaneous Rhythmic Activity in Early Chick Spinal Cord Influences Distinct Motor Axon Pathfinding Decisions." *Brain Research Reviews* 57(1):77–85.
- Harvey PJ, Li Y, Li X, Bennett DJ. 2006. "Persistent Sodium Currents and Repetitive Firing in Motoneurons of the Sacrocaudal Spinal Cord of Adult Rats." *Journal of Neurophysiology* 96(3):1141–57.
- Hultborn H. 2006. "Spinal Reflexes, Mechanisms and Concepts: From Eccles to Lundberg and Beyond." *Progress in Neurobiology* 78(3–5):215–32.
- Illert M and Wietelmann D. 1989. "Distribution of Recurrent Inhibition in the Cat Forelimb." *Progress in Brain Research* 80:273–81; discussion 269–71.
- Jankowska E, Padel Y, Zarzecki P. 1978. "Crossed Disynaptic Inhibition of Sacral Motoneurons." *The Journal of Physiology* 285:425–44.
- Jessell TM and Sanes JR. 2000. "Development. The Decade of the Developing Brain." *Current Opinion in Neurobiology* 10(5):599–611.

- Jessell TM. 2000. "Neuronal Specification in the Spinal Cord: Inductive Signals and Transcriptional Codes." *Nature Reviews Genetics* 1(1):20–29.
- Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinpflug C. 2010. "SYMPOSIUM REVIEW: Going Native: Voltage-Gated Potassium Channels Controlling Neuronal Excitability." *The Journal of Physiology* 588(17):3187–3200.
- Kania A. 2014. "Spinal Motor Neuron Migration and the Significance of Topographic Organization in the Nervous System." Pp. 133–48 in *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 800.
- Kastanenka KV and Landmesser LT. 2013. "Optogenetic-Mediated Increases in in Vivo Spontaneous Activity Disrupt Pool-Specific but Not Dorsal-Ventral Motoneuron Pathfinding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(43):17528–33.
- Kastanenka KV and Landmesser LT. 2010. "In Vivo Activation of Channelrhodopsin-2 Reveals That Normal Patterns of Spontaneous Activity Are Required for Motoneuron Guidance and Maintenance of Guidance Molecules." *Journal of Neuroscience* 30(31):10575–85.
- Kimelman D and Martin BL. 2012. "Anterior-Posterior Patterning in Early Development: Three Strategies." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 1(2):253–66.
- Kirkby LA, Sack GS, Firl A, Feller MB. 2013. "A Role for Correlated Spontaneous Activity in the Assembly of Neural Circuits." *Neuron* 80(5):1129–44.
- Kirkwood PA, Sears TA, Westgaard RH. 1981. "Recurrent Inhibition of Intercostal Motoneurons in the Cat." *The Journal of Physiology* 319:111–30.
- Kolisnyk B, Guzman MS, Raulic S, Fan J, Magalhães AC, Feng G, Gros R, Prado VF, Prado MA. 2013. "ChAT-ChR2-EYFP Mice Have Enhanced Motor Endurance But Show Deficits in Attention and Several Additional Cognitive Domains." *Journal of Neuroscience* 33(25):10427–38.
- Krieger C and Sears TA. 1988. "The Development of Voltage-Dependent Ionic Conductances in Murine Spinal Cord Neurons in Culture." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 66(10):1328–36.
- Kuo JJ, Lee RH, Zhang L, Heckman CJ. 2006. "Essential Role of the Persistent Sodium Current in Spike Initiation during Slowly Rising Inputs in Mouse Spinal Neurons." *The Journal of Physiology* 574(Pt 3):819–34.

- Ladle DR, Pecho-Vrieseling E, Arber S. 2007. "Assembly of Motor Circuits in the Spinal Cord: Driven to Function by Genetic and Experience-Dependent Mechanisms." *Neuron* 56(2):270–83.
- Lamotte d'Incamps B and Ascher P. 2008. "Four Excitatory Postsynaptic Ionotropic Receptors Coactivated at the Motoneuron-Renshaw Cell Synapse." *The Journal of Neuroscience* 28(52):14121–31.
