



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la voie cortico-spinale et son implication dans l'intégration sensori-motrice

Charlotte Bichara

► **To cite this version:**

Charlotte Bichara. Caractérisation de la voie cortico-spinale et son implication dans l'intégration sensori-motrice. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ094 . tel-03687241

**HAL Id: tel-03687241**

**<https://theses.hal.science/tel-03687241v1>**

Submitted on 3 Jun 2022

**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.



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



**ÉCOLE DOCTORALE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**INCI – CNRS 3212**

**THÈSE** présentée par :

**Charlotte BICHARA**

soutenue le : **08 Octobre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Science de la vie et de la santé - Spécialité : Neurosciences

**Caractérisation de la voie cortico-spinale et son implication dans l'intégration sensori-motrice**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme CORDERO-ERAUSQUIN Matilde** Chargé de recherches, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme ANTRI Myriam**

Chargée de recherches, Université Clermont Auvergne

**Mme EGO-STENGEL Valérie**

Chargée de recherches, Université Paris-Saclay

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. VEINANTE Pierre**

Professeur, Université de Strasbourg

**M. LENA Clément**

Directeur de recherches, École Normale Supérieure

**M. BROCHIER Thomas**

Directeur de recherches, Institut de la Timone



## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les Docteurs **Myriam Antri**, **Valérie Ego-Stengel**, **Thomas Brochier**, **Clément Léna** et **Pierre Veinante** de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury et de lire mon travail de thèse.

Ces quatre années de thèse ont été particulièrement enrichissantes. C'est une période qui a été marquée par des hauts et des bas, et si j'ai réussi à ne pas (trop) perdre la boule, c'est parce que j'ai eu un entourage formidable qui m'a encouragée à ne jamais baisser les bras.

Je voudrais commencer par remercier **Matilde**, qui m'a donné ma chance à l'issue du master. Merci d'avoir accepté de m'encadrer, de ce que vous m'avez appris, de m'avoir soutenue sans économiser votre temps notamment pour la MRT. Grâce à vous, j'ai eu de belles opportunités (collaboration, participation à des congrès majeurs...). J'ai vraiment apprécié d'avoir une réelle écoute dans la construction du projet et une grande liberté d'action. Tout cela m'aura beaucoup aidée à me construire en tant que scientifique.

Je souhaite aussi remercier les chercheurs de l'équipe, **Philippe**, **Bernard**, **Fred** et **Didier** mais aussi **Aline** pour tous vos retours constructifs et vos conseils pour mon projet et mes manips et pour des retraites vosgiennes inoubliables. Un grand merci aussi à mon équipe d'origine, **Rémy**, **Perrine** et **Sylvain** avec lesquels j'ai aussi beaucoup appris pendant mon master et le début de ma thèse, et qui m'ont soutenue pour la MRT. Merci pour tous vos conseils.

Merci à **Caroline Rouaux**, pour m'avoir invitée à collaborer à un super projet sur la SLA. Ce fut un réel plaisir de manipuler avec **Thibaut Burg** et **Jelena Scekic-Zahirovic**.

J'adresse aussi des remerciements sincères à toute l'équipe du **Chronobiotron**, et particulièrement à **Sophie**, **Dom** et **Stéphane** qui ont toujours été d'une très grande réactivité, et dont l'aide a été extrêmement précieuse.

À vous les copains : Merci d'avoir rempli mon cœur de joie et mon ventre de bières (petite dédicace à **Nouredine**, qui nous a bien fournis en pintes).

À ma clique d'origine : **Taddy**, merci de m'avoir prise sous ton aile, je suis fière d'avoir été ton padawan. **Benjaminou**, mon binôme de thèse, camarade de « bieraubeurre ». **Lou**, ma partenaire de Photoshop « minou ». **Yunuen**, thank you for all your teachings, and **Varen**, thank you for the fun times and the many rounds of beer.

A mon équipe adoptive : **Ludo** mon frerot, maman sera fière. **Frédérique, Laurène, Francine (Fede)**, thanks for the many emergency beers at the Chariot. Michelangelo (**Théo**), simplement le plus beau, que dire d'autre... **Gilles** du ruisseau et **Théo2**, la dernière portée de petits biologistes programmeurs, à vous la relève. Merci d'avoir été là pour le fun et le moins fun, je ne pouvais pas rêver d'une meilleure team. Vous en avez décoré des bureaux les copains ! #AyaNakamura, votre chef d'œuvre.

Sans oublier tout le reste de la famille Neuro: **Claire, Clem, Louise, Léa, Damien, Guillaume, Shani**. Et une pensée spéciale pour les plus anciens : **Baptiste, Bastien** et **Géraldine** : les originaux, survivants du master, mais aussi **Jacques** (#Yapasdeneuronsdanslecaca), **Lucas** (de la L1 jusqu'à la thèse, ça en fait des apéros !) et **Xavier** (rdv au prochain marathon HP).

Bien sûr, un grand merci pour votre soutien mes amies de toujours, **Manon** et **Edwige**, parfois loin des yeux mais jamais loin du cœur. Et enfin merci à ma super famille, à mes **parents**, et à **Marion** et **Ben** pour tous les rires (et les bagarres), qui ont servi d'exutoire à mon stress. J'espère que je n'ai pas été trop chiante (juste comme il faut) pendant ces 4 ans particulièrement (et puis tous les autres). Un merci spécial à ma merveilleuse mère pour la correction des fautes de ce manuscrit (S'il en reste, c'est que j'en ai rajoutées après ton passage !

A tous ceux que j'ai oubliés,  
sincères oups.

Cette thèse est dédiée à mes grands-parents, qui ont été et resteront ma source d'inspiration quotidienne. Vous m'avez quitté sur le chemin, mais j'espère que de là-haut, vous êtes fiers de moi.



## Table des matières

<b>Liste des figures .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des annexes .....</b>	<b>3</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>4</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>6</b>
<b>Introduction générale : circuits de la motricité .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Muscles squelettiques : effecteurs du mouvement .....</b>	<b>8</b>
<b>II. Moelle épinière : actionneur final des mouvements .....</b>	<b>9</b>
1. Généralités .....	9
2. Organisation de la moelle épinière .....	10
2.1. Évolution .....	10
2.2. Développement .....	10
2.3. Laminae .....	11
2.4. Motoneurones .....	11
2.5. Retours sensoriels.....	13
• Retours cutanés .....	13
• Neurones cibles d'informations cutanées.....	14
• Retours proprioceptifs .....	14
• Neurones cibles d'information proprioceptives .....	15
2.6. Circuit pré-moteur .....	16
• Principe de fonctionnement des Générateurs Centraux de Patron.....	16
• Interneurones des circuits moteurs .....	17
2.6. Réflexes.....	19
2.7. Inhibition des fibres afférentes primaires.....	21
• Mécanisme de l'inhibition présynaptique .....	22
• Rôle de la PAD.....	24
<b>III. Contrôle supra-spinal du mouvement .....</b>	<b>27</b>
1. Structures impliquées directement.....	27
1.1. Formation réticulée médullaire (MRF) .....	27
1.2. Noyau vestibulaire (VN).....	28
1.3. Noyau rouge (RN) .....	29
1.4. Cortex .....	29
2. Structures impliquées indirectement.....	30



2.1.	Région mésencéphalique locomotrice (MLR) .....	30
2.2.	Ganglions de la base (GB) .....	31
2.3.	Cervelet.....	31
3.	Contrôle via une modulation sensorielle .....	32
4.	Cortex et motricité .....	34
4.1.	Anatomie .....	35
4.2.	Fonction du cortex.....	36
	• Préparation et initiation du mouvement .....	36
	• Mouvements précis des pattes avant .....	37
	• Locomotion .....	37
4.3.	Interaction avec les autres acteurs du mouvement .....	38
4.4.	Voie de contrôle directe : le tractus cortico-spinal.....	38
	• Évolution et développement.....	39
	• Anatomie.....	40
	• Rôle de la voie CS .....	42
	<b>Projet de thèse.....</b>	<b>45</b>
	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>46</b>
1.	<b>Modèles animaux .....</b>	<b>46</b>
2.	<b>Enregistrements électrophysiologiques .....</b>	<b>46</b>
2.1.	Enregistrement EMG .....	46
2.2.	Enregistrement DRP .....	48
3.	<b>Photostimulation corticale.....</b>	<b>49</b>
4.	<b>Photostimulation de la moelle épinière .....</b>	<b>50</b>
5.	<b>Pyramidotomie.....</b>	<b>50</b>
6.	<b>Injections corticales et spinales.....</b>	<b>51</b>
7.	<b>Histologie .....</b>	<b>51</b>
8.	<b>Virus.....</b>	<b>52</b>
9.	<b>Analyse d'images .....</b>	<b>52</b>
9.1.	Site d'injection.....	52
9.2.	Distribution spatiale des neurones spinaux, cibles du CST.....	53
10.	<b>Quantification et analyse statistique .....</b>	<b>53</b>
	<b>Résultats.....</b>	<b>54</b>

<b>Discussion</b> .....	<b>89</b>
<b>1. Modèle murin</b> .....	<b>89</b>
<b>2. Voie cortico-spinale</b> .....	<b>90</b>
2.1. Ségrégation des populations de NCS.....	90
2.2. Rôle moteur.....	91
2.3. Rôle sensoriel .....	92
• Interprétation des DRPs.....	92
• Pharmacologie DRPs .....	93
2.4. Collatérales du CST et voies ventrales et latérales.....	93
<b>3. Cibles du CST</b> .....	<b>94</b>
3.1. Traçage monosynaptique antérograde .....	94
3.2. Identification des cibles lombaires du CST .....	95
3.3. Rôle des cibles lombaires du CST.....	95
3.4. Relai cervical de la commande motrice.....	96
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>97</b>
<b>5. Perspectives</b> .....	<b>98</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>100</b>
<b>I. Sclérose latérale amyotrophique</b> .....	<b>100</b>
1. Généralités sur la SLA.....	100
2. Modèles.....	101
3. Mécanismes de la maladie .....	101
3.1. Atteinte des motoneurones.....	101
3.2. Atteinte du cortex.....	101
3.3. Hypothèses de propagation.....	102
4. Objectifs du projet SLA.....	103
5. Matériels et Méthodes.....	104
5.1. Modèles animaux .....	104
5.2. Injections spinales.....	104
5.3. Enregistrement des volées descendantes .....	105
5.4. Enregistrement EMG .....	105
5.5. Enregistrement DRP.....	105
5.6. Analyse.....	105
6. Résultats.....	106
7. Discussion.....	107

<b>II. Projet collaboratif.....</b>	<b>108</b>
1. Objectif du projet collaboratif.....	108
2. Matériels et Méthodes.....	108
2.1. Enregistrement du réflexe H.....	108
2.2. Analyse des signaux.....	109
3. Résultats.....	110
<b>III. Publication projet « cholinergique » .....</b>	<b>126</b>
<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b><i>167</i></b>

## **Introduction**

- Figure 1. Muscles, motoneurones et fibres sensorielles
- Figure 2. Développement embryonnaire de la moelle épinière
- Figure 3. Repères anatomiques spinaux
- Figure 4. Lamination de la moelle épinière
- Figure 5. Fonction des motoneurones
- Figure 6. Retours sensoriels
- Figure 7. Générateurs Centraux de Patron
- Figure 8. Réflexes
- Figure 9. Physiologie de la PAD
- Figure 10. Voies supra-spinales de contrôle de la motricité
- Figure 11. Modèles internes
- Figure 12. Contrôles descendants de la PAD
- Figure 13. Anatomie du cortex
- Figure 14. Anatomie de la voie cortico-spinale
- Figure 15. Diversité des neurones cortico-spinaux

## **Matériel et méthodes**

- Figure 16. Analyse des EMG
- Figure 17. Analyse qualitative des EMGs
- Figure 18. Techniques d'enregistrement et analyse des DRPs
- Figure 19. Cartographie du cortex et photostimulations
- Figure 20. Pyramidotomie

## **Discussion**

- Figure 21 – Conclusions et hypothèses

## **Annexes**

Figure 22. Chronologie des atteintes du modèle SOD1

Figure 23. Hypothèses de propagation

Figure 24. Table de Z-Scores & compte-rendu des mesures

Figure 25. Transmission des signaux cortico-spinaux

Figure 26. Techniques d'enregistrement et analyse du réflexe H

## *Liste des annexes*

- I.     Projet sclérose latérale amyotrophique
- II.    Projet collaboratif
- III.   Publication projet « cholinergique »

## Abréviations

- BMP** : Bone Morphogenetic Protein
- BSP** : Biceps Semi-tendineux Postérieur
- CFA** : Caudal Forelimb Area
- ChAT** : Choline AcetylTransférase
- CM** : connexions Cortico-Motoneuronales
- CPG** : Générateurs Centraux de Patron
- CST** : Tractus Cortico-Spinal
- dCST** : CST dorsal
- dICST** : CST dorso-latéral
- vCST** : CST ventral
- DCn** : noyau des Colonnes Dorsales
- DREADD** : Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs
- DRG** : Ganglions Rachidiens Dorsaux
- dSC** : neurones Spinaux Cérébelleux dorsaux
- EMG** : Électromyographie
- GABA** : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique
- GAD** : Glutamate Décarboxylase
- GB** : Ganglions de la Base
- GFP** : Green Fluorescent Protein
- GS** : muscle *Gastrocnemius*
- HLA** : Hindlimb Area
- Réflexe H** : Réflexe de Hoffman
- IC** : Capsule Interne
- IN** : Interneurones
- NCS** : Neurones Cortico-Spinaux
- NMDA** : N-méthyl-D-aspartate
- NRM** : Noyau du Raphé Magnus
- M** : Muscle
- MdV** : partie ventrale de la formation réticulée médullaire

**MN** : Motoneurone  
**MRF** : Formation Réticulée Médulaire  
**MRN** : Noyau Rouge Magnocellulaire  
**OTG** : Organe Tendineux de Golgi  
**OI** : Olive Inférieure  
**PA** : Potentiels d'Action  
**PAD** : Primary Afferent Inhibition  
**Pn** : noyaux du Pont  
**PPSE** : Potentiels Post Synaptiques Excitateurs  
**PPSI** : Potentiels Post Synaptiques Inhibiteurs  
**PRN** : Noyau Rouge Parvocellulaire  
**RF** : Formation Réticulée  
**RN** : Noyau Rouge  
**RFA** : Rostral Forelimb Area  
**SHH** : Sonic Hedgehog  
**SLA** : Sclérose latérale Amyotrophique  
**SOD1** : SuperOxyde Dismutase 1  
**S** : Slow  
**TA** : muscle *Tibialis Anterior*  
**FR** : Fast Résistant  
**FF** : Fast Fatigable  
**VC** : Vitesse de Conduction  
**vGluT ou VG** : Transporteur vésiculaire du Glutamate  
**VN** : Noyau Vestibulaire  
**5-HT** : 5-hydroxytryptamine



L'une des fonctions essentielles que l'homme partage avec la vaste majorité des espèces appartenant au règne animal est la capacité de se mouvoir. Il s'agit d'un besoin fondamental qui permet aux individus de s'adapter dans leur environnement et de survivre.

Pour obtenir une action coordonnée, il est nécessaire que le message envoyé aux motoneurones soit approprié et bien planifié d'une part, mais aussi que les nombreux retours sensoriels liés au mouvement soient pris en compte en direct. Certains retours sont essentiels à la correction du mouvement et à sa perception alors que d'autres sont inutiles voire parfois redondants et pourraient perturber l'action s'ils n'étaient pas supprimés. Nous nous sommes intéressées à ces deux points clés sensoriel et moteur du contrôle du mouvement, soupçonnés d'impliquer la voie cortico-spinale. Nous nous sommes demandé comment le filtrage des informations sensorielles s'articule autour de la commande motrice pour produire un comportement moteur volontaire coordonné. J'approfondirai les objectifs précis du projet à la fin de l'introduction.

Afin de mieux comprendre le contexte de cette étude, je commencerai ce manuscrit par introduire tous les acteurs du contrôle moteur, en mettant l'accent sur le rôle des interneurones spinaux, que nous avons exploré dans nos travaux. Je parlerai aussi en détail du rôle du cortex et particulièrement de sa voie directe de projection vers la moelle épinière. Dès que possible, je parlerai des données connues chez le rongeur puisque notre projet a été réalisé chez la souris. Lorsqu'il sera nécessaire de mentionner d'autres espèces, que ce soit pour comparer avec le rongeur ou par manque de littérature, je m'efforcerai de le préciser.

## *Introduction générale : circuits de la motricité*

Nous nous créons une représentation du monde autour de nous, de notre environnement. Cette représentation a un intérêt essentiel, qui est celui de guider le mouvement. Les informations obtenues par nos différents sens nous permettent d'adapter notre comportement à chaque situation. On peut ainsi décider s'il est possible ou non d'engager une tâche motrice, d'anticiper la trajectoire des mouvements que l'on va réaliser ou encore la force que l'on appliquera sur les objets avec lesquels on interagira. Tout au long du mouvement, les paramètres de la commande motrice dépendent de l'environnement et de l'état du corps dans cet environnement. La première étape est de déterminer l'objet du déplacement, puis de préparer une série de mouvements qui nous permettra d'atteindre cet objectif. Pour ce faire, nous devons élaborer un plan, c'est-à-dire 1) préparer la position des membres et l'angle des articulations, 2) calculer l'évolution nécessaire de ces paramètres pour permettre de placer les membres, et donc le corps, dans la position attendue, en prenant en compte les propriétés (taille, poids, résistance...) de chaque segment de membre en mouvement et leur position initiale.

Lorsque la commande motrice est envoyée, et qu'une action est générée, cela provoque de grandes quantités de retours sensoriels liés au mouvement. Ces informations sensorielles permettent de le guider et de l'ajuster continuellement. L'obtention d'un mouvement coordonné et sans erreurs est donc possible grâce à l'élaboration d'une commande appropriée et d'un paramètre essentiel, qui est l'intégration des informations sensorielles du corps et de l'environnement. Ainsi, pour être au summum de l'adaptation dans son environnement, chaque espèce possède divers organes et récepteurs sensoriels lui permettant de recevoir un maximum d'informations sur son propre corps et sur son entourage. Ces informations peuvent alors être transmises aux diverses structures motrices, de manière plus ou moins intégrées qui enverront en retour leurs messages aux motoneurones puis organes moteurs, effecteurs finaux du mouvement, les muscles.

## I. Muscles squelettiques : effecteurs du mouvement

Afin de déplacer ses membres dans l'espace, des muscles sont insérés grâce aux tendons sur les os, liés entre eux par une articulation. La force et la vitesse de contraction du muscle détermineront les caractéristiques du mouvement. Les muscles sont constitués de fibres musculaires (ou cellules musculaires), contenant la machinerie générant la contraction du muscle. Chacune de ces fibres reçoit une innervation principalement cholinergique provenant de la moelle épinière et portée par les motoneurones jusqu'au niveau de la jonction neuromusculaire. Une unité motrice est constituée d'un motoneurone et de toutes les fibres musculaires qu'il innerve. Plus ce nombre est élevé, plus le nombre de fibres recrutées par l'activation du neurone est grand et donc moins fin sera le mouvement. Il existe deux grands types de fibres musculaires dont les capacités de contraction diffèrent (Figure 1).

- Les fibres lentes de type *I*, dont la vitesse de contraction est lente, la tension maximale faible et qui sont peu fatigables.
- Les fibres rapides de type *II*, pouvant être très résistantes à la fatigue (type *IIa*) ou peu résistantes (type *IIb*), dont la vitesse de contraction est rapide et la tension maximale forte.

En fonction du rôle de chaque muscle, s'il est impliqué dans les mouvements fins ou dans des mouvements plus grossiers, sa constitution en types de fibres musculaires diffère. Par exemple, s'il joue un rôle dans le maintien de la posture, il sera constitué en grande partie de fibres résistantes à la fatigue.

Le muscle squelettique est non seulement constitué de fibres musculaires décrites ci-dessus, mais il contient aussi des fibres musculaires dites « intra-fusales » situées au cœur des muscles, dont le niveau d'étirement est communiqué au système nerveux central à travers des afférences sensorielles proprioceptives (type *Ia* et *II*). En outre, il existe l'organe tendineux de Golgi (OTG), situé à l'insertion du tendon sur l'os, qui permet de mesurer la force de contraction du muscle. Cet organe est à l'origine d'un message sensoriel dirigé vers le système nerveux central, véhiculé par les fibres *IIb* (Figure 1).

À tout moment du mouvement, le système nerveux est donc informé de l'étirement des muscles et de leur force de contraction afin de pouvoir éventuellement les ajuster. Cet

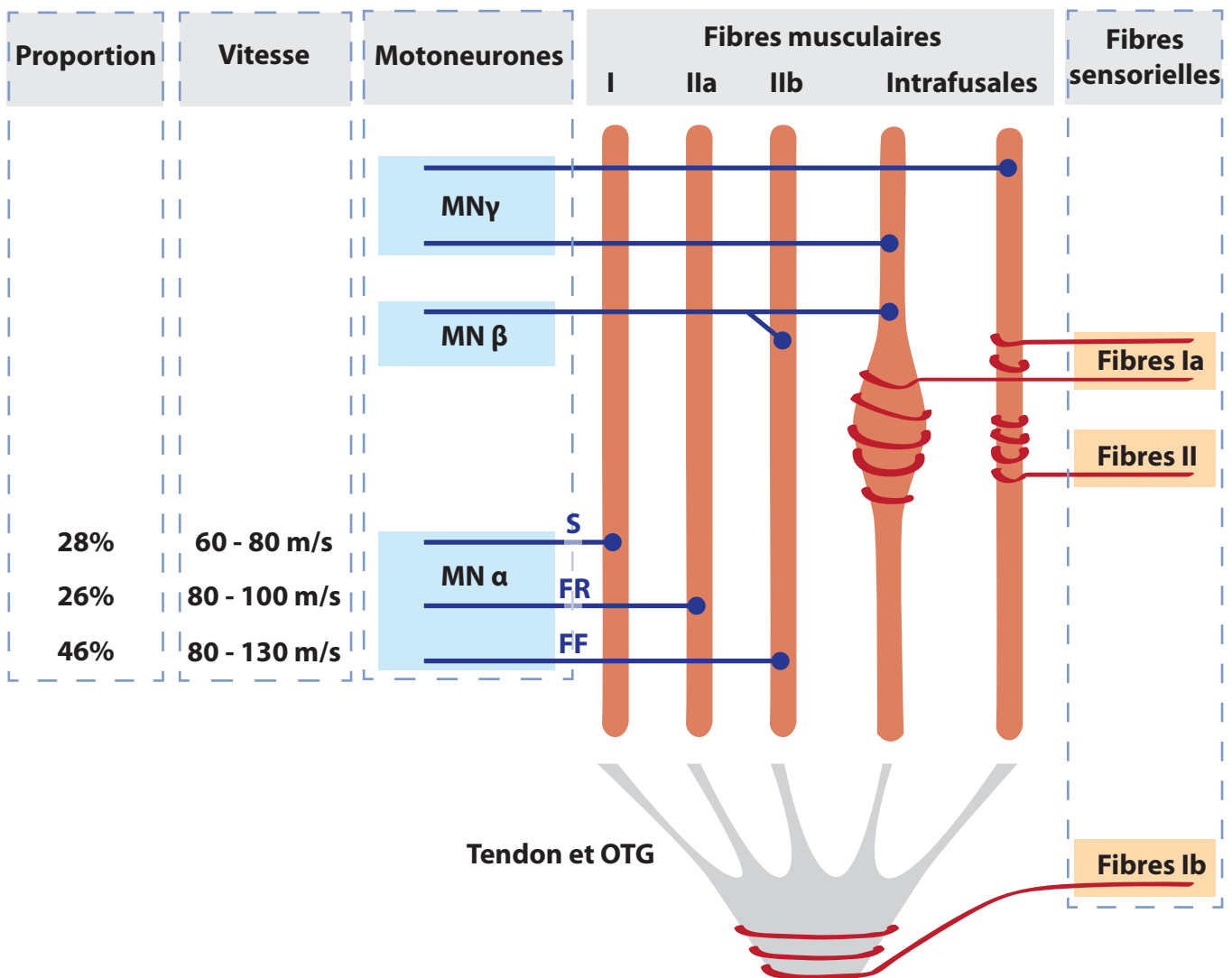


Figure 1. Muscles, motoneurones et fibres sensorielles

Organisation des connexions entre les différents types de motoneurones et les fibres musculaires I, Ila, Ilb et intrafusales. Illustration des fibres sensorielles (cadres oranges) innervant les fibres musculaires et l'OTG au niveau des tendons, et les fibres sensorielles. Indication des proportions (colonne 1) et vitesses (colonne 2) respectives des sous-types de motoneurones  $\alpha$ .

**OTG:** Organe tendineux de golgi, **MN:** Motoneurone

ajustement est fondamental, et il nécessite non seulement ces informations dites « proprioceptives » (définies plus en détails dans le chapitre [retour proprioceptif](#)), mais également de nombreuses informations sensorielles « extéroceptives » provenant de l'interaction avec l'environnement. Enfin, à l'exception des muscles de la face, tous les muscles striés squelettiques acheminent leurs informations sensorielles vers la moelle épinière : premier et dernier niveau d'intégration permettant l'ajustement du mouvement en cours de réalisation.

## II. Moelle épinière : actionneur final des mouvements

### 1. Généralités

Les premières traces de l'exploration des fonctions de la moelle épinière ont été attribuées à Hippocrate. Dans ses écrits, il décrit pour la première fois les conséquences cliniques des lésions spinales. Plus tard, au II<sup>ème</sup> siècle après JC, la fonction de la moelle devient de plus en plus claire pour Claude Galien qui la qualifie d'organe conducteur des messages sensorimoteurs, du cerveau vers les membres et des membres vers le cerveau. Pendant très longtemps, un point de vue soutenu par le médecin Thomas Willis au XVII<sup>ème</sup> siècle, a été de considérer la moelle comme l'organe le plus important du corps, plus encore que le cerveau, puisque certains animaux peuvent garder certains processus sensorimoteurs intacts après décapitation, mais pas après lésions spinales (Johal et al 2018). En 1811, l'anatomie fonctionnelle de la moelle est étudiée plus précisément par Charles Bell, grâce à des expérimentations sur les chiens. Il constate qu'en piquant la racine ventrale (ou antérieure chez les bipèdes) de la moelle épinière, on produit un mouvement, alors qu'en piquant la racine dorsale (ou postérieure), aucun mouvement n'est observable. Cette constatation a permis de révéler la division antéro-postérieure sensorimotrice de la moelle épinière. Environ 10 ans plus tard, François Magendie arrive à des conclusions similaires. Après lésion des racines ventrales d'un chien, il constate une paralysie, alors que la lésion des racines dorsales provoque une anesthésie du membre (Magendie 1822). Ces premières observations ont été rassemblées sous le terme d'« hypothèse de Bell-Magendie » et sont pionnières dans la compréhension de l'organisation fonctionnelle de la moelle épinière.

## 2. Organisation de la moelle épinière

### 2.1. *Évolution*

La moelle épinière apparaît chez les vertébrés et permet à ce sous embranchement du règne animal, la locomotion grâce à des mouvements ondulatoires et/ou aux mouvements des membres. Ceci est rendu possible grâce à la spécialisation d'une famille de neurones moteurs, les motoneurones, qui sont particulièrement accumulés au niveau des segments spinaux innervant les membres, à savoir les segments cervicaux et lombaires. Cette accumulation donne lieu à des renflements de la moelle qui sont plus ou moins développés en fonction des besoins de l'espèce en mobilité de ces membres.

### 2.2. *Développement*

La moelle épinière dérive du neurectoderme, qui se creuse pendant le développement embryonnaire pour former le tube neural. Celui-ci apparaît chez l'homme au cours de la neurulation primaire, pendant le premier trimestre du développement. La moelle est créée au niveau de la partie la plus caudale des vésicules primaires (le Rhombencéphale) formées lors du processus de céphalisation. Elle constitue la vésicule secondaire la plus caudale du rhombencéphale, appelée le Myélencéphale. Lors du développement, se mettent en place des gradients protéiques de signalisation dorso-ventraux (par exemple, Sonic Hedgehog (SHH), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), WNT) qui impactent l'activité des facteurs de transcription en fonction de leurs concentration. Ces signaux morphogènes sont ainsi responsables de la spécification neuronale. Les différents sous types neuronaux générés définissent des groupes fonctionnels, et migrent ensuite dans la moelle épinière de manière non linéaire, c'est à dire indépendamment de leur position d'origine, pour atteindre l'organisation segmentaire et laminaire finale (Lai et al 2016) (Figure 2).

Les vertèbres et la moelle continuent de se développer après la naissance, et cela à des rythmes différents. C'est ce qui donne lieu au décalage observé entre les vertèbres et le segment spinal qu'elles recouvrent (Harrison et al 2013, Sakla 1969). Les racines motrices et sensorielles sortent du canal rachidien au niveau du foramen vertébral qui leur correspond. De ce fait, les dernières vertèbres (à partir de L5) ne recouvrent que des racines. Il s'agit de la

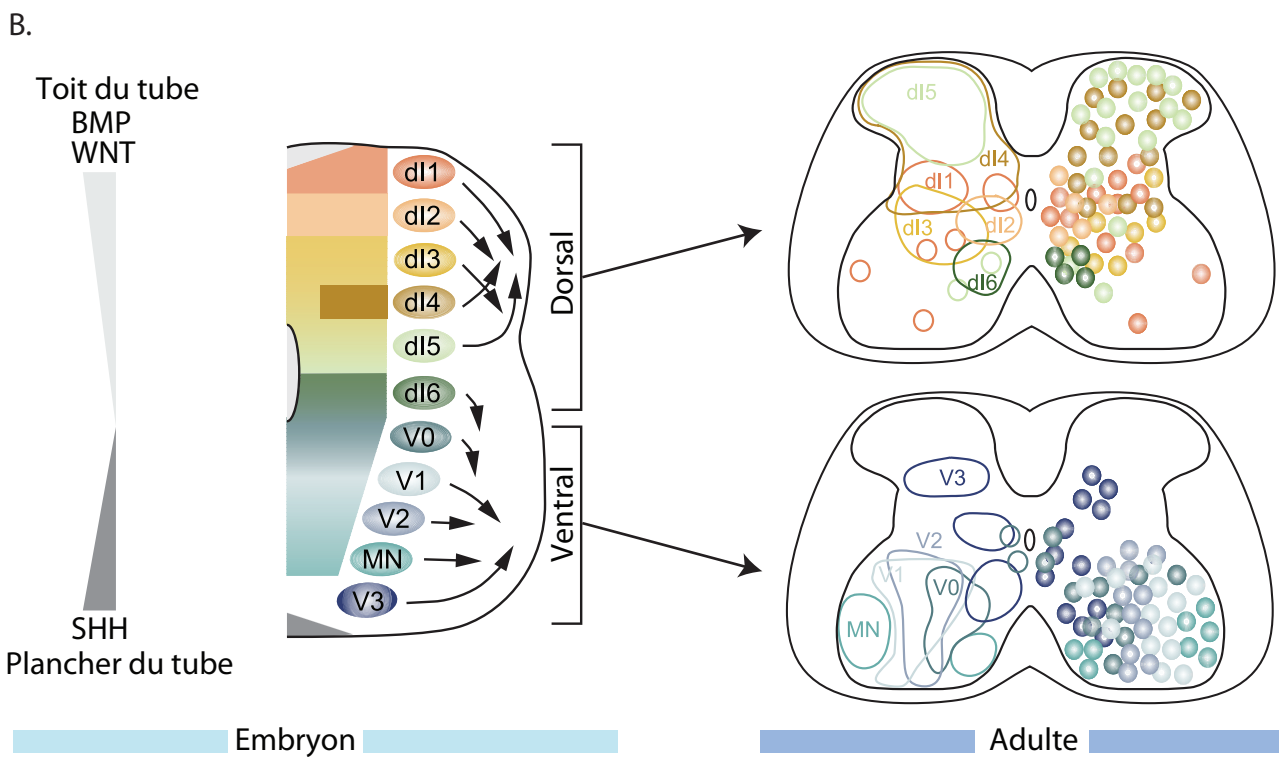
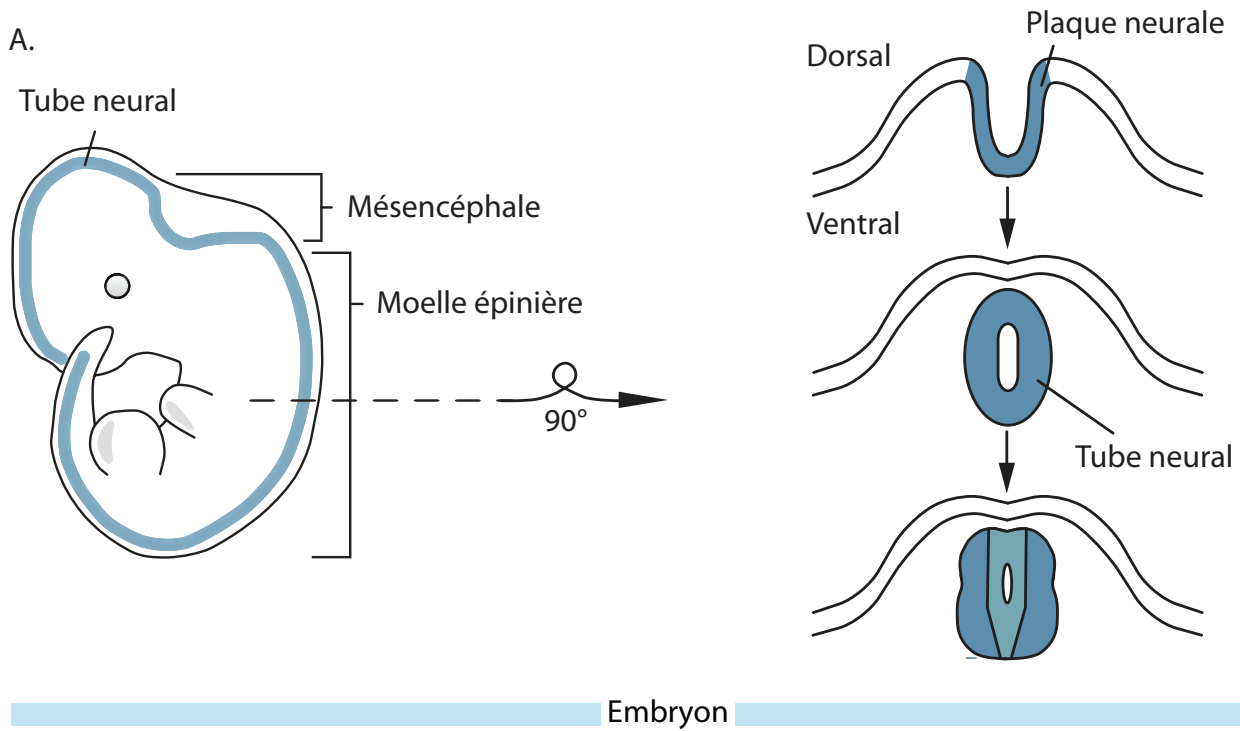


Figure 2. Développement embryonnaire de la moelle épinière

**A.** Lors du développement du tube neural, l'invagination de la plaque neurale se ferme, permettant la formation du tube neural, qui deviendra le système nerveux central, et dans sa partie caudale, la moelle épinière. **B.** Différenciation des différents types cellulaires grâce à la mise en place de gradients protéiques de SHH, BMPs et WNT, qui contrôleront l'expression des facteurs de transcription. Cette différenciation est suivie d'une migration des populations vers une organisation non linéaire (Modifié d'après Lai et al 2016).

**SHH:** Sonic Hedgehog, **BMPs:** Bone Morphogenetic Protein

« queue de cheval » de la moelle épinière. Pour ces raisons, Il est donc nécessaire de bien connaître les repères anatomiques lors de manipulations chirurgicales de la moelle (Figure 3).

### 2.3. *Laminae*

La matière grise de la moelle épinière contient des populations cellulaires morphologiquement très hétérogènes. Elle a pourtant une organisation intrinsèque en couches appelées laminae de Rexed (Rexed 1952, Rexed 1954), différenciables principalement par la cytoarchitecture des neurones (forme, taille du corps cellulaire, densité de neurones...) (Todd 2010) (Figure 4).

La vision classique de la division anatomo-fonctionnelle de la moelle est la suivante :

La **corne dorsale** est formée des laminae I à VI et constitue une zone de convergence et d'intégration des informations sensorielles provenant de la périphérie d'une part, mais aussi de structures cérébrales via des projections descendantes. C'est aussi de cette corne que part une grande partie des projections ascendantes en direction du diencephale et du mésencéphale, faisant état de la situation du corps dans son environnement direct.

La **corne intermédiaire** est constituée des laminae VII et X, qui comprennent en grande partie des neurones à fonction autonome, innervant les viscères.

Enfin, la **corne ventrale** est formée des laminae VIII et IX contenant notamment les neurones modulateurs de la sortie motrice, et les effecteurs de sa commande, les motoneurones.

Ces considérations sont en outre liées à la présence à proximité des cornes ventrales et dorsales de leurs racines respectives, aux rôles moteurs et sensoriels. Cependant lorsqu'on regarde les études plus en détail, on peut constater que cette vision est très simplifiée et que les fonctions sensorielles et motrices sont tellement intriquées et interdépendantes dans la moelle, qu'il est parfois difficile de considérer une réelle division anatomique des fonctions.

### 2.4. *Motoneurones*

Les motoneurones sont les neurones de dernier ordre de la commande motrice, puisqu'ils sont ceux qui innervent directement les muscles. Ils expriment la Choline AcetylTransférase



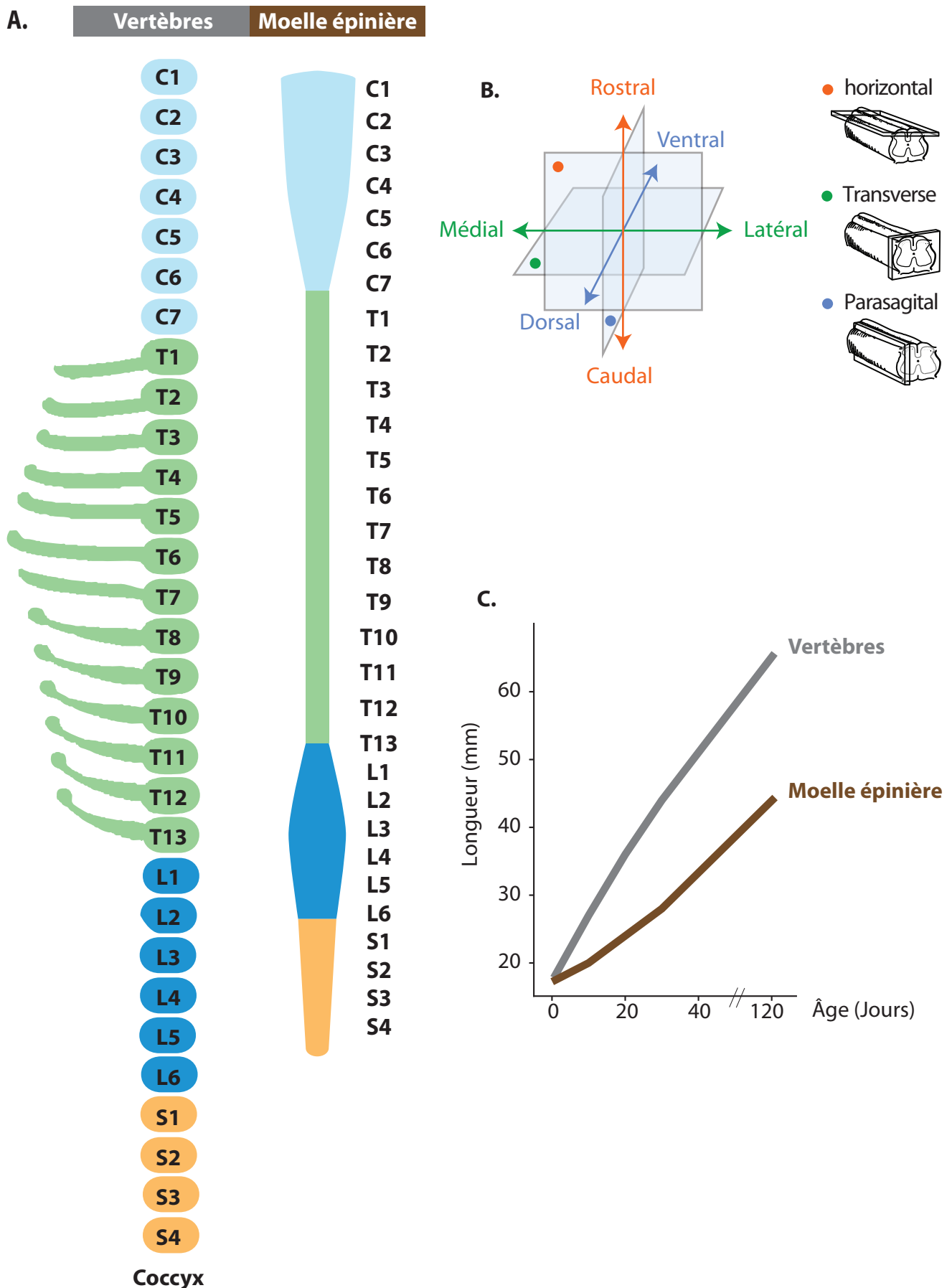


Figure 3. Repères anatomiques spinaux

**A.** Représentation de la localisation des segments spinaux par rapport aux vertèbres (Adapté de «*Vertebral Classification in Human and Mouse*», LifeMap Discovery - LifeMap Sciences). **B.** Axes et plans utilisés pour décrire la moelle épinière. **C.** Croissance comparative de la moelle épinière et de la colonne vertébrale, expliquant le décalage illustré en **A.** (adapté de Sakla et al 1969).

C: Cervical, T: Thoracique, L: Lombaire, S: Sacral

(ChAT), enzyme de synthèse de l'acétylcholine, leur neurotransmetteur principal. Ils forment des groupes fonctionnels, localisés en majorité dans les segments cervicaux et lombaires pour ce qui est de l'innervation des membres antérieurs et postérieurs respectivement. Leurs axones sortent de la moelle par les racines ventrales, voyagent ensemble dans un nerf avec ceux innervant les mêmes groupes musculaires et se séparent du nerf commun pour rejoindre leur muscle cible. Ces nerfs peuvent être moteurs purs, sensoriels purs, ou mixtes. Les motoneurones innervant les muscles et leur permettant de les contracter sont appelés les motoneurones alpha. Il en existe plusieurs types (Figure 1) :

- Les motoneurones lents, de type S (pour « slow ») sont des petits motoneurones, avec une vitesse de conduction (VC) relativement lente. Ils innervent principalement les fibres musculaires de type *I*.
- Les motoneurones rapides de type F (pour « fast »), plus rapides, peuvent être résistants (FR) ou fatigables (FF) et innervant respectivement les fibres musculaires *IIa* et *IIb*. Ils possèdent quant à eux des corps cellulaires de grande taille.

Cette diversité de taille permet une variation dans la vitesse de recrutement. En effet, suivant la loi d'Ohm, puisque les motoneurones à petits corps cellulaires ont une plus forte résistance, ils seront plus facilement activés que ceux à grand corps cellulaire, jouant non seulement sur la vitesse de conduction du message, sa durée, mais aussi et surtout sur la séquence d'activation des motoneurones (Enoka & Pearson 2013).

Ainsi, la force de contraction du muscle dépend non seulement du recrutement des unités motrices mais aussi du type de muscles recrutés et de la fréquence de décharge du motoneurone.

Il existe d'autres types de motoneurones, les motoneurones beta et gamma. Ces motoneurones innervent, en plus du muscle (beta), ou uniquement (gamma), les fibres intra-fusales, permettant un bon ajustement de l'étirement du muscle. En effet, la contraction des fibres intra-fusales en réponse à l'activation du motoneurone gamma, n'est généralement pas suffisante pour déclencher la contraction du muscle, mais elle l'est pour augmenter la décharge des fibres sensorielles *Ia*, et ainsi ajuster la sensibilité des motoneurones alpha. Ce système permet d'agir comme un comparateur entre l'étirement effectif du muscle, et celui attendu et provoqué dans le fuseau (Figure 5) .

**A.**



**B.**

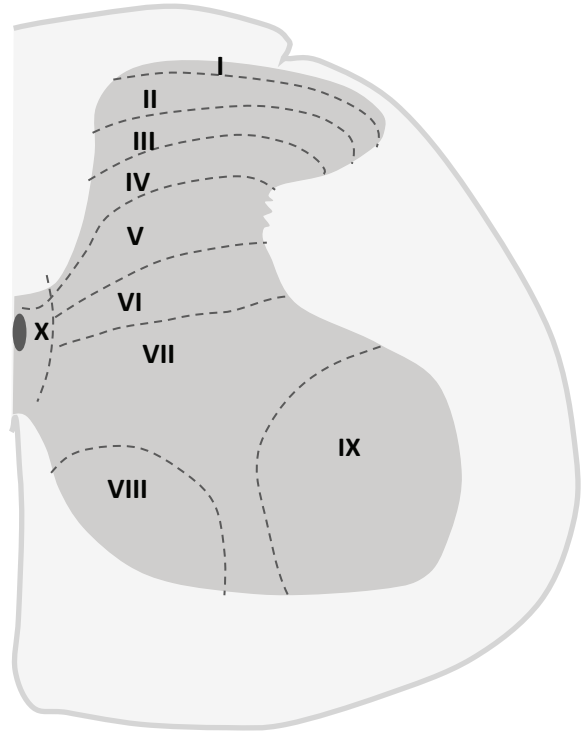


Figure 4. Lamination de la moelle épinière

**A.** Section transverse de la moelle lombaire de rat avec un marquage NeuN ciblant les neurones. Les séparations entre différentes laminae sont visibles grâce aux lignes en pointillé (Modifié d'après Todd, 2010). **B.** Représentation schématique de la section et des laminae. (Echelles non fournies)

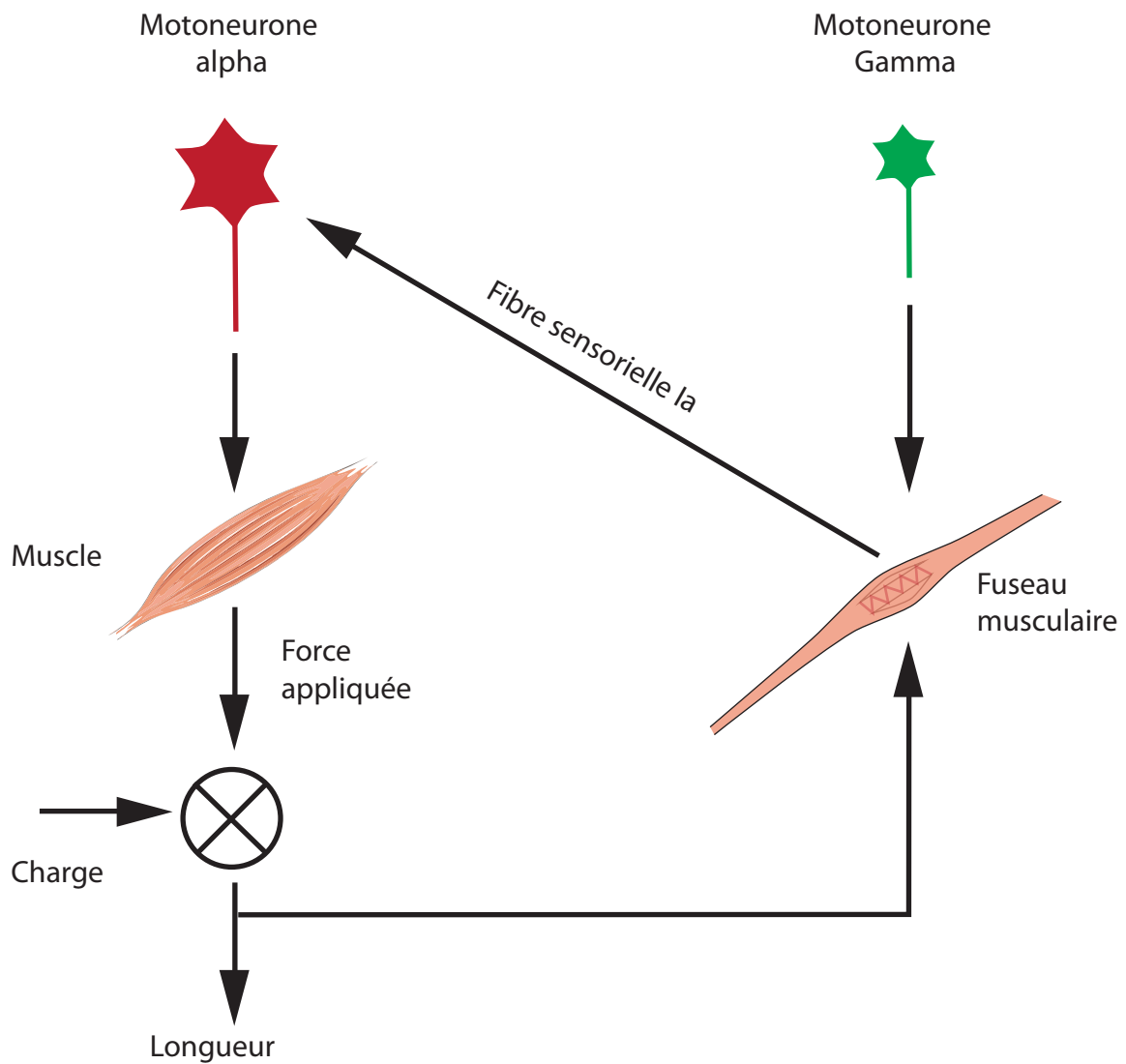
## 2.5. Retours sensoriels

Sherrington a été l'un des premiers à distinguer trois fonctions majeures du système sensoriel (Enoka & Pearson 2013, Gardner & Johnson 2013). Il différencie les informations proprioceptives (qu'il qualifie de « sens profonds »), extéroceptives (« sens superficiels ») et intéroceptives (« sens viscéraux »). Lorsque les récepteurs périphériques sont stimulés, que ce soit dans un contexte actif (suite à un mouvement) ou passif (action de l'environnement), ils génèrent un message qui est acheminé vers la moelle épinière par les fibres sensorielles primaires dont les corps cellulaires se situent dans les ganglions rachidiens dorsaux (DRGs) (Figure 6). Ces fibres ont différents seuils d'activation, ainsi que différents diamètres, degrés de myélinisation et vitesses de conduction du signal, et, en fonction de la spécialisation de leurs terminaisons périphériques, elles vont être amenées à encoder différentes modalités sensorielles (plus de détails dans (Roudaut et al 2012)). Je ne présenterai ici que les retours sensoriels tactiles et proprioceptifs, sans parler des autres sens spéciaux tels que l'ouïe, l'audition ou l'équilibre qui peuvent eux aussi participer au mouvement, mais dont les messages ne transitent pas par la moelle épinière.

- Retours cutanés

Des récepteurs se situent sur notre peau et permettent d'informer le système nerveux central d'un contact et de le catégoriser. Ils peuvent apporter les informations sur la température (thermorécepteur) d'un l'objet, sa consistance (mécanorécepteur), sa dangerosité potentiel (nocicepteur) ou encore la présence de certaines molécules (chémorécepteur). Les fibres nociceptives ou à haut seuil, sont faiblement ou non myélinisées (respectivement A $\delta$  et C) et ont la vitesse de conduction la plus faible (4 - 30 m/s). Ces petites fibres, contactent notamment les neurones des couches les plus superficielles (*I* et *II*) de la corne dorsale.

Les fibres non nociceptives, fortement myélinisées avec une vitesse de conduction plus élevée (30 – 100 m/s) font synapse dans des couches plus profondes de la corne dorsale. Les fibres A $\beta$  transmettent majoritairement des messages cutanés bas seuil, transduits de divers mécanorécepteurs et sont indicatifs de différents paramètres tels que le toucher léger, l'étirement de la peau, les vibrations etc. Ces informations sont directement envoyées dans



**Figure 5. Fonction des motoneurones**

Représentation schématique des fonctions des motoneurones  $\alpha$  et  $\gamma$ . Les motoneurones  $\alpha$  contactent les fibres musculaires et provoquent la contraction du muscle et l'application de la force voulue sur un objet d'une certaine charge. Cette contraction mène à l'étirement des fibres intra-fusales. Les motoneurones  $\gamma$  peuvent déclencher conjointement la contraction de ces fibres intra-fusales afin d'augmenter la décharge des fibres Ia et d'ajuster la décharge des motoneurones  $\alpha$  (Modifié d'après Kandel et al 2013).

les noyaux supra-spinaux gracile et cunéiforme en passant par leurs faisceaux homonymes, tout en laissant des collatérales contactant les interneurons spinaux.

- **Neurones cibles d'informations cutanées**

Les populations neuronales recevant les informations sensorielles, et particulièrement cutanées à haut seuil ont été extensivement étudiées. Ces travaux ont permis l'identification de nombreuses populations sur la base de leur morphologie (Maxwell et al 2007), ou de l'expression de certains gènes et de leur localisation (Abraira et al 2017). Ces populations de neurones, et les informations sensorielles cutanées qu'ils reçoivent ont leur rôle à jouer dans la bonne exécution du mouvement. Ils peuvent être directement impliqués dans les circuits moteurs spinaux (voir chapitre [Réflexes](#)), ou plus indirectement, par les informations qu'ils envoient aux structures supra-spinales dédiées, par l'intermédiaire des neurones de projection ([Figure 6](#)).

L'importance des retours sensoriels issus des mécanorécepteurs a été démontrée chez l'homme (Choi et al 2016), notamment dans des exercices de force et de précision lors de tâches qui nécessitent de saisir des objets (Witney et al 2004). En effet, ils peuvent être impliqués dans des réflexes cutanés (voir chapitre [Réflexes](#)), par leurs contacts directs ou indirects sur les motoneurones. Chez les rongeurs, la délétion de certaines populations comme les neurones dl3 de la corne dorsale profonde provoque une baisse de performance dans des tâches demandant de la force et de la dextérité, comme celle de la grille inversée, ou de l'échelle horizontale (Bui et al 2013). De plus, la délétion des neurones vGluT3, recevant eux aussi des informations cutanées de bas seuil impacte la capacité de relâcher sa nourriture lorsque la souris l'a apportée à sa bouche, soulignant là aussi un défaut dans la précision de la force à appliquer sur un objet (Ueno et al 2018).

- **Retours proprioceptifs**

La proprioception ou « sens de soi » est en quelque sorte notre sixième sens. Elle est à l'origine de la sensation que l'on a d'habiter son corps (Tuthill & Azim 2018). Il s'agit de l'ensemble des informations sensorielles qui nous permettent de situer notre corps dans l'espace, de connaître la position de nos membres, et ainsi d'ajuster notre position lors d'un

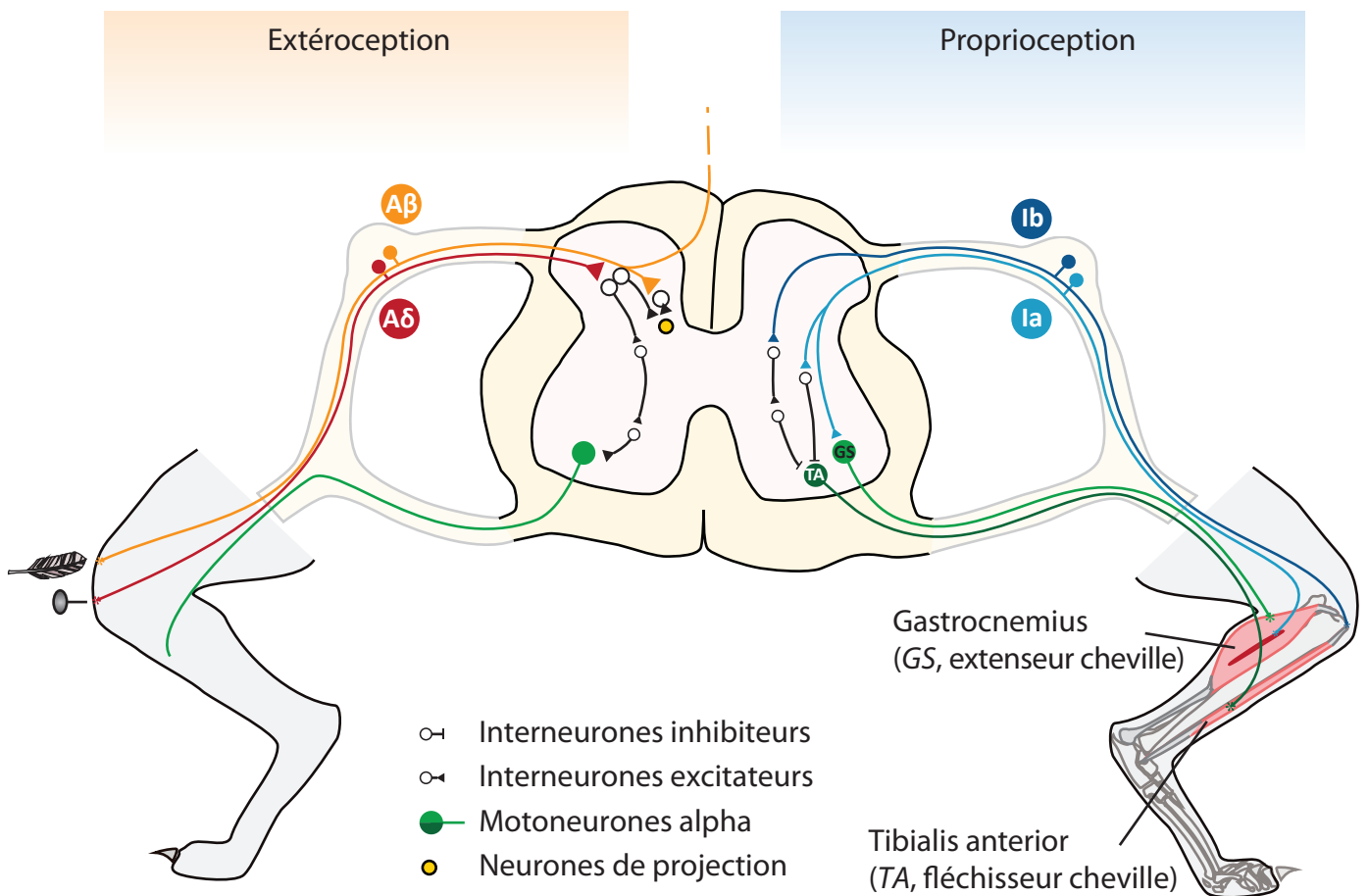


Figure 6. Retours sensoriels

Représentation schématique des retours cutanés ( $A\beta$  et  $A\delta/C$ ) et proprioceptifs (Ia et Ib), et des circuits contactés au sein de la moelle épinière chez la souris (Modifié d'après Côté et al 2018). Les fibres  $A\beta$  (orange) apportent les informations du toucher léger (non nociceptif), vers les centres supra-spinaux, et laissent une collatérale vers le circuit spinal et les neurones de projection. Les fibres  $A\delta$  (rouge) apportent les informations nociceptives vers les interneurones spinaux, et peuvent contacter les motoneurones  $\alpha$  par un circuit indirect. Les fibres proprioceptives participent au circuit de l'inhibition réciproque : les fibres Ia (bleu clair) contactent les interneurones Ia inhibiteurs ou les motoneurones directement, tandis que les fibres Ib (bleu foncé) contactent les motoneurones via un circuit indirect inhibiteur (voies réflexes détaillées dans la figure 8).

mouvement ou au repos. Une grande diversité de récepteurs participe à cette fonction, tels que des récepteurs dans la rétine ou encore nos récepteurs cutanées, mais classiquement, le terme de propriocepteur est utilisé pour parler des récepteurs des muscles et des tendons. Les fibres A $\alpha$  (*Ia* et *Ib* et *II*) véhiculent la majorité des messages proprioceptifs provenant des fibres du fuseau musculaire et de l'OTG. Ces messages terminent dans la corne dorsale profonde ainsi que dans la corne ventrale et contactent pour la plupart directement ou indirectement des motoneurones (Jankowska 1992) (Figure 6). Toutes ces informations sensorielles provenant des muscles et des tendons, s'ajoutent à celles provenant de la peau, et permettent d'ajuster continuellement la décharge des interneurones spinaux engagés dans le contrôle du mouvement. En plus de cet effet « à l'étage spinal » sur les motoneurones, ces informations sur l'état du corps sont aussi intégrées au niveau spinal puis, si nécessaire, envoyées aux centres supra-spinaux. Elles sont transmises notamment jusqu'aux aires corticales sensorielles, grâce aux voies ascendantes des cordons dorsaux, pour une intégration supplémentaire de l'information, voire même une interprétation consciente (Gardner & Johnson 2013), mais aussi en grande partie vers le cervelet, via le tractus spinocérébelleux (Eccles et al 1961). Les retours proprioceptifs sont essentiels pour la régulation de la locomotion, puisqu'ils entraînent les circuits locomoteurs et permettent ainsi de déclencher le pas chez des chats spinalisés (Akay 2020, Kriellaars et al 1994, Pearson et al 1992). En outre, chez les souris, lorsque ces retours sensoriels ne sont pas fonctionnels, par exemple suite à la mutation du gène *Egr3* (early growth response 3) affectant spécifiquement les fibres *Ia/II*, le mouvement locomoteur est dégradé (Akay et al 2014). Ces retours proprioceptifs ont aussi un potentiel thérapeutique important, puisqu'ils semblent nécessaires à la récupération du mouvement à la suite d'une contusion de la moelle épinière (Takeoka & Arber 2019).

- Neurones cibles d'information proprioceptives

Les interneurones spinaux peuvent recevoir des informations provenant des fibres sensorielles proprioceptives et sont alors généralement qualifiés d'interneurones du groupe *I* (a ou b) ou *II* selon la nature de ces afférences. Ces neurones participent principalement au relai de l'information sensorielle aux motoneurones afin de réaliser différents types de réflexes (voir chapitre [Réflexes](#)), et ainsi de réguler les mouvements. Ils sont aussi la cible d'informations convergentes provenant des structures supra-spinales ce qui permet un degré supplémentaire de modulation (Voir chapitre [Contrôle supra-spinal](#)).



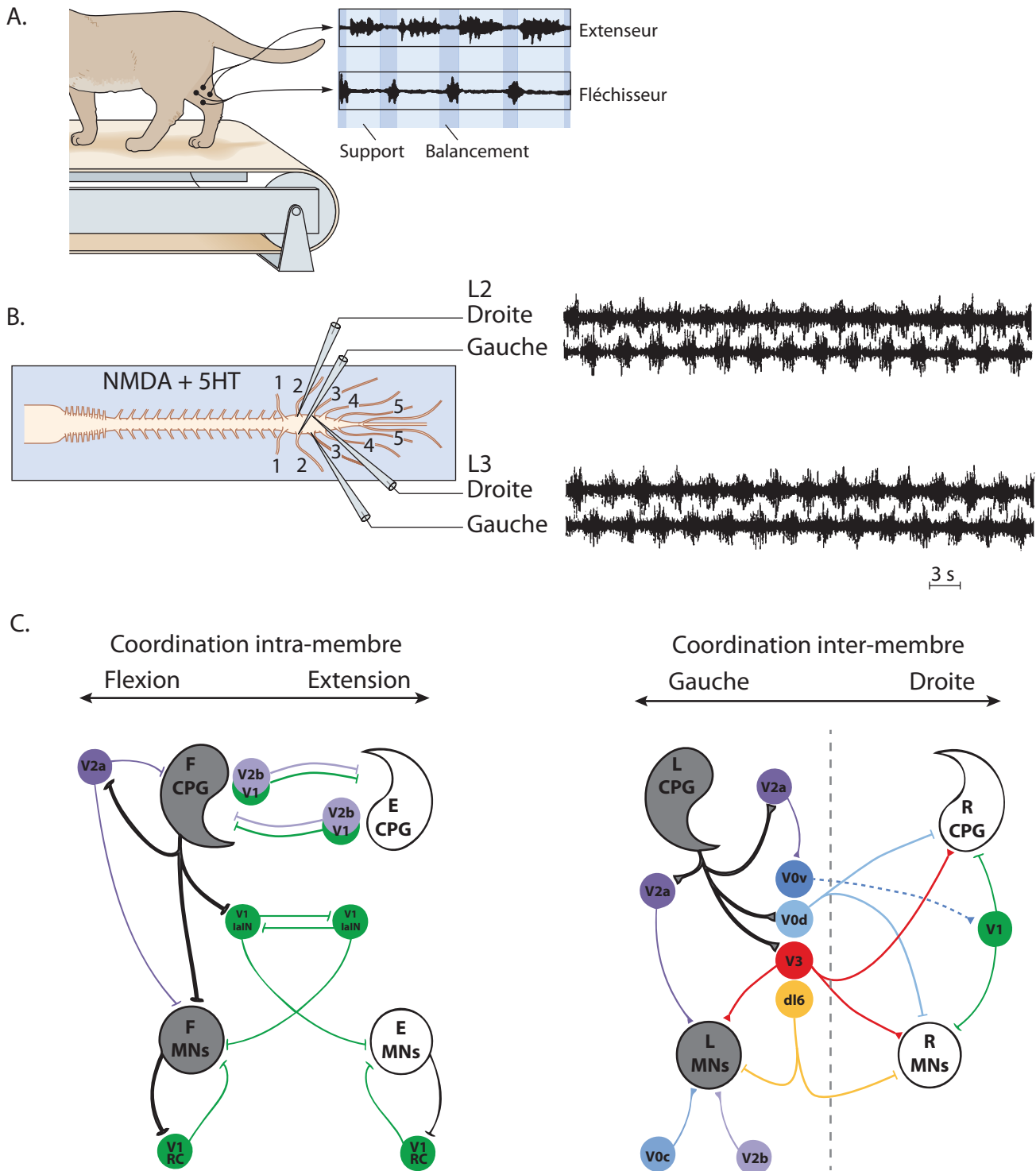
Comme indiqué précédemment, les fibres afférentes proprioceptives ciblent aussi des populations qui permettent de relayer l'information dans les structures supra-spinales. Les neurones spinocérébelleux dorsaux (dSC), retrouvés au niveau des colonnes de Clarke représentent une partie importante de ces neurones relais. Leur rôle serait de recevoir des informations sensorielles proprioceptives provenant des fuseaux neuromusculaires ainsi que des OTG afin de préparer puis d'envoyer dans le circuit supra-spinal une représentation globale des muscles, utilisée pour la bonne élaboration du mouvement (Bosco & Poppele 2001).

Les retours sensoriels qu'ils soient cutanés ou proprioceptifs sont donc essentiels à l'élaboration normale des mouvements, grâce à leur capacité de réguler la coordination, et les tâches qui requièrent de la précision.

## *2.6. Circuit pré-moteur*

- Principe de fonctionnement des Générateurs Centraux de Patron

Les Générateurs Centraux de Patron (CPGs) locomoteur sont des circuits de neurones dont l'activité est auto-entretenu, permettant la génération d'une décharge rythmée des neurones moteurs et dont l'action consiste à exciter ou inhiber sélectivement des groupes de muscles pour entraîner un mouvement stéréotypé (locomotion, mastication...) (Figure 7). Ils jouissent d'une grande autonomie, et peuvent à eux seuls, lorsqu'ils sont entraînés pharmacologiquement par de la L-Dopa, de la sérotonine (5-HT) et des agonistes glutamatergiques (NMDA), maintenir une activité rythmique mesurée au niveau des racines ventrales, nerfs moteurs ou muscles pouvant s'apparenter à celle enregistrée lors d'une locomotion normale (Grillner & Zangger 1979, Karadimas et al 2019, Liu et al 2009, Zagoraiou et al 2009). On parle alors de « locomotion fictive » ou de « locomotor like activity ». Malgré cette autonomie, les CPGs nécessitent d'être entraînés et ajustés au cours du mouvement et lorsque des changements ont lieu dans l'environnement (Grillner 2006, Grillner & Jessell 2009).



**Figure 7. Générateurs Centraux de Patron**

**A.** Illustration de l'activité rythmique des muscles et de l'alternance des extenseurs et des fléchisseurs lors de la locomotion du chat sur un tapis roulant. **B.** (gauche) Enregistrement de la locomotion fictive en mesurant la décharge des motoneurones (via les racines ventrales) de la moelle épinière en présence de NMDA et 5HT. (droite) Mesure de la décharge rythmique et alternée des motoneurones (Modifié d'après Kandel et al 2013). **C.** Représentation schématique du circuit d'interneurones d'origine développementale ventrale impliqué dans la coordination des muscles d'un membre (gauche) ou des différents membres entre eux (droite). Les projections démontrées expérimentalement sont illustrées par une ligne continue et les connectivités prédites par des lignes discontinues (Modifié d'après Côté et al 2018).

**CPG:** Générateurs Centraux de Patron, **MN:** Motoneurone, **L:** Left, **R:** Right, **F:** Flexion, **E:** Extension

Les afférences nécessaires à l'entraînement et l'ajustement de ces circuits proviennent alors en grande partie des noyaux moteurs du tronc cérébral, du cortex et des entrées sensorielles (Whelan 1996).

Ces CPGs interagissent avec la circuiterie des interneurons spinaux, qui permet de coordonner l'activité des différents segments et des membres opposés pendant la locomotion. Dans le cas des mouvements non stéréotypés, qui ne nécessitent pas l'action des CPGs, différentes familles d'interneurones interviennent pour transmettre les commandes motrices et sensorielles convergeant de différents centres supra-spinaux (discutés dans le chapitre « [Contrôle supra-spinal du mouvement](#) »).

- Interneurones des circuits moteurs

Il existe une grande variété d'interneurones spinaux qui permettent de transmettre et moduler la commande motrice (Brownstone & Bui 2010), que ce soit en relayant des informations sensorielles périphériques ou des informations sensorielles et motrices descendantes. Pour mieux comprendre l'organisation des circuits spinaux, ces interneurons ont été partagés en deux catégories en fonction de leur localisation dorso-ventrale au cours du développement embryonnaire. Ces catégories sont elles-mêmes divisées en 6 classes dans lesquelles les neurones ont été distribués en fonction de leur expression de certains facteurs de transcription embryonnaires. Une des deux catégories regroupe les neurones ayant une origine développementale dorsale, constituée des classes dl1 à dl6 ; l'autre catégorie regroupe les neurones d'origine développementale ventrale, constituée des classes V0, V1, V2 et V3 (Alaynick et al 2011, Goulding 2009) ([Figure 2](#)). Il est généralement considéré que les neurones impliqués dans la fonction motrice ou en relation étroite avec les réseaux des CPGs sont les interneurons provenant de la catégorie des neurones d'origine ventrale d'une part, et des classes dl6 et dl3 d'autre part (Alaynick et al 2011). Afin de pouvoir synchroniser ou désynchroniser différents groupes de muscles, ils peuvent projeter à distance en traversant la ligne médiane ou les différents segments ([Figure 7C](#)).

Les interneurons **proprio-spinaux** ont pour caractéristique de prendre origine dans la moelle épinière, de projeter dans un segment différent de celui de son corps cellulaire (Flynn et al 2011). La fonction de ces proprio-spinaux est d'associer fonctionnellement plusieurs segments spinaux en formant des connexions avec des neurones positionnés rostralement ou

caudalement (Miller et al 1975), et de distribuer l'information motrice provenant de structures supra-spinales aux différents segments spinaux et notamment aux motoneurones (Laliberte et al 2019, Zaporozhets et al 2011). L'implication de ces neurones dans les fonctions motrices a été démontrée, que ce soit par leur connexion directe avec les motoneurones (Ni et al 2014), ou par leur rôle dans différentes tâches comportementales. Leur rôle s'étend de la motricité fine, jusqu'à la coordination entre membres et au maintien de la posture, que ce soit dans des situations physiologiques ou pathologiques.

Chez le chat, les neurones proprio-spinaux situés dans les segments C3-C4 ont été mis en évidence grâce à leur rôle dans des tâches de motricité fine, telles que l'extension de la patte pour atteindre une cible (Alstermark et al 2007, Alstermark et al 1981). Chez le singe, ils sont similairement impliqués dans la dextérité du mouvement de la main (Tohyama et al 2017). De plus, certains de ces neurones possèdent des axones connectant les segments cervicaux et lombaires en passant par les cordons ventro-latéraux. L'association fréquente des segments cervicaux caudaux avec les segments lombaires rostraux (Nathan et al 1996, Reed et al 2006, Reed et al 2009) laisse penser qu'ils pourraient participer au maintien de la posture (Delwaide et al 1977), et à la régulation de la coordination des CPGs lombaires et cervicaux lors de tâches locomotrices (Brockett et al 2013, Cowley et al 2010, Dietz 2002). Ces neurones sont donc d'une importance capitale dans la physiologie motrice. Ils semblent de plus impliqués dans les processus de rétablissement à la suite de lésions partielles de la moelle épinière. En effet, ils sont soupçonnés d'être des acteurs de la rémission spontanée (Flynn et al 2011, Laliberte et al 2019) pouvant être observée dans ces conditions pathologiques et sont ainsi étudiés de près en tant que potentielle cible de traitement (Courtine et al 2009, Courtine et al 2008).

Les interneurones proprio-spinaux peuvent traverser un nombre variable de segments rostralement ou caudalement, et sont donc classés en deux sous populations : les « short range », qui ne projettent pas plus loin qu'un segment et demi au-delà de celui où se situe le soma, et les « long range » qui projettent à des distances supérieures (Conta & Stelzner). D'autre part, ils peuvent être **commissuraux**, c'est-à-dire qu'ils peuvent posséder des axones qui traversent la ligne médiane pour contacter des circuits controlatéraux (Stokke et al 2002). Certains groupes de neurones pré-moteurs ne possèdent même qu'exclusivement des projections controlatérales (Stepien et al 2010), ce qui indique un rôle probable dans la

coordination entre l'hémicorps gauche et le droit. Parmi ces neurones proprio-spinaux commissuraux, les interneurons de la sous-classe V2a exprimant le facteur de transcription ChX10 (Ni et al 2014) ont été particulièrement étudiés. Cette classe a été identifiée dans plusieurs espèces, comme le poisson zèbre (Eklof-Ljunggren et al 2012, Ljunggren et al 2014) ou encore la souris. Ils sont excitateurs, et soupçonnés de participer à l'alternance gauche droite des pattes (Crone et al 2008), principalement lors de vitesses de déplacement élevées. En effet, chez la souris, leur délétion spécifique (ciblant les neurones ChX10) par la toxine diphtérique, génère un déficit dans la locomotion rapide (85cm/s, 3 fois leur rythme normal). Dans ce cas, plutôt que de simplement accélérer leur allure normale, les souris désynchronisent leur pas (Crone et al 2009). Cette délétion des neurones ChX10 a également mis en évidence le rôle de la famille de neurones V2a dans les mouvements fins, puisque les souris peinent à réaliser une trajectoire appropriée vers leur cible avec leurs pattes avant (Azim et al 2014). Le même phénomène est observé lors de l'inhibition pharmacologique aiguë et spécifique des ChX10 (par la technique de DREADD). Les souris ont là aussi une baisse de performance dans une tâche de mouvement de la patte vers une cible (Ueno et al 2018).

## *2.6. Réflexes*

La moelle épinière est loin de n'être qu'un simple relai de l'information vers les noyaux supra-spinaux. L'une des fonctions essentielles qu'elle est capable de réaliser indépendamment du cerveau est le réflexe. C'est Descartes qui donne son nom aux réflexes en s'inspirant de la réflexion de la lumière pour décrire la transformation sensorimotrice. Dans ce cas, le rayon incident est l'information sensorielle et le rayon réfléchi est la conséquence motrice (Windhorst 2007). En 1906, Sherrington propose que ce réflexe spinal, défini comme un mouvement automatique simple et stéréotypé provoqué par la stimulation de récepteurs de la peau ou de ceux du muscle, soit considéré comme l'unité de base du mouvement et que les mouvements complexes ne soient souvent qu'une combinaison de réflexes. Cette vision n'a pas été conservée car il a été démontré plus tard que d'autres mouvements peuvent avoir lieu sans la présence de stimulus sensoriels, bien qu'il existe des fonctions telles que la locomotion, qui peuvent exister uniquement grâce aux entrées sensorielles, et donc sont bien issues d'une combinaison de réflexes (Shumway-Cook & Woollacott 2007). On considère qu'un réflexe est spinal lorsqu'il persiste après transection complète de la moelle épinière.

Après des siècles d'étude, on comprend que les réflexes n'ont rien de simple, qu'ils peuvent être profondément élaborés et complexes, car ils sont finement modulés par les voies descendantes (Eccles & Lundberg 1959, Lundberg 1964). Ils sont d'une utilité majeure dans les conditions physiologiques, et ils servent d'excellents témoins de l'intégrité du réseau neuronal dans un contexte clinique. Les réflexes consistent en l'activation des fibres sensorielles primaires qui vont transmettre l'information à des groupes de motoneurones directement ou en passant par des chaînes d'interneurones (plus ou moins courtes en fonction de la nature du signal afférent) inhibiteurs ou excitateurs, provoquant une transformation sensori-motrice et ainsi, l'activation des muscles permettant le mouvement attendu et l'inhibition des muscles antagonistes (muscle s'opposant au mouvement attendu). Ces réflexes ont une fonction protectrice essentielle, illustrée par les réflexes nociceptifs qui vont permettre d'éviter le danger en déclenchant le retrait rapide du membre exposé. L'amplitude du mouvement réalisé est proportionnelle à l'intensité du stimulus et permet un déplacement suffisant pour éviter le stimulus nociceptif, sans pour autant faire perdre l'équilibre ou générer un mouvement exagéré. Par exemple, si l'on marche sur un clou, les petites fibres A $\delta$  transmettront l'information aux motoneurones fléchisseurs de la jambe concernée pour l'éloigner du clou, tout en inhibant les muscles extenseurs antagonistes. En plus, afin de garder l'équilibre, le réflexe d'extension croisée est déclenché grâce aux fibres sensorielles qui contactent des interneurones commissuraux, permettant l'activation des motoneurones innervant les extenseurs de la jambe controlatérale et l'inhibition de ceux en charge de sa flexion (Figure 8A). D'autres fibres cutanées peuvent également être à l'origine de réflexes mono et pluri-synaptiques. Par exemple, la stimulation de fibres à bas seuils dans des nerfs strictement cutanés comme le nerf sural ou le nerf radial superficiel, induisent un réflexe qui semble impliqué dans la réalisation de mouvement demandant force et précision (Bui et al 2013, Drew & Rossignol 1987, Witney et al 2004). Ces réflexes jouent aussi un rôle dans la régulation de la locomotion et sont différentiellement modulés de manière phase-dépendante (LaBella et al 1992).

D'autres réflexes sans fonction protectrice impliquent des fibres proprioceptives et peuvent avoir une fonction de maintien de posture, voire permettre, lors des mouvements automatiques ou volontaires, de réguler la position du corps en fonction des changements induits par le mouvement. Un exemple très étudié de ce type de réflexe est le réflexe

Fig8

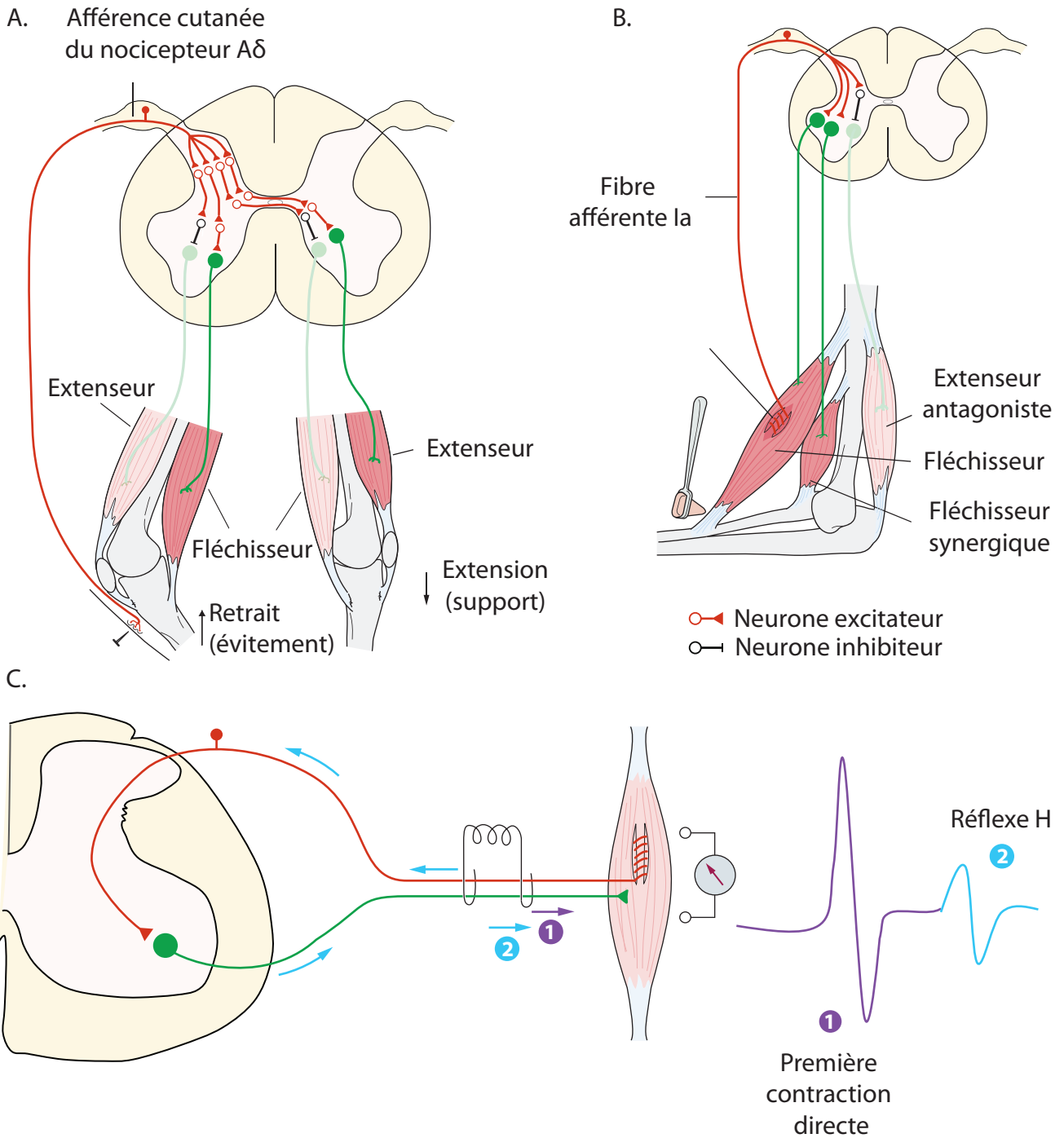


Figure 8. Réflexes

**A.** Illustration du réflexe poly-synaptique. Les fibres sensorielles A $\delta$  activent un circuit excitateur poly-synaptique permettant la flexion de la jambe ayant subi une stimulation nociceptive, et un autre permettant l'extension de la jambe controlatérale. En parallèle, ces fibres activent un circuit inhibiteur des muscles antagonistes. **B.** Illustration du réflexe myotatique. Les fibres sensorielles des fibres intrafusales activent un circuit excitateur monosynaptique permettant l'activation des fléchisseurs de la jambe ayant subi une stimulation au niveau du tendon, alors qu'un circuit di-synaptique inhibiteur permet l'inhibition des muscles antagonistes. **C.** Illustration du réflexe H ou de Hoffman. Ce réflexe est déclenché par la stimulation électrique d'un nerf mixte. Cette stimulation active directement les fibres motrices, générant une première contraction directe du muscle innervé, et active en parallèle les fibres sensorielles qui généreront une seconde contraction du muscle retardée, car le signal emprunte le circuit spinal du réflexe myotatique (Modifié d'après Kandel et al 2013).

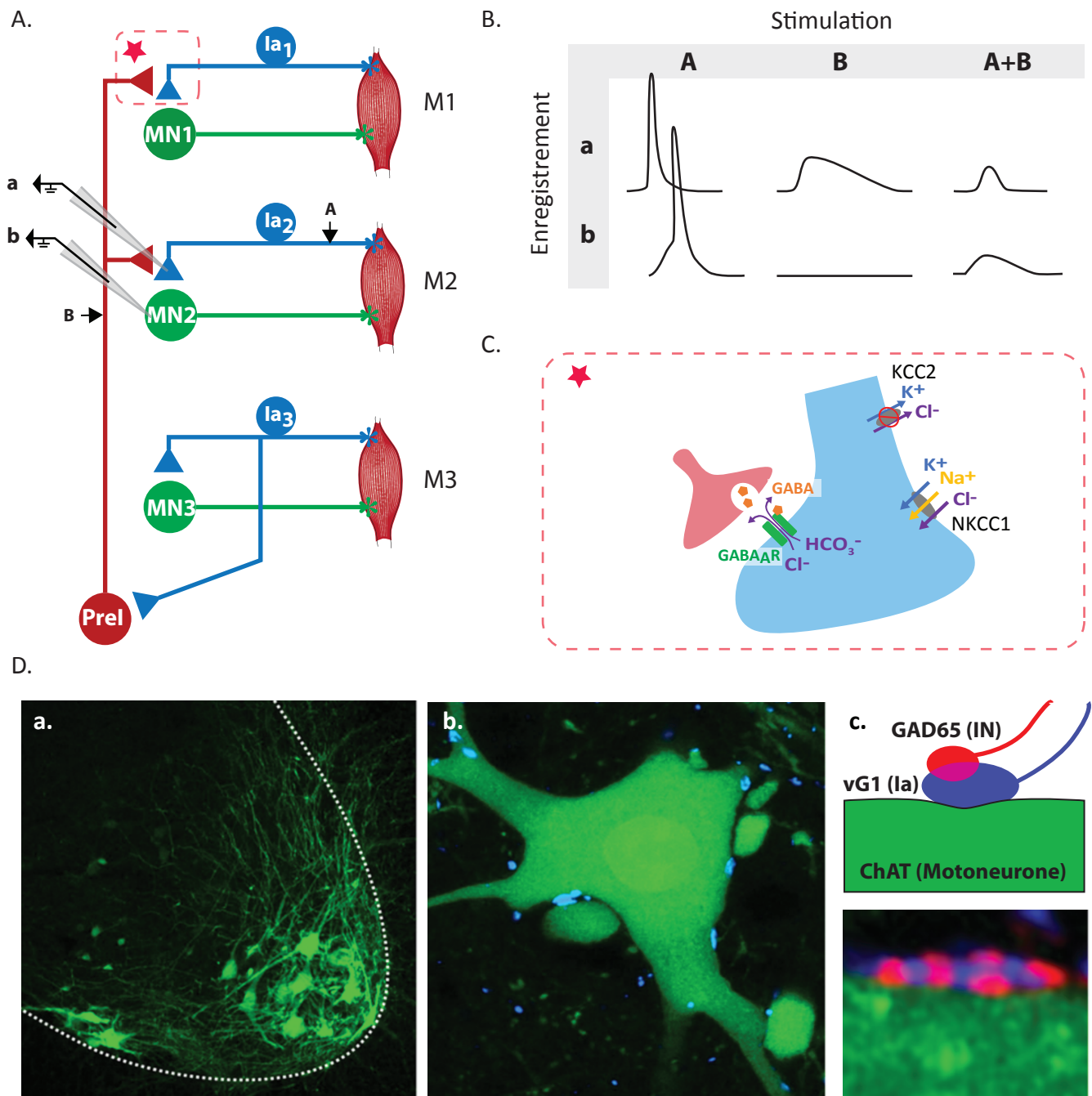
myotatique (ou « stretch reflex »). Il s'agit d'un réflexe monosynaptique, dans le sens où les fibres sensorielles proprioceptives *Ia* impliquées excitent directement le motoneurone alpha innervant le muscle étiré sans passer par un interneurone. De son côté, l'inhibition réciproque du muscle antagoniste est médiée par un interneurone inhibiteur (interneurone *Ia*) (Eccles & Lundberg 1958) (Figure 8B). Ce réflexe proprioceptif est mesurable chez les humains, les singes, mais aussi les rongeurs grâce à la mesure du réflexe de Hoffman, ou « réflexe H ». Cette technique consiste à enregistrer par électromyographie (EMG) un muscle lors de la stimulation du nerf mixte qui l'innerve. Une telle stimulation provoquera une première contraction directe du muscle mesuré, par propagation orthodromique du signal électrique, puis une deuxième (le réflexe H), retardée de quelques ms (4-5ms) liée à l'activation des fibres sensorielles, et ainsi au déclenchement d'un réflexe monosynaptique (Figure 8C) (Kandel et al 2013).

Effectivement, bien que par définition autonome, les réflexes peuvent être affinés par des centres régulateurs supra-spinaux (voir chapitre [contrôle supra-spinal](#)) (Eccles & Lundberg 1959, Lundberg 1964). Ils peuvent être inhibés ou facilités et cela à différents niveaux de chaque boucle, grâce à des contacts des neurones à projections descendantes sur un ou plusieurs des acteurs du réflexe. Les interneurones *Ia* impliqués dans le réflexe myotatique sont par exemple la cible d'informations différentielles (excitatrices et inhibitrices en fonction de leur cibles) supra-spinales directes ou indirectes convergeant du noyau vestibulaire et pluri-synaptiques provenant du noyau rouge, et du cortex (Hultborn et al 1976).