- Lamotte d'Incamps B, Krejci E, Ascher P. 2012. "Mechanisms Shaping the Slow Nicotinic Synaptic Current at the Motoneuron-Renshaw Cell Synapse." *The Journal of Neuroscience* 32(24):8413–23.
- Lance-Jones C. 1982. "Motoneuron Cell Death in the Developing Lumbar Spinal Cord of the Mouse." *Brain Research* 256(4):473–79.
- Lawson SJ, Davies HJ, Bennett JP, Lowrie MB. 1997. "Evidence That Spinal Interneurons Undergo Programmed Cell Death Postnatally in the Rat." *The European Journal of Neuroscience* 9(4):794–99.
- Lee RH and Heckman CJ. 2001. "Essential Role of a Fast Persistent Inward Current in Action Potential Initiation and Control of Rhythmic Firing." *Journal of Neurophysiology* 85(1):472–75.
- Lee SK and Pfaff SL. 2001. "Transcriptional Networks Regulating Neuronal Identity in the Developing Spinal Cord." *Nature Neuroscience* 4(Supp):1183–91.
- Lindsly C, Gonzalez-Islas C, Wenner P. 2017. "Elevated Intracellular Na⁺ Concentrations in Developing Spinal Neurons." *Journal of Neurochemistry* 140(5):755–65.
- Lipski J, Fyffe RE, Jodkowski J. 1985. "Recurrent Inhibition of Cat Phrenic Motoneurons." *The Journal of Neuroscience* 5(6):1545–55.
- Lovrics A, Gao Y, Juhász B, Bock I, Byrne HM, Dinnyés A, Kovács KA. 2014. "Boolean Modelling Reveals New Regulatory Connections between Transcription Factors Orchestrating the Development of the Ventral Spinal Cord." *PloS One* 9(11):e111430.
- Lu DC, Niu T, Alaynick WA. 2015. "Molecular and Cellular Development of Spinal Cord Locomotor Circuitry." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8:25.
- Mantegazza M, Yu FH, Powell AJ, Clare JJ, Catterall WA, Scheuer T. 2005. "Molecular Determinants for Modulation of Persistent Sodium Current by G-Protein Betagamma Subunits." *The Journal of Neuroscience* 25(13):3341–49.

- Markin SN, Klishko AN, Shevtsova NA, Lemay MA, Prilutsky BI, Rybak IA. 2016. "A Neuromechanical Model of Spinal Control of Locomotion."
- McCobb DP, Best PM, Beam KG. 1990. "The Differentiation of Excitability in Embryonic Chick Limb Motoneurons." *The Journal of Neuroscience* 10(9):2974-84
- McCobb DP, Best PM, Beam KG. 1989. "Development Alters the Expression of Calcium Currents in Chick-Limb Motoneurons." *Neuron* 2(6):1633-43.
- McCurdy ML and Hamm TM. 1992. "Recurrent Collaterals of Motoneurons Projecting to Distal Muscles in the Cat Hindlimb." *Journal of Neurophysiology* 67(5):1359–66.
- Mears SC and Frank E. 1997. "Formation of Specific Monosynaptic Connections between Muscle Spindle Afferents and Motoneurons in the Mouse." *The Journal of Neuroscience* 17(9):3128–35.
- Milner LD and Landmesser LT. 1999. "Cholinergic and GABAergic Inputs Drive Patterned Spontaneous Motoneuron Activity before Target Contact." *The Journal of Neuroscience* 19(8):3007–22.
- Momose-Sato Y , Nakamori T, Sato K. 2012. "Pharmacological Mechanisms Underlying Switching from the Large-Scale Depolarization Wave to Segregated Activity in the Mouse Central Nervous System." *European Journal of Neuroscience* 35(8):1242–52.