### 2.7. Inhibition des fibres afférentes primaires

Les retours sensoriels peuvent aussi être modulés localement au niveau spinal par des informations sensorielles provenant d'autres parties du corps, plus ou moins distantes de la zone modulée. En effet, les entrées sensorielles proprioceptives ou cutanées, provenant d'un muscle ou de la peau, peuvent moduler les entrées sensorielles d'un autre muscle (Figure 9A, B). Cela a lieu en inhibant de manière présynaptique la transmission des informations sensorielles, directement au niveau de l'entrée des fibres dans la moelle, donc avant la première synapse du système nerveux central. La première description d'inhibition présynaptique des fibres afférentes primaires a été réalisée par Frank et Fuortes en 1957. En





**Figure 9. Physiologie de la PAD**

**A.** Illustration de la connectivité des circuits engendrant une PAD par l'activation de fibres afférentes adjacentes. Dans cet exemple, la fibre afférente Ia3 inhibe les entrées Ia1 et Ia2 par l'intermédiaire d'un interneurone présumé GABAergique exerçant une inhibition présynaptique (Prel). A et B représentent les sites de stimulation utilisés pour le tableau **B**, et a et b, les sites d'enregistrement intracellulaires. **B.** Tableau théorique représentant les effets de la stimulation des sites A, B ou A et B, ainsi que les conséquences enregistrées sur les sites a et b. (Modifié d'après McComas, 2016). **C.** Illustration de l'effet subcellulaire de l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> par les Prel sur des fibres afférentes primaires. L'absence d'expression de KCC2 mène à un gradient de concentration tel que l'activation des GABA<sub>A</sub> donne lieu à un efflux de chlorure. **D.** Motoneurons ChAT::GFP+ (en vert) (a) ainsi qu'une vue rapprochée avec l'apposition de terminaisons vGlut1 (ou VG1 en bleu) (b). Organisation de l'inhibition présynaptique par l'interneurone Prel sur des terminaisons Ia (c en haut) et vue réelle en microscopie de cette architecture (c en bas) (Modifié d'après Betley et al 2009). (L'article ne fournit pas les échelles)

**MN:** Motoneurone, **Prel:** Interneurone de l'inhibition présynaptique, **IN:** Interneurone, **M:** Muscle

effet, ils constatent qu'une stimulation du nerf d'un fléchisseur entraîne une réduction des potentiels post synaptiques excitateurs (PPSE) reçus par le nerf du muscle extenseur gastrocnémien (GS) lors de la stimulation de ses entrées sensorielles. Il a été conclu qu'il s'agissait bien d'une inhibition des fibres afférentes et non une inhibition post synaptique des motoneurones, car ils n'ont observé aucune modification des potentiels post synaptiques inhibiteurs (PPSI) reçus par les motoneurones du GS pendant la stimulation du nerf du fléchisseur, ni du signal transmis lors de la stimulation directe du motoneurone. Cette théorie a été confirmée plus tard par d'autres (Eccles J. C. 1961, Wall 1958).

- Mécanisme de l'inhibition présynaptique

L'inhibition présynaptique des fibres afférentes primaires repose principalement sur les transmissions GABAergiques. Les récepteurs canaux GABA<sub>A</sub> sont perméables aux ions chlorures (et bicarbonates). La concentration intracellulaire en ions chlorures est donc un paramètre essentiel déterminant la force motrice et ainsi la puissance de l'inhibition. Durant le développement, la plupart des neurones subit un changement au niveau de l'expression du cotransporteur Potassium (K<sup>+</sup>) /Chlorure (Cl<sup>-</sup>) (KCC2) (Wang et al 2002). L'augmentation de l'expression du KCC2 à la membrane va générer une baisse de la concentration de Cl<sup>-</sup> dans les neurones, et ainsi une diminution de son potentiel d'équilibre (jusqu'à environ -60mV). De ce fait, dans la plupart des neurones chez l'adulte, l'ouverture d'un canal Cl<sup>-</sup>, provoque son entrée dans la cellule, et ainsi une hyperpolarisation de la membrane (Rivera et al 1999). Dans les fibres afférentes primaires, ce changement n'a pas lieu et l'ARN de KCC2 n'est pas retrouvé au niveau des DRGs (Kanaka et al 2001). De ce fait, le potentiel d'équilibre du Cl<sup>-</sup> reste élevé (environ -30mV), l'ouverture des canaux Cl<sup>-</sup> au niveau de ces fibres a pour effet la sortie d'ions Cl<sup>-</sup> et l'activation des récepteurs GABA sur ces neurones dépolarise la membrane (Figure 9C) (Cattaert et al 1992, Rudomin 1990, Rudomin & Schmidt 1999).

L'inhibition présynaptique des fibres afférentes primaires est essentiellement basée sur l'apposition axo-axonique d'une terminaison GABAergique sur l'axone d'une fibre afférente. Cette apposition a été démontrée chez de nombreuses espèces vertébrées et invertébrées (Betley et al 2009, Cattaert & El Manira 1999, Cattaert et al 1992, Lamotte d'incamps et al 1998, Wang-Bennett & Glantz 1985, Watson et al 1991). Chez la souris, 90%

des terminaisons sensorielles (proprioceptives) sur des motoneurons reçoivent des synapses provenant des neurones GABAergiques GAD2 (ou GAD65) (Figure 9D) (Betley et al 2009).

Il a été observé que l'effet dépolarisant de ces synapses GABAergiques sur les fibres afférentes primaires donne lieu à une atténuation du signal sensoriel transmis aux neurones cibles et à l'inhibition présynaptique mesurée. Cette inhibition est relativement longue, puisqu'elle peut durer entre 200 et 1000ms (Côté et al 2018, Eccles J. C. 1961, Eccles et al 1962). Elle permet de diminuer l'amplitude des potentiels d'action (PA) qui voyagent à travers l'axone inhibé, et il est considéré chez les vertébrés que si le PA est diminué jusqu'à des valeurs proches de 90 mV ou moins, cela permet une diminution significative, voire une suppression totale (avec un PA en dessous de 50 mV) des neurotransmetteurs libérés à la synapse, et ainsi une diminution de l'amplitude des PPSE observés ou leur disparition dans le neurone postsynaptique (Graham & Redman 1994).

L'hypothèse actuelle dominante est que l'interneurone GABAergique est lui-même sous le contrôle d'au moins un interneurone excitateur, appelé « interneurone de premier ordre ». Cet interneurone serait la cible d'informations périphériques d'une part, et descendantes d'autre part (Rudomin & Schmidt 1999, Tahayori & Koceja 2012).

Il est aussi intéressant de noter que certains suggèrent l'existence de mécanismes indépendants des interneurones GABAergique (Hochman et al 2010). En effet, la proximité structurale entre les récepteurs GABAergiques, glycinergiques, nicotiniques et sérotoninergiques (5HT3) laisse supposer qu'un potentiel croisement de l'effet des drogues testées est possible. Hochman et ses collaborateurs suspectent principalement l'existence d'une action nicotinique sur les fibres afférentes primaires. Cette hypothèse est étayée par l'existence de contacts cholinergiques sur certaines fibres afférentes primaires (Ribeiro-Da-Silva & Cuello 1990), ainsi que de sites de liaison à l'alpha bungarotoxine (antagoniste nicotinique) sur les fibres à larges diamètres (bas seuil). Ces fibres se terminent d'autre part, à proximité d'un large plexus de fibres cholinergiques et d'une population de neurones potentiellement source de ce plexus (Mesnage et al 2011, Pawlowski et al 2013).

- **Shunt vs inactivation**

Deux hypothèses coexistent pour expliquer l'impact inhibiteur de la dépolarisation des fibres afférentes primaires (PAD). La première est que la longue dépolarisation induite par la PAD provoquerait l'inactivation des canaux  $\text{Na}^+$  voltage dépendants, ce qui s'opposerait à la conduction des PAs provenant de la périphérie. La seconde explication qui est essentiellement préférée est que l'ouverture des canaux  $\text{Cl}^-$  au niveau de la synapse GABAergique induirait un « shunt », c'est à dire une importante baisse de la résistance membranaire, là aussi s'opposant au passage des PAs. Des expériences réalisées chez la langouste, sur des préparations *ex vivo*, vont dans le sens d'un mécanisme de shunt des PAs, plutôt que de l'inactivation des canaux sodium. En effet, la simple dépolarisation des fibres sensorielles (n'impliquant alors que l'ouverture des canaux voltages dépendants), à une intensité équivalente à celle générée par les PADs de plus faible intensité, n'affecte pas l'amplitude des PA provenant de la périphérie (Cattaert & El Manira 1999). Au contraire, l'application locale de GABA provoque une baisse de résistance d'accès jusqu'à 67%, ainsi qu'une réduction d'amplitude des PA de 75% (Cattaert et al 1992). Les PADs de plus grandes amplitudes seraient de leur côté potentiellement capables d'induire une inactivation des canaux  $\text{Na}^+$  voltage dépendants en plus du shunt par l'activation des récepteurs GABA perméables au chlore.

D'autres mécanismes, que je ne détaillerai pas, sont soupçonnés d'être à l'origine ou de participer à l'inhibition présynaptique, sans impliquer la dépolarisation des fibres. Par exemple, bien que plutôt contesté par des expériences de pharmacologie consistant à bloquer spécifiquement les récepteurs  $\text{GABA}_A$  ou  $\text{GABA}_B$  (Stuart & Redman 1992), il est supposé que ce type d'inhibition pourrait être généré par les récepteurs  $\text{GABA}_B$ , par l'intermédiaire de protéines G, provoquant l'inhibition de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage dépendants et ainsi une réduction de la libération des neurotransmetteurs (Graham & Redman 1994, Rudomin & Schmidt 1999, Walmsley et al 1995).

- Rôle de la PAD

La PAD, permettant l'inhibition présynaptique des fibres sensorielles est suspectée d'avoir plusieurs rôles, plus largement détaillés dans la revue de McComas (McComas 2016) :

- **Au niveau des réflexes et des mouvements automatiques**

Grace aux contacts des fibres sensorielles sur des populations neuronales impliquées dans les voies réflexes, l'inhibition présynaptique peut jouer un rôle dans la diminution ou la suppression de ces réflexes qui pourraient, s'ils ne sont pas contrôlés, interférer avec les mouvements en cours. En effet, la perte de cette inhibition est l'une des principales causes suspectées dans l'apparition de spasticités dans des pathologies atteignant les contrôles descendants (Burke & Ashby 1971). De plus, pour le mouvement automatique de locomotion, il semble aussi y avoir une relation étroite avec les mécanismes d'inhibition présynaptiques. En effet, chez les chats décérébrés, certaines phases des mouvements de locomotion fictive sont accompagnées d'une modulation de la PAD au niveau des afférences cutanées et musculaires (Duenas & Rudomin 1988, Gossard et al 1990). Cette PAD liée à la locomotion est générée par plusieurs sources telles que les retours sensoriels, les circuits des CPGs et les contrôles descendants (Rossignol et al 2006).

- **Pendant les mouvements volontaires :**

La PAD a aussi son rôle à jouer dans les mouvements volontaires. Là aussi, elle aurait un rôle de prévention de la perturbation de ces mouvements par le déclenchement intempestif de réflexes. Et en effet, lors de la phase active d'un mouvement volontaire chez le primate, il a été montré qu'une stimulation d'un nerf cutané (le nerf radial superficiel), provoque une moindre décharge des interneurons spinaux localisés à la proximité de la terminaison centrale des fibres contenues par le nerf, par rapport à une stimulation effectuée au repos. De plus, le test d'excitabilité de Wall (Wall 1958), consistant à mesurer l'augmentation du seuil d'excitabilité des fibres afférentes (due à leur dépolarisation par la PAD), permet aux auteurs d'arriver à une conclusion similaire : les fibres sensorielles sont dépolarisées pendant la phase active du mouvement volontaire (Seki et al 2003). Il s'agit de la première démonstration de l'existence de la PAD et de sa modulation chez un animal éveillé réalisant un mouvement volontaire. Cela permet de conclure qu'il existe une commande, initiée lors d'un mouvement volontaire dont le rôle serait de diminuer les signaux sensoriels générés par ce mouvement (la réafférence), afin d'éviter leurs interférences (Seki & Fetz 2012). L'absence de cette inhibition présynaptique au cours du mouvement a un impact réel sur la coordination du mouvement. En effet, lorsque les interneurons GABAergiques GAD2 des segments cervicaux (C3-T1) sont spécifiquement supprimés à l'aide de la toxine diphthérique, les souris ne sont plus

capables d'effectuer un mouvement coordonné vers une cible. Les auteurs observent une oscillation du membre qu'ils associent à la perte du contrôle des retours sensoriels (Fink et al 2014).

- **Au repos**

Enfin, au repos la PAD jouerait aussi un rôle, mais dans ce contexte, principalement au niveau des contrôles nociceptifs. La célèbre théorie du « *gate control* » (Mendell 2014, Meunier & Pierrot-Deseilligny 1989) par exemple est fortement basée sur l'existence d'inhibition présynaptique des informations à hauts ou bas seuils au niveau de leurs contacts avec les neurones de projections. Ce type de contrôle permet d'éviter que les circuits spinaux et leurs cibles supra-spinales soient surchargés d'informations, parfois même redondantes, qui pourraient être perçues à tort comme nociceptives. L'existence de PAD sur les fibres C à haut seuil permettant l'envoi ou non d'informations nociceptives vers les structures supra-spinales a également été démontrée (Moreno-Lopez et al 2013).

### III. Contrôle supra-spinal du mouvement

Bien que certains circuits spinaux moteurs puissent agir en autonomie des structures encéphaliques, leur action doit être initiée, stoppée et si nécessaire modulée. Diverses voies descendantes sont responsables de ce contrôle. Certaines structures ont des neurones qui projettent directement sur les interneurons spinaux, alors que d'autres participent de manière plus indirecte (Figure 10). Les différents segments spinaux peuvent recevoir des entrées spécifiques, puisqu'ils ont des fonctions différentes. C'est particulièrement vrai pour les rongeurs. Prenons par exemple leur segment cervical, en charge des tâches fines allant de l'extension du membre antérieur vers une cible jusqu'aux mouvements de préhension. Pour ces animaux quadrupèdes, ce segment doit recevoir de surcroît une innervation permettant le contrôle de la locomotion. De leur côté, leurs membres postérieurs ne sont pas capables de réaliser des mouvements de préhension. Le circuit lombaire aura donc besoin de recevoir des signaux descendants différents. Cependant ces contrôles descendants sont encore à l'étude et les informations sur leur rôle ne sont malheureusement pas toujours disponibles pour tous les segments et tous les types de tâches comportementales.

#### 1. Structures impliquées directement

Les structures que je considérerai dans cette section comme directement impliquées dans le contrôle supra-spinal du mouvement sont celles qui ont des projections directes vers les circuits spinaux et dont le rôle est de participer à l'exécution d'une tâche motrice, que ce soit en contactant les motoneurons directement ou via des interneurons spinaux. Je n'entrerai pas ici dans les détails concernant le cortex. Cette structure a été fondamentale dans mon projet, et un chapitre entier ([Cortex et motricité](#)) y sera donc dédié.

##### 1.1. Formation réticulée médullaire (MRF)

Cette formation, aussi appelée formation réticulée ponto-médullaire, rassemble plusieurs noyaux du tronc cérébral : les noyaux réticulés du pont et les noyaux réticulés gigantocellulaires et magnocellulaires (Kim et al 2017b). Il s'agit d'une structure connue pour

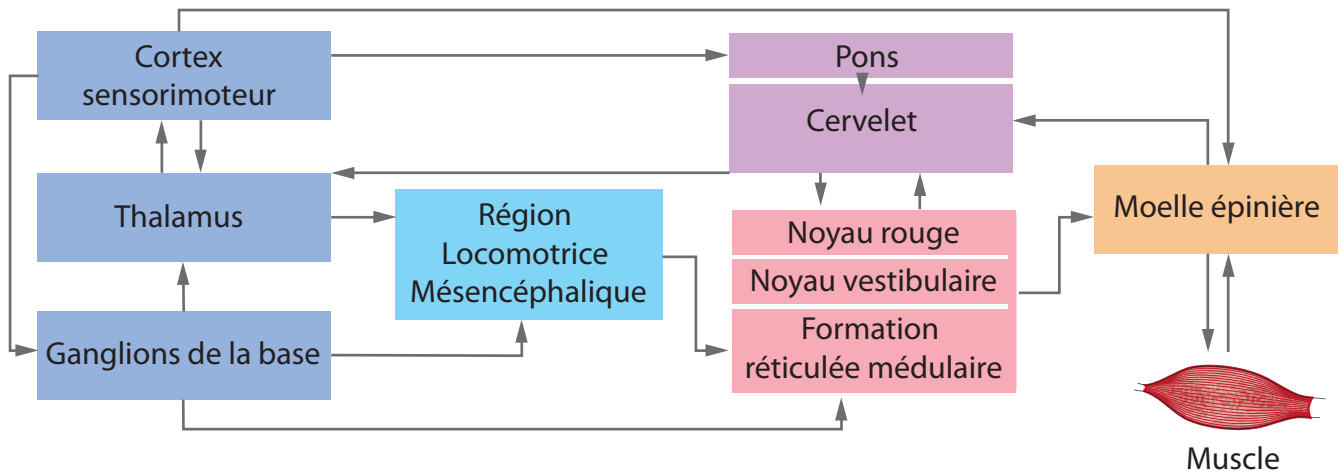


Figure 10. Voies supra-spinales de contrôle de la motricité

Schéma non exhaustif de la connectivité des structures du système nerveux central en charge du contrôle de la motricité telle qu'elle est globalement comprise actuellement. Certaines structures projettent directement vers les circuits spinaux tandis que d'autres exercent un contrôle plus indirect, en réalisant des relais vers d'autres centres moteurs. Les centres moteurs spinaux sont modulés par les retours sensoriels transmis par les fibres afférentes. Les circuits issus du tronc cérébral participent entre autre au maintien de l'équilibre et de la posture ainsi qu'à l'initiation et l'arrêt de la locomotion et sont sous contrôle du cortex, du thalamus et des ganglions de la base. Le cervelet permet la coordination des comportements moteurs en intégrant les retours sensoriels réels et prédits pour optimiser la réalisation de la tâche motrice, tandis que le cortex participe à son initiation et à son raffinement (Modifié d'après Goulding et al 2009).



sa capacité à initier la locomotion. En effet, chez le chat décérébré et sur des préparations *ex vivo* de tronc cérébral avec la moelle épinière de jeune rat, un train de stimulation électrique ou une activation pharmacologique de la MRF suffisent à déclencher une locomotion fictive (Garcia-Rill & Skinner 1987, Liu & Jordan 2005).

Cette région du tronc cérébral est aussi chargée de l'arrêt de la locomotion, et cela, via sa population de neurones glutamatergiques V2a (Chx10) (à ne pas confondre avec les interneurons proprio-spinaux du même nom et de la même lignée génétique Chx10, localisés dans la moelle épinière). En effet, l'activation spécifique de ces neurones par optogénétique bloque les circuits locomoteurs spinaux et la locomotion en cours (Bouvier et al 2015).

La partie ventrale de la formation réticulée médullaire (MdV) a la particularité de contenir des neurones prémoteurs, i.e. contactant directement des motoneurons des membres antérieurs et postérieurs. Cette région a donc été étudiée spécifiquement dans certains comportements moteurs de précision : l'ablation spécifique des neurones excitateurs glutamatergiques de la MdV par la toxine diphtérique a permis de démontrer leur implication dans des tâches de coordination motrice, telles que le Rotarod à vitesse incrémentielle, et des tâches de préhension d'objet (Esposito et al 2014).

L'activité des neurones de la MRF est soumise au contrôle d'autres structures motrices importantes, telles que le cortex, le noyau rouge (Esposito et al 2014) ou encore la région mésencéphalique locomotrice (Kim et al 2017b).

### *1.2. Noyau vestibulaire (VN)*

Les récepteurs sensoriels du système vestibulaire se situent dans l'oreille interne. Ils permettent d'apporter aux VNs des informations statiques et dynamiques. Les informations statiques détectent la position de la tête dans l'espace par rapport au plan horizontal afin d'ajuster la posture du corps. Les informations dynamiques, sont transmises par des capteurs d'accélération angulaire dont le but est de participer au maintien de l'équilibre pendant le mouvement.

En plus de ces informations sensorielles, les VNs échangent une grande quantité d'informations avec le cervelet (Barmack 2003). Ces interactions permettent d'ajuster la posture notamment dans le cas où la position de la tête prédite par le cervelet diffère de la position réelle. Ces noyaux reçoivent des entrées provenant des aires pré-motrices et

sensorielles du cortex. Cette convergence d'informations permet la modulation, en fonction du contexte, des réflexes vestibulaires (vestibulo-colique et vestibulo-oculaire) (MacKinnon 2018). En outre, les neurones vestibulaires peuvent contacter directement les motoneurones spinaux des membres antérieurs et postérieurs, avec une innervation préférentielle pour les motoneurones lombaires (Esposito et al 2014). Ils agissent principalement sur les muscles axiaux et les extenseurs afin d'ajuster l'équilibre lors des déplacements.

### *1.3. Noyau rouge (RN)*

Le noyau rouge est une structure située à cheval entre le diencephale et le mésencéphale et donc à l'entrée du tronc cérébral. Il se compose d'une partie magnocellulaire et d'une partie parvocellulaire. Il joue un rôle important dans la motricité grâce à son tractus rubro-spinal composé de neurones projetant sur des interneurones spinaux ainsi que directement sur les motoneurones cervicaux et lombaires (Esposito et al 2014). Les neurones rubro-spinaux sont globalement regroupés en fonction de leur site de projection (plutôt cervicaux ou lombaires), avec le groupe lombaire situé plus ventro-latéralement que le groupe cervical (Liang et al 2012). Cette structure reçoit principalement des entrées provenant du cervelet ainsi que du cortex sensori-moteur.

Les études fonctionnelles de cette structure montrent qu'elle a un rôle important dans le maintien de la posture et dans l'ajustement, exercé à travers le tractus rubro-spinal (Zelenin et al 2010). Ses fonctions sont cependant mesurables sur un champ très étendu de tâches comportementales. En effet, son activité a aussi été corrélée à des tâches qui vont de l'initiation du mouvement (Martin & Ghez 1988) à la locomotion (Lavoie & Trevor 2002) et au grattage (Arshavsky et al 1978), jusqu'au mouvement des muscles distaux et aux activités de préhension (Horn et al 2000, Morris et al 2015, Van Kan & Mccurdy 2000).

### *1.4. Cortex*

Le cortex est l'une des structures essentielles au contrôle descendant des circuits spinaux. Il contacte directement la moelle, mais aussi indirectement par des projections sur presque tous les noyaux moteurs mentionnés dans ce chapitre. En effet, il envoie des

messages aux neurones de la MRF, du RN, de la région mésencéphalique locomotrice, des ganglions de la base et du cervelet via les noyaux du pont.

Puisqu'il s'agit d'une structure clé du projet, je rentrerai dans plus de détails dans le chapitre [Cortex et motricité](#).

## 2. Structures impliquées indirectement

Dans cette section, je listerai et décrirai brièvement les structures indirectement impliquées dans le contrôle du mouvement. Il s'agit de celles dont le rôle principal est lié au mouvement et qui ne possèdent pas, ou seulement peu, de projections directes vers les circuits spinaux.

### 2.1. *Région mésencéphalique locomotrice (MLR)*

Cette région regroupe les noyaux pédonculo-pontins et cunéiformes. Il s'agit d'une région classiquement définie comme responsable du contrôle locomoteur (Kim et al 2017b). Elle semble régir l'initiation de la locomotion ainsi que la modulation de sa vitesse (Gatto & Goulding 2018, Ryczko & Dubuc 2013). En effet, la stimulation électrique de cette zone chez la souris permet l'initiation de la locomotion (Roseberry et al 2016), et cela à travers un relais sur la MRF, puisque l'ablation de cette deuxième empêche les effets décrits de la stimulation de la MLR (Noga et al 2003). En outre, chez les souris, des intensités de stimulations graduellement croissantes permettent l'augmentation de la vitesse de course (Caggiano et al 2018). Parmi les structures de sortie de la MLR, se trouvent le raphé magnus et le locus coeruleus. Ces deux structures agissent au niveau de la moelle épinière via des contrôles sérotonergiques ainsi que noradrenergiques, en facilitant l'auto-entretien des décharges motoneuronales (via des courants entrant persistants), qui participent au maintien de la posture pendant la locomotion. Ce contrôle serait aussi à l'origine du contrôle de l'excitabilité des CPGs (MacKinnon 2018).

Cette région reçoit des informations provenant de multiples structures, telles que le cortex, l'hypothalamus médial et latéral et les ganglions de la base. De ce fait, une hypothèse suggère que le rôle de la MLR pourrait être dans le choix du type de locomotion en fonction

du contexte et donc en fonction des messages reçus par ces différentes structures (exploration, défense...) (Ryczko & Dubuc 2013).

## *2.2. Ganglions de la base (GB)*

Les ganglions de la base sont constitués d'un ensemble de structures qui interagissent dans le but de sélectionner le type de locomotion approprié à effectuer (Grillner et al 2005). En effet, via la voie directe ou indirecte, ils peuvent soit activer soit inhiber les structures motrices en aval. De façon schématique, la voie directe mène à l'inhibition de la substance noire réticulée et du globus pallidus interne (les noyaux de sortie inhibiteurs des ganglions de la base), puis à la désinhibition de la structure motrice ciblée (thalamus, MLR) et ainsi à l'initiation du mouvement. A l'inverse, la voie indirecte recrute d'autres structures du circuit des ganglions de la base (globus pallidus externe et noyau subthalamique), menant à la désinhibition des voies de sorties inhibitrices et donc à l'inhibition des structures motrices cibles, s'opposant de ce fait au mouvement associé (Kravitz et al 2010, Ryczko & Dubuc 2013).

## *2.3. Cervelet*

La réalisation d'un mouvement coordonné est possible grâce aux retours sensoriels. En effet, il a été théorisé que le calcul de la commande motrice serait réalisé à partir du retour sensoriel attendu à la suite du mouvement, grâce au « **modèle inverse** », un programme neuronal supposément localisé dans le cervelet ([Figure 11](#)). En outre, l'action doit pouvoir être ajustée dans le cas où la commande motrice serait erronée. Les retours sensoriels permettent au système nerveux de détecter une telle erreur. Cependant si les centres commandant le mouvement devaient attendre le retour sensoriel pour l'ajuster, cela induirait un délai de correction trop important. Dans le cas des mouvements rapides, comme les saccades oculaires (Shadmehr et al 2010), le mouvement se termine avant l'arrivée des retours sensoriels. C'est à partir de ce constat que de nouvelles théories ont émergées. Pour pallier ce problème de délai, il existerait des réseaux de neurones qui permettent de prédire l'issue sensorielle d'une commande motrice (en effectuant une sorte de transformation sensori-motrice). Ainsi, ces retours prédits permettraient de mettre à jour la commande motrice sans attendre les retours réels. Et dans le cas des mouvements plus lents, ils pourraient, avec l'aide des retours réels, améliorer l'estimation de l'état du corps pour permettre des corrections

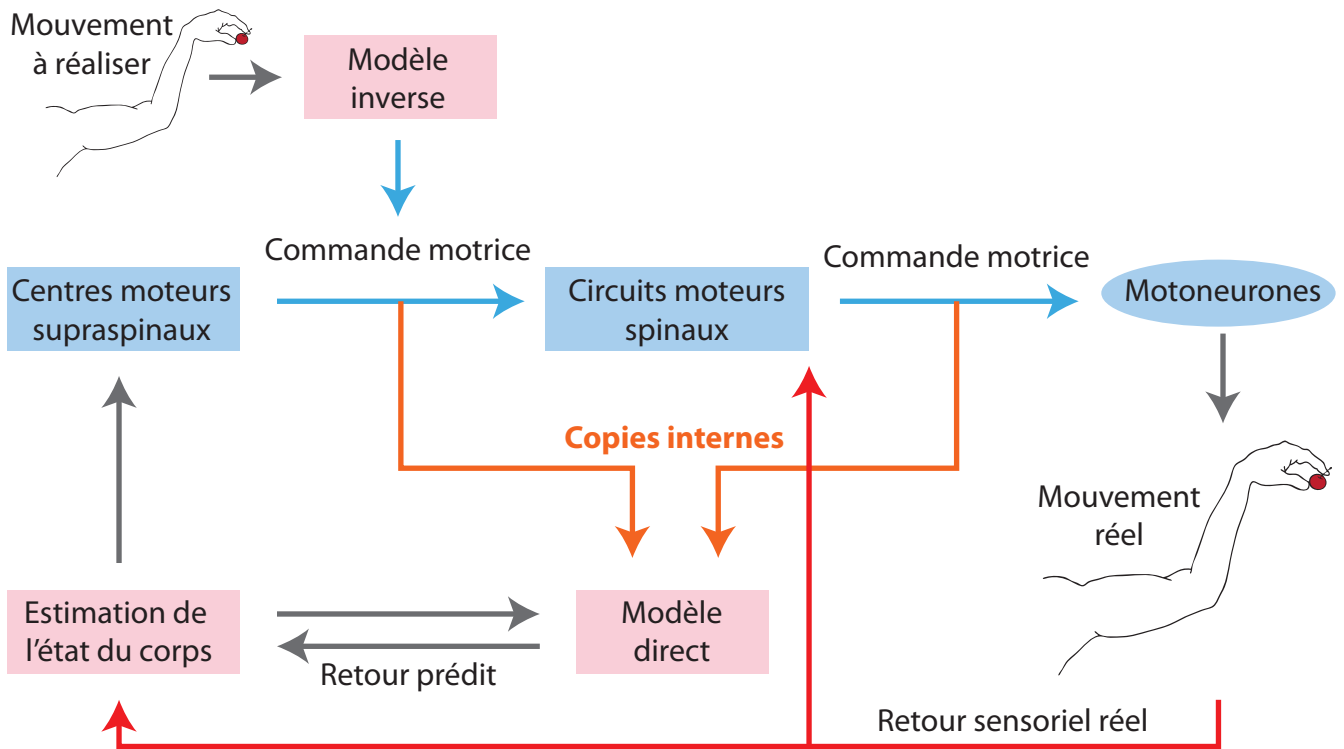


Figure 11. Modèles internes

Représentation d'un schéma putatif du fonctionnement des modèles internes directs et inverses et leur intégration dans le circuit de contrôle des mouvements. La commande motrice est générée par les centres moteurs supra-spinaux sur la base du modèle inverse, qui génère à partir de l'issue sensorielle attendue, une commande motrice appropriée. En temps réel, les retours sensoriels issus du mouvement réalisé vont guider les circuits moteurs et donner une estimation de l'état du corps suite à la commande. Ces retours, ainsi que la copie efférente de la commande motrice seront utilisés par le modèle direct pour générer une prédiction sensorielle, et ainsi optimiser et corriger, avec un délai réduit, les commandes motrices (Modifié d'après Azim & Alstermark 2015).

plus efficaces ([Figure 11](#)) (Azim & Alstermark 2015). Ce modèle de prédiction est appelé « **modèle direct** » (ou « forward model ») et peut être affiné avec l'entraînement.

Le cervelet est l'un des candidats à la réalisation de ces tâches, puisque qu'il est soupçonné de contenir les circuits sous-jacents aux deux modèles internes (Wolpert & Kawato 1998). Ces soupçons sont basés sur des preuves anatomiques et physiologiques (Wolpert et al 1998). Les neurones corticaux qui génèrent une commande motrice ont des collatérales capables de transmettre la « copie interne/efférente » ou « décharge corollaire » du message moteur, capable d'initier la prédiction des conséquences sensorielles d'une action. Ces collatérales contactent entre autres, via les fibres moussues après un relai dans les noyaux du pont, les circuits du cervelet. Cette structure constitue un lieu de convergence de cette copie interne et des retours sensoriels, et participerait ainsi à la génération d'une prédiction de l'état futur du corps, et ainsi des conséquences sensorielles de la commande motrice (Huang et al 2013). Ainsi, si le cervelet détecte une différence entre la prédiction et le retour sensoriel réel, une correction pourra être transmise par les noyaux profonds du cervelet puis aux centres moteurs qu'il contacte. Ces centres moteurs ciblés, à savoir essentiellement le thalamus, le noyau rouge et le tronc cérébral, intégreront ces instructions avec les informations sensori-motrices reçues par ailleurs afin d'exécuter un mouvement. Bien que ces structures relayant les instructions cérébelleuses soient les plus exhaustivement étudiées, certains travaux relatent l'existence d'une projection mineure mais directe cérébello-spinale jouant un rôle dans la performance et l'apprentissage moteur (Sathyamurthy et al 2020).

### 3. Contrôle via une modulation sensorielle

Comme expliqué dans les chapitres précédents, une composante essentielle à la bonne exécution du mouvement est l'analyse en direct des entrées sensorielles. Ces informations permettent à la fois de préparer un mouvement adapté à la situation, de le guider, et de le corriger au cours de son exécution en prenant en compte les résultats effectifs de la commande motrice.

Il existe des mécanismes permettant le filtrage différentiel des informations sensorielles, rassemblés sous le terme de « *sensori-gating* ». Un exemple concret illustrant ce principe est l'« effet cocktail party ». Il décrit notre capacité à concentrer notre attention sur une voix en particulier dans une ambiance bruyante. Pendant un mouvement, le principe est le même. Lorsqu'on réalise une action, un très grand nombre de récepteurs sensoriels est activé et beaucoup de ces informations peuvent être redondantes ou non essentielles à l'exécution correcte de la tâche réalisée. Dans ce cas, l'amplitude de ces signaux peut être réduite, voire supprimée, ce qui a pour conséquence d'augmenter la « visibilité » (ou gain relatif) des informations essentielles. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en œuvre dans le processus de « *sensori-gating* », tels que les inhibitions post-synaptiques classiques qui ont lieu à différents niveaux des voies sensorielles ascendantes. Il existe aussi des systèmes d'inhibition présynaptiques qui peuvent avoir lieu directement au niveau des fibres afférentes primaires (PAD), site d'entrée des informations sensorielles musculaires ou cutanées (voir section [inhibition des fibres](#)) ou même à des niveaux plus avancés dans la chaîne d'information. En effet, dans le cadre du mouvement, ces inhibitions peuvent avoir lieu dans diverses structures relayant les informations sensorielles jusqu'au cortex comme par exemple au niveau des noyaux cunéiformes (Andersen et al 1962a). Dans cette section, nous détaillerons essentiellement les contrôles sensoriels descendants qui sont effectués par l'intermédiaire de la PAD.

Comme expliqué dans la section [inhibition des fibres](#), la PAD peut être déclenchée localement par l'activation de fibres sensorielles adjacentes. En outre, il a été démontré que certaines structures de l'encéphale et du tronc cérébral sont capables de générer une PAD. En effet, autour des années 90, de multiples études ont été effectuées chez le chat sur ce sujet, grâce à la réalisation de stimulations de diverses structures en parallèle d'un enregistrement de la PAD sur différents types d'afférences (groupe I (a et b)). Ces enregistrements montrent une action différentielle des voies descendantes en fonction du type de fibres ciblé. En effet, les auteurs de cette étude ont démontré que la formation réticulée (RF) et le noyau du raphé magnus (NRM) sont capables de dépolariser les fibres afférentes primaires de type Ib, mais pas celles de type Ia. En outre pour ces dernières, lorsqu'une dépolarisation est provoquée par la stimulation du nerf du biceps semi-tendineux postérieur (BSP), la co-stimulation d'une de ces voies descendantes prend un caractère inhibiteur, et rapproche ainsi les valeurs

enregistrées du seuil de repos de la fibre enregistrée (Quevedo et al 1995) (Figure 12). Dans une autre étude, le noyau rouge a été stimulé lors de l'enregistrement de fibres *Ia*, *Ib* ou *II*. Là aussi, son rôle dépend de sa cible. Dans les fibres de types *Ia* et *Ib*, le noyau rouge peut déclencher une PAD, tandis qu'il n'aura aucun effet sur le type *II*. Son rôle peut aussi être différent au sein d'un même type de famille, puisqu'il peut (de même que la FR ou le NRM) s'opposer à la dépolarisation de certaines fibres *Ia*, induite par la stimulation du BSP (Jiménez et al 1988). En outre, le noyau vestibulaire a aussi la capacité de dépolariser les fibres afférentes de type *I* (Rudomin et al 1986). Enfin, le cortex fait partie des structures démontrées comme étant capables de générer une PAD, et cela chez le singe, (Abdelmoumène et al 1970), le chat (Andersen et al 1962b, Andersen et al 1963, Carpenter et al 1963), mais aussi le rat (Wall & Lidierth 1997).

#### 4. Cortex et motricité

Le rôle du cortex dans le mouvement est classiquement associé aux tâches volontaires. À la différence des actions réflexes pures, le mouvement volontaire survient à la suite d'une intention et ne nécessite pas d'être activé par un stimulus sensoriel. Une fois que l'objectif est déterminé, par exemple *\*attraper une tasse sur une table\**, il existe une quasi-infinité de mouvements possibles qui s'offre à nous. En effet, le mouvement volontaire n'est pas complètement stéréotypé. Le choix de la manière d'effectuer l'action peut dépendre d'une grande variété d'éléments: « *Dois-je me pencher ou me lever ? Y a-t-il des obstacles à éviter ? Ma main dominante est-elle libre ? Par quel côté attraper la tasse ? Sera-t-elle chaude ?...* » Tous ces éléments dépendent du contexte, capté par nos sens, et finalement d'une décision. Le cortex est divisé en plusieurs zones anatomiques et fonctionnelles, qui permettent d'intégrer toutes les informations nécessaires à la prise de décision et à l'élaboration d'un plan (cortex sensoriels et associatifs (préfrontal et pariétal)) et à l'exécution de la commande motrice (cortex moteur).



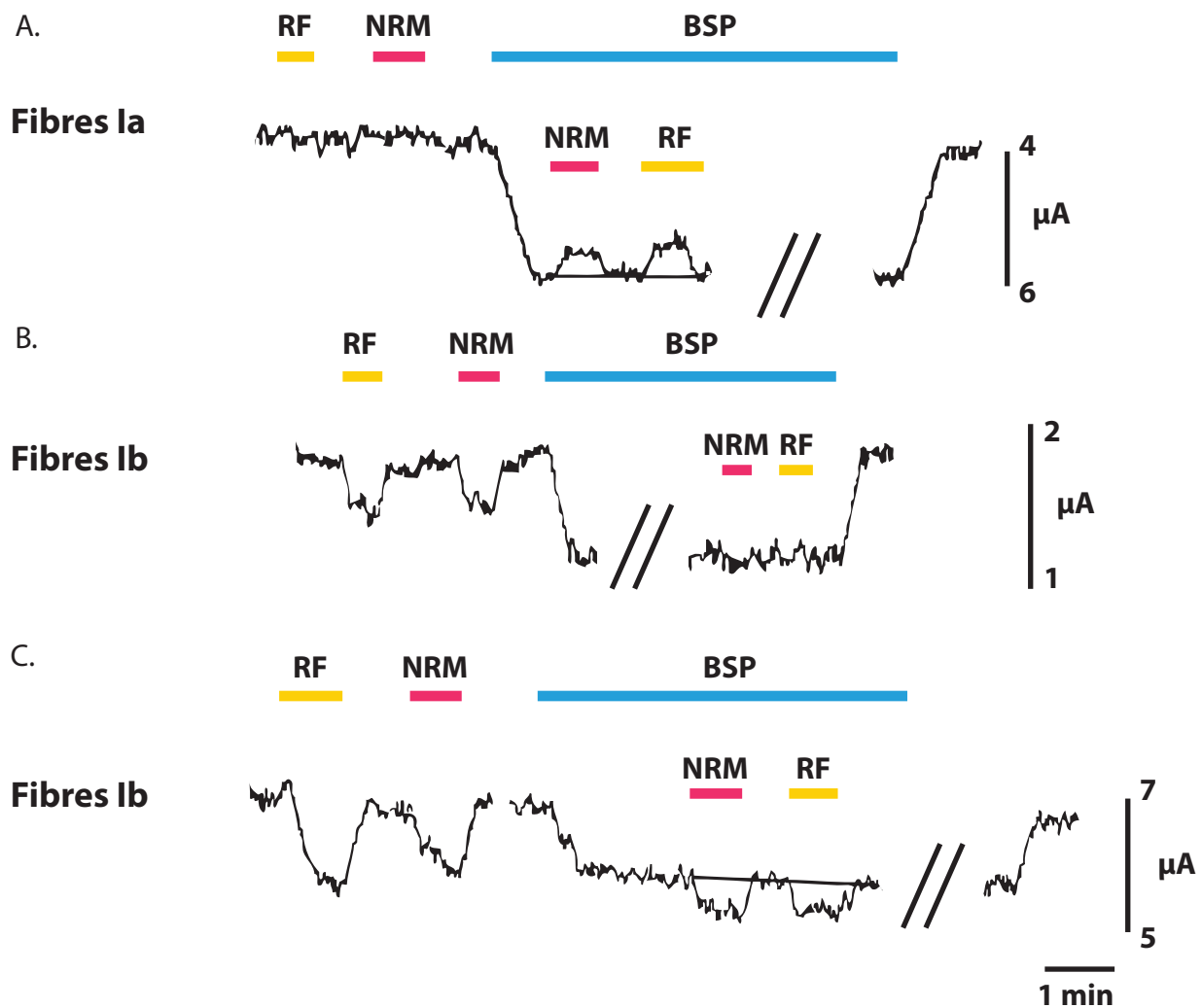


Figure 12. Contrôles descendants de la PAD

Enregistrement indirect de la PAD, et mesure des effets différentiels de la stimulation de structures cérébrales en fonction des types de fibres ciblées. Les auteurs de ces études réalisent une stimulation de la terminaison de la fibre dans la moelle en enregistrant le potentiel antidromique dans les nerfs correspondants. Ils mesurent ensuite le seuil de stimulation nécessaire à l'obtention d'une probabilité de décharge constante dans la fibre enregistrée. Il s'agit de leur ligne de base. La présence de PAD est observée par une réduction de ce seuil. **A.** la stimulation de la RF et du NRM n'a pas d'effet sur le seuil intraspinal de la fibre Ia, mais inhibe la PAD induite par la stimulation du BSP. **B.** En revanche, cette stimulation génère une PAD dans des fibres Ib, et peut même se sommer à la PAD induite par la stimulation du BSP. **C.** (Modifié d'après Rudomin & Schmidt 1999).

**RF:** Formation Réticulée, **BSP:** Biceps Semi-tendineux Postérieur, **NRM:** Noyau du Raphé Magnus

#### 4.1. Anatomie

Les cortex sensoriels et moteurs sont distingués dans les atlas courants grâce à leur anatomie. Le cortex est divisé en 6 couches, distinguées par le type cellulaire qu'elles contiennent (Figure 13). La couche granulaire interne (IV) est la couche réceptrice principale des informations sensorielles transitant généralement par le thalamus. Elle est donc largement développée dans les cortex sensoriels, contrairement à la couche pyramidale interne (V), qui contient principalement les neurones pyramidaux, neurones de sortie du cortex. Il s'agit de neurones qu'on qualifie de corticofuges, pouvant projeter vers d'autres aires corticales, ou vers des structures sous corticales. Ces neurones sont nombreux dans le cortex moteur, dont la couche V est par conséquent très développée, et la couche IV particulièrement réduite (cortex agranulaire) (Figure 13).

Chez le rongeur, il semble qu'il y ait une divergence au niveau des règles sur la délimitation du cortex moteur, entre la règle classique basée sur l'anatomie et l'histologie, et celle basée sur des critères fonctionnels. En effet, d'un point de vue fonctionnel, des micro-stimulations électriques intra-corticales ont été réalisées chez des souris (Li & Waters 1991, Tennant et al 2011) et ont permis de cartographier les zones du cortex provoquant un mouvement dans les membres antérieurs ou postérieurs. Ces expériences ont mis en évidence trois zones principales à l'origine de contractions dans l'hémicorps controlatéral. Deux zones sont responsables du mouvement des pattes avant. L'une est appelée aire rostrale des membres antérieurs ou RFA (Rostral Forelimb Area) permettant d'engager les épaules et les poignets, et l'autre, l'aire caudale des membres antérieurs ou CFA (Caudal Forelimb Area), provoque un mouvement des épaules, des poignets et des phalanges. Enfin la troisième zone, la plus caudale est celle qui permet le mouvement des membres postérieurs. Je l'appellerai HLA (Aire des membres postérieurs ou Hindlimb Area) par analogie avec les deux autres aires. Ces zones ne correspondent pas aux aires motrices classiques. En fait, les zones CFA et HLA se situent en partie, si ce n'est en majorité, sur une zone définie comme sensorielle (Figure 13). Il est donc généralement accepté chez le rongeur de parler de cortex sensori-moteur (Vogelaar & Estrada 2016).

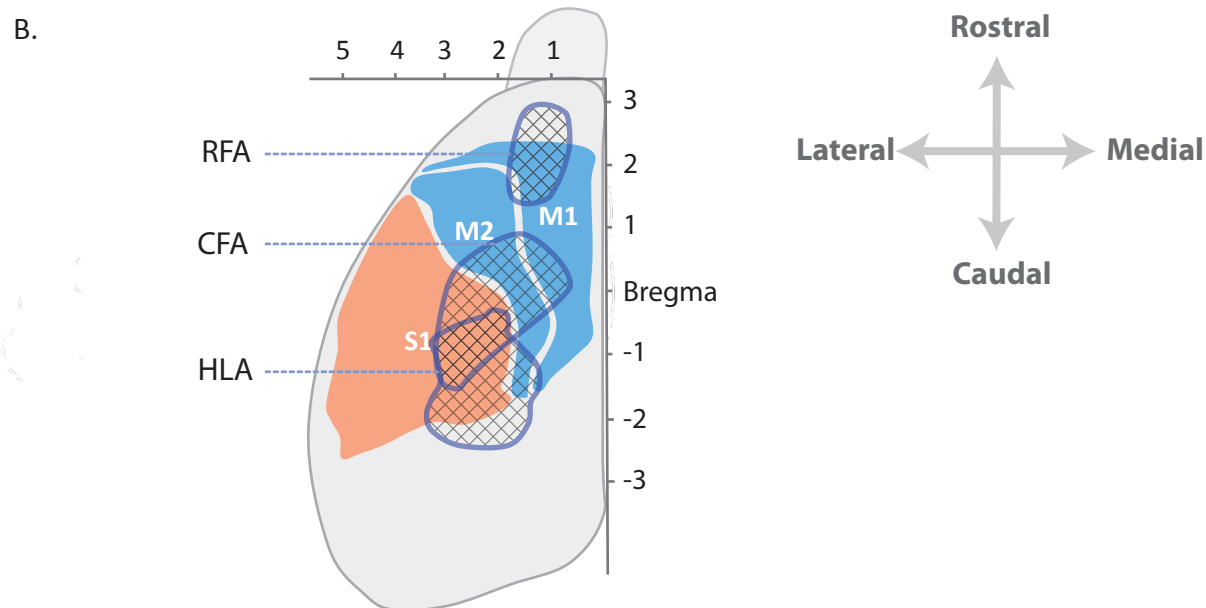
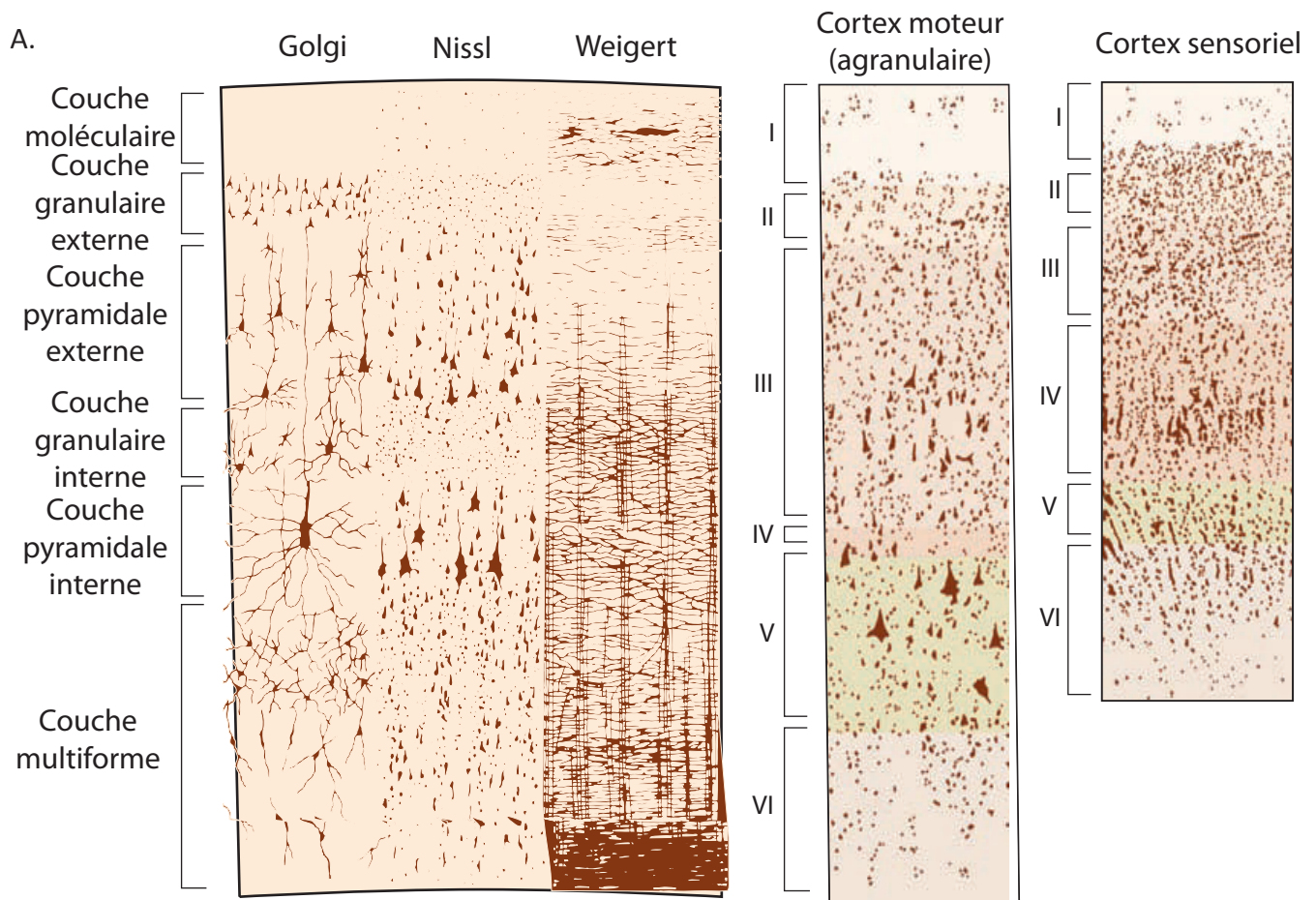


Figure 13. Anatomie du cortex

**A.** Histologie du cortex humain. Le marquage Golgi révèle un sous ensemble de corps cellulaires et leurs arborisations, la méthode Nissl, les corps cellulaires et les dendrites proximales et le marquage de Weigert, la myélinisation des fibres. Le cortex est divisé en 6 couches qui dépendent de ces caractéristiques histologiques. L'épaisseur des différentes couches permet de différencier des zones corticales. Par exemple lorsque la couche V est développée et que la couche IV est réduite, on parle de cortex agranulaire, ou du cortex moteur (Modifié d'après Kandel et al 2013). **B.** Cortex de souris (vue du dessus). Les zones oranges et bleues (M1, M2 et S1) correspondent aux délimitations classiques anatomiques du cortex. Les zones bleues hachurées correspondent aux délimitations fonctionnelles, basées sur des cartographies réalisées par des stimulations. (basé sur des données de Tennant et al 2011 et Li et al 1991). (L'article ne fournit pas les échelles)

**CFA:** Caudal Forelimb Area, **RFA:** Rostral Forelimb Area, **HLA:** Hindlimb Area

#### 4.2. Fonction du cortex

L'implication du cortex dans les fonctions motrices a été démontrée depuis plus d'un siècle. Cela a commencé à cette époque avec le chercheur allemand Hitzig, qui observe que la simple stimulation électrique du cortex d'un chien pouvait générer la contraction de muscles de l'hémisphère opposé. Cela a mené Leyton et Sherrington, en 1917, à décrire pour la première fois le cortex moteur du singe (Leyton & Sherrington 1917). Il a même été démontré plus tard que de longues stimulations pouvaient générer des mouvements complexes chez le singe et le rongeur (Graziano et al 2002, Hira et al 2015). Cette fonction motrice du cortex a été confirmée plusieurs fois et chez de nombreuses espèces de mammifères (Li & Waters 1991, Penfield & Boldrey 1937). Depuis cette époque, il a été clairement démontré que le cortex est en effet capable d'envoyer une commande motrice (de manière plus ou moins directe) vers les motoneurones puis les muscles afin de générer un mouvement, mais que ce n'est pas la seule manière qu'il a de contrôler une action. En effet, des zones sensori-motrices corticales émergent aussi d'autres voies de contrôle de type sensorielles, participant entre autres, au processus de « sensori-gating ».

L'activité du cortex est différente en fonction des tâches dans lesquelles les animaux sont engagés, mais aussi, en fonction des phases du mouvement. Il semble que ces différences soient plus évidentes encore lorsqu'on compare les mouvements automatiques tels que la locomotion avec les mouvements fins, qui demandent une attention particulière à l'environnement extérieur et à l'état du corps. Pour illustrer ces différences, je parlerai du rôle du cortex dans la phase de préparation et d'initiation du mouvement et je présenterai deux types de tâches motrices qui illustrent l'engagement différentiel tâche-dépendant du cortex : Les tâches de précision (mieux représentées par les mouvements des pattes avant) et les tâches de locomotion.

- Préparation et initiation du mouvement

Le cortex joue un rôle prépondérant dans les tâches qui requièrent un mouvement précis des membres et l'analyse d'informations sensorielles variées permettant de guider le mouvement. Cependant il a aussi été étudié pour son rôle dans la préparation et l'initiation du mouvement. En effet, l'activité du cortex moteur prédit le mouvement puisqu'il est déjà actif quelques secondes avant celui-ci (Chabrol et al 2019, Economo et al 2018, Svoboda & Li

2018). De plus, chez la souris, ce rôle dans l'initiation a été démontré dans des tâches de précision dirigées vers un but. En effet, l'inactivation pharmacologique (Muscimol : agoniste des GABA<sub>A</sub>) ou optogénétique (par l'activation des interneurons inhibiteurs corticaux) du cortex, empêche ou ralentit dans la majorité des cas, l'initiation du mouvement lors des tâches de précision (Galinanes et al 2018, Miri et al 2017).

- **Mouvements précis des pattes avant**

Pour les pattes avant, en plus du rôle dans la locomotion, s'ajoutent des mouvements de plus grande dextérité. En effet, malgré leur absence de pouces opposables, les rongeurs peuvent réaliser des mouvements fins, leur permettant de réaliser un mouvement précis vers un objet, et sa préhension. En fait, sur une échelle de 1 à 8 déterminée par Heffner et Masterson (8 étant le score attribué aux humains), les rongeurs obtiennent un score de 3-4 (Heffner & Masterton 1975). Ces tâches sont, elles aussi, dépendantes du cortex, comme cela a été démontré par des expériences de lésions et d'inhibition pharmacologiques ou optogénétiques. En effet, à l'exception de quelques études controversées (Kawai et al 2015) une grande majorité des études récentes ont démontré que la performance du mouvement des pattes avant vers un objet ainsi que la préhension sont fortement affectées par de telles suppressions de l'activité du cortex (Galinanes et al 2018, Guo et al 2015, Miri et al 2017).

- **Locomotion**

Le rôle du cortex dans la locomotion est encore assez mal compris et est toujours sujet à controverse. Cependant de manière générale, les expériences de lésion du cortex sensori-moteur ou d'inhibition pharmacologiques semblent montrer un impact minime sur les performances au niveau des tâches locomotrices grossières, c'est à dire sur les tâches exigeant beaucoup d'automatismes et relativement peu de précision. En effet, des animaux (chats ou rongeurs) réalisant de la marche sur un tapis roulant ou sur une surface plate et régulière ne verront pas leur démarche affectée par une ablation du cortex sensori-moteur ou par son inhibition pharmacologique (Beloozerova & Sirota 1993, Darmohray et al 2019, Miri et al 2017).

Il serait pourtant erroné de considérer que le cortex ne joue pas de rôle dans des tâches de locomotion. En effet, l'activité du cortex semble particulièrement corrélée avec la finesse de la locomotion. Chez le chat ou le rat, lorsque la difficulté de la tâche est augmentée par la présence d'obstacles ou de marches à franchir, l'activité des neurones de la couche V (corticofuges) est augmentée (Beloozerova & Sirota 1993, DiGiovanna et al 2016), et dans ce type de tâches, une lésion du cortex impacte la performance des animaux (Beloozerova & Sirota 1993).

#### *4.3. Interaction avec les autres acteurs du mouvement*

Les neurones de la couche V appartiennent à des populations variées, constituées d'interneurones ou de neurones corticofuges projetant dans des structures différentes. Ils permettent, ensemble, la génération d'un mouvement coordonné. Parmi les neurones pyramidaux, qui sont ceux projetant hors du cortex, on trouve plusieurs populations. Certains neurones projetant vers les régions du thalamus qui contactent en retour le cortex, participent vraisemblablement, grâce à la boucle thalamo-corticale, à l'activité de préparation du mouvement (Guo et al 2017). En outre, d'autres neurones projettent vers des noyaux moteurs tels que les ganglions de la base, les noyaux du Pont (qui font relai vers le cervelet), le noyau rouge, et les noyaux moteurs du tronc cérébral tels que la formation réticulée médullaire (Economo et al 2018, Gao & Zheng 2004, Oswald et al 2013). Certains neurones du cortex contactent la moelle épinière directement (neurones cortico-spinaux, NCS) ou indirectement via une de ses structures de sortie. Toutes ces voies aux origines corticales sont potentiellement des actrices du contrôle moteur, et sont impactées lors des expériences visant à modifier l'activité du cortex.

#### *4.4. Voie de contrôle directe : le tractus cortico-spinal*

Le tractus cortico-spinal (CST) est la voie la plus directe connectant le cortex et la moelle épinière. Son rôle a été particulièrement étudié dans le contrôle moteur, car il s'agit d'une voie qui peut être atteinte dans plusieurs pathologies assez communes, telles que les contusions de la moelle épinière qui atteignent selon l'OMS entre 250 000 et 500 000 nouvelles personnes chaque année, ou encore la sclérose latérale amyotrophique qui affecte

en France 2,5 personnes pour 100 000 habitants. Cette voie a été découverte au XVII<sup>ème</sup> siècle par Willis, et a été depuis explorée en détails d'un point de vue anatomique et fonctionnel chez une grande variété de mammifères allant du rongeur jusqu'à l'homme.

- Évolution et développement

Le CST apparaît pour la première fois chez les mammifères. Son développement débute *in utero*, puis se poursuit de manière post-natale. Pendant sa croissance, il forme des synapses parfois transitoires avec ses cibles (Gu et al 2017, Kamiyama et al 2015, Low et al 2008), et atteint sa maturité environ 2-3 semaine après la naissance (Stanfield 1992).

Chez l'homme, il est constitué à 20% de neurones qui font directement synapse sur les motoneurones (via les connexions cortico-motoneuronales, CM) et les neurones restants contactent des interneurones spinaux (Watson & Harvey 2009). L'hypothèse est que lors de l'évolution des primates supérieurs, cette voie directe aurait été développée de manière préférentielle, par rapport aux systèmes utilisés pour la locomotion quadrupède (Dietz 2002), et qu'elle serait le substrat de l'incroyable dextérité de ces espèces. En effet, un parallélisme a été observé entre l'apparition des terminaisons du CST dans les laminae profondes de la moelle épinière ainsi que des CM et l'augmentation de l'indice de dextérité (Heffner & Masterton 1975). Chez le rongeur adulte, il est généralement accepté que les CM n'existent pas (Ebbesen & Brecht 2017, Murabe et al 2018, Yang & Lemon 2003) malgré certaines études (D'Acunzo et al 2014, Gu et al 2017, Weidner et al 2001) soutenant l'existence de rares connexions. Cependant, pendant le développement embryonnaire et peu après leur naissance, les souris possèdent des CM, qui finissent par être éliminées par l'interaction des molécules de la famille des sémaphorines avec leur récepteur de la famille des plexines (Sema6D-PlexA1) (Gu et al 2017). Dans cette étude, les auteurs démontrent que si cette interaction est empêchée, il y a non seulement maintien des CM chez les souris adultes, mais en plus amélioration de la performance des souris dans des tâches de dextérité. Ces expériences vont dans le sens de l'hypothèse de Heffner et Masterson en concluant de l'existence d'un lien causal entre les CM et l'augmentation de l'indice de dextérité. Cependant, il est clair que les rats et les souris adultes font aussi preuve de dextérité, malgré l'absence de CM. De nombreuses études se sont penchées sur la question du rôle du CST dans les tâches de précision chez les souris. Bien que différent de celui des primates, le CST des rongeurs

pourrait permettre de mieux comprendre les fonctions de la voie cortico-spinale indirecte, qui représente pas moins de 80% des connexions cortico-spinales chez les humains.

- Anatomie

Trajet :

C'est à partir des axones des neurones pyramidaux de la couche V du cortex qu'est formé le tractus pyramidal ou CST. Il voyage au travers de la capsule interne jusqu'au tronc cérébral, à la suite duquel le tractus croise la ligne médiane au niveau des pyramides bulbaires (Figure 14). Juste avant la décussation, ce tractus se divise en trois faisceaux d'axones. Le faisceau principal, constitué selon les études d'approximativement 80 à 95% des fibres (Oudega & Perez 2012, Welniarz et al 2016), croise la ligne médiane tout en passant d'une position ventrale à dorsale. Il se divise finalement en un CST dorsal (dCST), localisé dans la partie profonde des colonnes dorsales constitué de la majorité des fibres ainsi qu'en un CST dorso-latéral (dlCST). Le restant des fibres n'est pas décussé, et reste ventral en entrant dans la moelle et forme le CST ventral (vCST) (Vogelaar & Estrada 2016). Cette dernière voie n'est visible que jusqu'aux segments mi-thoraciques, après lesquels, elle devient trop anecdotique pour être tracée (Vahlsing & Feringa 1980).

Source :

En fonction de la zone du cortex d'où émergent les fibres du CST, le segment ciblé dans la moelle épinière sera différent. Kamiyama et ses collaborateurs l'ont démontré en injectant des billes rétrogrades dans les segments spinaux cervicaux et lombaires et en cartographiant leur soma dans le cortex (Kamiyama et al 2015). Ils ont constaté que les neurones avec des projections sur les segments cervicaux sont localisés, chez l'adulte, à travers tout le cortex sensori-moteur. À l'inverse, les neurones ciblant les segments lombaires ne sont retrouvés que dans la zone du cortex correspondant à la HLA. Dans cette zone, les neurones peuvent donc projeter à l'un ou l'autre de ces renflements, ou aux deux dans certains cas. Les zones plus rostrales du cortex semblent donc garder un schéma de projection purement cervical (Figure 15).



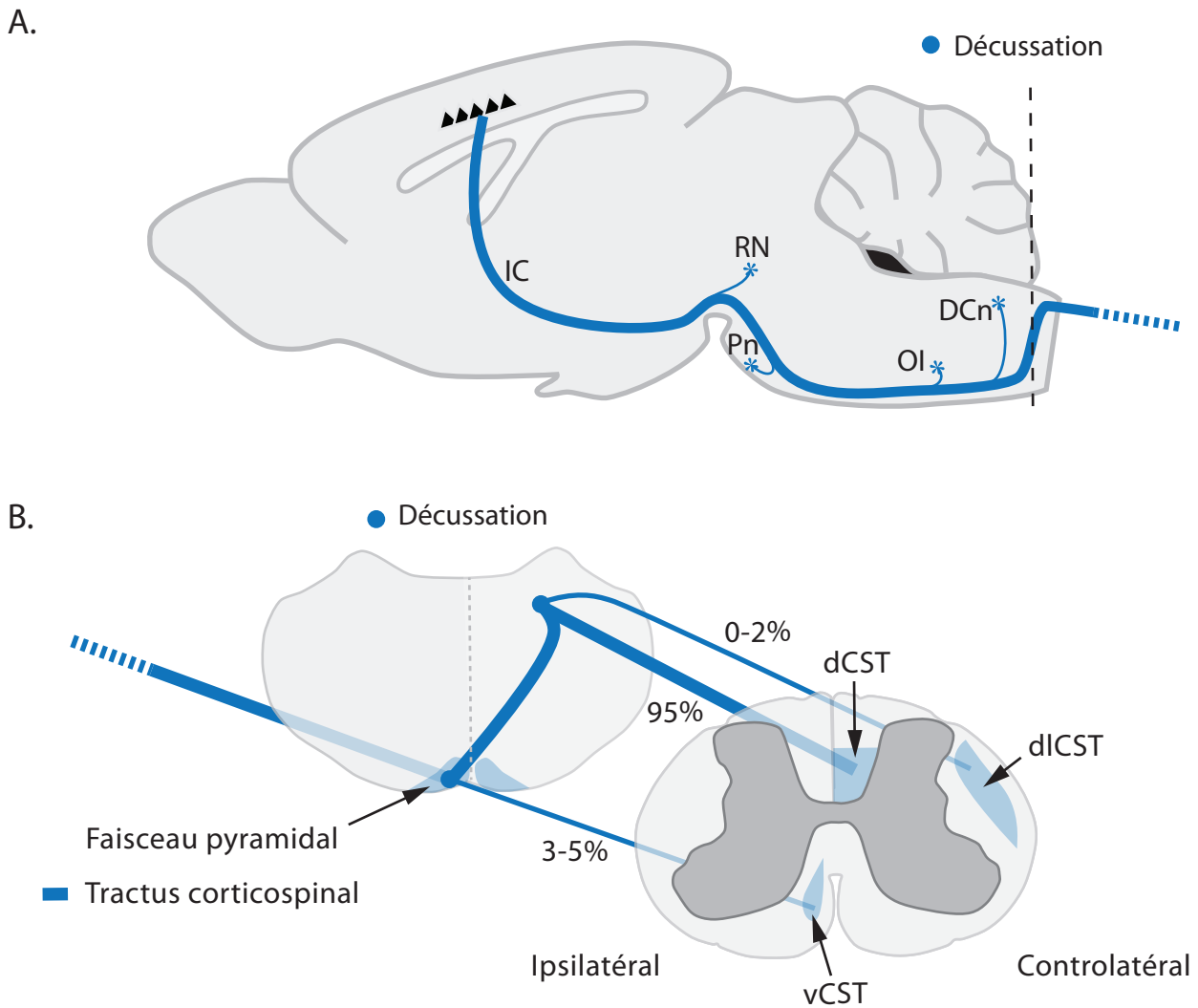


Figure 14. Anatomie de la voie cortico-spinale

Illustration du trajet des axones des neurones cortico-spinaux et des structures ciblées par leurs collatérales. **A.** Le tractus cortico-spinal émerge de la couche V du cortex, puis voyage à travers la IC avant de longer les noyaux du pont. Il avance dans la partie ventrale du tronc cérébral puis devient dorsal à l'endroit de sa décussation. **B.** C'est à ce niveau qu'il pénètre dans la moelle épinière pour donner le faisceau principal dorsal, et les deux autres faisceaux mineurs. Sur son trajet, il envoie des collatérales vers le RN, les Pn, l'OI, le DCn.

**IC:** Capsule Interne, **RN:** Noyau Rouge, **Pn:** noyaux du Pont, **OI:** olive inférieure, **DCn:** noyau des colonnes dorsales, **dCST:** CST dorsal, **dlCST:** CST dorso-latéral, **vCST:** CST ventral

Terminaison :

Chez les rongeurs, ces neurones terminent dans la moelle épinière, essentiellement dans la corne dorsale profonde (D'Acunzo et al 2014, Liu et al 2018). Cependant en fonction de leur source exacte, la terminaison des fibres peut être différente. Que ce soit pour les segments cervicaux ou lombaires, même s'il semble qu'il existe globalement une sorte de gradient sensori-moteur dorso-ventral spinal correspondant à un gradient sensori-moteur latéro-médian cortical, il n'existe pas une réelle ségrégation entre neurones cortico-spinaux sensoriels et moteurs et certaines fibres d'une même zone corticale peuvent avoir des terminaisons, et donc des rôles différents (Figure 15) (Ueno et al 2018). Cette ségrégation des fibres en différents groupes anatomiques (en fonction de leur origine ainsi que de leurs terminaisons) reflète l'existence d'une divergence fonctionnelle parmi les neurones cortico-spinaux (Olivares-Moreno et al 2017). Bien que le rôle de ces différents groupes commence à être étudié, il n'est pas encore bien compris.

Collatérales :

Lors du développement post natal des rongeurs, le tractus cortico-spinal émet des collatérales, vers des structures globalement identiques à celles des collatérales du CST chez le primate (Terashima 1995). Chez l'adulte, ces collatérales sont observées au niveau de l'encéphale vers le colliculus supérieur, le noyau rouge, les noyaux du pont, l'olive inférieure et les noyaux des colonnes dorsales (Figure 14). Le rôle de ces voies dérivées du CST n'est pas encore bien compris. D'autre part le CST distribue des collatérales dans différents segments spinaux (Kamiyama et al 2015). Leur intérêt a été démontré dans le cadre de lésions de la moelle épinière. En effet, chez les rongeurs, les chats, le primate et l'homme, un degré varié de récupération spontanée ou induite des capacités motrices peut être observé à la suite de lésions spinales. Dans ces cas, il est suggéré que ces collatérales terminant dans d'autres segments soient à l'origine de la récupération par leur bourgeonnement sur des populations d'interneurones spinaux autour du site lésé (Courtine et al 2008, Oudega & Perez 2012). De la même manière, les collatérales encéphaliques du CST pourraient, elles aussi, jouer un rôle dans cette récupération, comme cela a été proposé pour la voie cortico-rubrale (Carmel & Martin 2014).

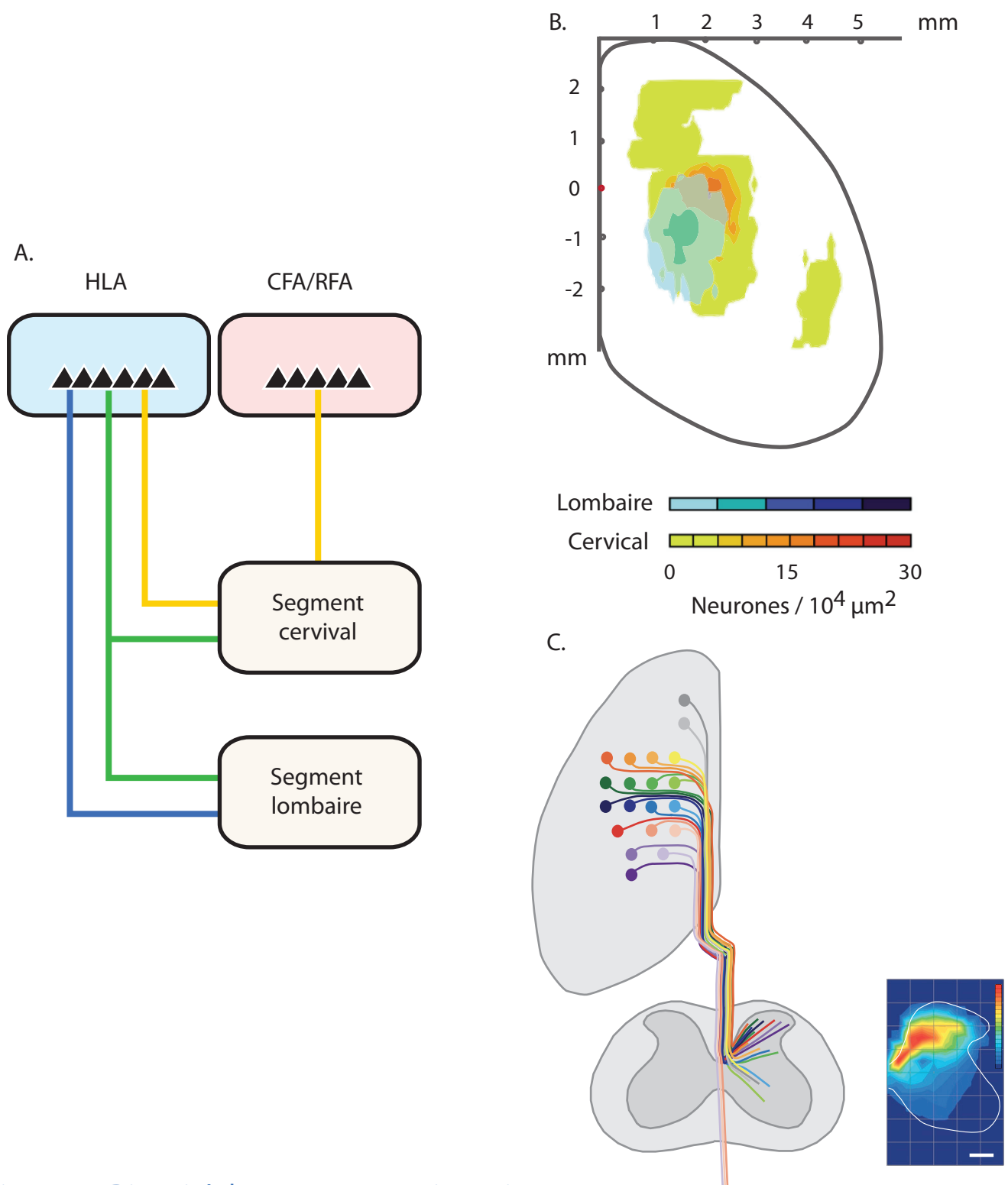


Figure 15. Diversité des neurones cortico-spinaux

Illustration de l'existence de multiples voies cortico-spinales, qui varient en fonction de la localisation de leurs corps cellulaires et de leurs terminaisons dans la moelle épinière. **A.** Résumé des cibles des NCS en fonction de leur source : le cortex HLA projette sur le segment lombaire, mais peut laisser des collatérales au niveau cervical. Les cortex CFA et RFA ne projettent qu'au segment cervical. **B.** Illustration des zones de superposition des NCS projetant sur les segments lombaires et cervicaux (Modifié d'après Kamiyama et al 2015). **C.** Illustration de la diversité des NCS au sein de groupes d'origine corticale similaire. Les neurones d'un même cortex ont des sites de projection différents au sein d'un même segment spinal. Sur cette figure, le segment cervical est illustré, et (à droite) la zone de plus grande densité de terminaisons se situe dans sa corne dorsale profonde (Modifié d'après Ueno et al 2018).

**NCS:** Neurones cortico-spinaux, **CFA:** Caudal Forelimb Area, **RFA:** Rostral Forelimb Area, **HLA:** Hindlimb Area

- Rôle de la voie CS

Puisque nous nous sommes particulièrement intéressées dans notre projet aux contrôles des pattes postérieures, je me concentrerai dans cette section uniquement sur les tâches impliquant ces membres, et donc plus précisément sur les tâches de locomotion et particulièrement sur celles qui sont complexes.

Une grande partie des études visant à comprendre le rôle du CST a utilisé une stratégie visant à cibler spécifiquement des neurones cortico-spinaux, afin de bloquer leur activité (lésion, délétion ou inhibition) ou de les activer. Ces stratégies ont permis de valider les études réalisées sur le cortex en général. En effet, là aussi, les études semblent s'accorder sur le fait que le CST ne soit généralement pas nécessaire dans la réalisation de tâches locomotrices simples telles que le Rotarod, le tapis roulant ou la marche sur un sol plat (Liu et al 2018, Muir & Whishaw 1999). En effet, pour pouvoir constater son rôle, il est nécessaire d'implémenter des tâches de locomotion plus fines. Par exemple, lors de la traversée d'une échelle horizontale, ou sur une roue aux barreaux espacés irrégulièrement, la lésion ou l'inhibition des neurones cortico-spinaux a un effet clair sur la performance des rongeurs (Bieler et al 2018).

Cette stratégie s'est montrée efficace, mais elle a des limites importantes, puisque certains des neurones du CST ont des collatérales vers des noyaux moteurs supra-spinaux. Il est donc souvent difficile de s'assurer que le phénomène observé est bien lié à un message transmis directement aux interneurons spinaux, et non à des intermédiaires supra-spinaux. De plus, ces techniques ciblent les neurones cortico-spinaux dans leur ensemble, ce qui ne permet pas de déceler les fonctions multiples de ces neurones en fonction de leurs cibles, telles que l'envoi d'une commande motrice, une information corollaire ou encore un signal de modulation moteur ou sensoriel (tel que la PAD). Pour pallier ces difficultés, une stratégie de plus en plus utilisée consiste à étudier directement le rôle des interneurons cibles du CST, recevant la commande corticale en se basant sur leur expression de certains facteurs génétiques (Ueno et al 2018). Cette stratégie est encore assez récente et bien qu'elle ait déjà permis d'aller un peu plus loin dans la compréhension des différents rôles de la voie cortico-spinale, la quantité d'informations sur les cibles participant aux tâches locomotrices est encore assez restreinte.

De nombreuses populations d'interneurones spinaux formant des contacts directs avec les motoneurones ont été identifiées ainsi que des marqueurs permettant de les reconnaître (chapitre [Circuit pré-moteur](#)). Grâce à ces identifications, il a été possible de mettre en évidence l'existence des contacts provenant du cortex sur certaines de ces populations et ainsi de préciser son rôle dans certaines tâches motrices. Ces populations ciblées dérivent de diverses familles de progéniteurs (Ueno et al 2018) et semblent jouer un rôle dans des fonctions variées, allant de la modulation du rythme des CPGs (Gosgnach et al 2006), jusqu'aux tâches de plus haute précision (Ueno et al 2018). Ces études apportent de nouvelles informations sur le rôle du CST et de ses cibles, mais il n'est toujours pas évident de savoir quelle est la réelle contribution de ces cibles au mouvement. Bien qu'il semble qu'une proportion des neurones V2a soit chargée de transmettre la commande motrice aux motoneurones, puisque leur inhibition diminue la contraction musculaire évoquée par le cortex, plusieurs autres populations pré-motrices ne jouent pas forcément un rôle aussi tranché, et pourraient jouer un rôle de modulateur en fonction des ordres corticaux ainsi que des retours sensoriels intégrés (Bourane et al 2015). En effet, certaines de ces populations cibles du CST ont été impliquées dans des processus sensoriels, et semblent essentielles à la bonne exécution du mouvement. Par exemple les neurones ROR $\alpha$  (Bourane et al 2015), V0c (Zagoraïou et al 2009) ou Zic2 (Paixao et al 2019) reçoivent des informations sensorielles périphériques et contactent les motoneurones. Leur rôle n'est certainement pas de relayer une commande motrice, mais plus probablement de moduler l'excitabilité des motoneurones en fonction du contexte sensori-moteur encodé par leurs entrées (Miles et al 2007). L'ablation de ces neurones donne aussi lieu à des baisses de performances dans certaines tâches locomotrices telles qu'une échelle penchée ou la traversée d'une tige fine. En outre, il existe des neurones intégrant des signaux corticaux et sensoriels, sans lien direct avec les motoneurones. Les neurones spinocérébelleux dorsaux par exemple, intègrent ce type d'informations et projettent vers les circuits cérébelleux. Ils sont donc soupçonnés de faire partie d'un circuit essentiel de convergence spinal entre la décharge motrice corollaire et les retours proprioceptifs, résultant théoriquement en la suppression des réafférences (Hantman & Jessell 2010).

Bien que la stratégie d'étudier les cibles du CST ait permis d'en apprendre beaucoup sur le rôle individuel des populations de neurones spinaux recevant la commande corticale, il n'est toujours pas évident de savoir si les phénomènes observés peuvent être attribués strictement à la voie CST. En effet, pour chaque facteur génétique étudié, seule une partie des neurones exprimant ce facteur reçoit des afférences du CST. Ainsi, lorsque c'est la population dans son ensemble qui est inhibée (ou détruite), il n'est pas possible de faire la part entre le rôle des interneurones effectivement cibles du CST et le reste de la population d'interneurones partageant des facteurs génétiques identiques. De plus, le rôle des différentes populations du CST (en fonction de leur origine et de leur cible) est toujours assez méconnu, et sujet à des controverses. En effet, alors que beaucoup d'études s'accordaient à dire que le CST ne joue un rôle que dans la locomotion fine, de récentes études viennent remettre ce principe en question. Il semble que, même pour des conditions de locomotion simple, la modulation de l'activité du CST originaire de la HLA, terminant sur des cibles cervicales aurait un effet sur la vitesse de déplacement des souris, et qu'un tel changement impacterait aussi le niveau d'exploration sur une tâche d'open field (Karadimas et al 2019). Ces controverses soulignent encore une fois l'évidence d'une ségrégation fonctionnelle des différents neurones cortico-spinaux en fonction de leur origine et de leurs cibles et ainsi, l'importance de l'étude de la voie cortico-spinale dans toute son étendue de fonction.

Dans ce projet de thèse nous avons voulu tenter d'en savoir plus sur les caractéristiques des contrôles descendants cortico-spinaux. Nous avons décidé de nous intéresser essentiellement à deux points majeurs du contrôle sensori-moteur d'un mouvement coordonné : 1) L'envoi de la commande motrice vers les motoneurones et 2) la gestion en direct des informations sensorielles reçues par le corps via l'étude de la PAD. Ma thèse s'est inscrite dans un objectif global qui est de comprendre comment le filtrage des informations sensorielles s'articule autour de la commande motrice pour produire un comportement moteur volontaire coordonné.

Nous avons contribué à cette thématique globales en répondant à **3 questions majeures** :

1. Quelle est la zone corticale d'origine de la commande motrice et de la PAD ?
2. Quelles sont les voies empruntées pour délivrer ces messages, et quelle est l'importance relative du CST ?
3. Quelles sont les cibles spinales de ces deux types de commandes ?

Nous avons fait le choix de travailler sur des souris, car il existe des souches transgéniques permettant de cibler précisément des populations de neurones et ainsi nous offrir une spécificité d'étude que ne nous permettraient pas d'autres espèces aux caractéristiques plus proches de l'homme. Je discuterai dans la suite de ce manuscrit des différences rongeurs/primate et de la possibilité de généraliser les résultats.

## Matériels et Méthodes

### 1. Modèles animaux

Cette étude a été réalisée dans le strict respect des lois nationales et internationales de bien-être des animaux de laboratoire et d'expérimentation et a été préalablement approuvée par le Comité d'éthique de Strasbourg (CREMEAS; CEEA35; numéro d'accord/protocole de référence: APAFIS #12982 - 2017122217349941 v3). Les souches suivantes de souris (mâles et femelles adultes) ont été utilisées : Thy1::ChR2 (Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng/J, Jackson Laboratory), TdTomato-Flex (*Gt(ROSA)26Sor<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J*, Jackson Laboratory), ChAT::EGFP (von Engelhardt et al 2007), GAD65::GFP (Lopez-Bendito et al 2004). Toutes les lignées à l'exception de la souche GAD65::GFP, ont été croisées (sur 10 générations minimum) pour obtenir un fond CD1. Les GAD65::GFP étaient sur un fond C57Bl6/J. Les souris ont été hébergées au Chronobiotron (UMS3415, CNRS, Université de Strasbourg) conformément à la convention européenne 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Pour toutes les chirurgies et enregistrements, les souris anesthésiées ont été placées sur un coussin chauffant et maintenues à 36-37° et ont reçu un gel protecteur sur les yeux. A la suite des chirurgies avec réveil, les souris ont été maintenues sous une lampe chauffante jusqu'à récupération puis soumises à une vigilance quotidienne la semaine suivant l'opération.

### 2. Enregistrements électrophysiologiques

#### 2.1. Enregistrement EMG

Une anesthésie à la kétamine/xylazine a été choisie pour affecter de manière minimale le tonus musculaire. Après l'anesthésie initiale (150 mg/kg de kétamine, Imalgene 1000 et 10 mg/kg de Xylazine, Rompun 20%), des doses complémentaires de Kétamine ont été administrées lorsque l'animal montrait des signes d'éveil. Chaque dose supplémentaire était précédée par une courte exposition à l'isoflurane 1 à 1,5%, pour ne pas risquer le réveil de l'animal (Tennant et al 2011). Les EMGs ont été réalisés à l'aide d'électrodes concentriques contenues dans des aiguilles (Myoline Xp). Ces électrodes ont été insérées à travers la peau



dans le muscle *tibialis anterior* (TA) des animaux et une électrode de masse a été logée dans la queue. Les réponses ont été recueillies à travers un amplificateur (IR183A, technologie Cygnus) disposé en série avec un deuxième amplificateur (Brownlee Precision, modèle 440). Les traces ont été filtrées avec un filtre passe-bande de 0,1 Hz à 10 kHz, enregistrées avec le logiciel Spike 2 (version 8.00, CED, Cambridge, UK), et analysées hors ligne avec Clampfit (pCLAMP, version 10.7) et Python pour une analyse plus approfondie (WinPython 2.7.10, Python Software Foundation). Les réponses EMG ont été enregistrées après photostimulation corticale ou spinale (voir ci-dessous), et la réponse à 3 stimulations consécutives a été moyennée pour analyse (Figure 16A). L'aire sous la courbe de la trace moyenne rectifiée (prise en valeur absolue) a été calculée dans plusieurs fenêtres de 30 ms : 3 fenêtres d'estimation du bruit débutant : 40 ms avant la stimulation (bruit 1, **B**), 140 ms et 170 ms après la stimulation (bruit 2 et 3) ; ainsi qu'une fenêtre de mesure du signal (**S**) débutant 10 ms après la stimulation (Figure 16B).

La réponse EMG a été présentée comme le rapport **S/B**. Dans les expériences de lésions CST, tous les rapports **S/B** ont été exprimés sous forme de pourcentage du rapport **S/B** contrôle (moyenne de 3 réponses avant la lésion). Le niveau de bruit (**S/B** de 1) a été exprimé de manière similaire en pourcentage du rapport **S/B** de contrôle défini ci-dessus.

Afin de s'assurer que le signal **S** observé était bien significatif, des mesures de Z-scores ont été réalisées. La moyenne et l'écart type ( $\sigma$ ) du bruit ont été mesurés à partir des 3 valeurs de bruit (bruit 1, 2 et 3) obtenues à partir de chaque enregistrement EMG, et utilisés pour calculer les Z-scores. Le Z-score de chaque réponse EMG à la stimulation a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$Z - score = \frac{Signal - \text{Bruit moyen}}{\sigma \text{ bruit}}$$

Un Z-score de 1,96 ou 3 correspondant à un niveau de signification de 0,05 ou 0,001 a été choisi pour distinguer les réponses significatives des réponses non significatives. Le choix du seuil de significativité a été choisi en accord avec l'inspection visuelle des traces, pour s'assurer que les réponses EMG n'étaient pas simplement dues au bruit.

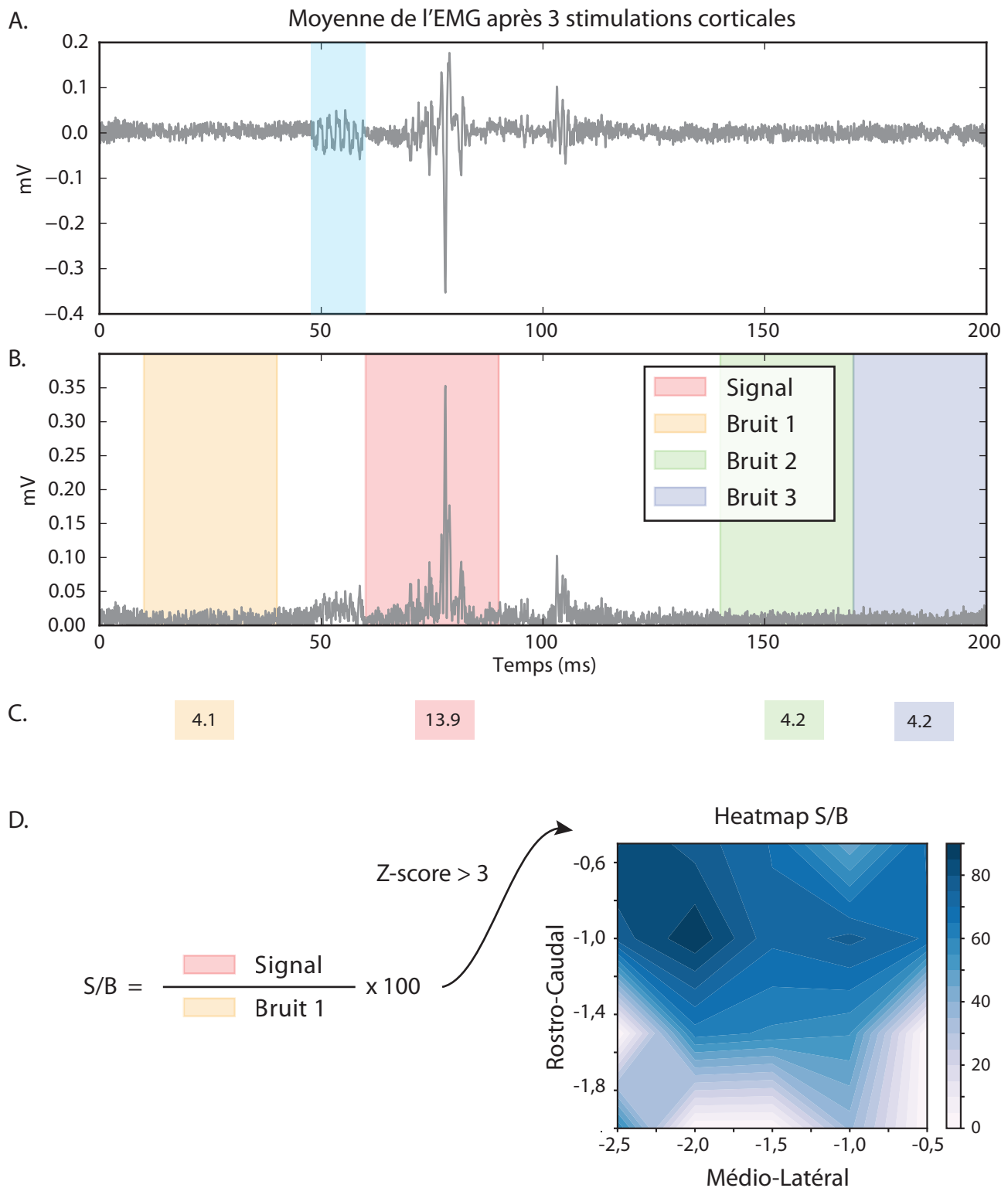


Figure 16. Analyse des EMG

**A.** Trace moyennée de l'EMG issue de 3 stimulations corticales successives. La zone bleue correspond à la fenêtre de photostimulation. **B.** Aperçu de la trace **A.** rectifiée (valeur absolue de chaque point). Les zones colorées correspondent aux fenêtres de mesures. **C.** Valeurs des aires sous la courbe de chaque fenêtre de mesures. **D.** le ratio entre l'aire sous la courbe du signal de la fenêtre rose (après stimulation) sur celle du signal de la fenêtre jaune (avant la stimulation) est interpolé pour construire la heatmap dès lors que le z-score (formule dans le texte) est significatif.