- Momose-Sato Y , Nakamori T, Sato K. 2012. "Spontaneous Depolarization Wave in the Mouse Embryo: Origin and Large-Scale Propagation over the CNS Identified with Voltage-Sensitive Dye Imaging." *European Journal of Neuroscience* 35(8):1230–41.
- Momose-Sato Y and Sato K. 2013. "Large-Scale Synchronized Activity in the Embryonic Brainstem and Spinal Cord." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7:36.
- Momose-Sato Y, Sato K, Kinoshita M. 2007. "Spontaneous Depolarization Waves of Multiple Origins in the Embryonic Rat CNS." *European Journal of Neuroscience* 25(4):929–44.
- 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(2):385–99.
- Myers CP, Lewcock JW, Hanson MG, Gosgnach S, Aimone JB, Gage FH, Lee KF, Landmesser LT, Pfaff SL. 2005. "Cholinergic Input Is Required during Embryonic Development to Mediate Proper Assembly of Spinal Locomotor Circuits." *Neuron* 46(1):37–49.

- Nakayama K, Nishimaru H, Iizuka M, Ozaki S, Kudo N. 1999. "Rostrocaudal Progression in the Development of Periodic Spontaneous Activity in Fetal Rat Spinal Motor Circuits In Vitro." *Journal of Neurophysiology* 81(5):2592–95.
- Navarrette R and Vrbová G. 1993. "Activity-Dependent Interactions between Motoneurons and Muscles: Their Role in the Development of the Motor Unit." *Progress in Neurobiology* 41(1):93–124.
- Nishimaru H, Iizuka M, Ozaki S, Kudo N. 1996. "Spontaneous Motoneuronal Activity Mediated by Glycine and GABA in the Spinal Cord of Rat Fetuses in Vitro." *The Journal of Physiology* 497 (Pt 1):131–43.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Kiehn O. 2006. "Activity of Renshaw Cells during Locomotor-like Rhythmic Activity in the Isolated Spinal Cord of Neonatal Mice." *Journal of Neuroscience* 26(20):5320–28.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. 2005. "Mammalian Motor Neurons Corelease Glutamate and Acetylcholine at Central Synapses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(14):5245–49.
- Nishimaru H and Kudo N. 2000. "Formation of the Central Pattern Generator for Locomotion in the Rat and Mouse." *Brain Research Bulletin* 53(5):661–69.
- Nornes HO and M. Carry M. 1978. "Neurogenesis in Spinal Cord of Mouse: An Autoradiographic Analysis." *Brain Research* 159(1):1–6.
- O'Donovan M, Ho S, Yee W. 1994. "Calcium Imaging of Rhythmic Network Activity in the Developing Spinal Cord of the Chick Embryo." *The Journal of Neuroscience* 14(11 Pt 1):6354–69.
- O'Donovan MJ. 1999. "The Origin of Spontaneous Activity in Developing Networks of the Vertebrate Nervous System." *Current Opinion in Neurobiology* 9(1):94–104.
- O'Donovan MJ, Chub N, Wenner P. 1998. "Mechanisms of Spontaneous Activity in Developing Spinal Networks." *Journal of Neurobiology* 37(1):131–45.
- O'Dowd DK, Ribera AB, Spitzer NC. 1988. "Development of Voltage-Dependent Calcium, Sodium, and Potassium Currents in *Xenopus* Spinal Neurons." *The Journal of Neuroscience* : 8(3):792–805.
- Oppenheim RW. 1991. "Cell Death During Development of the Nervous System." *Annual Review of Neuroscience* 14(1):453–501.

- Osterstock G, Le Bras B, Arulkandarajah KH, Le Corronec H, Czarnecki A, Mouffle C, Bullier E, Legendre P, Mangin JM. 2018. "Axoglial Synapses Are Formed onto Pioneer Oligodendrocyte Precursor Cells at the Onset of Spinal Cord Gliogenesis." *Glia* 66(8):1678–94.
- Perrier JF and Hounsgaard J. 2000. "Development and Regulation of Response Properties in Spinal Cord Motoneurons." *Brain Research Bulletin* 53(5):529–35.
- Perry S, Gezelius H, Larhammar M, Hilscher MM, Lamotte d'Incamps B, Leao KE, Kullander K. 2015. "Firing Properties of Renshaw Cells Defined by *Chrna2* Are Modulated by Hyperpolarizing and Small Conductance Ion Currents I_h and I_{SK} ." *European Journal of Neuroscience* 41(7):889–900.
- Phelps PE, Barber RP, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. 1984. "Postnatal Development of Neurons Containing Choline Acetyltransferase in Rat Spinal Cord: An Immunocytochemical Study." *The Journal of Comparative Neurology* 229(3):347–61.
- Phelps PE, Barber RP, Brennan LA, Maines VM, Salvaterra PM, Vaughn JE. 1990. "Embryonic Development of Four Different Subsets of Cholinergic Neurons in Rat Cervical Spinal Cord." *The Journal of Comparative Neurology* 291(1):9–26.
- Philippidou P and Dasen JS. 2013. "Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization." *Neuron* 80(1):12–34.
- 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(2):367–84.
- Prasad T, Wang X, Gray PA, Weiner JA. 2008. "A Differential Developmental Pattern of Spinal Interneuron Apoptosis during Synaptogenesis: Insights from Genetic Analyses of the Protocadherin-gamma Gene Cluster." *Development* 135(24):4153–64.
- Pun S, Sigrist M, Santos AF, Ruegg MA, Sanes JR, Jessell TM, Arber S, Caroni P. 2002. "An Intrinsic Distinction in Neuromuscular Junction Assembly and Maintenance in Different Skeletal Muscles." *Neuron* 34(3):357–70.
- Ren J and Greer JJ. 2003. "Ontogeny of Rhythmic Motor Patterns Generated in the Embryonic Rat Spinal Cord." *Journal of Neurophysiology* 89(3):1187–95.
- Renshaw B. 1946. "Central Effects of Centripetal Impulses in Axons of Spinal Ventral Roots." *Journal of Neurophysiology* 9(3):191–204.

- Ribera AB and Spitzer NC. 1989. "A Critical Period of Transcription Required for Differentiation of the Action Potential of Spinal Neurons." *Neuron* 2(1):1055–62.
- Ribera AB and Spitzer NC. 1990. "Differentiation of IKA in Amphibian Spinal Neurons." *The Journal of Neuroscience* 10(6):1886–91.
- Ribes V and Briscoe J. 2009. "Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(2):a002014–a002014.
- Rigato C, Swinnen N, Buckinx R, Couillin I, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P, Le Corrond H. 2012. "Microglia Proliferation Is Controlled by P2X7 Receptors in a Pannexin-1-Independent Manner during Early Embryonic Spinal Cord Invasion." *Journal of Neuroscience* 32(34):11559–73.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. 1999. "The K⁺/Cl[−] Co-Transporter KCC2 Renders GABA Hyperpolarizing during Neuronal Maturation." *Nature* 397(6716):251–55.
- Roelink H. 1996. "Tripartite Signaling of Pattern: Interactions between Hedgehogs, BMPs and Wnts in the Control of Vertebrate Development." *Current Opinion in Neurobiology* 6(1):33–40.
- Rosenberg SS and Spitzer NC. 2011. "Calcium Signaling in Neuronal Development." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(10):a004259–a004259.
- Russell JM. 2000. "Sodium-Potassium-Chloride Cotransport." *Physiological Reviews* 80(1):211–76.
- Sapir T, Geiman 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(5):1255–64.
- 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(19):4201–12.
- Saywell SA, Ford TW, Kirkwood PA. 2013. "Axonal Projections of Renshaw Cells in the Thoracic Spinal Cord." *Physiological Reports* 1(6):e00161.
- Scain AL, Le Corrond H, Allain AE, Muller E, Rigo JM, Meyrand P, Branchereau P, Legendre P. 2010. "Glycine Release from Radial Cells Modulates the Spontaneous Activity and Its Propagation during Early Spinal Cord Development." *The Journal of Neuroscience* 30(1):390–403.