**S:** Signal, **B:** Bruit 1

Une étude qualitative des réponses EMG a été réalisée dans les expériences comprenant des pyramidotomies (voir ci-après, section [Pyramidotomie](#)). Dans ces cas, l'aire sous la courbe des signaux EMG moyennés a été mesurée sur des fenêtres de 5ms. J'appellerai l'évolution au cours du temps de ces aires/5ms, l'Aire Instantanée (AI). Pour chaque souris Thy1::ChR2 les AIs ont été calculées sur 4 fenêtre de 200 ms : 3 situées avant la lésion (conditions contrôle) et 1 après la lésion ([Figure 17A](#)). Pour chacune de ces souris, les AIs contrôles ont ensuite été moyennées ([Figure 17B](#)). Afin de mettre en évidence une potentielle différence qualitative du profil de réponse entre les conditions précédant et suivant la lésion, et d'extraire la composante cortico-spinale (composante CS) supprimée par la pyramidotomie, nous avons, pour chaque souris, soustrait l'AI « lésion » à l'AI des contrôles moyennés ([Figure 17C](#)). Enfin, afin de vérifier si cette composante CS, extraite des souris Thy1::ChR2, possédait un profil similaire à celui des souris « ChR2 rétro », nous avons moyenné les composantes CS des 4 souris Thy1::ChR2, afin de comparer la résultante à la moyenne des AIs « ChR2 rétro » ([Figure 17D](#)).

## 2.2. Enregistrement DRP

Sous anesthésie à l'isofluorane (1,5-2%), la moelle épinière des souris a été fixée avec l'unité de moelle épinière d'un cadre stéréotaxique (instruments Narishige). Une laminectomie a été réalisée pour exposer la surface des segments lombaires de la moelle épinière (L3-L6). Une fois la dure-mère ouverte sur toute la partie exposée de la moelle, les racines dorsales deviennent accessibles. A l'aide d'une pipette pasteur crochetée à la chaleur et arrondie sur son bout pour la rendre non abrasive, les racines sont disséquées et isolées. Avec des micro-ciseaux, une racine (entre L4 et L6) est délicatement séparée des autres, coupée à quelques mm de la moelle, puis aspirée dans une pipette de verre. Un puits d'agarose est alors créé sur la moelle épinière exposée et rempli de NaCl 0,9%. Le NaCl du puits est aspiré dans le capillaire et permet la conduction des signaux électriques. L'électrode de référence constituée d'un fil d'argent fondu sur son extrémité est déposée sur la surface de la moelle ([Figure 18A](#)). Les amplificateurs, filtres et logiciels utilisés étaient les mêmes que pour les enregistrements EMG. Les DRP mesurés en réponse à 30 photostimulations corticales ou spinales successives (voir ci-dessous) ont été moyennés pour l'analyse. L'amplitude de la

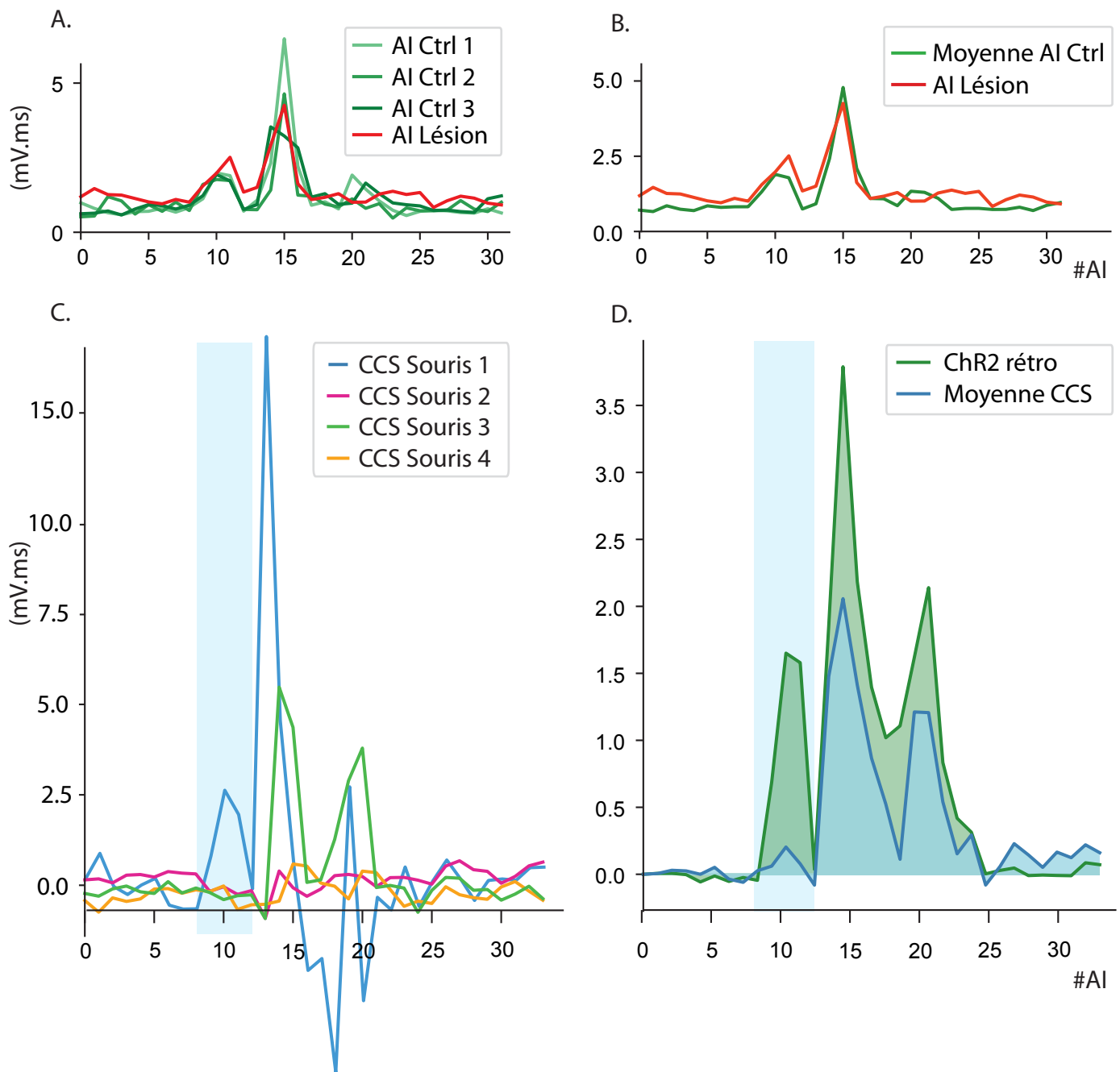


Figure 17. Analyse qualitative des signaux EMG

Représentation graphique de la méthode d'analyse quantitative des EMGs. **A.** Exemple représentatif des AIs (aire sous la courbe EMG mesurée avec un pas de 5ms) d'une souris Thy1::ChR2 dans les conditions précédant la pyramidotomie (AIs Ctrl, vert) et après celle-ci (AI lésion). La stimulation a lieu à 50 ms, soit à l'index AI #10 **B.** Exemple représentatif des « AIs Ctrl » moyennés et comparé à l'« AI lésion ». **C.** Superposition des composantes CS (CCS), de chacune des souris Thy1::ChR2. **D.** Comparaison des CCS moyennées avec les AIs moyennées des souris « ChR2 rétro ».

**AI :** Aire instantanée, **Ctrl :** Condition contrôlée (avant lésion), **CCS :** Composante Cortico-Spinale

réponse entre son début et son pic a été mesurée en utilisant Clampfit 10.0. L'amplitude du bruit a été mesurée de manière similaire sur une fenêtre de 50ms précédant la stimulation.

### 3. Photostimulation corticale

Une stimulation optogénétique du cortex a été réalisée sur des animaux anesthésiés lors de l'enregistrement des EMGs ou des DRPs. Au niveau du cortex, une craniotomie d'environ 9 mm<sup>2</sup> a été réalisée sous stéréo-microscope du côté controlatéral du site d'enregistrement (Figure 19).

- La contraction musculaire, mesurée par EMG, a été évoquée par photostimulation avec une fibre optique de 250 µm (source laser 473 nm PSU-III-FDA) en utilisant le protocole suivant: trains de 6 impulsions, durée 1 ms, intervalle 2 ms; 15 s minimum entre chaque train.
- Les DRPs ont été obtenus par photostimulation avec une sonde de 105 µm (source LED 460 nm, Prizmatix) en utilisant le protocole suivant: trains de 5 impulsions de 8 ms, intervalle de 1 ms et 2 s entre chaque train.

Dans les deux cas, la sonde a été déplacée à la surface du cortex tous les 500 µm de la fenêtre exposée. Des contours isopotentiels ont été tracés, en utilisant pour les EMGs le ratio S/B et pour les DRPs l'amplitude du pic à chaque point de photostimulation dans le cortex, grâce à une interpolation linéaire sur un ensemble de X, Y, Z triple d'une matrice. Les valeurs ont été normalisées par rapport aux plus grandes valeurs de chaque animal. Pour l'EMG, seuls les rapports S/B supérieurs au seuil de significativité, c'est-à-dire dont le score Z était supérieur à 3 (détaillés dans le tableau de données supplémentaires 1A) ont été pris en compte pour l'analyse. Ensuite, les contours isopotentiels ont été superposés aux plans métriques de la vue de dessus du cortex (Figure 16D. et Figure 18B. et C).

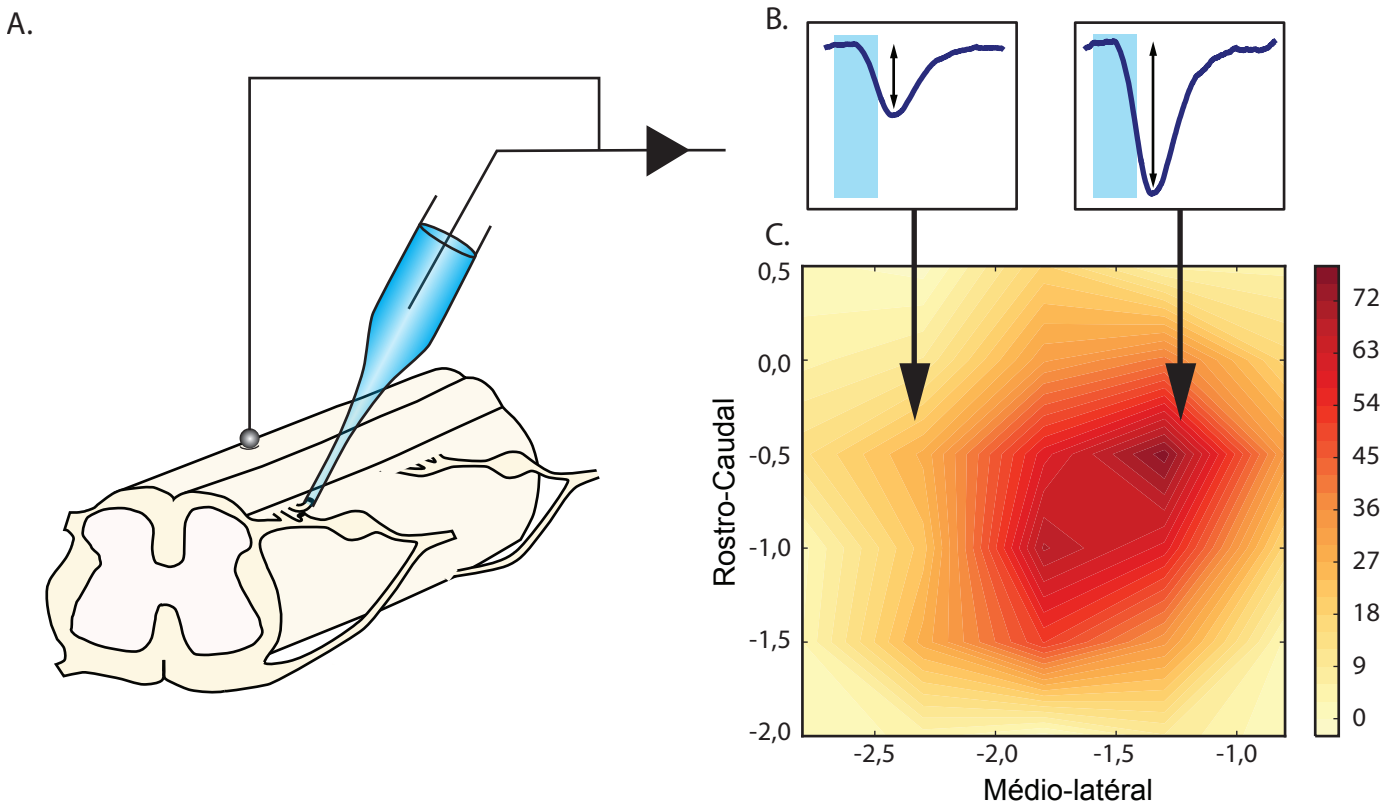


Figure 18. Techniques d'enregistrement et analyse des DRPs

**A.** Illustration des conditions d'enregistrement des DRPs. Une fois la laminectomie effectuée sur les souris anesthésiées, un puits d'agarose est coulé autour de la moelle afin de la garder constamment immergée dans une solution physiologique de NaCl. Dans ces conditions, la dure-mère est ouverte sur tout le segment exposé, et les racines dorsales deviennent accessibles une racine est coupée à environ 2mm de la moelle, puis aspirée dans un capillaire de verre contenant l'électrode d'enregistrement ainsi que du NaCl. L'électrode de référence est déposée sur la surface de la moelle. **B.** Le cortex ou la moelle épinière sont photo-stimulés (fenêtre bleue) et les DRPs peuvent être enregistrés. **C.** L'amplitude des DRPs est ensuite mesurée et interpolée pour construire une heatmap.

#### 4. Photostimulation de la moelle épinière

Une stimulation optogénétique de la moelle épinière a été réalisée sur des souris anesthésiées après laminectomie, en utilisant une sonde de 1 mm (source LED) placée sur la surface de la moelle épinière lombaire, au-dessus du site d'injection (Figure 19). Les trains de stimulation étaient ceux utilisés pour la stimulation corticale. Les enregistrements EMG et DRP ont été effectués séquentiellement et nécessitaient donc d'alterner entre différents types d'anesthésie: isoflurane, pour les chirurgies de craniotomies et laminectomies, puis kétamine/xylazine, pour les enregistrements des EMGs, et enfin, un nouveau passage sous isoflurane 1,5-2% pour les enregistrements des DRPs. Pour ce type photostimulation, les enregistrements des DRP et EMG de 3 séries de photostimulation ont été moyennés. Seules les souris remplissant ces critères ont été conservées pour l'analyse:

- Critère 1. Souris dans lesquelles a été détecté la présence de neurones TdTomato<sup>+</sup>/EYFP<sup>+</sup> dans la zone spinale stimulée.
- Critère 2. Parmi les souris sélectionnées par le critère 1 : souris pour lesquelles la réponse n'est pas restreinte à la fenêtre de stimulation (artefact photoélectrique probable).

#### 5. Pyramidotomie

Des pyramidotomies par lésion électrolytique du CST ont été réalisées dans des souris Thy1::ChR2 et des souris ayant subi une injection du virus AAV rétrograde (nommées ci-après « ChR2 rétro »). Après une première fenêtre ouverte au-dessus du cortex, une seconde craniotomie est réalisée au-dessus de la décussation pyramidale (3.5 -4 mm caudal à Bregma). La lésion a été réalisée à 6 mm de profondeur, avec des impulsions de 200 ms, à 30 mA, en utilisant un stimulateur à courant continu (Digitimer Ltd thorug), et envoyées à travers une électrode bipolaire en argent (Figure 20). A la fin de l'expérience, le cerveau est prélevé pour vérifier la justesse de la lésion par analyse histologique.

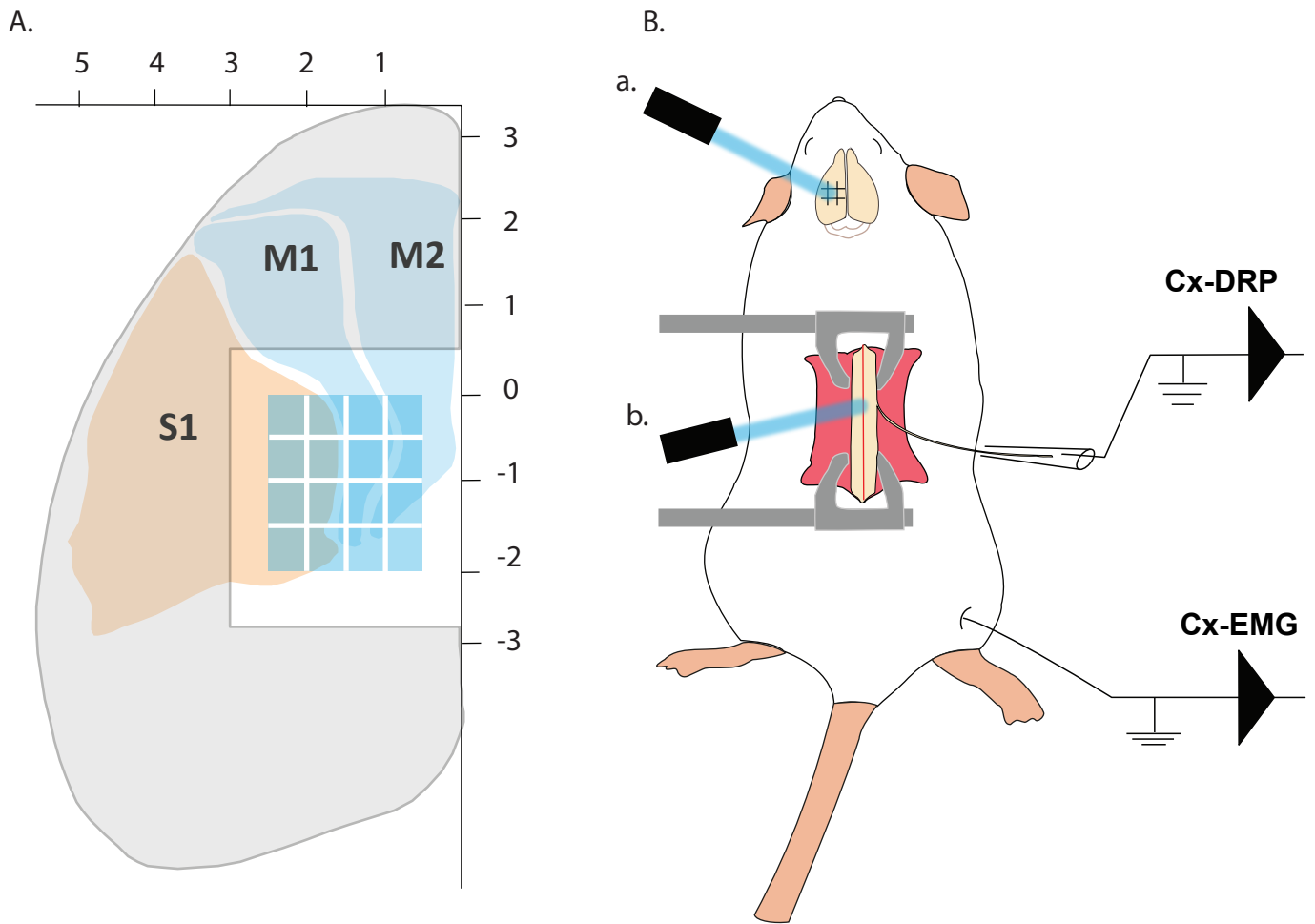


Figure 19. Cartographie du cortex et photostimulations

**A.** Représentation de la fenêtre corticale ouverte par craniotomie (zone non grisée), ainsi que la grille (carrés bleus) de photostimulation. **B.** Les cartographies corticales ont été réalisées dans la configuration **a.**, alors que la configuration **b.** correspond aux photostimulations spinales. La fibre optique est posée au contact du tissu, et les enregistrements d'EMGs ou de DRPs peuvent être effectués. Les EMGs et DRPs ont été mesurés sur des souris différentes pour les cartographies, et successivement sur une même souris pour les photostimulations spinales.

**S1:** Cortex sensoriel 1, **M1:** Cortex moteur 1, **M2:** Cortex moteur 2, **Cx-DRP:** DRP induit par stimulation corticale, **Cx-EMG :** induit par stimulation corticale



## 6. Injections corticales et spinales

Des injections stéréotaxiques corticales (1,5-2 mm latéralement, 0,5-1 mm caudalement par rapport à Bregma, 0,5 mm de profondeur) ont été réalisées comme décrit précédemment (Cetin et al 2007) sous anesthésie à l'isoflurane (2-3%). En bref, 90 à 270nL de virus ont été injectés par pression manuelle à l'aide d'une seringue de 5 ml couplée à un capillaire en verre calibré, sous contrôle visuel. Les injections spinales ont été effectuées en utilisant un protocole de pression manuelle similaire. Le segment L4 a été ciblé et localisé en utilisant la dernière côte comme point de repère. Une fois la peau incisée, la moelle épinière a été fixée avec l'unité de moelle épinière d'un cadre stéréotaxique (instrument Kopf, modèle 986C). Ensuite, les muscles recouvrant localement le segment spinal ont été écartés et la dure-mère a été ouverte sur quelques mm à l'aide d'une aiguille. La pipette a été insérée dans l'espace exposé entre deux vertèbres (T13-L1, correspondant au segment spinal L4). 0,45µL de virus a été injecté 300 µm latéralement à la ligne médiane (repérée grâce au vaisseau dorsal) et à 300-400 µm de profondeur (mesuré à partir de la surface de la moelle).

Dans les deux cas, du Manitol 12,5% a été injecté i.p. (0,2 - 0,5 ml) après la chirurgie pour améliorer la propagation du vecteur et améliorer la transduction (Burger et al 2005). Les animaux ont été gardés 2 semaines pour les injections de « ChR2 rétro » et 5 semaines minimum pour les injections doubles, avant de réaliser les enregistrements DRP et/ou EMG *in vivo* ou les analyses histologiques.

## 7. Histologie

Les souris ont été perfusées de manière transcardiaque avec du tampon phosphate « PB » (mélange d'hydrogénophosphate de sodium et de dihydrogénophosphate de sodium) suivi de 4% de paraformaldéhyde (PFA) dilué dans du PB à 0,1 M. Lorsque l'analyse histologique a été précédée d'enregistrements électrophysiologiques, le cerveau et la moelle épinière étaient post-fixés pendant une nuit dans du PFA dilué à 4% dans du PB à 0,1M. Des coupes du cerveau (coronales ou sagittales) et de la moelle épinière (transversales ou sagittales) de 50 µm ont été réalisées sur un vibratome (Leica VT1000 S) et montées sur des lames grâce à un milieu de

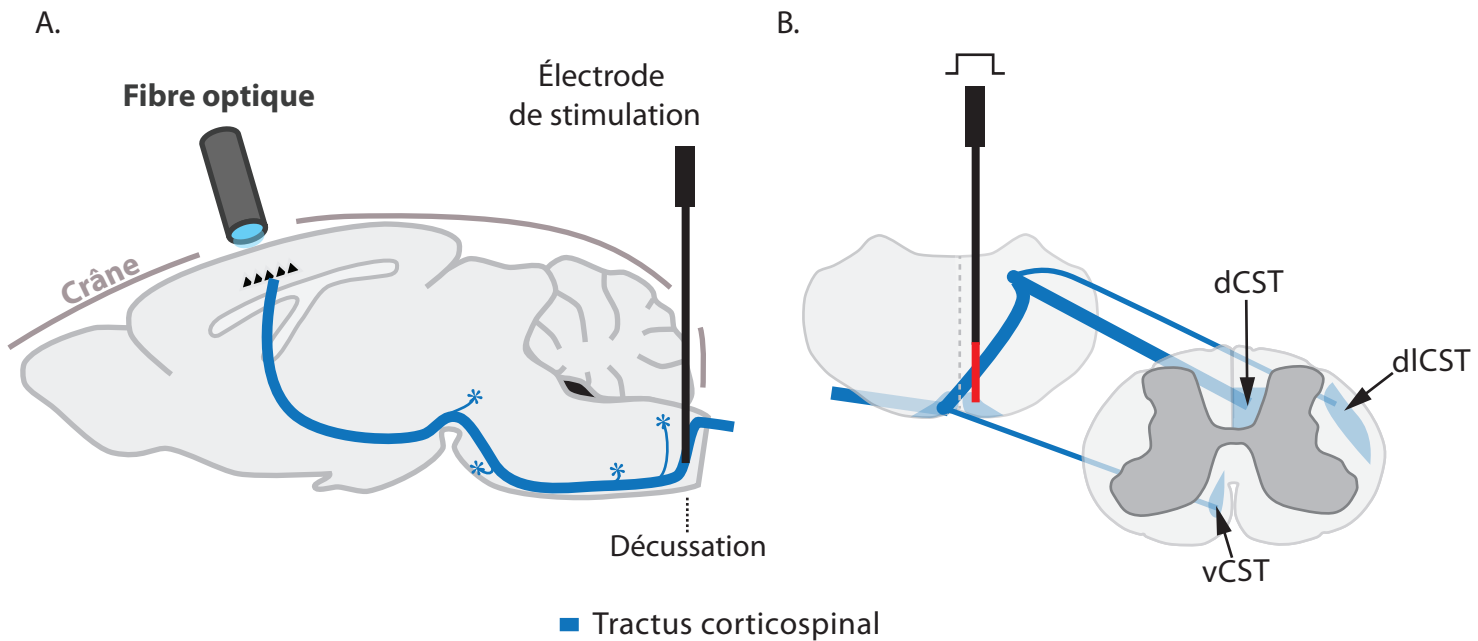


Figure 20. Pyramidotomie

**A.** Une fois le crâne exposé, une fenêtration est ouverte au-dessus du cortex HLA et au-dessus de la partie caudale du cervelet. La fibre optique est placée sur la fenêtration corticale. Une fois les photostimulations de contrôle effectuées, l'électrode de stimulation est insérée dans la fenêtration caudale, jusqu'à la décussation. **B.** La stimulation électrique (détails dans le texte) est alors réalisée, et génère une lésion électrolytique dans la zone autour de la partie de l'électrode non isolée. L'électrode peut être recouverte d'un colorant type Dil afin de repérer la lésion plus aisément lors de la vérification histologique.

**HLA:** Hindlimb Area

montage simple (DAKO) ou supplémenté d'une coloration DAPI (Vectashield, laboratoires Vector).

## 8. Virus

- Le virus **AAV2/1-CBA-WGA-CRE-WPRE** a été acheté à la plateforme d'outils moléculaires du Centre de recherche CERVO (Québec, Canada) et a été utilisé à un titre de  $8 \times 10^{12}$  vg/ml.
- Le virus **AAV-Ef1a-DIO-ChETA-EYFP** provient du laboratoire de Karl Deisseroth (Kravitz et al 2010) (Addgene viral prep # 26968-AAV9; <http://n2t.net/addgene:26968>; RRID: Addgene\_26968) et a été utilisé à un titre de  $1 \times 10^{13}$  vg/ml.
- Le virus **AAV-CAG-hChr2-H134R-tdTomato** provient du laboratoire de Karel Svoboda (Mao et al 2011) (Addgene viral prep # 28017-AAVrg; <http://n2t.net/addgene:28017>; RRID: Addgene\_28017), et a été utilisé à un titre de  $7 \times 10^{12}$  vg/ml.

## 9. Analyse d'images

### 9.1. Site d'injection

L'étendue du site d'injection cortical a été estimée en mesurant la fluorescence de la protéine rapportrice (TdTomato) dans la couche V du cortex. L'intensité de la fluorescence a été analysée comme décrit précédemment (Lorenzo et al 2008, Mesnage et al 2011) sur des coupes de cerveau de 50  $\mu\text{m}$ , régulièrement espacées (250  $\mu\text{m}$ ) qui ont été imagées au microscope (Axio Imager 2, Zeiss). En bref, la fonction «Plot Profile» du logiciel ImageJ (W. Rasband, National Institutes of Health) a été utilisée pour mesurer l'intensité de la fluorescence le long de l'axe horizontal d'un rectangle de 6000x250  $\mu\text{m}$  contenant la couche V du cortex ([Figure de données supplémentaires 1](#) de la section [résultats](#)). Ces valeurs ont été normalisées par rapport à l'intensité la plus élevée pour chaque animal et utilisées pour tracer une carte de densité pour chaque site d'injection. Les limites de la zone d'injection ont été définies comme 30% de l'intensité maximale, correspondant à l'intensité approximative des neurones individuels.

## 9.2. Distribution spatiale des neurones spinaux, cibles du CST

Des coupes de la moelle lombaire (50  $\mu\text{m}$ ) ont été montées en série et imagées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss ou d'un microscope confocal Leica SP5 II. Les images ont été alignées manuellement avec Photoshop en utilisant le canal central et le cordon dorsal comme points de repère. Chaque neurone marqué a ensuite reçu des coordonnées correspondant à sa distance au centre du canal central (X et Y) et à l'indice de la tranche qui le contient (Z). Ces coordonnées ont été utilisées pour calculer le nombre de neurones marqués tous les 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  (pour X x Y) ou 200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$  (pour X x Z) afin de construire des graphiques de densité.

## 10. Quantification et analyse statistique

Pour chaque test, la normalité et l'égalité des variances ont été vérifiées par SigmaPlot (Version 13, Copyright © 2014 Systat Software, Inc) en utilisant les méthodes de Shapiro-Wilk et Brown-Forsythe, avant d'appliquer les tests paramétriques. Toutes les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle et les tests post-hoc n'ont été effectués que si nous observions un effet statistiquement significatif. Les valeurs de  $P$  pour la comparaison multiple ont été mesurées en utilisant la méthode de Holm-Sidak. Les barres d'erreur sur toutes les figures représentent l'erreur standard de la moyenne. L'annotation « \* » correspond à  $P < 0,05$  et l'annotation « NS » à une absence de significativité (c'est à dire  $P \geq 0,05$ ). La puissance des tests a été systématiquement vérifiée, pour s'assurer qu'elle était supérieure à la puissance souhaitée de 0,80.

(Moreno-Lopez YL, Bichara C et al)

Title:

**The main role of the lumbar corticospinal tract in rodent is sensory gating, not motor command**

Authors:

**Yunuen Moreno-Lopez<sup>1</sup>, Charlotte Bichara<sup>1</sup>, Philippe Isope, Matilde Cordero-Erausquin**

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work

**Keywords** : corticospinal, sensory gating, primary afferent depolarization, motor control

**Abstract** (250)

It is generally assumed that the main function of the corticospinal tract (CST) is to convey motor commands to bulbar or spinal motoneurons. Yet the CST has been shown to have other functions (1), such as the modulation of sensory inputs (2, 3). Differential filtering of sensory signals at their entry point in the spinal cord, through primary afferent depolarization (PAD), has been hypothesized to ensure voluntary (including skilled) movements execution (4-6). Here we demonstrate that motor and PAD commands, in mice, follow segregated paths within the CST. By sequentially investigating different stages of corticofugal pathways, we show that the cortex induces PAD in lumbar sensory afferents exclusively through the CST and a population of lumbar interneurons located in the deep dorsal horn. In contrast, the cortex largely conveys the motor command via supraspinal motor centers, although it can also be encoded by the CST. In this latter case, our results suggest that the motor command reaches the hindlimb motoneurons through a relay in the upper spinal cord. At lumbar level, the main role of the CST is thus the modulation of sensory inputs, which is an essential component of the selective tuning of sensory feedback to ensure well-coordinated and skilled movement.

## Text

### Introduction

A coordinated movement relies not only on a proper motor command, but also on the online analysis of a constant multi-sensory feedback indicating whether the movement has reached the planned objective or requires correction (6-8). To optimize the analysis of the overwhelming quantity of reafferent information, the irrelevant (because expected) or redundant sensory inputs can be inhibited whether at their entry point or further up along the sensory pathway, a phenomenon known as “sensory gating”(9). The cortex has the ability to inhibit the entry of sensory information in the central nervous system, at the level of the spinal cord, through primary afferent depolarization (PAD). This could be one of the underlying mechanisms of sensory gating. PAD can be evoked by the sensorimotor cortex in primates (10), cats (11-13) and rats (14). Interestingly, recent studies in mice have shown that both proprioceptive feedbacks and their presynaptic inhibition are essential for performing smooth movements in mice (6, 7). Altogether, these data indicate the involvement of the cortex in coordinated movements by driving the motoneurons as well as inhibiting the sensory afferent fibers via PAD. In this study we contribute to the elucidation of the neuronal pathways underlying these two functions.

Whether for controlling motoneurons or modulating sensory information, the cortex needs to interact with the spinal cord, and the corticospinal tract (CST) represents the most direct pathway to do so. Its involvement in motor control is long acknowledged, although its precise contribution might vary depending on the motor task (locomotion vs. skilled movement) or target limb (forelimb vs. hindlimb) (15-17). The CST has also been shown to be involved in cortically-evoked PAD in cats, as stimulation of this tract (at the level of the pyramids) evokes PAD, while pyramidotomy abolishes it (18). But dissecting the specific role of the CST has proved difficult because of the lack of proper tools to target it by exclusion of other functionally or anatomically overlapping paths.

Importantly, none of the CST functions can rely exclusively on direct CST contacts onto motoneurons (MN) as these represent the exception rather than the rule. Indeed, monosynaptic CST-MN contacts are present (in adults) only in some higher primates, while CST-interneuronal connections are preponderant across species (rodents and primates) (3, 19,

20). In the recent years, genetic factors have enabled the identification of several interneuronal populations, and of their inputs, including those from the cortex (3, 21-23). In these populations, up to 65% of the neurons receive CST inputs (3), but there is always a fraction of neurons that is not targeted by the CST. While manipulating these populations has been extremely informative to better understand their role, it remains unclear whether the observed functions can be specifically attributed to the targets of the CST or more generally to the complete population sharing identical genetic markers. Therefore, it is still difficult to assess the specific role of the targets of the CST in movements.

In this study, we have investigated the corticofugal paths conveying motor command and modulation of sensory inputs through PAD. We have in particular interrogated the contribution of the CST and of its direct lumbar targets through the development of an innovative intersectional viral strategy. We show that PAD in lumbar primary afferents is conveyed exclusively by the CST through a population of lumbar interneurons. In contrast, our results suggest that motor command to the hindlimbs is relayed either through supraspinal motor centers, or through the CST with a propriospinal relay in the upper cord. The role of the lumbar CST thus appears to be mainly the modulation of sensory inputs, which in turn selectively increases sensory gain and enhances motor output during movement.

## **Results**

### *PAD and muscular contractions originates from the same cortical area*

The rodent sensorimotor cortex has a highly somatotopic organization(24). Mainly studied in a motor perspective, it has been repeatedly mapped for its ability to provoke motor contraction (24, 25), but never yet in the mouse with regard to its ability to induce PAD. This cortically-evoked PAD inhibits the transmission of sensory information from primary afferents to the central nervous system and can be experimentally assessed by recording cortically-evoked dorsal root potentials (DRPs, Fig. 1A). We thus recorded DRPs *in vivo* in lumbar roots L4-L6 (conveying hindlimb sensory inputs) of Thy1::ChR2 mice, expressing channelrhodopsin2 in layer V cortical neurons(26), and mapped the cortical area eliciting DRPs and muscle



contractions in the hindlimb (Fig. 1A,B). Using photostimulations at the surface of the cortex, we identified the area inducing the largest DRPs (center: AP=-0.75 mm, L=1.5 mm; Fig. 1C, n=7 mice) and the largest electromyographic (EMG) signal in the tibialis anterior (center: AP=-0.75 mm, L=1.75mm, n=5 mice; Fig. 1C). Interestingly, these two zones essentially overlap, demonstrating for the first time in rodents that cortically-evoked PAD and motor command of the hindlimb originate from the same cortical area.

### *Spinal targets of the CST*

We next investigated the spinal circuit underlying cortically-evoked DRPs. DRPs can be segmentally-evoked, by the activation of a neighboring root; this dampens sensory inputs through GABA-dependent primary-afferent depolarization (27) although other mechanisms involving cholinergic pathways have also been described (28). In addition, GABAergic terminals presynaptic to proprioceptive fibers have been shown to arise from GAD65 interneurons (29, 30) and their activation produces DRPs (6). We thus investigated whether the CST directly targets GAD65-expressing spinal lumbar neurons that could in turn inhibit primary afferents. In TdTomato-flex mice crossed with GAD65::GFP mice, we infected cortical neurons located in the area inducing hindlimb DRPs and EMG (Extended data Fig.1) with a viral monosynaptic anterograde transsynaptic tool (AAV1-CBA::WGA-Cre) encoding the Cre-recombinase fused to the wheat germ agglutinin (WGA) (31). The fusion with WGA provides transsynaptic properties to Cre, which is then transferred to cortical monosynaptic targets where it unlocks the expression of TdTomato (see Methods, Extended data Fig. 2). We evaluated the proportion of GAD65+ neurons among the spinal targets of the CST revealed by Td-Tomato expression (Fig. 1D-E):  $16.4 \pm 3.2\%$  of spinal Td-Tomato+ neurons were GAD65::GFP+ (n=3 mice), suggesting that the cortically-evoked DRP could be mediated by the activation of GAD65 interneurons within a circuit involving a single spinal player. By performing a similar experiment in ChAT::EGFP mice, only  $2.2 \pm 1.8\%$  of the targets of the CST were ChAT::EGFP positive (n=4 mice), excluding a direct contribution of a cholinergic mechanism (extended data Fig. 3).

### *Segregation of pathways for cortically-evoked DRPs and motor command*

Although DRPs and motor commands are elicited by the same area in the mouse sensorimotor cortex, whether they share the same corticofugal pathway and spinal circuits remains to be

elucidated. We first interrogated the contribution of indirect cortical-to-spinal pathways to these two functions (Fig. 2). As broad photostimulation of the cerebral cortex in Thy1::ChR2 activates a variety of layer V cortical neurons(26); we selectively lesioned the direct CST (Fig. 2B) using an electrolytic lesion at the level of the pyramidal decussation (pyramidotomy) (Extended Data Fig.4A, C). This protocol spares potential CST collaterals targeting the brainstem motor nuclei, that are branching more rostrally (32, 33) as well as rubrospinal or reticulospinal tracts that can be activated by direct corticorubral or corticoreticular neurons (Fig. 2B). Cortically evoked DRPs were completely abolished by this pyramidotomy (DRP amplitude  $3.8 \pm 0.32 \mu\text{V}$  before,  $0.30 \pm 0.12 \text{m}\mu\text{V}$  after,  $n=3$  mice,  $p=0.006$ ), whereas cortically-evoked EMGs were hardly affected (S/N Ratio  $3.3 \pm 0.61$  before,  $2.2 \pm 0.1$  after,  $n=4$  mice,  $p=0.517$ , all Z-Scores above significance after lesion, Extended Data table 1B) (Fig. 2C-D). This demonstrates that indirect cortical-to-spinal pathways (involving supraspinal motor centers) do not encode cortically-evoked DRPs but have a prominent role for cortically-evoked motor contraction of the hindlimb. Our results show that, in rodents, the CST mediates cortically-evoked DRPs and hence modulates sensory inputs in a presynaptic manner.

Although the contribution of the rubrospinal or reticulospinal tracts to motor command is well acknowledged in both rodents and primates, the CST is also believed to encode motor drive (16). This could have been underrated by simultaneous stimulation of the indirect cortical-to-spinal pathways in Thy1::ChR2 mice. We thus directly interrogated the contribution of the CST to motor contraction by targeting exclusively these neurons through injection of a ChR2-encoding retrograde AAV in the lumbar spinal cord (Fig. 3A). As expected, the infected corticospinal neurons were located in the area delimited by the previous functional mapping of hindlimb muscle contraction and DRP (Fig. 3B-C). Their specific photostimulation (at the cortical level) induced a robust EMG signal (S/N Ratio  $1.65 \pm 0.14$ ,  $n=4$  mice, Fig. 3E, upper), demonstrating that CS neurons had indeed the ability to encode motor contraction. Because some CS neurons are known to send collaterals to supraspinal regions involved in motor command(33), we next addressed whether the recorded motor command traveled through the direct cortical-to-spinal branch of CS neurons or via supraspinal relays. A caudal pyramidotomy (Extended Data Fig.4C) completely abolished the EMG signal evoked by cortically activating CS neurons (S/N Ratio  $0.9 \pm 0.12$ ;  $n=3$  mice,  $p=0.013$ ; all Z scores below significance after pyramidotomy, extended Data table 1C) (Fig. 3D-E). This demonstrates that,

while the CST may have supraspinal collaterals, these do not encode motor output. Rather, it is through their direct spinal branch that CS neurons are able to drive motor command, although their contribution does not appear quantitatively significant when other cortical neurons are simultaneously activated.

#### *Spinal targets of the CST evoke DRPs but not muscular contraction*

Because both the DRPs and motor command of a given limb are encoded by the same sensorimotor cortical area and can be relayed directly by corticospinal tract, we next interrogated how these functions are segregated at the spinal level. CS neurons projecting to the lumbar spinal cord can have collaterals at the cervico-thoracic level(15, 34). There, they can contact cervical propriospinal neurons (35, 36) that in turn project to lumbar motoneurons to relay motor command (35) and are believed to be involved in the coordination of segments (37-40). In order to test specifically the contribution of the lumbar branch of CS neurons, without risking antidromic stimulation of rostral collaterals, we combined the transynaptic tool presented above with an intersectional approach at the lumbar level. We first identified the lumbar area containing the targets of the CST, after cortical injection of AAV1-CBA::WGA-Cre in TdTomato-flex mice (Fig. 4A): they were concentrated in spinal lumbar segments L2-L3, rostral to the large pools of motoneurons, in the contralateral deep dorsal horn (laminae IV to VII) (Fig. 4B). They were mostly located in the medial zone, lateral to the dorsal funiculus, where the CST fibers penetrate the grey matter. We thus combined the cortical injection of AAV1-CBA::WGA-Cre with the injection of an AAV encoding for a Cre-dependent form of ChETA (a Chr2 variant(41)) in the lumbar segment L3, in the medial third of the dorsal horn (Fig. 4C). In this way, we restricted the expression of ChETA to the lumbar targets of the CST (Fig. 4C, D). Photostimulation of these neurons through the spinal surface induced DRPs in the ipsilateral lumbar root of 8 out of 9 mice ( $2.93 \pm 0.48 \mu\text{V}$ ,  $n=8$  mice, Fig. 4E-G), demonstrating DRPs can be directly controlled by the CST projecting to the lumbar cord through the targeted interneurons. However, photoactivation of these same lumbar CS-postsynaptic neurons did not elicit any movement of the hindlimb or muscle contraction as attested by flat EMG recordings (S/N Ratio  $1.0 \pm 0.02$ ;  $n=7$  mice, Z-Scores below significance, extended Data table 1D) (Fig. 4E-G), suggesting that CST-evoked motor command is mediated by a spinal circuit located at another spinal level. Cortically-evoked DRPs and EMGs thus follow a similar corticofugal pathway that then segregates at the spinal level.

## Discussion

In this study, we have evaluated the contribution of the CST to the cortical control of movements, either through its ability to convey the motor contraction command or to control sensory inputs. Several brain and spinal structures have been shown to be involved in the generation and control of movement, depending on the exact motor task under consideration. The cortex is classically associated to forelimb skilled movements (17, 42-44) and to complex locomotor tasks (obstacles crossing, leaning scale or beam, etc.) (16, 45-47) while its role in gross locomotion appears, if anything, minor (46, 47). Here, we have explored the ability of the cortex to induce a motor contraction of the hindlimb (tibialis anterior), and to modulate sensory inputs incoming from the hindlimb (DRP in lumbar sensory roots), two functions that could contribute to the ability of the cortex to control movement.

### *Hindlimb sensorimotor cortex*

We have first identified the zone of the cortex involved in these two functions through functional and anatomical means. The cortical area where our photostimulation induces hindlimb contraction is similar to that previously reported from functional studies in mice, and defined by these authors as motor cortex (24, 25). This same cortical area (centered around 1mm caudal and 1,5mm lateral to bregma) is partly labelled as primary somatosensory cortex in some atlases and studies (15, 48, 49). We thus use the conservative term “hindlimb sensorimotor cortex”. Interestingly, our functional experiments to map the cortical area inducing PAD resulted in the exact same area. This overlap might be a specificity of the “hindlimb area” of the cortex (HLA), and may not generalize to the “forelimb areas” (RFA and CFA). Indeed, the CS neurons from the forelimb areas are known to be spatially segregated (forming clusters projecting either to the dorsal or to the intermediate-ventral cervical cord), while those from the HLA are largely intermingled (50). In addition, our results demonstrate that the same cortical area is labelled after retrograde tracing from the lumbar cord (Fig. 3C) excluding the existence of another pool of cortico-lumbar neurons beside those identified by the functional mapping of the cortex.

### *Motor command*

Our study concludes that a large fraction of the cortical motor command to the hindlimb is conveyed through indirect pathways. These could involve the reticular formation or the red nucleus, structures that are known to receive cortical innervation, to project directly or indirectly onto spinal motoneurons, and to control different parameters of movements (51-53). Our recordings also confirm that the cortex conveys a motor command to the hindlimb through the direct corticospinal pathway, however direct stimulation of the CS lumbar targets fails to produce motor contraction. This is consistent with a recent study that demonstrated that the cortical motor command to the hindlimb can be mediated by corticospinal neurons projecting to the cervical cord, and then relayed by cervical-to-lumbar propriospinal neurons (15). Although we selectively study CS projecting at least to the lumbar cord (through lumbar retrograde infection), many CS neurons are known to have collaterals at different spinal segments (34): their photostimulation at the cortex level could thus activate cervical pathways in addition to lumbar ones.