- Schaller KL and Caldwell JH. 2000. "Developmental and Regional Expression of Sodium Channel Isoform NaCh6 in the Rat Central Nervous System." *The Journal of Comparative Neurology* 420(1):84–97.
- 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(6):817–28.
- Spitzer NC. 2006. "Electrical Activity in Early Neuronal Development." *Nature* 444(7120):707–12.
- Spitzer NC and Baccaglini PI. 1976. "Development of the Action Potential in Embryo Amphibian Neurons in Vivo." *Brain Research* 107.
- Spitzer NC and Lamborghini JE. 1976. "The Development of the Action Potential Mechanism of Amphibian Neurons Isolated in Culture." *Cell Biology* 73(5):1641–45.
- Spitzer NC, Lautermilch NJ, Smith RD, Gomez TM. 2000. "Coding of Neuronal Differentiation by Calcium Transients." *BioEssays* 22(9):811–17.
- Spitzer NC, Vincent A, Lautermilch NJ. 2000. "Differentiation of Electrical Excitability in Motoneurons." *Brain Research Bulletin* 53(5):547–52.
- Stam FJ, Hendricks TJ, Zhang J, Geiman EJ, Francius C, Labosky PA, Clotman F, Goulding M. 2012. "Renshaw Cell Interneuron Specialization Is Controlled by a Temporally Restricted Transcription Factor Program." *Development (Cambridge, England)* 139(1):179–90.
- Stifani N. 2014. "Motor Neurons and the Generation of Spinal Motor Neuron Diversity." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:293.
- Stifani N, Freitas AR, Liakhovitskaia A, Medvinsky A, Kania A, Stifani S. 2008. "Suppression of Interneuron Programs and Maintenance of Selected Spinal Motor Neuron Fates by the Transcription Factor AML1/Runx1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17):6451–56.
- Sugita S, Fleming LL, Wood C, Vaughan SK, Gomes MP, Camargo W, Naves LA, Prado VF, Prado MA, Guatimosim C, Valdez G. 2016. "VACHT Overexpression Increases Acetylcholine at the Synaptic Cleft and Accelerates Aging of Neuromuscular Junctions." *Skeletal Muscle* 6(1):31.

- Stil A, Liabeuf S, Jean-Xavier C, Brocard C, Viemari JC, Vinay L. 2009. "Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord." *Neuroscience* 164(2):809-21
- Sun YA and Poo MM. 1987. "Evoked Release of Acetylcholine from the Growing Embryonic Neuron." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(8):2540-44.
- Suzue, T. 1996. "Movements of Mouse Fetuses in Early Stages of Neural Development Studied in Vitro." *Neuroscience Letters* 218(2):131-34.
- Suzue T and Shinoda Y. 1999. "Highly Reproducible Spatiotemporal Patterns of Mammalian Embryonic Movements at the Developmental Stage of the Earliest Spontaneous Motility." *The European Journal of Neuroscience* 11(8):2697-2710.
- Tabak J, Rinzel J, O'Donovan MJ. 2001. "The Role of Activity-Dependent Network Depression in the Expression and Self-Regulation of Spontaneous Activity in the Developing Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience* 21(22):8966-78.
- Tazerart S, Viemari J-C, Darbon P, Vinay L, Brocard F. 2007. "Contribution of Persistent Sodium Current to Locomotor Pattern Generation in Neonatal Rats." *Journal of Neurophysiology* 98(2):613-28.
- 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." *The Journal of Neuroscience* : 28(34):8577-89.
- Theiss RD, Kuo JJ, Heckman CJ. 2007. "Persistent Inward Currents in Rat Ventral Horn Neurones." *The Journal of Physiology* 580(Pt. 2):507-22.
- Thoby-Brisson M, Trinh J-B, Champagnat J, Fortin G. 2005. "Emergence of the Pre-Botzinger Respiratory Rhythm Generator in the Mouse Embryo." *Journal of Neuroscience* 25(17):4307-18.