We cannot exclude the possibility that some lumbar targets of the CST contribute to conveying the cortical motor command to the hindlimb, but that they are not sufficiently labeled through our transynaptic approach. The efficiency of WGA-Cre transynaptic tracing is indeed known to be sometimes target specific (31), and the number of labelled neurons in the spinal cord suggest that not all targets are labeled. However, this would still implicate that these neurons are distinct from the ones implicated in the generation of a DRP, and that these two functions use segregated pathways. Another technical caveat could be that the photostimulation using an optic fiber positioned at the surface of the cord is insufficient to induce activation of the CS-postsynaptic neurons involved in motor command. This seems unlikely as we have recorded local field potentials as deep as 1000  $\mu\text{m}$  in the spinal cord after surface illumination (data not shown). While these technical issues cannot be excluded, the recent report by Karadimas and collaborators (15) strongly support to the hypothesis that the motor cortical command conveyed by the CST uses a relay in another spinal segment.

### *Sensory control*

Beyond inducing hindlimb muscle contraction, we have characterized the ability of the cortex to induce dorsal root potentials. DRPs are a measure of the primary afferent depolarization (PAD), a phenomenon initially described after stimulation of a neighboring afferent fiber (segmental PAD) (14). Segmental PAD is believed to be mediated by GABAergic receptors whose activation induces a depolarization (due to a high chloride content of primary afferents) that reduces the amplitude of incoming action potentials and thus inhibits synaptic transmission (54, 55). It has been proposed that the presynaptic GABAergic, last order neuron that could be located in laminae V-VI, is under the control of a first order excitatory interneuron, that could receive peripheral and descending (including cortical) inputs (27, 56). The vast majority of last-order GABAergic neurons express GAD65 (found in 90% of axo-axonic synapses onto primary afferent terminals contacting motoneurons) (29). The targets of the CST identified by our transynaptic labeling are indeed predominantly located in laminae IV-VI, and include a small population of GAD65-expressing neurons. Although this is no proof that these GAD65-expressing targets of the CST neurons are involved in Cx-evoked DRPs, they represent a potential substrate for this effect that would thus not require a spinal first order excitatory interneuron.

The control of incoming sensory information through PAD plays an important role in the generation of coordinated movements and processing of sensory information, including nociceptive information (57). GAD65-expressing neurons are essential for smoothed movements (6), but whether they require peripheral or cortical information to do so is yet unknown. Similarly, recordings in primates demonstrated that sensory information is inhibited in a modality- and phase-dependent manner during voluntary movements (5, 9, 58) suggesting that this inhibition is somehow related to the motor command, but the exact underlying mechanism remains to be elucidated. Here, we demonstrate that CS neurons from the same sensorimotor cortex area (but not necessarily a single population) are able to relay both motor command and sensory modulation to hindlimb, but through segregated pathways.

## *Conclusion*

Altogether, our results demonstrate a segregation of pathways involved in cortically-evoked sensory modulation vs. motor control. The direct corticospinal tract is able to induce motor contraction, independently of its supraspinal collaterals, through spinal targets possibly located at the cervico-thoracic level. However, we show that motor command mainly involves non-CST pathways, most likely cortico-rubral, or -reticular ones. On the other hand, the major and essential role of the lumbar rodent CST appears to be hindlimb sensory gain at the primary afferent level, through a population of lumbar CS-postsynaptic neurons whose activation is sufficient to produce DRPs. While the CST has long been known to have different functions and to have progressively evolved towards an essentially fine motor tract (1), we here show that its prominent role in the rodent lumbar cord is modulation of sensory inputs. This suggests that sensory modulation by the CST has not evolved secondary to motor control, but rather precedes motor control in the evolution of the CST. This paradigm shift also forces re-interpretation of previous studies aiming at promoting CST function in a therapeutic perspective, whether in mouse models of spinal injury or neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis. While most of these studies have exclusively considered motor command aspects, our results provide a new perspective to analyze these efforts by taking into account the primary role of rodent lumbar CST, i.e. sensory modulation.

## MATERIALS AND METHODS

**Animal models.** This study was carried out in strict accordance with the national and international laws for laboratory animal welfare and experimentation and was approved in advance by the Ethics Committee of Strasbourg (CREMEAS; CEEA35; agreement number/reference protocol: APAFIS#

12982 - 2017122217349941 v3). The following mice strains were used (adult males and females): Thy1::ChR2 (Cg-Tg(Thy1-COP4/EYFP)18Gfng/J, Jackson Laboratory), TdTomato-Flex (*Gt(ROSA)26Sor<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J*, Jackson Laboratory), ChAT::EGFP(59), GAD65::GFP(60). All lines except GAD65::GFP were back-crossed (at least 10 generations) on a CD1 background. GAD65::GFP were on a C57Bl6/J background. The mice were housed in the Chronobiotron facility (UMS3415, CNRS, University of Strasbourg) in accordance with the European convention 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

### **Electrophysiological recordings.**

*EMG recording:* Ketamine/Xylazine anesthesia was chosen to minimally affect muscular tone. After the initial anesthesia (150 mg/kg of ketamine, Imalgene 1000 and 10 mg/kg of Xylazine, Rompun 20%), complementary doses of Ketamine were given when the animal was showing signs of awakening (additional doses bridged by short exposure to Isoflurane 1–1.5%)(61). Concentric EMG needle electrodes (Myoline Xp) were inserted in the *tibialis anterior* muscle of the animals and a ground electrode was inserted in the tail. Responses were collected with a recording amplifier (IR183A, Cygnus technology) in series with a second amplifier (Brownlee Precision, model440). The traces were filtered with a bandwidth of 0.1 Hz–10 kHz, recorded with Spike 2 software (version 8.00, CED, Cambridge, UK), and analyzed off line with Clampfit (pCLAMP, version 10.7) and home-made python routines (WinPython 2.7.10, Python Software Foundation). EMG responses were recorded after cortical or spinal photostimulation (see below), and the response to 3 consecutive stimulations was averaged for analysis. The area under the curve of the rectified average trace was calculated in a window of 30ms, either 40 ms before (baseline noise, N) or 10 ms after (signal, S) the onset of the stimulation. The EMG response was presented as the S/N ratio. In CST lesion experiments, all S/N ratios were expressed as a % of the control S/N (average of 3 responses before the lesion). The noise level (S/N of 1) was similarly expressed as a % of the above defined control S/N.



*DRP recording:* Under isoflurane (1.5-2%) anesthesia, the mice spinal cord was fixed with the spinal cord unit of a stereotaxic frame (Narishige instruments). A laminectomy was performed to expose the surface of lumbar L3-L6 spinal cord segments. A dorsal root (L4-L6) was dissected, cut before the DRG, and suctioned with a glass pipet. An agar pool was created on the exposed spinal cord, and filled with NaCl 0.9%. The amplifiers/filters/software used were the same as for the EMG recordings. DRPs in response to 60 successive cortical or spinal photostimulations (see below) were averaged for analysis. The amplitude of the response from the onset to the peak was measured using Clampfit 10.0. The amplitude of the noise was similarly measured on a window preceding photostimulation. For spinal photostimulation, DRPs and EMGs recordings of 3 series of photostimulation were averaged.

**Cortical photostimulation.** Optogenetic stimulation of the cortex was performed on anesthetized animals while recording EMG or DRP. For the cortex, a craniotomy of approximately 9mm<sup>2</sup> was performed under stereo microscope on the contralateral side from the recording site. Muscle contraction, measured by EMG, was evoked by photostimulation with a 250  $\mu$ m-probe (473 nm laser source PSU-III-FDA) using the following protocol: trains of 6 pulses, 1 ms duration, 2 ms interval; 15 s minimum between each train. DRPs were elicited by photostimulation with a 105  $\mu$ m-probe (460 nm LED source, Prizmatix) using the following protocol: trains of 5 pulses of 8 ms, 1 ms interval and 2 s between each train. In both cases, the probe was moved at the surface of the cortex along a 500  $\mu$ m-spaced grid. Isopotential contour plots were created, using for EMGs the S/N and for DRPs the peak amplitude (both normalized to the largest values in each animal) at each photostimulation point in the cortex, using a linear interpolation on a set of X, Y, Z triples of a matrix. For EMG, only S/N ratio above significance (Z-Score>3, Extended Data table 1A) were considered for the analysis. Then the isopotentials contours were superimposed on the metric planes of the top view of the cortex(48).

**Spinal cord photostimulation.** Optogenetic stimulation of the spinal cord was performed on anesthetized mice after laminectomy (described above for DRPs recordings), using a 1 mm probe (LED source) placed on the surface of the lumbar spinal cord (on top of the injection site). The stimulation trains were those used for cortical stimulation. EMG and DRP recordings were sequentially performed and required to alternate between different types of anesthesia:

isoflurane (craniotomy and laminectomy surgery), ketamine/xylazine (EMG recording), isoflurane 1.5–2 % (DRPs recordings). Only the mice filling the two following criteria were kept for analysis: (i) TdTomato<sup>+</sup>/EYFP<sup>+</sup> neurons were found in the stimulated area; (ii) the response was not limited to the stimulation window (probable photoelectric artefact).

**Pyramidotomy.** Electrolytic lesion of the CST was performed in a subset of THY1::ChR2 and ChR2 retrogradely labeled mice, with 200 ms pulses, 30 mA using a constant current stimulator (Digitimer Ltd thorug) through a silver bipolar electrode inserted in the pyramidal decussation (3.5-4 mm caudal to Bregma, 6 mm deep). The brain was removed for histological analysis at the end of the experiment.

#### **Cortical and spinal injections.**

Brain injections (1.5–2 mm lateral, 0.5–1 mm caudal to Bregma, 0.5 mm deep) were performed as previously described(62) under isoflurane anesthesia (2–3%). Briefly, 90 to 270 nL of virus was injected by manual pressure using a 5 mL syringe coupled to a calibrated glass capillary, under visual control. Spinal injections were performed using a similar manual pressure protocol. The pipette was inserted in the exposed space between two vertebrae (T13-L1, corresponding to spinal L4), as previously described(63). 0.45 µL of virus was injected 300 µm lateral to the midline and 300-400 µm deep. In both cases, Manitol 12.5% was injected i.p. (0.2 – 0.5 ml) after the surgery to enhance vector spread and improve transduction(64) The animals were kept 2 weeks for the retroAAV injections and a minimum 5 weeks for dual injections before in vivo DRPs and/or EMGs recordings or histological analysis.

**Virus.** AAV2/1-CBA-WGA-CRE-WPRE was purchased at the molecular tools platform at the Centre de recherche CERVO (Québec, Canada), and was used at a titer of  $8 \times 10^{12}$  vg/ml. AAV-Ef1a-DIO ChETA-EYFP was a gift from Karl Deisseroth(41) (Addgene viral prep # 26968-AAV9; <http://n2t.net/addgene:26968> ; RRID:Addgene\_26968) and was used at a titer of  $1 \times 10^{13}$  vg/mL. AAV-CAG-hChR2-H134R-tdTomato was a gift from Karel Svoboda(65) (Addgene viral prep # 28017-AAVrg; <http://n2t.net/addgene:28017> ; RRID:Addgene\_28017), and was used at a titer of  $7 \times 10^{12}$  vg/mL.

## Histology

Mice were transcardially perfused with PB followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PB 0.1M, or, if histological analysis followed electrophysiological recordings, the brain and spinal cord were post-fixed overnight in PFA 4% in PB 0.1M. Serial 50 µm brain (coronal or sagittal) and spinal (transverse or sagittal) sections were performed on a vibratome (Leica VT1000 S) and mounted using a DAPI staining mounting medium (Vectashield, Vector laboratories).

**Image analysis.** The extent of the cortical injection site was estimated by measuring the spread of reporter protein fluorescence (TdTomato) in the layer V of the cortex. The intensity of fluorescence was analyzed as previously described(66, 67) on evenly spaced (250 µm apart) transverse brain sections imaged with a microscope (Axio Imager 2, Zeiss). Briefly, the “Plot Profile” function of ImageJ software (W. Rasband, National Institutes of Health) was used to measure the intensity of fluorescence along the horizontal axis of a 6000x250 µm rectangle containing the layer V of the cortex (Extended data Fig. 1). These values were normalized to the highest intensity for each animal, and used to plot a density map of each injection site. The contour of the injection area was defined as 30% of the maximal intensity, corresponding to the approximate intensity of individual neurons.

*Spatial distribution of corticospinal post-synaptic neurons:* Spinal\_lumbar sections (50µm) were mounted serially and imaged using a Zeiss epifluorescence microscope or a Leica SP5 II confocal microscope. Images were aligned manually with Photoshop using the central canal and the dorsal funiculus as landmarks. Each labeled neuron was assigned coordinates corresponding to its distance to the center of the central canal (X and Y) and the index of the slice containing it (Z). This was used to calculate the number of labeled neurons every 100 µm x 100 µm bins (XxY) (or 200 µm x200 µm X x Z) in order to build density plots.

**Quantification and statistical analysis.** The mean and standard deviation of the Noise were measured from the 3 Noise values obtained from each EMG recording, and used to calculate the Z-scores. The Z-score of each EMG response to the stimulation was calculated using the following equation:

$$Z\text{-score} = \frac{\text{Signal} - \text{mean Noise}}{\text{standard deviation of Noise}}$$

A Z-score of 1.96 or 3 corresponding to a significance level of 0.05 or 0.001 was chosen to discriminate significant responses from non-significant ones. The conservative choice of threshold was chosen in agreement with visual inspection of the traces, to ensure that any EMG responses was not simply due to noise. For each tests, the normality and variance equality were verified by SigmaPlot (Version 13, Copyright © 2014 Systat Software, Inc) using Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe's methods, before we applied the parametric tests. All the data were analyzed using a one-way ANOVA and a post-hoc test was performed only if an effect showed statistical significance. The P-values for multiple comparison were measured using Holm-Sidak's method. Error bars in all Figures represent mean  $\pm$  s.e.m., \*P < 0.05, NS, no statistical significance (P  $\geq$  0.05). The power of the tests was systematically attested to be above the desired power of 0.80.

## **Acknowledgments**

We thank the following for providing/generating specific mouse lines: Gábor Szabó for GAD65::GFP, Jakob von Engelhardt for ChAT::EGFP. YML was supported by a postdoctoral fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20160936264) and CB was funded by a fellowship from the Ministère de la Recherche. We thank Dr. Sophie Reibel-Foisset and the staff of the animal facility (Chronobiotron, UMS 3415 CNRS and Strasbourg University) for technical assistance. We also thank Yves De Koninck, Frédéric Doussau and Didier Desaintjan for critical reading of the manuscript.

## References

1. Lemon RN (2008) Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 31:195-218.
2. Moreno-Lopez Y, Olivares-Moreno R, Cordero-Erausquin M, & Rojas-Piloni G (2016) Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat* 10:24.
3. Ueno M, *et al.* (2018) Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Rep* 23(5):1286-1300 e1287.
4. Confais J, Kim G, Tomatsu S, Takei T, & Seki K (2017) Nerve-Specific Input Modulation to Spinal Neurons during a Motor Task in the Monkey. *J Neurosci* 37(10):2612-2626.
5. Seki K, Perlmutter SI, & Fetz EE (2003) Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nat Neurosci* 6(12):1309-1316.
6. Fink AJ, *et al.* (2014) Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature* 509(7498):43-48.
7. Akay T, Tourtellotte WG, Arber S, & Jessell TM (2014) Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(47):16877-16882.
8. Azim E & Seki K (2019) Gain control in the sensorimotor system. *Curr Opin Physiol* 8:177-187.
9. Seki K & Fetz EE (2012) Gating of sensory input at spinal and cortical levels during preparation and execution of voluntary movement. *J Neurosci* 32(3):890-902.
10. Abdelmoumene M, Besson JM, & Aleonard P (1970) Cortical areas exerting presynaptic inhibitory action on the spinal cord in cat and monkey. *Brain Res* 20(2):327-329.
11. Andersen P, Eccles JC, & Sears TA (1962) Presynaptic inhibitory action of cerebral cortex on the spinal cord. *Nature* 194:740-741.
12. Andersen P, Eccles JC, & Sears TA (1964) Cortically Evoked Depolarization of Primary Afferent Fibers in the Spinal Cord. *J Neurophysiol* 27:63-77.
13. Carpenter D, Lundberg A, & Norrsell U (1963) Primary Afferent Depolarization Evoked from the Sensorimotor Cortex. *Acta Physiol Scand* 59:126-142.

14. Wall PD & Lidierth M (1997) Five sources of a dorsal root potential: their interactions and origins in the superficial dorsal horn. *J Neurophysiol* 78(2):860-871.
15. Karadimas SK, *et al.* (2019) Sensory cortical control of movement. *Nat Neurosci*.
16. Wang X, *et al.* (2017) Deconstruction of Corticospinal Circuits for Goal-Directed Motor Skills. *Cell* 171(2):440-455 e414.
17. Miri A, *et al.* (2017) Behaviorally Selective Engagement of Short-Latency Effector Pathways by Motor Cortex. *Neuron* 95(3):683-696 e611.
18. Rudomin P, Solodkin M, & Jimenez I (1986) PAD and PAH response patterns of group Ia- and Ib-fibers to cutaneous and descending inputs in the cat spinal cord. *J Neurophysiol* 56(4):987-1006.
19. Ebbesen CL & Brecht M (2017) Motor cortex - to act or not to act? *Nat Rev Neurosci* 18(11):694-705.
20. Alstermark B, *et al.* (2011) Motor command for precision grip in the macaque monkey can be mediated by spinal interneurons. *J Neurophysiol* 106(1):122-126.
21. Bourane S, *et al.* (2015) Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160(3):503-515.
22. Hantman AW & Jessell TM (2010) Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal corollary circuit. *Nat Neurosci* 13(10):1233-1239.
23. Abraira VE, *et al.* (2017) The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168(1-2):295-310 e219.
24. Ayling OG, Harrison TC, Boyd JD, Goroshkov A, & Murphy TH (2009) Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat Methods* 6(3):219-224.
25. Li CX & Waters RS (1991) Organization of the mouse motor cortex studied by retrograde tracing and intracortical microstimulation (ICMS) mapping. *Can J Neurol Sci* 18(1):28-38.
26. Arenkiel BR, *et al.* (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54(2):205-218.
27. Rudomin P & Schmidt RF (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129(1):1-37.

28. Hochman S, Shreckengost J, Kimura H, & Quevedo J (2010) Presynaptic inhibition of primary afferents by depolarization: observations supporting nontraditional mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1198:140-152.
29. Betley JN, *et al.* (2009) Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit. *Cell* 139(1):161-174.
30. Hughes DJ, *et al.* (2005) P boutons in lamina IX of the rodent spinal cord express high levels of glutamic acid decarboxylase-65 and originate from cells in deep medial dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(25):9038-9043.
31. Libbrecht S, Van den Haute C, Malinouskaya L, Gijsbers R, & Baekelandt V (2017) Evaluation of WGA-Cre-dependent topological transgene expression in the rodent brain. *Brain Struct Funct* 222(2):717-733.
32. Alstermark B & Pettersson LG (2014) Skilled reaching and grasping in the rat: lacking effect of corticospinal lesion. *Front Neurol* 5:103.
33. Akintunde A & Buxton DF (1992) Origins and collateralization of corticospinal, corticopontine, corticorubral and corticostriatal tracts: a multiple retrograde fluorescent tracing study. *Brain Res* 586(2):208-218.
34. Kamiyama T, *et al.* (2015) Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *J Neurosci* 35(3):1181-1191.
35. Ni Y, *et al.* (2014) Characterization of long descending premotor propriospinal neurons in the spinal cord. *J Neurosci* 34(28):9404-9417.
36. Ueno M, Hayano Y, Nakagawa H, & Yamashita T (2012) Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain* 135(Pt 4):1253-1267.
37. Miller S, Van Der Burg J, & Van Der Meche F (1975) Coordination of movements of the hindlimbs and forelimbs in different forms of locomotion in normal and decerebrate cats. *Brain Res* 91(2):217-237.
38. Nathan PW, Smith M, & Deacon P (1996) Vestibulospinal, reticulospinal and descending propriospinal nerve fibres in man. *Brain* 119 ( Pt 6):1809-1833.
39. Reed WR, Shum-Siu A, Onifer SM, & Magnuson DS (2006) Inter-enlargement pathways in the ventrolateral funiculus of the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 142(4):1195-1207.

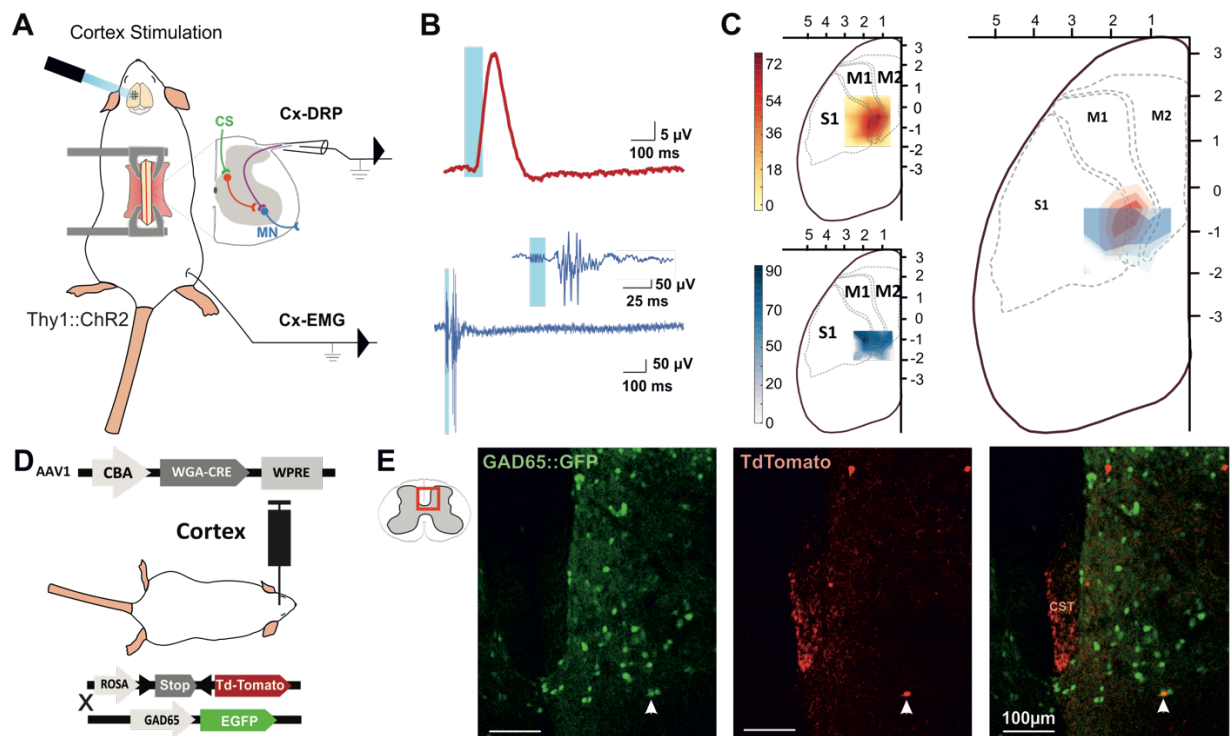
40. Reed WR, Shum-Siu A, Whelan A, Onifer SM, & Magnuson DS (2009) Anterograde labeling of ventrolateral funiculus pathways with spinal enlargement connections in the adult rat spinal cord. *Brain Res* 1302:76-84.
41. Gunaydin LA, *et al.* (2010) Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* 13(3):387-392.
42. Starkey ML, *et al.* (2005) Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol* 195(2):524-539.
43. Galinanes GL, Bonardi C, & Huber D (2018) Directional Reaching for Water as a Cortex-Dependent Behavioral Framework for Mice. *Cell Rep* 22(10):2767-2783.
44. Guo JZ, *et al.* (2015) Cortex commands the performance of skilled movement. *Elife* 4:e10774.
45. Bieler L, *et al.* (2018) Motor deficits following dorsal corticospinal tract transection in rats: voluntary versus skilled locomotion readouts. *Heliyon* 4(2):e00540.
46. DiGiovanna J, *et al.* (2016) Engagement of the Rat Hindlimb Motor Cortex across Natural Locomotor Behaviors. *J Neurosci* 36(40):10440-10455.
47. Beloozerova IN & Sirota MG (1993) The role of the motor cortex in the control of accuracy of locomotor movements in the cat. *J Physiol* 461:1-25.
48. Kirkcaldie M, Watson c, Paxinos G, & Franklin K (2012) Straightening out the mouse neocortex. *Australian Neuroscience Society Annual Conference*.
49. Liu Y, *et al.* (2018) Touch and tactile neuropathic pain sensitivity are set by corticospinal projections. *Nature* 561(7724):547-550.
50. Olivares-Moreno R, *et al.* (2017) The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Struct Funct* 222(9):3945-3958.
51. Esposito MS, Capelli P, & Arber S (2014) Brainstem nucleus MdV mediates skilled forelimb motor tasks. *Nature* 508(7496):351-356.
52. Zelenin PV, Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, & Deliagina TG (2010) Activity of red nucleus neurons in the cat during postural corrections. *J Neurosci* 30(43):14533-14542.
53. Lavoie S & Drew T (2002) Discharge characteristics of neurons in the red nucleus during voluntary gait modifications: a comparison with the motor cortex. *J Neurophysiol* 88(4):1791-1814.



54. Prescott SA & De Koninck Y (2003) Gain control of firing rate by shunting inhibition: roles of synaptic noise and dendritic saturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):2076-2081.
55. Doyon N, *et al.* (2011) Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLoS Comput Biol* 7(9):e1002149.
56. Eccles JC, Kostyuk PG, & Schmidt RF (1962) Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres. *J Physiol* 161:237-257.
57. McComas AJ (2016) Hypothesis: Hughlings Jackson and presynaptic inhibition: is there a big picture? *J Neurophysiol* 116(1):41-50.
58. Seki K, Perlmutter SI, & Fetz EE (2009) Task-dependent modulation of primary afferent depolarization in cervical spinal cord of monkeys performing an instructed delay task. *J Neurophysiol* 102(1):85-99.
59. von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, & Monyer H (2007) Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *J Neurosci* 27(21):5633-5642.
60. Lopez-Bendito G, *et al.* (2004) Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb Cortex* 14(10):1122-1133.
61. Tennant KA, *et al.* (2011) The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex* 21(4):865-876.
62. Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, & Osten P (2006) Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1(6):3166-3173.
63. Tappe A, *et al.* (2006) Synaptic scaffolding protein Homer1a protects against chronic inflammatory pain. *Nat Med* 12(6):677-681.
64. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, & Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51(1):5-17.
65. Mao T, *et al.* (2011) Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron* 72(1):111-123.
66. Lorenzo LE, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y, & Ribeiro-da-Silva A (2008) Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol* 508(4):592-604.

67. Mesnage B, *et al.* (2011) Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons of the dorsal horn of the mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 519(16):3139-3158.

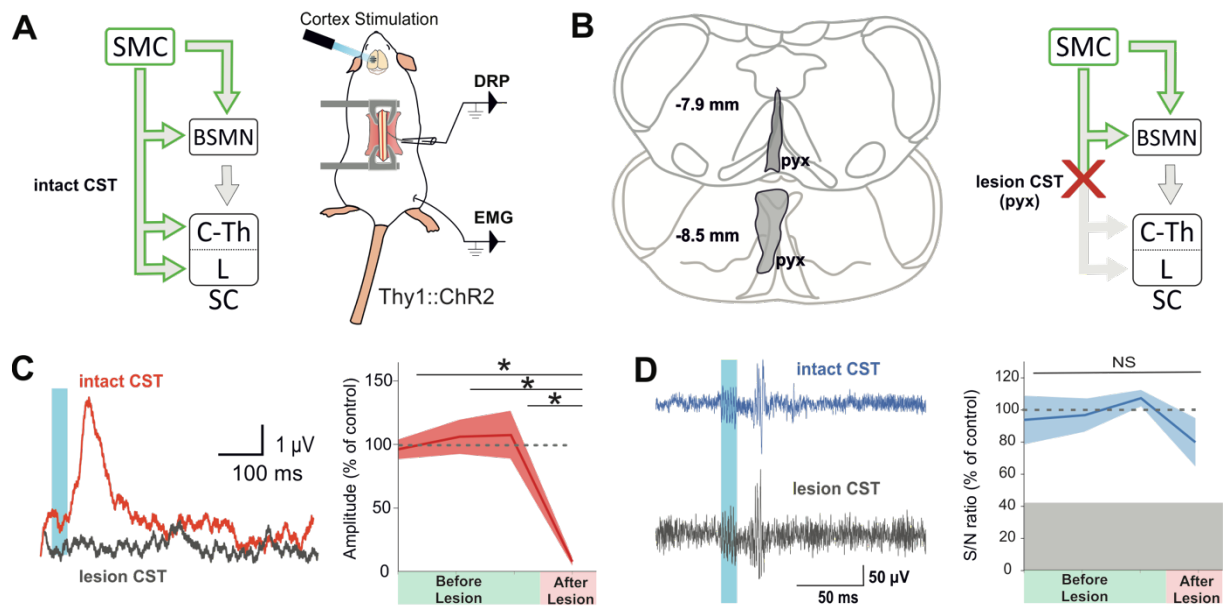
## Figures



**Figure 1. The same cortical area evokes dorsal root potentials and muscular contractions of the hindlimbs.**

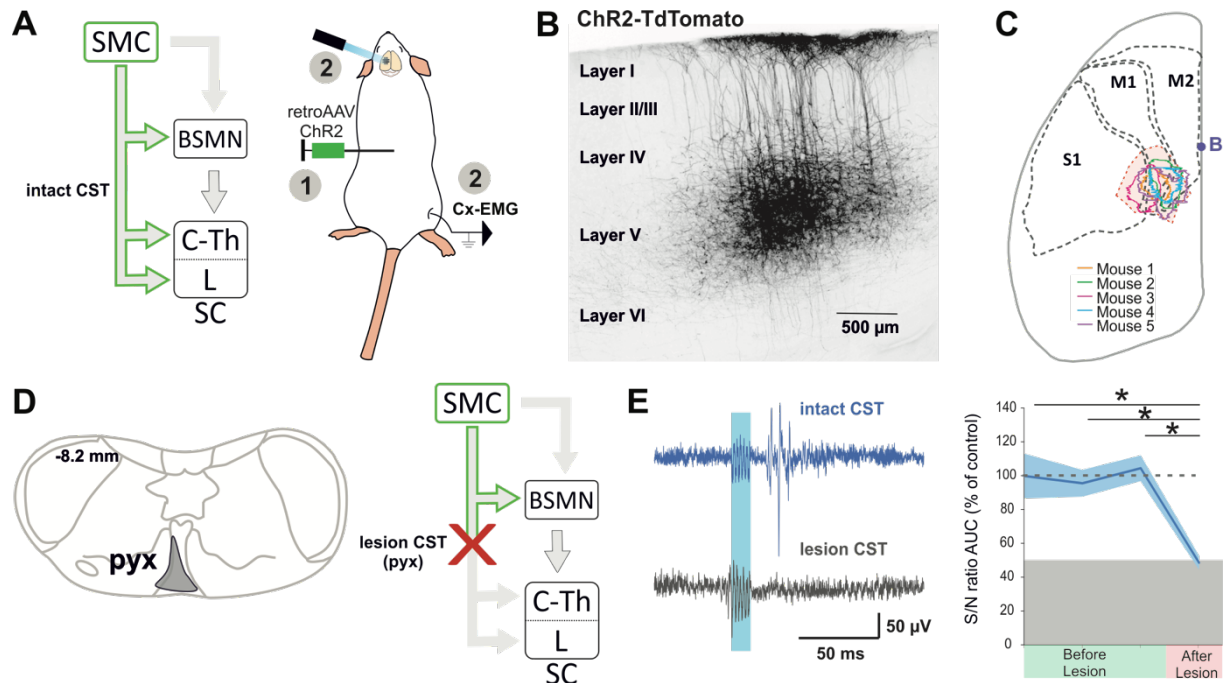
- A. Schematic experimental design for cortically-evoked (Cx-) DRP and EMG recordings elicited by photostimulation of the contralateral sensorimotor cortex of Thy1::ChR2 mice. DRPs correspond to the presynaptic depolarization of primary afferents propagating antidromically to the suction recording electrode containing a lumbar dorsal root, while EMGs are recorded in the *tibialis anterior* muscle.
- B. Representative traces of a cortically-evoked DRP (top red trace, average of 30 sweeps) and EMG (bottom blue trace, average of 3 sweeps) after photostimulation (blue window) of the contralateral cortex.
- C. *Left*, Heatmaps of the amplitude of the responses of cortically-evoked DRPs (top) and EMGs (bottom) in % of the maximum response. *Right*, Overlap of the two maps (red: DRP, blue: EMG) presented as isopotential contour plots (three color grades corresponding to 37%, 50% and 63% of maximum value). Coordinates of the cortex are expressed in mm and centered on *Bregma*. M1: primary motor cortex, M2: secondary motor cortex, and S1: primary sensory cortex, according to the Paxinos atlas (48).

- D. Schematic experimental design to identify GAD65-expressing neurons amongst corticospinal neurons targets: AAV1-CBA-WGA-CRE was injected in the sensorimotor cortex of TdTomato-flex X GAD65::GFP mice.
- E. Photomicrographs (z projection of confocal images) of a GAD65::GFP mouse lumbar dorsal horn (localization of the view indicated in the inset) after transynaptic labeling from the hindlimb sensorimotor contralateral cortex. A target of the CST (expressing TdTomato after transynaptic transfer of WGA-Cre) also expresses GAD65::GFP. CST: corticospinal tract.



**Figure 2. The corticospinal tract is essential for cortically-evoked inhibition of primary afferents.**

- A. *Left*, diagram showing direct and indirect cortical-to-spinal paths. In green: paths potentially activated by photostimulation in the cortex of Thy1::ChR2 mice. *Right*, experimental design.
- B. *Left*, drawing showing the extent of the pyramidal lesion (in grey, pyx) in the frontal plane (distance to *Bregma* indicated) in two animals whose recordings are respectively illustrated in C and D. *Right*, diagram showing the indirect cortical-to-spinal paths spared by the pyramidotomy.
- C. *Left*, Representative traces of cortically-evoked DRPs recording before (red) and after (grey) CST lesion (average of 30 traces). *Right*, the pyramidotomy abolishes cortically-evoked DRPs ( $p = 0.006$ , one-way ANOVA,  $n = 3$  mice). Post-hoc test Holm-Sidak,  $*P < 0.05$
- D. *Left*, Representative traces of cortically-evoked EMG recording before (blue) and after (grey) pyramidal lesion (average of 3 traces). *Right*, There is no significant change in the S/N ratio of the EMG response before and after the pyramidal lesion ( $p = 0.517$ , one-way ANOVA,  $n = 4$  mice). Grey zone: noise level (see Methods).

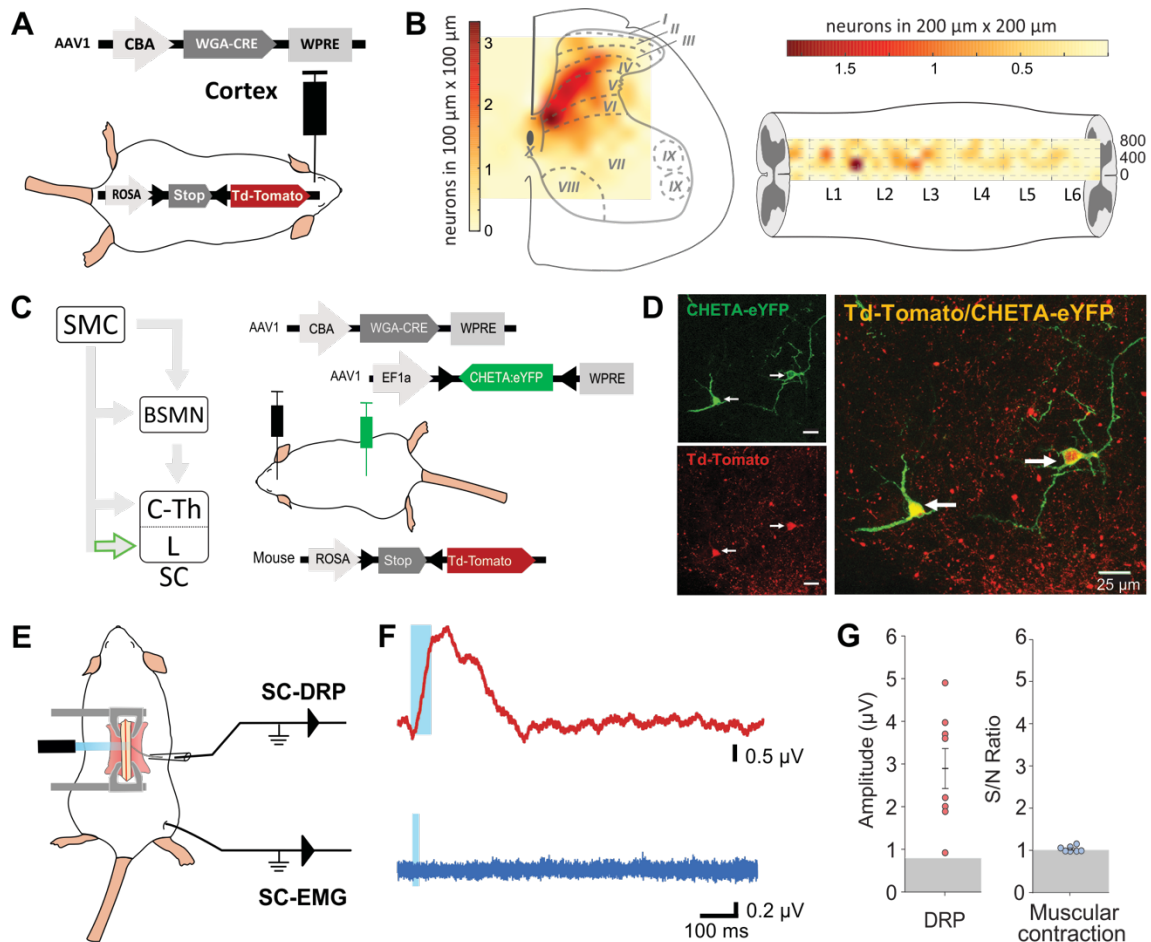


**Figure 3. The corticospinal tract can encode muscular contractions.**

- A. *Left*, diagram illustrating corticospinal neurons and their collaterals expressing ChR2 after retrograde infection in the lumbar cord with a retroAAV. *Right*, experimental design: the photostimulation and EMG recording session took place at least 3 weeks after the infection.
- B. Sagittal image from the sensorimotor cortex (Lateral= 0.68 mm), showing retrogradely labeled corticospinal neurons (expressing ChR2-TdTomato fluorescence).
- C. Drawing of a cortex top view, showing the localization of retrogradely labeled corticospinal neurons in the 5 animals (solid lines). They are within the area functionally determined as inducing DRPs and EMGs in the hindlimb (dashed lines).
- D. *Left*, drawing showing the extent of the pyramidal lesion in the animal whose recordings are illustrated in E. *Right*, diagram showing the supraspinal collaterals of ChR2-expressing CS neurons spared by the pyramidotomy.
- E. *Left*, cortically evoked EMG recordings before (blue) and after (grey) the pyramidal lesion. *Right*, the pyramidotomy abolishes cortically-evoked EMG ( $p=0.012$ , one-way

ANOVA, n= 4 mice). Post-hoc test Holm-Sidak, \*P < 0.05. Grey zone: noise level (see Methods)

The blue window on recording traces indicates light stimulation. SMC: sensorimotor cortex, BSMN: brain stem motor nuclei, C-Th: cervico-thoracic spinal cord, L-SC: Lumbo-sacral spinal cord.



**Figure 4. Lumbar corticospinal postsynaptic neurons encode DRPs but no movements.**

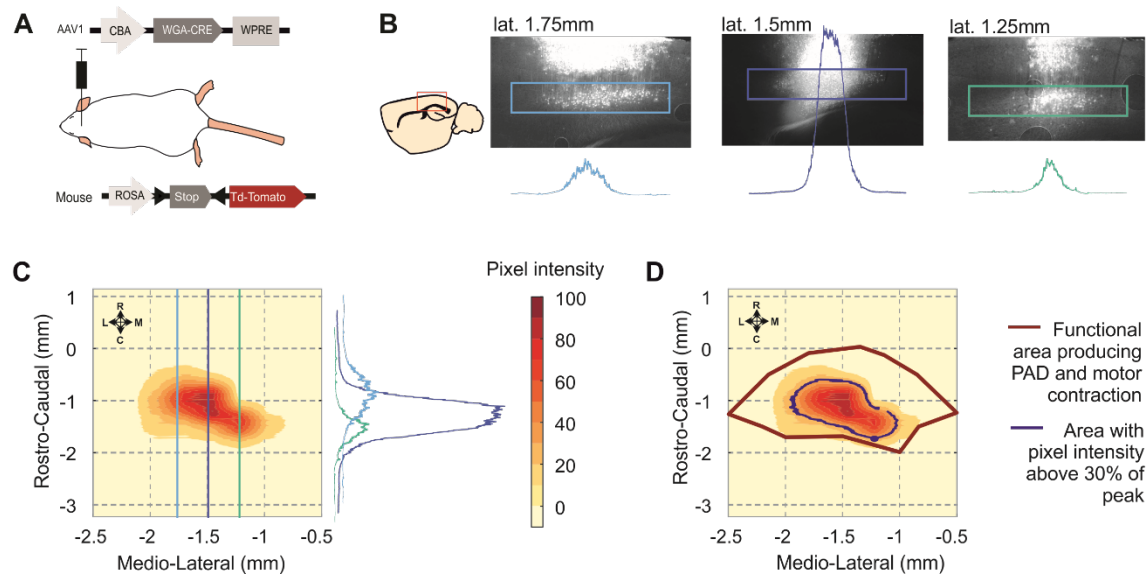
- Experimental design: the targets of the CST are labeled through a transynaptic approach consisting of AAV1-CBA-WGA-CRE injection in the hindlimb sensorimotor cortex of TdTomato-flex mice.
- Localization of the spinal targets of the CST: heatmap showing the distribution of the neurons in the lumbar cord (6 mm long) projected into the transverse plane (average of 9 mice) (*left*) or horizontal plane (average of 6 mice) (*right*) plane.
- Left*, Diagram illustrating that only lumbar direct targets of the CST express CHETA in the following experiment. *Right*, Experimental design: TdTomato-flex mice received an injection of AAV1-CBA-WGA-CRE in the hindlimb sensorimotor cortex and an injection of AAV1-Efl-flex-CHETA-eYFP in the L4 spinal segment.



- D. Photomicrographs (z projection of confocal images) from the dorsal horn of the spinal cord (laminae V/VI); the arrows point at two targets of the CST expressing TdTomato+ and CHETA-eYFP.
- E. Experimental design illustrating spinal photostimulation of the lumbar targets of the CST.
- F. Representative traces of DRP (red trace, average of 60 traces) and EMG (blue trace, average of 3 traces) recordings from the same animal after photostimulation of the lumbar targets of the CST (blue window).
- G. Photostimulation of the lumbar targets of the CST induces DRPs (left) but no EMG signal (right). Grey zone: noise level (see Methods).

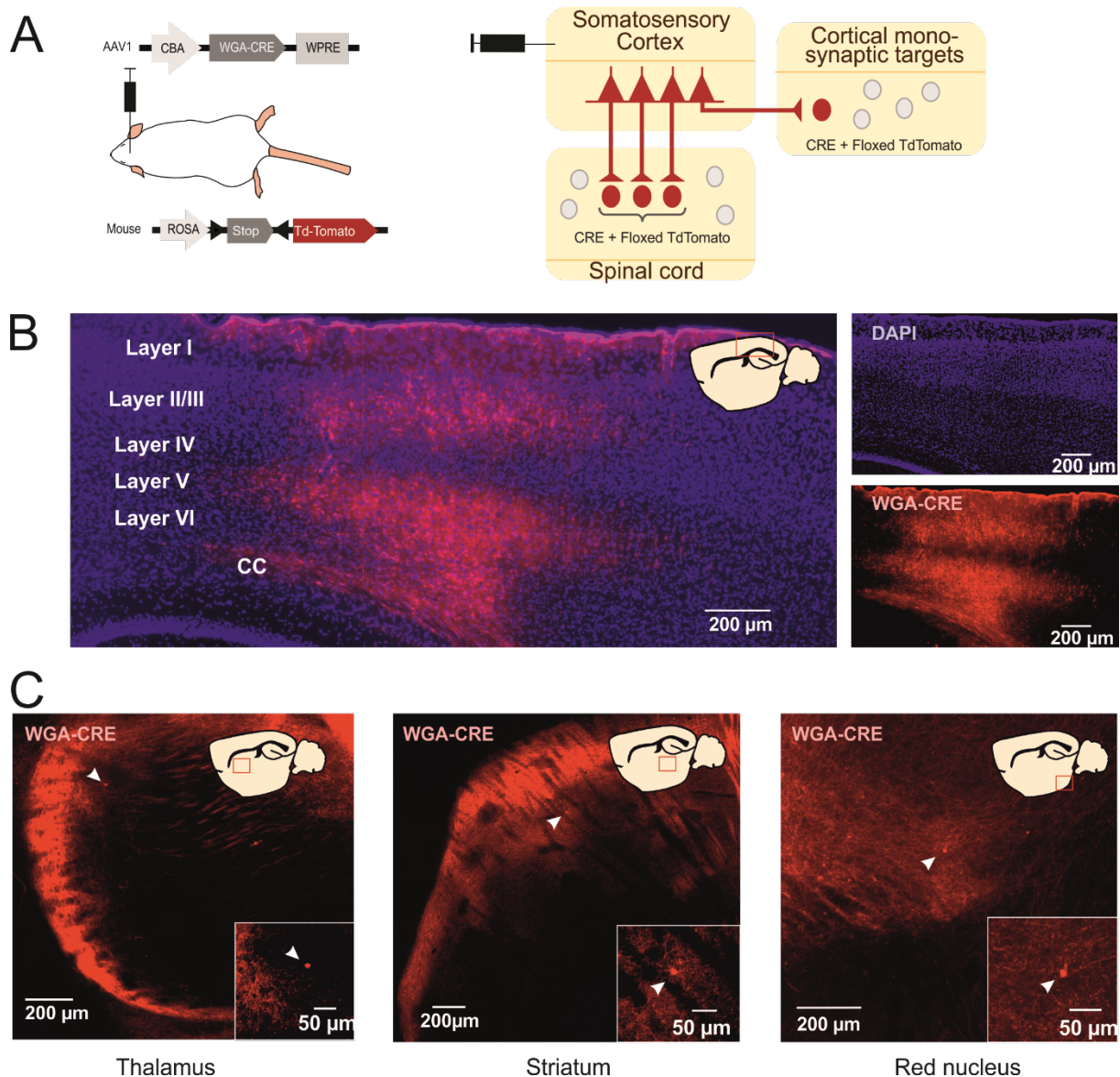
SMC: sensorimotor cortex, BSMN: brain stem motor nuclei, C-Th: cervico-thoracic spinal cord, L-SC: Lumbo-sacral spinal cord.