- Tong H and McDearmid JR. 2012. "Pacemaker and Plateau Potentials Shape Output of a Developing Locomotor Network." *Current Biology* : CB 22(24):2285-93.
- Urbani A and Belluzzi O. 2000. "Riluzole Inhibits the Persistent Sodium Current in Mammalian CNS Neurons." *The European Journal of Neuroscience* 12(10):3567-74.
- Vaughn JE, Henrikson CK, Grieshaber JA. 1974. "A Quantitative Study of Synapses on Motor Neuron Dendritic Growth Cones in Developing Mouse Spinal Cord." *The Journal of Cell Biology* 60(3):664-72.

- Vaughn JE. 1989. "Review: Fine Structure of Synaptogenesis in the Vertebrate Central Nervous System." *Synapse* 3(3):255–85.
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F. 2000. "Perinatal Development of Lumbar Motoneurons and Their Inputs in the Rat." *Brain Research Bulletin* 53(5):635–47.
- Wang S, Polo-Parada L, Landmesser LT. 2009. "Characterization of Rhythmic Ca²⁺ Transients in Early Embryonic Chick Motoneurons: Ca²⁺ Sources and Effects of Altered Activation of Transmitter Receptors." *The Journal of Neuroscience* : 29(48):15232–44.
- Wenner P and O'Donovan MJ. 2001. "Mechanisms That Initiate Spontaneous Network Activity in the Developing Chick Spinal Cord." *Journal of Neurophysiology* 86(3):1481–98.
- Wilhelm JC, Rich MM, Wenner P. 2009. "Compensatory Changes in Cellular Excitability, Not Synaptic Scaling, Contribute to Homeostatic Recovery of Embryonic Network Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(16):6760–65.
- Wilson L and Maden M. 2005. "The Mechanisms of Dorsoventral Patterning in the Vertebrate Neural Tube." *Developmental Biology* 282(1):1–13.
- Xie H and Ziskind-Conhaim L. 1995. "Blocking Ca(2+)-Dependent Synaptic Release Delays Motoneuron Differentiation in the Rat Spinal Cord." *The Journal of Neuroscience* 15(9):5900–5911.
- Xu H, Clement A, Wright TM, Wenner P. 2007. "Developmental Reorganization of the Output of a GABAergic Interneuronal Circuit." *Journal of Neurophysiology* 97(4):2769–79.
- Xu H, Whelan PJ, Wenner P. 2005. "Development of an Inhibitory Interneuronal Circuit in the Embryonic Spinal Cord." *Journal of Neurophysiology* 93(5):2922–33.
- Yamamoto Y and Henderson CE. 1999. "Patterns of Programmed Cell Death in Populations of Developing Spinal Motoneurons in Chicken, Mouse, and Rat." *Developmental Biology* 214(1):60–71.
- Young SH and Poo MM. 1983. "Spontaneous Release of Transmitter from Growth Cones of Embryonic Neurones." *Nature* 305(5935):634–37.
- Yvert B, Branchereau P, Meyrand P. 2004. "Multiple Spontaneous Rhythmic Activity Patterns Generated by the Embryonic Mouse Spinal Cord Occur Within a Specific Developmental Time Window." *Journal of Neurophysiology* 91(5):2101–9.

- Zagoraïou L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM, Miles GB. 2009. "A Cluster of Cholinergic Premotor Interneurons Modulates Mouse Locomotor Activity." *Neuron* 64(5):645–62.
- Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G. 2011. "Cell Type-specific Channelrhodopsin-2 Transgenic Mice for Optogenetic Dissection of Neural Circuitry Function." *Nat Methods*.
- Zhong G, Masino MA, Harris-Warrick RM. 2007. "Persistent Sodium Currents Participate in Fictive Locomotion Generation in Neonatal Mouse Spinal Cord." *Journal of Neuroscience* 27(17):4507–18.
- Ziskind-Conhaim L. 1988. "Electrical Properties of Motoneurons in the Spinal Cord of Rat Embryos." *Developmental Biology* 128(1):21–29.