## Supplementary figures



### Supplementary Figure 1. Sensorimotor injection site analyses : cortical layer V fluorescence quantification.

- Schematic experimental design to transynaptically label cortical postsynaptic neurons.
- Left*, drawing of a sagittal slice of the mouse brain illustrating (red square) the localization of the pictures at the right. *Right*, images of the sensorimotor cortex of a single animal, at different lateral positions from the midline. The blue squares show the analyzed area, comprising cortical layer V. The plots show the vertical averages of pixel intensity throughout each blue square. The 3 slices are localized in the sites indicated by the blue lines in C.
- Example of an injection site represented as a heat map of the pixel intensity across the layer V of a cortex. The map is build using the three plots presented in B (illustrated here in the right to show their orientation) as well as additional ones from sequential brain sections on the same animal.
- Overlap between the heat map in C and the functional area eliciting motor contraction and PAD (Red line). The black line indicates the area with a pixel intensity above 30 %.

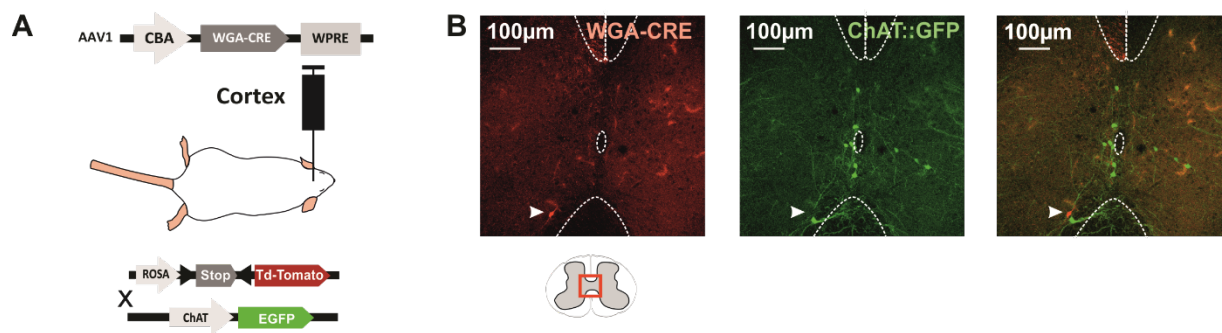


### Supplementary Figure 2. Monosynaptic transynaptic tracing from the cortex

- A. Schematic experimental design to transynaptically label cortical postsynaptic neurons.
- B. Sagittal image of the injection site, in the sensorimotor cortex, illustrating TdTomato+ neurons (red) and DAPI (blue). The drawing inset shows the area corresponding to the image.
- C. Example of stained postsynaptic cortical neurons found in the brain, in the thalamus, striatum and red nucleus. The arrow points TdTomato+ neurons. The drawing inset indicates the area corresponding to the image (red square).

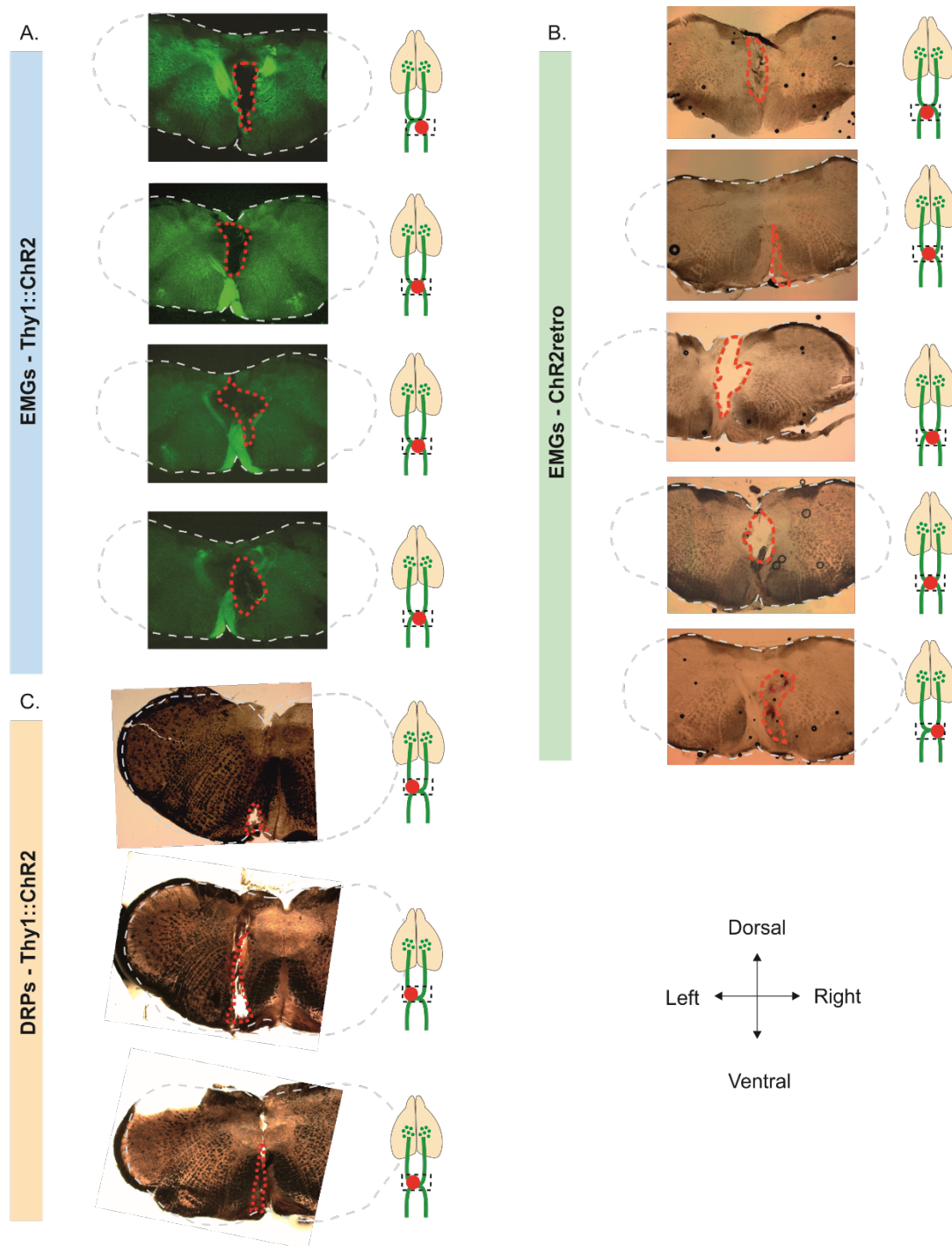
As illustrated in this figure, the targets of the CST are always located in nuclei directly innervated by the cortex, whatever the delay between the injection time and the observation

(result now shown). This confirms previous data demonstrating that the WGA-Cre transynaptic labeling is monosynaptic [Libbrecht, S., Van den Haute, C., Malinouskaya, L., Gijbers, R. & Baekelandt, V. Evaluation of WGA-Cre-dependent topological transgene expression in the rodent brain. *Brain Struct Funct*, doi:10.1007/s00429-016-1241-x (2016)].



### Supplementary Figure 3. Postsynaptic corticospinal neurons do not colocalize with ChAT.

- A. Schematic experimental design to transsynaptically label the targets of the CST in ChAT::GFP transgenic mice.
- B. Images from the intermediate spinal cord (around central canal, see inset in the bottom) showing the targets of the CST TdTomato+ (red) and ChAT::GFP+ neurons. The arrow points to a target of the CST that does not express GFP.



**Supplementary Figure 3. Histology of the pyramidotomies.**

- A. Slices of Thy1::ChR2 mice used for EMG recordings at the level of the decussation of the pyramids. Extent of the electrolytic lesion in hatched red.
- B. Slices of ChR2 retrogradely labeled mice used for EMG recordings at the level of the decussation of the pyramids. Extent of the electrolytic lesion in hatched red.
- C. Slices of Thy1::ChR2 mice used for DRP recordings at the level of the decussation of the pyramids. Extent of the electrolytic lesion in hatched red.

<b>A</b>	Thy1::Chr2	0.5	1	1.5	2	2.5	
	-0.5	12.5740682	3.37104211	19.3783971	16.3535276	69.863141	
	-1	7.53966831	6.04138632	6.80818832	35.9359962	4.10332195	
	-1.5	1.38289899	8.15556082	5.9476861	5.92829435	2.21480321	Z-score > 3
	-2	ND	9.87158889	1.05941526	0.53101415	4.35257525	Z-score < 3

<b>B</b>	Thy1::Chr2	Mouse 1	Mouse 2	Mouse 3	Mouse 4
	Before Lesion 1	7.610458139	229.6160926	37.53542818	21.79331496
	Before Lesion 2	5.672072407	12.37332975	10.20378725	41.78392375
	Before Lesion 3	5.677845219	13.16420671	30.07757256	43.0112216
	Electrode in decusation	22.50949887	18.0548327	67.66510035	103.2101852
	Electrolytic lesion	56.50936769	28.66464861	20.93490606	10.76134456

<b>C</b>	Chr2 retroAAV	Mouse 1	Mouse 2	Mouse 3	Mouse 4
	Before Lesion 1	16.26824017	15.63906278	10.3465225	30.70771151
	Before Lesion 2	6.796548504	18.06664921	9.457854941	4.642069763
	Before Lesion 3	10.30119153	27.32758053	5.189551589	15.59097657
	Electrode in decusation	2.647111486	3.860625737	-0.61473621	1.03036173
	Electrolytic lesion	-1.103002655	1.050864043	1.69665654	0.681847169

<b>D</b>	Chr2 in CSPN	Mouse 1	Mouse 2	Mouse 3	Mouse 4	Mouse 5	Mouse 6	Mouse 7
	Spinal photostimulation	-0.4337	-0.6292	0.7742	0.0013	-0.3344	-0.5436	1.7913

Z-score > 1.96

Z-score < 1.96

**Supplementary table 1. Z-score of individual EMG responses assessing the significance of the corresponding S/N ratio.**

- Matrix of the median Z-Score (from 5 animals) for EMG responses recorded at each stimulated point of the cortex. Data presented in Fig. 1C. Coordinates are expressed in mm from Bregma.
- Z-score of the EMG response for each experimental condition in Thy1::Chr2. Data presented in Fig. 2D.
- Z-score of the EMG response for each experimental condition in mice injected with the ChETA expressing retroAAV. Data presented in Fig. 3E.
- Median Z-score of the EMG responses for each mouse expressing Chr2 in the targets of the CST. Data presented in Fig. 4G.

## Discussion

Le rôle de ma thèse a été d'explorer les circuits sensori-moteurs portés par le tractus cortico-spinal jusqu'à la moelle épinière. Nous avons tenté de mieux comprendre la relation entre la commande motrice et le contrôle sensoriel cortical, dans le but de préciser nos connaissances sur les circuits de la motricité. Grâce à des techniques d'électrophysiologie *in vivo*, de traçage viral et d'optogénétique, nous avons réussi à faire progresser nos connaissances fondamentales des circuits moteurs, en démontrant qu'un rôle majeur des neurones cortico-spinaux lombaires est le contrôle des entrées sensorielles, et en précisant le fonctionnement de l'envoi de la commande motrice.

### 1. Modèle murin

Un premier point essentiel à aborder est celui des limites du modèle utilisé dans notre étude. Malgré l'existence d'une fidèle conservation des systèmes moteurs des vertébrés, certains aspects ont évolué différemment entre les espèces. D'un point de vue, neuroanatomique, physiologique et comportemental, les primates s'éloignent en partie des rongeurs et des félins. De ce fait, bien que l'étude des circuits moteurs chez les modèles murins permette sans aucun doute un certain degré d'extrapolation aux systèmes humains, il est évident que ces modèles ont des limites. Il existe des différences anatomiques et fonctionnelles qui se retrouvent notamment dans la voie cortico-spinale. En effet, le CST ne termine pas exactement sur les mêmes cibles, puisqu'il vise les neurones spinaux plutôt dorsaux et intermédiaires chez les souris alors que chez le primate, les projections du CST dans la moelle épinière sont plus profondes (Bortoff & Strick 1993, Heffner & Masterton 1975, Kuypers 1982, Leroy & Brown 1971). La zone du cortex d'où émerge le CST occupe proportionnellement une aire plus importante chez le primate et les fibres cortico-spinales voyagent dans la moelle épinière à travers un tractus principalement dorso-latéral (Courtine et al 2007, Lemon 2008). Enfin l'existence des CM est corrélée à l'existence de mouvements de très haute dextérité, et le champ des tâches possibles chez le primate, particulièrement celles impliquant les mouvements des mains, est nettement plus large. Cependant ces différences évidentes ne rendent pas le modèle murin obsolète. Par exemple, chez le primate



comme chez le rongeur, la majorité des terminaisons spinales du CST contacte des interneurons spinaux (Ebbesen & Brecht 2017, Watson & Harvey 2009). De plus, l'étude des primates a elle aussi ses limites, elle est techniquement plus complexe, et parfois même inenvisageable. Par exemple, l'identification précise de populations neuronales et la génération de mutation, que ce soit pour marquer des population ou pour affecter des fonctions, ne sont virtuellement pas possibles chez le primate, pour des raisons techniques, financières et éthiques. Il est donc souvent nécessaire de passer par le rongeur avant de pouvoir tester le caractère translationnel des résultats (Courtine et al 2007). C'est d'ailleurs de cette façon que sont développées beaucoup de stratégies thérapeutiques pour de nombreuses affections du système moteur (sclérose en plaque, SLA, Huntington, contusions spinales etc...).

## 2. Voie cortico-spinale

### 2.1. Ségrégation des populations de NCS

La vue du cortex comme une structure homogène contrôlant les motoneurons a bien changé, et cela grâce aux expériences démontrant la ségrégation fonctionnelle et anatomique du CST (Moreno-Lopez et al 2016). C'est particulièrement vrai pour le cortex rostral, en charge des fonctions cervicales, dans lequel a été constatée l'existence de groupes fonctionnels ségrégués de NCS (Ueno et al 2018). Ils projettent sur des segments distincts ou sur des régions différentes au sein d'un même segment, et sont actifs à différents stades du mouvement (Wang et al 2017). Les données sont moins nombreuses et moins précises concernant les différentes populations de NCS du cortex HLA. Toutefois, elles indiquent que chez le rat les populations de NCS du HLA projetant dans la moelle dorsale et intermédiaire sont partiellement mélangées (Olivares-Moreno et al 2017). D'autre part, certains NCS caudaux peuvent projeter à la fois sur les segments lombaires et cervicaux (Kamiyama et al 2015).

Notre étude a permis de vérifier d'une part, l'implication du cortex dans la génération de DRPs pour la première fois chez les souris, et d'autre part de cartographier cette fonction sensorielle relativement à la commande motrice. Nous avons ainsi révélé que des NCS aux fonctions différentes (sensorielles et motrices), étaient situés dans la même zone du cortex HLA, confirmant ainsi les soupçons de la multiplicité des fonctions au sein d'un même cortex.

Cette superposition des fonctions pourrait être une spécificité du cortex HLA, puisque les NCS projetant à différentes profondeurs dans la moelle lombaire sont nettement moins ségrégués qu'en cervical (Olivares-Moreno et al 2017). La résolution des outils utilisés ne nous permet cependant pas de vérifier si les neurones responsables de ces deux fonctions sont les mêmes ou s'il existe une ségrégation en plus petits groupes de neurones. Cette question reste donc toujours ouverte.

## 2.2. Rôle moteur

Notre étude a démontré que la commande motrice corticale est portée par les voies corticofuges impliquant d'autres centres moteurs supra-spinaux, ainsi que par le CST, puisque nous avons pu observer un mouvement et mesurer la contraction du muscle chez les souris Thy1 avec et sans pyramidotomie, ainsi que chez les souris exprimant la ChR2 exclusivement dans les NCS (avant pyramidotomie). Cependant nos premières observations sur les souris Thy1 étaient surprenantes, puisque la lésion du CST au niveau de sa décussation n'a pas provoqué de changement quantitatif significatif de la contraction musculaire. Ce premier résultat suggérait que la commande motrice était exclusivement indirecte. C'est seulement en infectant spécifiquement le CST innervant le segment lombaire, que sa contribution a pu être observée. Pour cette raison il semble raisonnable de postuler que le CST n'est pas le principal acteur de la transmission de la commande motrice, et que son rôle dans cette fonction pourrait au contraire être mineur, ce qui expliquerait l'absence d'effet visible de ce type de lésion. Cependant, nos enregistrements EMGs ne sont pas parfaitement stables, et cela est principalement dû aux conditions d'anesthésies. En effet, afin d'obtenir une contraction musculaire à la suite de la stimulation du cortex, il est nécessaire d'utiliser un cocktail de Kétamine et de Xylazine suffisamment léger, pour que l'animal ne soit pas trop profondément endormi (Tennant et al 2011). Ce n'est que dans ces conditions particulièrement instables, qu'un mouvement peut être observé, et cela pendant un laps de temps très court (l'anesthésie devant être renouvelée au moindre signe de réveil de l'animal). Cette variabilité dans les enregistrements EMGs pourrait expliquer que la condition « lésion » ne diffère pas significativement des contrôles chez les souris Thy1. Nous avons réalisé des analyses plus fines, afin de vérifier si cette absence de différence quantitative ne cachait pas une différence qualitative physiologiquement significative. Cette analyse nous a permis de

voir une différence dans la forme du signal après vs. avant pyramidotomie chez certains animaux, mais pas de façon systématique. Un échantillonnage plus grand pourrait permettre de répondre à ce problème, que ce soit pour les analyses qualitatives ou quantitatives.

### 2.3. Rôle sensoriel

La perte totale des DRPs à la suite de la pyramidotomie des Thy1 permet de conclure qu'ils sont exclusivement transmis par le CST. Les autres voies connues pour leur capacité de générer une PAD, comme celles initiées dans le noyau rouge ou la formation réticulée, si elles existent aussi chez le rongeur, sont donc indépendantes du cortex HLA.

- **Interprétation des DRPs**

Les DRPs nous permettent d'enregistrer la dépolarisation des fibres afférentes primaires. Il s'agit d'une méthode de mesure de la PAD, puisque le signal mesuré provient de la propagation antidromique de la dépolarisation des terminaisons des fibres, dans la moelle épinière. Cela étant, notre méthode ne nous permet pas de déterminer le type de fibres dépolarisées par la stimulation du cortex. Cette information pourrait être utile afin de comprendre précisément le rôle de la PAD corticale en général, et en particulier au niveau lombaire. En effet, ce rôle spécifique n'est pas bien connu. D'après les données de la littérature sur le rongeur, il semble qu'une des cibles de la PAD corticale puissent être les fibres C, chargées principalement d'apporter des informations cutanées nociceptives (Moreno-lopez et al 2013). Chez le chat, il semblerait que le cortex soit responsable de l'inhibition des fibres Ib, provenant de l'OTG (Andersen et al 1962). Pour mieux comprendre le rôle que le cortex pourrait avoir à travers la PAD, on peut donc se pencher sur le travail de Seki et ses collaborateurs, qui ont mesuré chez le singe l'effet de l'inhibition de fibres cutanées. Ils démontrent que les informations cutanées sont inhibées lors des phases actives d'un mouvement volontaire (Seki et al 2012). Le rôle d'une telle inhibition pourrait être de diminuer le flux des informations tactiles superflues qui pourraient perturber le mouvement volontaire. Cependant puisque nous n'avons pas distingué le type de fibres ciblées, et que nous avons travaillé sur des souris anesthésiées, nous ne pouvons pas exclure que le rôle de la PAD corticale mesurée soit aussi ou uniquement dans la régulation des réflexes et des

mouvements automatiques ou même dans des conditions passives au repos. Dans tous les cas, il est clair que le CST lombaire joue un rôle prépondérant dans le processus de « sensorigating » via la PAD.

- Pharmacologie DRPs

Le mécanisme d'inhibition présynaptique rapide repose principalement sur les transmissions GABAergiques. Cependant les fibres afférentes primaires contiennent une diversité d'autres récepteurs dont l'activation peut provoquer une dépolarisation des terminaisons, tel que des récepteurs NMDA et AMPA/Kainate (Russo et al 2000). Pour s'assurer de la nature de la PAD corticale, nous avons tenté d'enregistrer les DRPs en présence d'antagonistes GABAergiques (Bicuculline et Gabazine) appliqués en bain sur la moelle épinière. Cependant, l'application de ce type de molécules a aussi pour effet de provoquer des spasmes chez la souris anesthésiée. Nous n'avons pas réussi à obtenir des enregistrements suffisamment stables dans ces conditions pour interpréter les résultats, et ces mécanismes restent donc à être explorés.

#### 2.4. Collatérales du CST et voies ventrales et latérales

Afin de vérifier le rôle de la voie cortico-spinale directe, nous avons réalisé des pyramidotomies caudales chez les souris exprimant la ChR2 dans les NCS, dans le but d'épargner les collatérales supra-spinales de ce tractus. Dans ces conditions, la perte totale de la contraction motrice nous indique l'absence d'un rôle significatif de ces collatérales dans la génération du mouvement. De plus, avec les souris Thy1, ce type de lésion a provoqué là aussi, une perte totale des DRPs induits par la stimulation du cortex. Cette fonction sensorielle est donc également transmise par le CST direct, et non par ses collatérales. L'impact de ces voies collatérales se limite donc certainement à une activité plus subtile de modulation, comme celle de l'envoi de la copie efférente au cervelet via les noyaux du pont (Person 2019). Isoler les fonctions d'une de ces collatérales sans affecter les autres voies est une tâche compliquée, mais qui pourrait s'avérer essentielle pour la compréhension complète des circuits corticofuges.

Un autre élément de la voie cortico-spinale qui reste incompris, est celui du rôle des différents trajets empruntés par le CST dans la moelle. La question de savoir si les messages sensoriels et moteurs enregistrés passent par le tractus dorsal majoritaire ou par les voies dorso-latérales et ventrales n'a malheureusement pas été résolue, alors qu'elle pourrait s'avérer fondamentale pour l'étude des contusions de la moelle épinière.

### 3. Cibles du CST

La première partie de notre travail nous a amenées à mieux comprendre quelles voies corticofuges sont empruntées pour la génération de PAD, et pour l'envoi de la commande motrice. Cependant, nous avons voulu poursuivre notre étude plus loin, en nous intéressant aux cibles spinales du CST. L'objectif était de savoir si les circuits sous-jacents à ces fonctions motrices et sensorielles sont distincts, ou si des voies similaires sont empruntées avant d'atteindre la cible finale du message.

#### 3.1. Traçage monosynaptique antérograde

Dans le but de marquer les cibles du cortex, nous avons utilisé le virus AAV codant pour la construction WGA::CRE, que j'appellerai ici « virus WGA::CRE ». Grâce au suivi du déroulement temporel de sa propagation et des structures infectées à la suite de son injection dans le cortex, nous en sommes arrivées à la conclusion que dans nos conditions, ce traceur antérograde transynaptique ne traversait qu'une seule synapse. C'est d'ailleurs à cette même conclusion que sont arrivés les auteurs d'une étude utilisant la WGA::CRE dans une construction virale différente (Libbrecht et al 2017). Ces caractéristiques nous ont donné l'opportunité non seulement de marquer spécifiquement les cibles directes du CST, mais en plus, de moduler leur activité. Cependant l'efficacité de ce traceur est limitée. En effet, un inconvénient de cet outil est son irrégularité dans le passage transynaptique entre les différents animaux et dans certains cas, le nombre de neurones n+1 marqués est très faible. Cela nous a donc amenées à augmenter nos groupes afin d'obtenir assez de données pour analyser la localisation moyenne des neurones ciblés.

### 3.2. Identification des cibles lombaires du CST

Ils se situent dans la corne dorsale profonde de la moelle épinière, approximativement là où les terminaisons des fibres cortico-spinales sont typiquement retrouvées (D'Acunzo et al 2014, Liu et al 2018). Nous avons voulu déterminer l'identité de ces cibles, et pour cela, nous avons injecté le virus WGA::CRE dans des souris exprimant une protéine fluorescente dans des populations d'interneurones spécifiques. Nous avons ainsi mis en évidence qu'une proportion notable (environ 16%) des neurones cibles du CST dans la moelle lombaire sont des neurones GABAergiques exprimant la GAD65 (ou GAD2). Les neurones GAD65 (ou GAD2) constituent une population fortement soupçonnée d'être responsable de l'inhibition présynaptique. Ce soupçon vient des contacts que ces neurones forment sur l'élément présynaptique des synapses entre les fibres sensorielles proprioceptives et les motoneurones (Betley et al 2009), et de l'effet physiologique provoqué par leur inhibition (Fink et al 2014). Ces neurones marqués pourraient donc être le substrat d'une PAD di-synaptique (CST-GAD65 (1), GAD65-Fibre sensorielle (2)) en charge de l'inhibition des fibres proprioceptives lors des mouvements fins. Cependant, il reste une proportion importante des neurones non identifiée, à priori excitateurs et glutamatergiques (puisque ni cholinergiques, ni GABAergiques) dont le rôle pourrait aussi être lié au transfert pluri-synaptique de la PAD corticale. Au niveau lombaire, d'autres fonctions que la PAD sont également portées par le CST et pourraient aussi certainement être relayées par les neurones que nous avons mis en évidence. En effet le CST contrôle des fonctions telles que la modulation sensorielle postsynaptique, notamment des voies nociceptives (Millan 2002), mais aussi des voies sensorielles à bas seuil (Bourane et al 2015, Liu et al 2018, Paixao et al 2019), ou encore des fonctions d'intégration de la décharge corollaire, dans le cas des neurones spinocérébelleux (Hantman & Jessell 2010).

### 3.3. Rôle des cibles lombaires du CST

L'injection additionnelle d'un virus codant pour la ChR2 floxée dans le segment lombaire a permis une activation spécifique des cibles du CST. Nous avons observé que cette activation ne permet pas la génération de contractions dans le muscle enregistré, ni de mouvement visible. Il n'est cependant pas possible d'exclure qu'il existerait un biais dans le passage transynaptique, qui serait à l'origine d'une infection préférentielle de certaines

populations plutôt que d'autres (Libbrecht et al 2017). Une autre explication de cette absence de mouvement pourrait être que la génération de la contraction d'un muscle nécessite qu'un grand nombre de neurones soit activé. Cependant, nous avons constaté que les EMGs étaient toujours plats, même dans les cas où le nombre de neurones marqués était important. En outre une faible quantité de neurones infectés a été suffisante pour mesurer des DRPs robustes. Il semblerait que les cibles lombaires du CST soient largement impliquées dans des tâches de modulation sensorielle, et tout particulièrement dans la PAD. La possibilité de l'existence de relais lombaires de la commande motrice ne peut être complètement exclue, mais dans ce cas force est de constater qu'il s'agirait d'une population distincte de celle qui relai les DRPs.

Cette étude fonctionnelle des cibles du CST nous a donc permis de démontrer que le rôle des NCS terminant sur des interneurons lombaires n'est pas la transmission de la commande motrice, mais plutôt la modulation des informations sensorielles, et cela en partie à travers la PAD.

#### 3.4. Relai cervical de la commande motrice

Si le CST transmet la commande motrice aux muscles de la patte arrière mais que les interneurons lombo-sacrés ne sont pas sa cible pour le relai, l'hypothèse la plus évidente est que les cibles se situent plus rostralement, dans les segments cervicaux ou thoraciques. Nos injections de « Chr2 rétro » ont été réalisées dans le segment lombaire, donc les NCS ciblés possèdent au moins une branche à cet étage spinal. Le relai rostral pourrait donc se faire grâce aux collatérales cervicales décrites dans une fraction des NCS lombaires (Kamiyama et al 2015). Certaines populations sont les candidates idéales pour réaliser un tel relais de l'information. Les neurones proprio-spinaux, dont certains projettent de la moelle cervicale ou thoracique vers les segments lombaires, peuvent directement contacter les motoneurons. Chez le rongeur, le chat ou le primate, il semble évident que les neurones proprio-spinaux sont une cible importante du CST (Alstermark et al 2007, Azim et al 2014, Illert et al 1977, Ueno et al 2018). La fonction de ces neurones proprio-spinaux pourrait ainsi consister en un relai de la commande motrice aux membres antérieurs ainsi qu'aux postérieurs afin de coordonner la locomotion.

#### 4. Conclusion

Les résultats de cette étude sur les voies issues du cortex, empruntées par les messages sensoriels et moteurs, laissent place à un nouveau paradigme du fonctionnement du contrôle de la motricité. Notre étude permet de conclure que le CST issu du cortex HLA joue un rôle au niveau des contrôles descendants moteurs et sensoriels à travers des cibles spinales différentes. La commande motrice serait envoyée via un intermédiaire proprio-spinal cervical aux motoneurones lombaires alors que le contrôle des entrées sensorielles serait relayé plus directement par un circuit lombaire. Cela implique l'existence d'une diversité fonctionnelle de NCS au niveau d'un même cortex (HLA).

Notre étude démontre que le contrôle sensori-moteur cortical des membres antérieurs et postérieurs est différent.

En effet, bien que les animaux ne soient pas paralysés, l'inhibition, l'ablation du cortex rostral (CFA/RFA) (Galinares et al 2018, Miri et al 2017) ou une pyramidotomie (Starkey et al 2005, Whishaw et al 1993), affecte fortement la capacité des souris à réaliser un mouvement précis des pattes avant. Ces contrôles corticaux des mouvements fins sont médiés par des voies descendantes directes, motrices et sensorielles, par l'intermédiaire de populations cervicales ségréguées (Ueno et al 2018). Ces populations neuronales spinales semblent essentielles à la bonne réalisation de différentes phases d'un mouvement fin, puisque leur inhibition affecte la performance des souris (Azim et al 2014, Ueno et al 2018).

En revanche, les voies en charge de la modulation des membres postérieurs semblent organisées différemment. Au lieu d'avoir une convergence des voies descendantes sensorielles et motrices au sein du même segment, les commandes motrices des NCS du cortex HLA font intervenir un relai cervical supplémentaire. Une fonction de ce relai pourrait être d'ajuster les mouvements des membres postérieurs en fonction des membres antérieurs lors d'une activité locomotrice fine. En outre, le contrôle direct du segment lombaire lui donnerait la possibilité de réguler le mouvement des pattes arrière, en s'appuyant sur les retours sensoriels cutanés ou proprioceptifs principalement. Ce contrôle lombaire aurait lieu via des populations excitatrices et inhibitrices aux rôles variés incluant mais ne se limitant pas à la PAD.



Les NCS des cortex rostraux et caudaux agiraient ainsi de manière complémentaire, en fonction de la tâche effectuée. Les comportements impliquant des mouvements fins des pattes avant seraient régulés par les cortex RFA et CFA. Les mouvements locomoteurs grossiers n'engageraient pas le cortex HLA. Enfin, les tâches de locomotion fine feraient intervenir la voie issue du HLA ainsi que potentiellement, les NCS du cortex rostral, mais cela reste à être démontré (Figure 21).

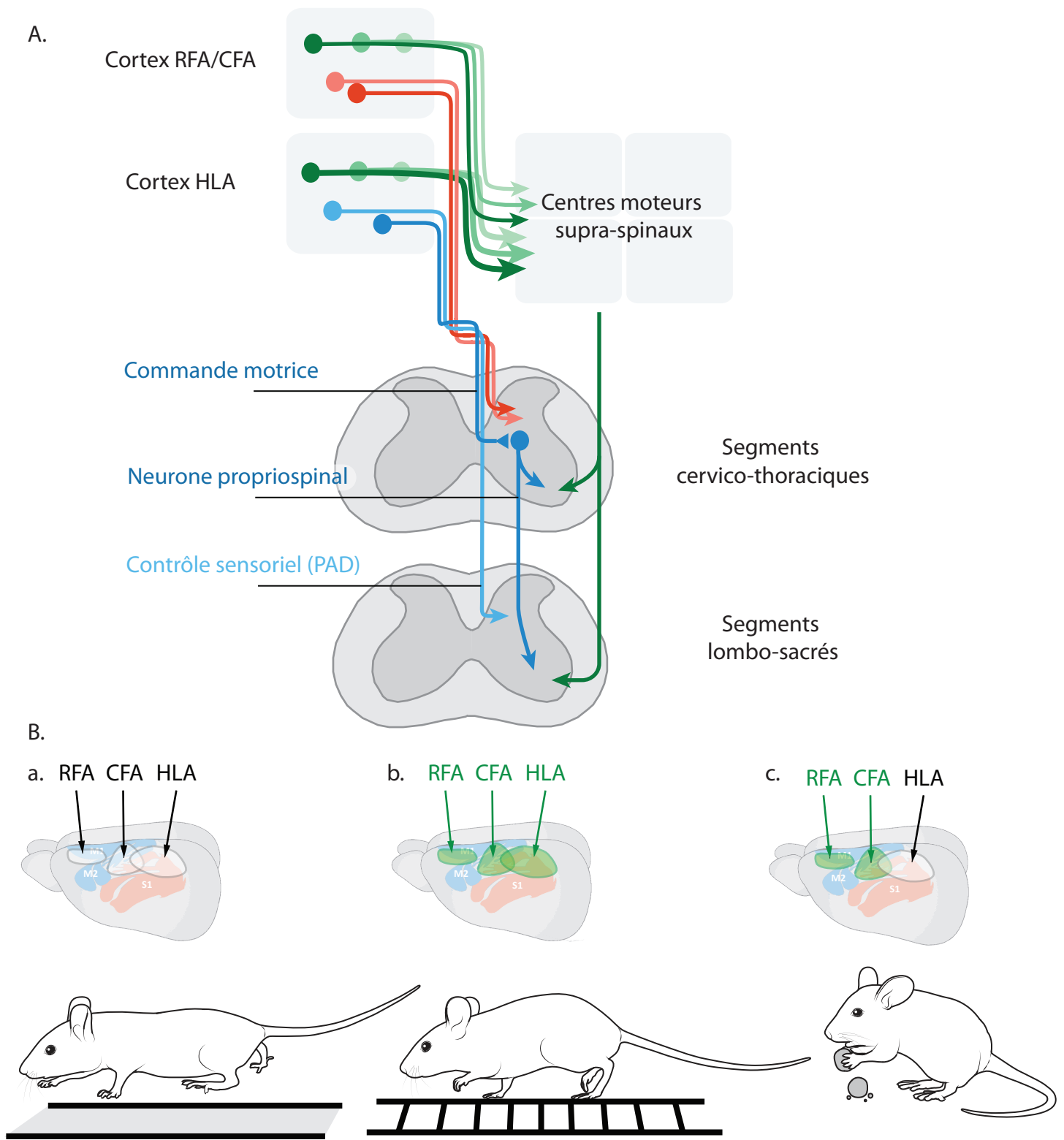
Notre étude souligne en outre l'importance de porter son attention sur la zone du cortex étudié, et de s'intéresser aux sous-types fonctionnels de NCS observés dans les expériences visant à comprendre les circuits du cortex et leurs rôles dans certaines tâches motrices, afin d'avoir une meilleure compréhension des résultats observés.

Enfin, ce changement de paradigme oblige également à réinterpréter les précédentes études visant à restaurer la fonction CST dans une perspective thérapeutique, que ce soit dans les modèles murins de lésions vertébrales ou de maladies neurodégénératives telles que la SLA. Alors que la plupart de ces études ont exclusivement étudié les aspects purement moteurs, nos résultats démontrent qu'il faut revisiter ces études en prenant en compte un rôle essentiel du CST lombaire des rongeurs, c'est-à-dire le contrôle sensoriel.

## 5. Perspectives

Notre étude a permis de répondre à des questions essentielles sur les circuits sensori-moteurs, mais elle ouvre aussi de nouvelles pistes d'études pour aller plus loin dans sa compréhension.

Une suite importante qui devrait être apportée à cette étude est l'exploration comportementale. En effet les DRPs mesurés ne nous informent pas sur le rôle réel de ce contrôle sensoriel descendant. Une solution pourrait être de moduler l'activité des cibles lombaires du CST chez des souris lors de la réalisation de tâches précises. Nous avons souhaité faire cette expérience pendant ma thèse à l'aide de l'injection d'un virus exprimant un DREADD inhibiteur (hM4Di) cre-dépendant, dans les souris infectées par le virus WGA::CRE. L'objectif était de réaliser une tâche de locomotion fine tout en enregistrant le trajet précis des pattes grâce à un système de « Motion Capture ». Malheureusement nous nous sommes



**Figure 21 – Conclusions et hypothèses**

**A.** Schéma synthétique du circuit sensori-moteur. Le cortex est divisé en plusieurs zones, en charge des fonctions des membres antérieurs (RFA/CFA) et postérieurs (HLA). Les voies corticofuges sont constituées de neurones contactant la moelle indirectement, en passant par des centres moteurs supra-spinaux (flèches vertes), et directement, via le CST. Les NCS du RFA/CFA (flèches rouges) innervent uniquement le segment cervical. Les NCS du HLA (flèches bleues) font relai sur les neurones proprio-spinaux cervicaux pour l'envoi de la commande motrice, et contactent directement le circuit lombaire pour le contrôle sensoriel (PAD). **B.** Hypothèse de l'implication différentielle des neurones cortico-spinaux. **a.** Pour les mouvements grossiers (ex : tapis roulant), le rôle des NCS est minimal, voire inexistant et l'implication du cortex (préparation, initiation...) est indirecte. Lors des tâches de précision **b.** locomotion fine ou **c.** dextérité manuelle, les NCS des cortex correspondant aux membres actifs sont activés.

heurtées à plusieurs obstacles. D'une part, le peu de passage transynaptique du virus nous a fait craindre un effet trop subtil pour être mesurable. Et d'autre part un problème majeur de spécificité s'est présenté : le virus supposé cre-dépendant s'exprimait dans des neurones qui ne contenaient pas la cre-recombinase. Ce projet, demandant plus de mises au point qu'anticipé, a été abandonné par manque de temps.

Un autre point clé qu'il reste à vérifier est l'identité des présumés relais cervicaux-thoraciques de la commande motrice. Pour s'assurer que notre hypothèse est la bonne, une possibilité serait d'inhiber la transmission glutamatergique au niveau cervical lors d'une stimulation optogénétique du CST. Une expérience similaire a été réalisée récemment sur une préparation cerveau-moelle *ex-vivo*. Dans cette expérience, la stimulation corticale accélère la locomotion fictive mesurée au niveau lombaire dans les conditions contrôles, alors que l'ajout d'acide kinurénique (bloquant la transmission synaptique) par un bain au niveau cervico-thoracique, bloque cet effet induit par le cortex (Karadimas et al 2019). Cependant dans ces expériences, toutes les voies corticofuges sont potentiellement activées. Notre approche avec le virus « Chr2 rétro » permettrait d'avoir une meilleure spécificité. Cette étude va dans le sens de notre hypothèse, et demande à être testée *in vivo* chez une souris adulte.

Toutes ces pistes d'études ainsi que plusieurs autres telles que l'identification précise des cibles du CST, ou du rôle de ses collatérales, ont été entamées à travers notre projet, et demandent à être explorées et résolues afin d'avancer dans notre compréhension de ces systèmes complexes.

## Annexes

### I. Sclérose latérale amyotrophique

L'étude des systèmes moteurs et particulièrement de la voie cortico-spinale nous a naturellement menées à nous intéresser à une maladie neurodégénérative où cette voie (entre autre) est affectée : la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Dans ce projet, que j'ai décidé de ne présenter qu'en annexe car il a été fortement tronqué du fait de la situation sanitaire, nous avons utilisé les données acquises et les outils développés au cours de ma thèse pour améliorer notre compréhension des mécanismes du développement de la pathologie. J'ai également participé à un travail collaboratif initié par Caroline Rouaux, chercheuse à l'INSERM à la faculté de médecine de Strasbourg.

Du fait de la place limitée finalement prise par ce projet, je ne décrirai que brièvement les principaux aspects de la pathologie et de ses mécanismes nécessaires pour la compréhension des résultats préliminaires présentés, avec une attention particulière sur les atteintes de la voie cortico-spinale.

#### 1. Généralités sur la SLA

La SLA est une maladie neurodégénérative très grave, menant à la mort du patient dans les 3 à 5 ans suivant le diagnostic. Il s'agit d'une atteinte du système moteur, et plus particulièrement de ce que les cliniciens appellent « neurones moteurs » : les motoneurones et neurones cortico-spinaux (NCS) (Swinnen & Robberecht 2014). Son étiologie, encore mal comprise, semble multifactorielle et liée à une interaction entre différents facteurs génétiques et environnementaux (sport, tabagisme, alimentation). Si 90% des formes sont sporadiques (de source encore inconnue), 10% ont été attribuées à des mutations variées (King et al 2016).

## 2. Modèles

Les mutations observées chez les patients, et en particulier celles dans le gène de la SuperOxyde Dismutase 1 (SOD1), ont été introduites chez la souris pour modéliser la pathologie : mutations SOD1 G37R, G85R, G86R ou la plus étudiée, G93A (Glycine 93 en Alanine) (Dal Canto & Gurney 1994). Ces modèles récapitulent les symptômes principaux, à savoir une perte de poids pré-symptomatique, une dégénérescence des NCS ainsi que des motoneurones, une dénervation massive à l'origine d'une paralysie progressive, et enfin, des agrégats protéiques neuronaux (Philips & Rothstein 2015) (Figure 22).

## 3. Mécanismes de la maladie

### 3.1. *Atteinte des motoneurones*

Parmi les nombreux mécanismes soupçonnés d'être responsables de la dégénérescence des motoneurones (stress oxydatif, l'inflammation, etc...) (Taylor et al 2016), nous nous sommes plus particulièrement intéressées à l'excitotoxicité, car elle pourrait impliquer la voie cortico-spinale, une des voies essentielles d'excitation des motoneurones. La dégénérescence des motoneurones serait induite par la suractivation des récepteurs au glutamate, par exemple due à une trop grande quantité de signaux excitateurs afférents (Jia et al 2015). Cela induirait la formation en excès d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que d'enzymes toxiques, menant à la mort du neurone excité (Van Damme et al 2005).

### 3.2. *Atteinte du cortex*

Les patients présentent une hyperexcitabilité corticale (Wagle-Shukla et al 2009), corrélée négativement avec leur survie (Shibuya et al 2016). Elle est aussi présente dans le modèle murin SOD1, avant même l'apparition des symptômes (Kiernan et al 2011, Vucic et al 2008). Elle pourrait être due à la dégénérescence des interneurones inhibiteurs et des contacts qu'ils forment avec les neurones corticaux de la couche V, induisant une désinhibition des NCS (Clark et al 2017, Maekawa et al 2004, Zhang et al 2016).

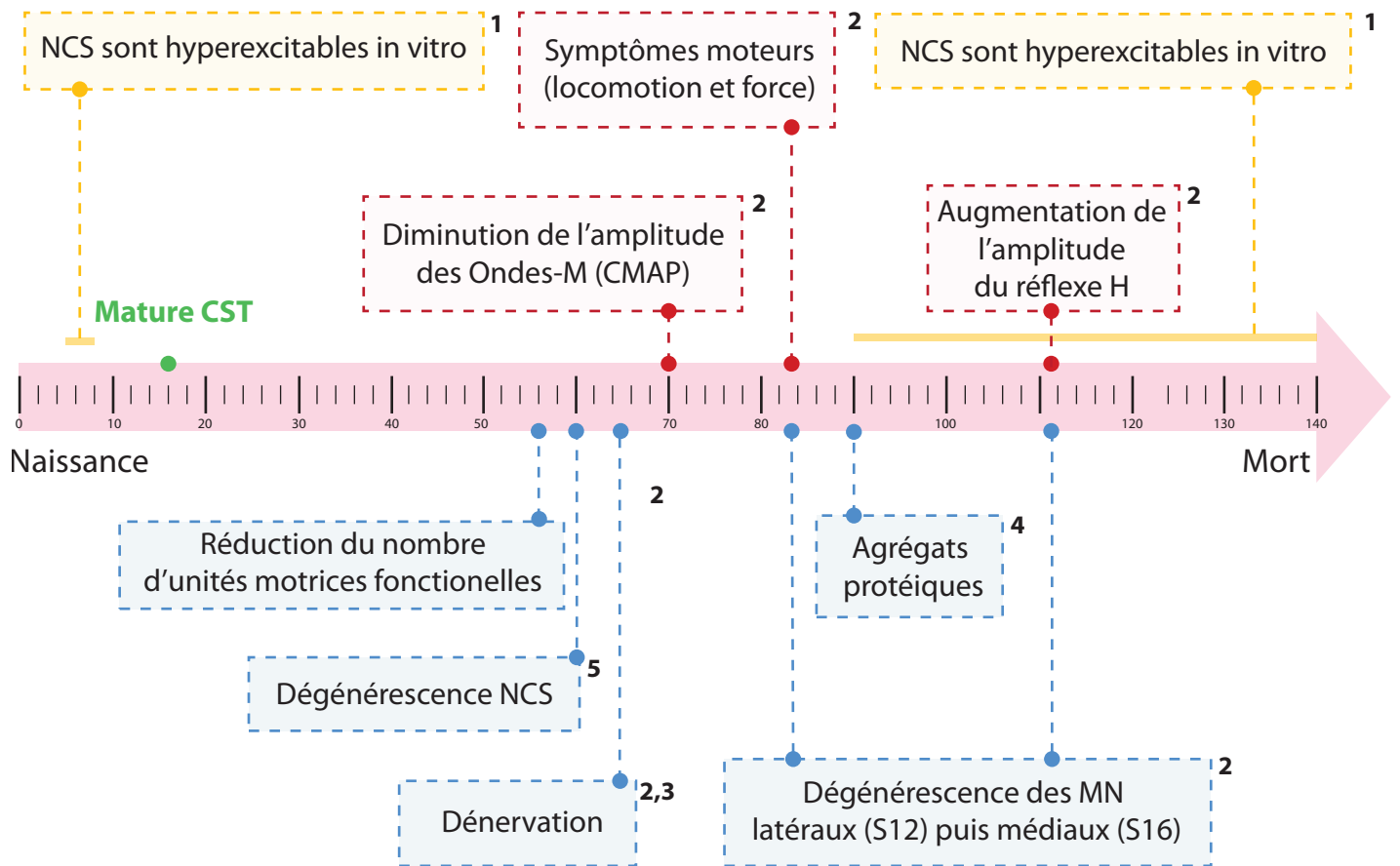


Figure 22. Chronologie des atteintes du modèle SOD1

Frise temporelle non exhaustive d'apparition des symptômes chez les souris SOD1 G93A. Les souris SOD1 G93A meurent en moyenne aux environs de 140 jours. La phase appelée pré-symptomatique correspond à la période de 0 à 90 jours, avant l'apparition d'une baisse de performance motrice (données issues de (1) Kim et al 2017, (2) Mancuso et al 2011, (3) Chui et al 1995, (4) Jeon et al 2019, (5) Zang et al 2002).

**NCS:** Neurones cortico-spinaux, **CMAP:** Compound Muscle Action Potential, **MN:** Motoneurone

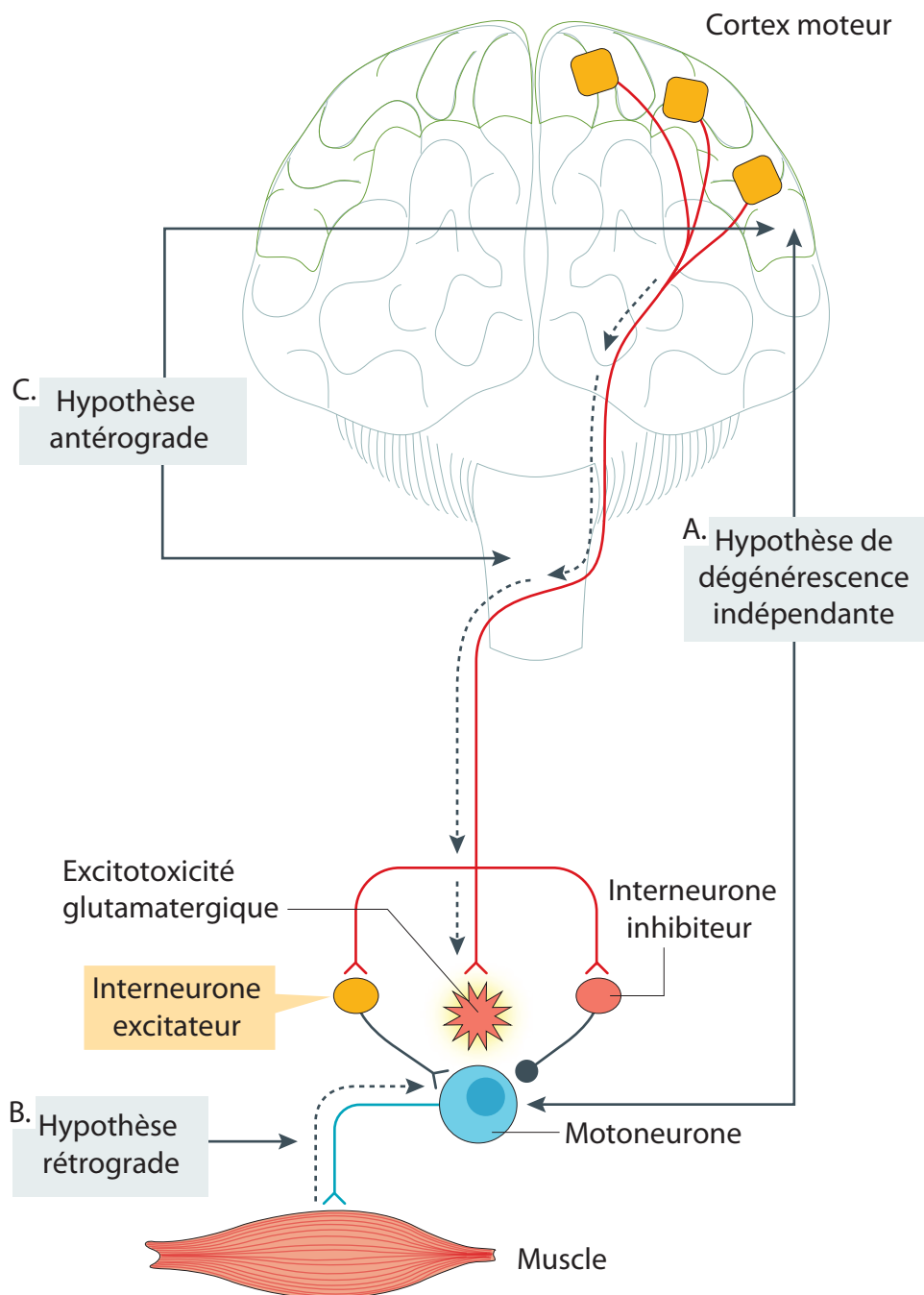
L'analyse post-mortem de cerveaux de patients a permis de démontrer la perte des NCS dans la couche V (Sasaki & Iwata 1999), ainsi qu'une arborisation dendritique altérée (Genc et al 2017). Chez les modèles murins SOD1 ces mêmes atteintes sont observées, et cela avant même l'apparition des premiers symptômes moteurs (Fogarty et al 2016, Ozdinler et al 2011, Yasvoina et al 2013, Zang & Cheema 2002).

Bien qu'il existe des études allant dans le sens de l'existence d'une hyperexcitabilité des NCS (Saba et al 2016), voire d'une excitotoxicité sur les NCS (Zhang et al 2016), d'autres l'observent *in vitro* à certains stades précoces et tardifs de la maladie, mais constatent que cette hyperexcitabilité n'est plus observée *in vivo* et donc certainement compensée (Kim et al 2017a). Ainsi, la question de l'altération de l'excitabilité du cortex et de son impact dans la pathologie est toujours ouverte.

### 3.3. Hypothèses de propagation

La question du lien entre la dégénérescence des motoneurones et celle des NCS rejoint celle du sens de propagation (antérograde du cortex vers les motoneurones, ou rétrograde de l'axone des motoneurones vers leur soma) de la maladie (Figure 23).

Dans notre étude nous nous sommes principalement intéressées à l'hypothèse antérograde, proposée par Eisen (Eisen et al 1992). Elle s'appuie sur l'atteinte fonctionnelle précoce du cortex chez les patients, et le changement pré-symptomatique de l'excitabilité corticale chez les souris SOD1, qui pourrait théoriquement être responsable d'une augmentation de l'excitation des motoneurones (Eisen et al 2017, Ravits et al 2007). Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, les NCS participent au contrôle de la décharge des motoneurones. De plus, ils sont aussi responsables de la régulation de la quantité d'informations sensorielles reçues par ces motoneurones, via, entre autre, le contrôle présynaptique des fibres sensorielles primaires. Ainsi, que ce soit une hyperactivité ou une hypoactivité des NCS, un tel changement pourrait donner lieu à des stimulations excessives et potentiellement excitotoxiques des motoneurones.



### Figure 23. Hypothèses de propagation

Représentation schématique des 3 hypothèses de propagation de la SLA. **A.** Les NCS et les motoneurons dégèrent de façon indépendante. **B.** L'hypothèse de propagation rétrograde propose que la SLA est principalement une maladie du motoneurone, dont la pathogénicité est transportée de manière rétrograde de la jonction neuromusculaire vers les corps cellulaires. **C.** L'hypothèse de propagation antérograde établit que la SLA débute au niveau du cortex, par son hyperexcitabilité, et est transmise à la moelle épinière via un processus d'excitotoxicité glutamatergique (modifié d'après Geesvasinga et al 2016).



#### 4. Objectifs du projet SLA

L'expertise acquise au cours de mon principal projet de thèse, telle que les techniques de traçage et d'enregistrements électrophysiologiques, ainsi que les nouvelles connaissances acquises, permettent d'interroger le mécanisme de propagation de la SLA dans un modèle murin SOD1. Grâce à une 4<sup>ème</sup> année de thèse financée par l'Association pour la Recherche sur la SLA par, nous avons eu cette opportunité. La question que nous nous sommes posée était de savoir si la fonctionnalité du CST était déjà changée à des stades pré-symptomatiques de la maladie, avant même les atteintes tissulaires spinales et musculaires, afin de confirmer (ou infirmer) l'hypothèse de progression antérograde de la maladie.

Le projet principal de ma thèse nous a permis conclure que le rôle du CST était hétérogène, ainsi que ses cibles. Nous avons donc la possibilité de mesurer deux fonctions de la voie cortico-spinale (commande motrice et contrôle des entrées sensorielles), reposant sur des relais spinaux différents, afin de disséquer plus en détails les voies affectées par cette maladie. La question principale de ce projet était donc :

A quel moment les fonctions de la voie cortico-spinale sont-elles affectées au cours de la SLA ?  
Pour cela, nous avons prévu d'évaluer, à différents stades de la pathologie si :

1. Le message cortical est véhiculé normalement jusqu'à la moelle épinière
2. Les fonctions du CST sont maintenues

Nous avons souhaité monitorer ces fonctions à plusieurs stades pré-symptomatiques de la maladie, afin d'effectuer un décours temporel et ainsi évaluer la progression de l'atteinte des CSN. La pandémie Covid-19 ne nous a permis d'étudier qu'un seul groupe, et nous avons choisi de nous focaliser sur le temps P50, correspondant à un stade présymptomatique « avancé ». A l'heure de l'écriture de ce manuscrit, nous avons seulement obtenu les résultats du groupe contrôle (souris porteuses de la forme WT du transgène).

## 5. Matériels et Méthodes

### 5.1. *Modèles animaux*

Cette étude a été réalisée dans le strict respect des lois nationales et internationales de bien-être des animaux de laboratoire et d'expérimentation et a été préalablement approuvée par le Comité d'éthique de Strasbourg (CREMEAS; CEEA35; numéro d'accord/protocole de référence: APAFIS #12982 - 2017122217349941 v3). Les souches suivantes de souris (mâles et femelles adultes) ont été utilisées : SOD1 G93A (appelées SODmut) exprimant le gène de la SOD humaine avec la mutation G93A (B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J, Jackson Laboratory), ainsi que leur contrôle : SOD1 (appelées SODwt) qui expriment la forme sauvage de la SOD1 humaine (B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J, Jackson Laboratory), fournies par le Dr. Marin Manuel (CNRS, Saint-Pères, Paris). Les souris ont été hébergées au Chronobiotron (UMS3415, CNRS, Université de Strasbourg) conformément à la convention européenne 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Pour toutes les chirurgies et enregistrements, les souris anesthésiées ont été placées sur un coussin chauffant et maintenues à 36-37° et ont reçu un gel protecteur sur les yeux. A la suite des chirurgies avec réveil, les souris ont été maintenues sous une lampe chauffante jusqu'à récupération puis soumises à une vigilance quotidienne la semaine suivant l'opération. Toutes les souris ont été utilisées (reproduction ou expérience) avant l'apparition du phénotype dommageable. Puisque dans ce modèle, une perte de poids précède l'apparition de symptômes moteurs, les animaux ont été soumis à une pesée régulière (au minimum bihebdomadaire) afin d'anticiper le déclenchement de la pathologie.

### 5.2. *Injections spinales*

Des injections de 360µl du virus « ChR2 rétro » (AAV-CAG-hChR2-H134R-tdTomato) ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le projet principal, au niveau du segment lombaire de souris âgées de 4 semaines (voir [Matériels et Méthodes p.51](#)).

### 5.3. *Enregistrement des volées descendantes*

Les enregistrements des volées descendantes ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour l'enregistrement des DRPs (voir [Matériels et Méthodes](#) du projet principal) mais sans effectuer la section des racines. Une électrode « boule d'argent » faite d'un fil d'argent fondu à son extrémité a été mise en contact avec la surface de la moelle, au niveau des colonnes dorsales (Alstermark & Pettersson 2014). Des photostimulations de 1ms répétées toutes les secondes ont été réalisées au niveau du cortex, en suivant les coordonnées du cortex HLA identifiées dans le projet principal. Les amplificateurs, filtres et logiciels utilisés étaient les mêmes que pour les enregistrements EMG. Les volées mesurées en réponse à 200 photostimulations corticales successives ont été moyennées pour l'analyse. L'amplitude de la réponse a été mesurée sur un ajustement de la trace moyennée réalisé selon un modèle gaussien. Le pic de la réponse correspond donc au maximum de la gaussienne, et le délai de réponse correspond au temps du pic.

### 5.4. *Enregistrement EMG*

Les enregistrements des EMGs ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles du projet principal (voir [Matériels et Méthodes p.46](#)).

### 5.5. *Enregistrement DRP*

Les enregistrements des DRPs ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles du projet principal (voir [Matériels et Méthodes p.48](#)).

### 5.6. *Analyse*

La présence ou l'absence d'une réponse (volées descendantes, EMG ou DRP) aux stimulations corticale est déterminée par la mesure d'un Z-Score (voir [Matériels et Méthodes p.46](#)) ([Figure 24](#)).

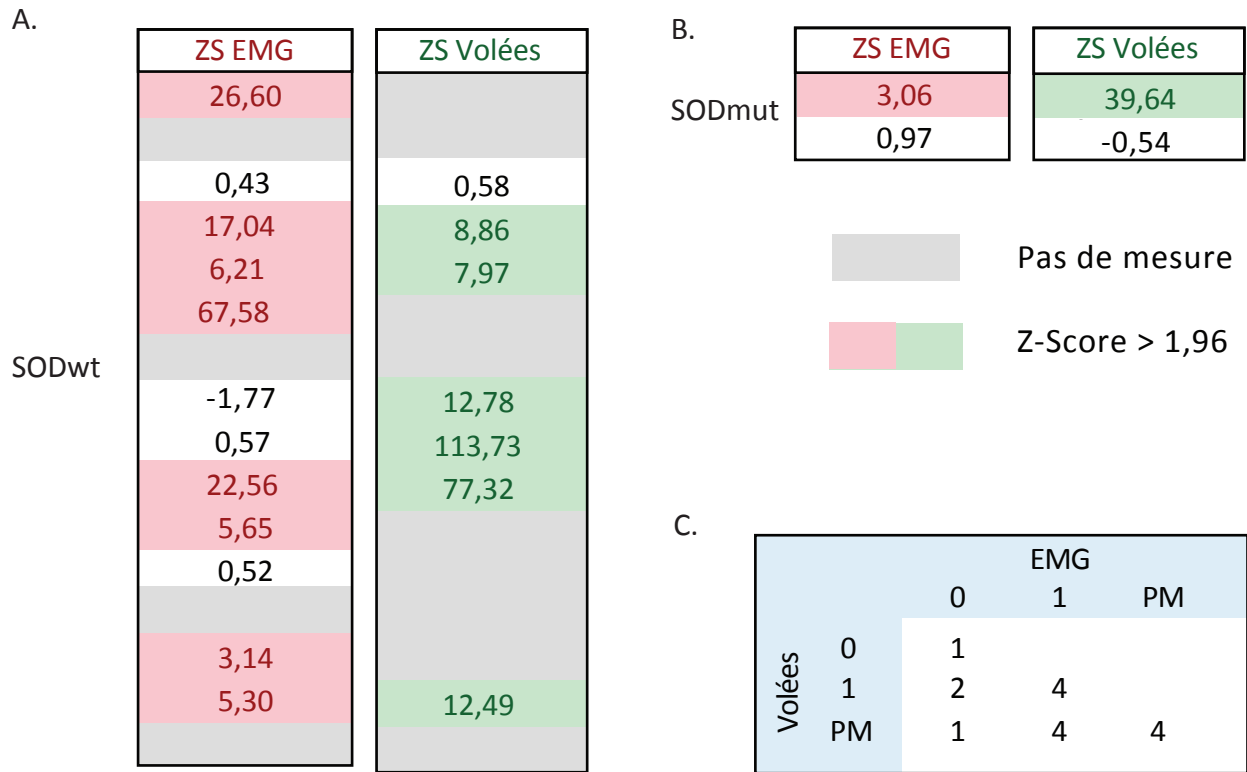


Figure 24. Table de Z-Scores & compte-rendu des mesures

**A-B** Chaque ligne correspond à une souris. Les Z-Score des signaux EMG (gauche) et des volées descendantes (droite), les scores > 1,96 correspondent à des réponses significatives, et donc à la contraction du muscle ou au passage de signaux cortico-spinaux. **C.** Table de compte-rendu des mesures effectuées. Pour les volées et les EMGs, nous distinguons les animaux sans réponses («0», Z-Score<1,96) de ceux avec une réponse («1», Z-score >1,96) et de ceux où la mesure n'a pas été possible («PM»).

**ZS** : Z-Score, **PM** : Pas de Mesure

## 6. Résultats

Afin de tester l'intégrité du message cortico-spinal, nous avons enregistré, en plus des réponses EMG, les volées descendantes (Alstermark & Pettersson 2014), c'est à dire le potentiel mesuré à la surface des colonnes dorsale, au-dessus du CST. Pour cela, nous avons infecté spécifiquement le tractus cortico-spinal issue du cortex HLA en réalisant des injections de « Chr2 rétro » dans le segment lombaire des souris. Les enregistrements ont été réalisés environ 3 semaines après, à p50, avant l'apparition de symptômes moteurs.

- Souris SODwt, surexprimant le gène de la SOD1 humaine sans la mutation G93A

Nous avons effectué les enregistrements sur 16 souris SODwt, en commençant par l'EMG (anesthésie kétamine/xylazine) puis en basculant vers une anesthésie gazeuse (isoflurane) pour l'enregistrement des volées. Dans ce fond génétique (C57BL/6 x SJL), les animaux sont plus petits que les souris CD1 utilisées dans le projet principal, et le taux de mortalité a été plus important. Chez 4 animaux, nous n'avons pu faire aucun enregistrement, et chez 5 autres animaux, nous n'avons pu effectuer que les EMG. Nous avons donc 12 enregistrements EMG pour les SODwt, dont 7 avec également les volées descendantes. Une de ces 7 souris ne démontrait ni de signal EMG significatif, ni de volée descendante significative en réponse à la stimulation des NCS ; et 2 ne présentaient qu'une volée descendante. Parmi les 5 animaux pour lesquels nous n'avons que l'enregistrement EMG, 1 ne présentait pas de signal significatif en réponse à la stimulation des NCS (Figure 24).

Chez les 6 souris SODwt avec une volée en réponse à la stimulation des NCS, celles-ci atteignaient un pic environ 30 ms après le début de la stimulation, avec une amplitude moyenne de 3,27  $\mu$ V (Figure 25 A-C). Chez ces souris, l'activation des NCS (avec une anesthésie différente) a provoqué dans la majorité des cas (4/6) une réponse EMG significative.

Prise indépendamment des volées, la stimulation des NCS a provoqué une contraction des muscles de la patte arrière controlatérale chez 8 des 12 animaux testés, avec un ratio S/B d'une valeur moyenne de 1,71 (Figure 25D et E).

- Souris SODmut, surexprimant le gène de la SOD1 humaine avec la mutation G93A

A l'heure de l'écriture de ce manuscrit, je n'ai testé que 2 souris SODmut, dont seule 1 a permis des enregistrements. Je ne commenterai donc pas ces données, ni ne les comparerai au groupe contrôle.

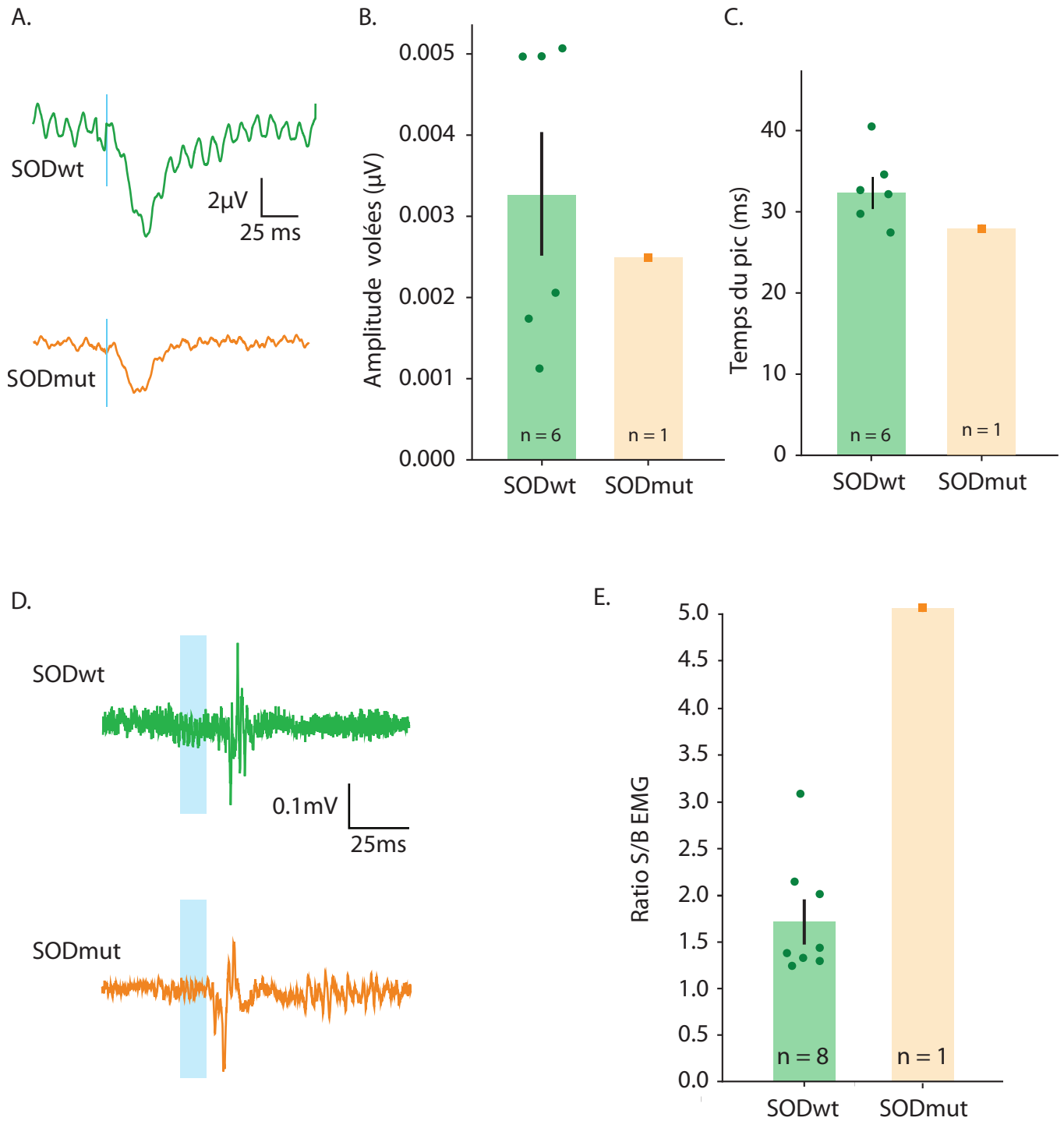


Figure 25. Transmission des signaux cortico-spinaux

**A.** Tracé représentatif des volées descendantes chez les souris SODwt (vert) et les souris SODmut (orange). **B.** Distribution des amplitudes des volées descendantes pour les deux groupes. **C.** Distribution du temps d'apparition du pic des volées descendantes pour les deux groupes. **D.** Tracé représentatif des réponses EMG chez les souris SODwt (vert) et les souris SODmut (orange). **E.** Distribution des valeurs des ratios S/B pour les deux groupes.

**S** : Signal, **B** : Bruit

## 7. Discussion

Ces résultats sont encore extrêmement préliminaires, et nécessitent l'utilisation de groupes de souris plus importants. De plus, un grand nombre des souris utilisées avaient une résistance moindre aux anesthésies de longue durée utilisés pour ces expériences. Pour cette raison, il n'a quasiment jamais été possible de réaliser les enregistrements de la PAD qui étaient initialement prévus, et les enregistrements des volées n'ont pas pu être systématiques.

L'absence de corrélation entre l'amplitude des volées cortico-spinales et celles des réponses EMG (coefficient de corrélation de Pearson  $R = -0,08$ ,  $n = 4$  souris) laisse penser qu'au moins un des deux paramètres ne reflète pas quantitativement l'intégrité de la voie cortico-spinale. Afin de disposer d'un paramètre supplémentaire, nous avons programmé de réaliser l'étude histologique des tissus prélevés chez les animaux testés. Ainsi, nous pourrions vérifier l'existence d'une corrélation entre la quantité de NCS exprimant la ChR2 et les volées ou les EMGs. Cela nous permettrait de savoir quel est le paramètre le plus intéressant à mesurer pour d'examiner la fonctionnalité du CST.

## II. Projet collaboratif

### 1. Objectif du projet collaboratif

Dans le cadre de mon doctorat, nous avons été amenées à participer à un projet collaboratif avec le Dr. Caroline Rouaux de l'INSERM et son groupe. Leur projet s'inscrit dans l'objectif de tester la validité de l'hypothèse antérograde de la SLA. Pour cela, leur étude a consisté à observer l'impact de l'absence des neurones corticofuges sur l'évolution de la maladie. L'ablation des neurones corticofuges dans un modèle SOD a été réalisée grâce à un croisement des souris SOD1 G86R avec des souris KO *Fezf2*, dans lesquelles les neurones corticofuges sont génétiquement absents. Cette étude a alors comparé l'évolution du phénotype pathologique des souris développant la SLA en l'absence de neurones corticofuges, avec des souris développant la SLA dans des conditions normales.

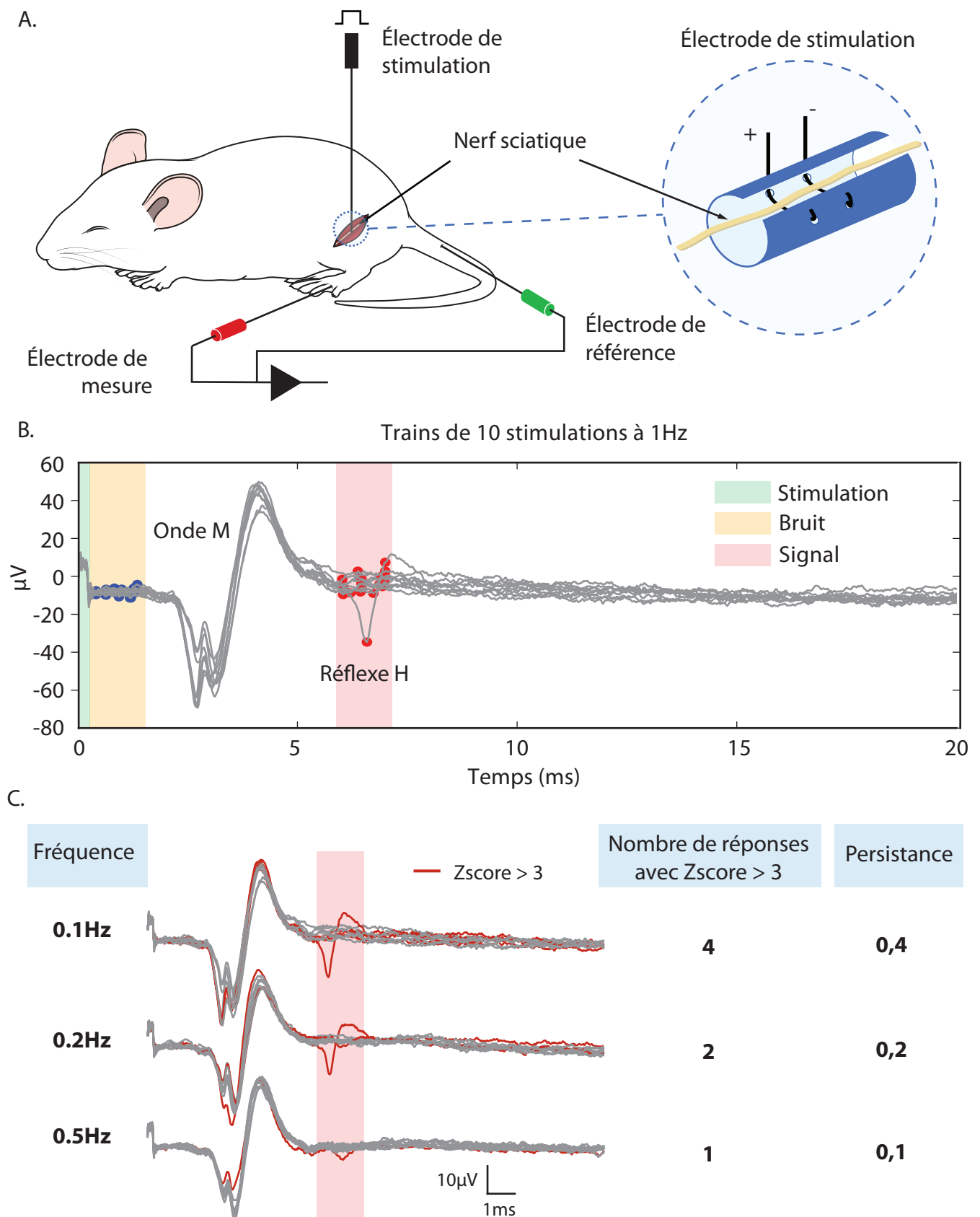
Pour que le phénotypage soit complet, ils ont souhaité suivre l'évolution du réflexe H (témoin de l'hyperréflexie observée chez les souris SOD1) dans leurs différents groupes de souris. Nous avons aidé à mettre en place une stratégie d'enregistrement de ce réflexe qui a été utilisé comme l'un des moyens de mesure de l'impact de l'absence des NCS sur la propagation de la maladie. J'ai en outre développé (programmation sous Python) une approche pour l'analyse des signaux électrophysiologiques enregistrés, et effectué la totalité de ces analyses (détaillée dans la section [Matériels et Méthodes](#) ci dessous).

### 2. Matériels et Méthodes

#### 2.1. Enregistrement du réflexe H

Le réflexe H a été évalué alternativement sur les deux membres postérieurs (avec un intervalle de trois semaines) de souris pré-symptomatiques âgées de 80 et 105 jours (Lee et al 2014). Les souris ont été anesthésiées avec une solution de kétamine/xylazine. Après incision de la peau le long du fémur, les muscles ont été écartés et le nerf sciatique exposé. Une électrode de stimulation cylindrique maison, permettant d'isoler le nerf des muscles, a été placée autour du nerf. Une électrode d'EMG a été placée dans les muscles abducteurs *digiti minimi* et les enregistrements ont été obtenus avec un amplificateur (Digitimer Ltd, DS3) ([Figure 26A.](#)).





**Figure 26. Techniques d'enregistrement et analyse du réflexe H**

**A.** Illustration du montage expérimental. Une électrode bipolaire est insérée dans un tube isolant le nerf des muscles. Le résultat de la stimulation est enregistré par une électrode d'EMG placée dans la patte. **B.** Superposition de 10 traces successives issues d'un train de stimulations. Mesure des voltages minimum et maximum dans la zone de bruit (points bleus) et dans la zone de signal (points rouges). **C.** Vérification de la présence de persistance du signal lors d'une augmentation de la fréquence de stimulation. Si le nombre de réponses diminue, il s'agit bien d'un réflexe H.

Une première stimulation de 0,2 ms à 0,1 Hz a été initialement appliquée, suivie d'une augmentation progressive de l'intensité du courant. Ce protocole nous a permis de trouver l'intensité minimale et maximale pour susciter une réponse M, afin de fixer l'intensité de stimulation à environ 50% de la réponse M. Pour chaque animal, nous avons testé la présence ou l'absence du réflexe H en effectuant 10 stimulations du nerf sciatique à 0,1 Hz, 0,2 Hz, 0,5 Hz et 1 Hz.

## 2.2. Analyse des signaux




Le programme Python que j'ai développé mesure, pour chacune des 10 traces, l'amplitude maximale du bruit, sur une fenêtre de 1 ms entre la stimulation et l'onde M ( $\Delta$ Bruit). De façon similaire, il mesure l'amplitude du réflexe H comme la valeur maximale de l'enregistrement sur une fenêtre de 1 ms située entre 5 et 8 ms après la stimulation ( $\Delta$ Réponse). La moyenne et l'écart type du  $\Delta$ Bruit ont été mesurés à partir des 10 valeurs de  $\Delta$ Bruit obtenues à partir des 10 traces successives pour chaque animal, et utilisées pour calculer les Z-scores (voir section [Matériels et Méthodes](#) p.46) ([Figure 26B.](#)).

Le réflexe H et les ondes F partagent certaines propriétés électrophysiologiques, mais la persistance de l'onde F, définie comme le nombre de réponses significatives divisée par le nombre de stimuli, est généralement indépendante de la fréquence de stimulation, ou tend à augmenter uniquement au-dessus des taux de stimulation de 1 à 2 Hz (Fierro et al 1991, Mesrati & Vecchierini 2004). Pour nous assurer que le signal observé était un réflexe H, nous n'avons pris en compte que les signaux montrant une diminution de cette valeur de persistance. On a considéré que les souris présentaient un réflexe H lorsqu'au moins une des deux jambes était positive ([figure 26C.](#)).

3. Resultats

(Burg et al 2020)

# Absence of Subcerebral Projection Neurons Is Beneficial in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Thibaut Burg, PhD <sup>1</sup>, Charlotte Bichara, MSc,<sup>2</sup> Jelena Scekcic-Zahirovic, MD, PhD,<sup>1</sup> Mathieu Fischer, MSc <sup>1†</sup>, Geoffrey Stuart-Lopez, MSc,<sup>1</sup> Aurore Brunet, MSc,<sup>1</sup> François Lefebvre, MD, PhD,<sup>3</sup> Matilde Cordero-Erausquin, PhD,<sup>2</sup> and Caroline Rouaux, PhD <sup>1†</sup>

**Objective:** Recent studies carried out on amyotrophic lateral sclerosis patients suggest that the disease might initiate in the motor cortex and spread to its targets along the corticofugal tracts. In this study, we aimed to test the corticofugal hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis experimentally.

**Methods:** *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2* knockout mouse lines were crossed to generate a model that expresses a mutant of the murine *Sod1* gene ubiquitously, a condition sufficient to induce progressive motor symptoms and premature death, but genetically lacks corticospinal neurons and other subcerebral projection neurons, one of the main populations of corticofugal neurons. Disease onset and survival were recorded, and weight and motor behavior were followed longitudinally. Hyper-reflexia and spasticity were monitored using electromyographic recordings. Neurodegeneration and gliosis were assessed by histological techniques.

**Results:** Absence of subcerebral projection neurons delayed disease onset, reduced weight loss and motor impairment, and increased survival without modifying disease duration. Absence of corticospinal neurons also limited presymptomatic hyper-reflexia, a typical component of the upper motoneuron syndrome.

**Interpretation:** Major corticofugal tracts are crucial to the onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis. In the context of the disease, subcerebral projection neurons might carry detrimental signals to their downstream targets. In its entirety, this study provides the first experimental arguments in favor of the corticofugal hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis.

ANN NEUROL 2020;00:1–15

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease characterized by rapidly progressing muscle atrophy and paralysis, leading to death within only 2 to 5 years of diagnosis. Clinically and histologically, ALS is defined as the progressive loss of two neuronal populations: corticospinal and corticobulbar neurons (CSN) in the motor cortex, and spinal and bulbar

motoneurons (MN) in the brainstem and spinal cord.<sup>1</sup> This duality has fostered a long-standing debate regarding the disease origin along the corticospinomuscular axis.<sup>2</sup>

Jean-Martin Charcot, who first described ALS, suggested a cortical origin and a propagation from the motor cortex to the spinal cord.<sup>3</sup> Comprehensive clinical examination of patients unraveled signs highly suggestive

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ana.25833

Received Dec 6, 2019, and in revised form Jun 23, 2020. Accepted for publication Jun 23, 2020.

Address correspondence to Dr Caroline Rouaux, Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. E-mail: [caroline.rouaux@inserm.fr](mailto:caroline.rouaux@inserm.fr)

<sup>†</sup>Current address: Department of Paediatrics, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, Oxford, UK.

From the <sup>1</sup>Inserm UMR\_S 1118, Mécanismes centraux et périphériques de la neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>2</sup>UPR 3212, Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, UPR 3212 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; and

<sup>3</sup>GMRC, service de santé publique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Additional supporting information can be found in the online version of this article.

of a cortical origin, such as the split hand syndrome and typical gait abnormalities.<sup>4</sup> Meanwhile, transcranial magnetic stimulation studies identified early hyperexcitability of the motor cortex that is negatively correlated with survival and manifests before disease onset, pointing again to a potentially initiating role of the motor cortex.<sup>5</sup> Cortical hyperexcitability has been proposed to translate into glutamatergic excitotoxicity to downstream targets of the CSN, ie, spinal and bulbar MN, providing a first possible mechanism for propagation.<sup>4</sup> More recently, staging of the TAR DNA binding protein (TARDBP; also known as TDP-43) pathology,<sup>6</sup> a histopathological burden that characterizes most ALS patients, led to the emergence of the so-called corticofugal hypothesis, which proposes a motor cortical origin of the disease and a direct, monosynaptic dissemination of misfolded TDP-43 proteins in a prion-like manner.<sup>7</sup> Although supported by several neuroimaging studies (reviewed by Brunet and colleagues<sup>8</sup>), corticofugal propagation cannot be assessed in patients. We thus reasoned that mouse genetics could prove useful to address a potential cortical origin and corticofugal propagation of ALS directly.

In rodents, as in humans, corticofugal projections arise from two populations: corticothalamic projection neurons and subcerebral projection neurons (SubCerPN) that include the disease-relevant CSN.<sup>9,10</sup> Although major differences exist between primates and rodents regarding the route of the corticospinal tract and the connectivity of CSN onto alpha motoneurons, many mouse models of ALS recapitulate CSN or SubCerPN degeneration (reviewed by Brunet and colleagues<sup>8</sup>). Likewise, we recently showed that *Sod1*<sup>G86R</sup> mice display presymptomatic CSN degeneration and a somatotopic relationship between CSN and spinal motoneuron degeneration,<sup>11</sup> as reported in ALS patients.<sup>12</sup>

Here, we sought to test the contribution SubCerPN to ALS by taking advantage of the *Fezf2* knockout mice that develop in the absence of SubCerPN.<sup>13</sup> These animals lack the gene encoding the transcription factor *Fezf2* (*Fezl*, *Zfp312*) that is both necessary<sup>14</sup> and sufficient to instruct birth and specification of CSN and other SubCerPN.<sup>15,16</sup> *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice are hyperactive,<sup>13</sup> present defects of cortical interneuron lamination and unbalanced cortical activity,<sup>17</sup> and fail to feed on solid food.<sup>13</sup> However, when fed soft food, *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice do not display any major motor phenotype: they walk and reproduce. We crossbred the *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines to generate a model ubiquitously expressing the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene, a condition sufficient to develop an ALS-like phenotype,<sup>18</sup> but entirely lacking CSN and other SubCerPN, hence challenging the definition of ALS.

An initial report of the findings presented here was published as a preprint on bioRxiv.<sup>19</sup>

## Materials and Methods

### Animals

All animal experiments were performed by authorized investigators and approved by the local ethical committee of Strasbourg University (CREMEAS, agreement #00738.01). Animals, kept 2 to 5 per cages, were housed in the animal facility of the Faculty of Medicine of Strasbourg, with a regular 12 hour/12 hour light/dark cycle, in constant conditions (21 ± 1°C; 60% relative humidity). Food and water were accessible ad libitum. *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice<sup>13</sup> were obtained from the Arlotta Laboratory. *Sod1*<sup>G86R</sup> males<sup>18</sup> were crossed with *Fezf2*<sup>+/-</sup> females, and F1 *Fezf2*<sup>+/-</sup>/*Sod1*<sup>G86R</sup> males were crossed with *Fezf2*<sup>+/-</sup>/WT females to obtain *Fezf2*<sup>+/-</sup>/WT (WT, n = 23); *Fezf2*<sup>-/-</sup>/WT (KO, n = 22); *Fezf2*<sup>+/-</sup>/*Sod1*<sup>G86R</sup> (*Sod1*, n = 14); and *Fezf2*<sup>-/-</sup>/*Sod1*<sup>G86R</sup> (KO/*Sod1*, n = 17). Males were used for survival, behavior, and histology. Males and females, in equal proportions, were used for H-reflex (n = 6 WT, n = 6 KO, n = *Sod1*, and n = KO/*Sod1*) and histology (75 days: n = 6 WT, n = 5 KO, n = 6 *Sod1*, and n = 3 KO/*Sod1*; and 105 days: n = 6 WT, n = 4 KO, n = 8 *Sod1*, and n = 5 KO/*Sod1*).

### Quantitative PCR Analyses

Tissue harvesting, RNA extraction, and qPCR were performed as described by Scekcic-Zahirovic and colleagues<sup>20</sup> using the following primers: *Gusb*, forward, 5'-CGAGTATGGAGCAGACGCA A-3' and reverse, 5'-AGCCTTCTGGTACTCCTCACT-3'; *Actb*, forward, 5'-ATGTGGATCAGCAAGCAGGA-3' and reverse, 5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCCT-3'; *Hsp90ab1*, forward, 5'-TACTACTCGGCTTCCCGTCA-3' and reverse, 5'-CCTGAAAGGCCAAAGGTCTCCA-3'; *Fezf2*, forward, 5'-GT GCGGCAAGGTGTTCAATG-3' and reverse, 5'-CAGACTTT GCACACAAACGGT-3'; *Sod1*, forward, 5'-GAGACCTGGGC AATGTGACT-3' and reverse, 5'-GTTTACTGCGCAATCCC AAT-3'; and *Chat*, forward, 5'-CTGGCCACCTACCTTC AGTG-3' and reverse, 5'-CCCCAAACCGCTTCACAATG-3'.

### Motor Tests and Regression Analyses

Mice were trained from 5 to 8 weeks of age and followed from 9 weeks until death. Motor coordination, endurance, muscle strength, and mouse gait were assessed as previously described.<sup>20</sup> Multiple linear regression analyses were run on R v.3.4.3 with all the relevant packages to include weight and speed as confounding variables. Normality of distributions was tested using the Shapiro–Wilk or the Kolmogorov–Smirnov test and assessed graphically using a normal quantile plot.

### Electromyography, H-Reflex, and Tail Long Lasting Reflex Recordings

All recordings were performed with a standard electromyographic apparatus (Dantec Dynamics, Skovlunde, Denmark) as previously described.<sup>21</sup> Tail spasticity of end-stage mice was determined and quantified as previously described.<sup>22</sup> Signal intensities were measured before and after stimulation, using ImageJ (US,

National Institutes of Health, Bethesda, MD). The H-reflex was assessed on presymptomatic mice aged 80 and 105 days (first and second hindlimb, respectively), by modifying a previously described method,<sup>23</sup> with stimulation of the sciatic nerve and recording in the abductor digiti minimi muscles. The amplitude of the H-reflex, as the peak–trough value of the recording on a 1 millisecond window situated at the expected latency for the H-reflex, was measured between 5 and 8 milliseconds after stimulation. Mice were considered to display an H-reflex when at least 1 of the 2 hindlimbs was positive.

### Retrograde Labeling of the CSN and Histological Procedures

CSN were retrogradely labeled with Fluorogold as previously described.<sup>14</sup> Animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) as described.<sup>20</sup> Nervous tissues were cut into 40- $\mu$ m-thick vibratome sections (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Sections were blocked for 30 minutes with 5% horse serum and 0.5% Triton X-100, incubated with primary antibody overnight, rinsed in phosphate-buffered saline and incubated for 2 hours with secondary antibody (1/500, Jackson Immuno-research, West Grove, PA).

For immunohistochemistry, sections were pretreated for 10 minutes in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and revealed upon 1 hour incubation in Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) with 0.075% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50mM Tris–HCl. Primary antibodies were as follows: goat anti-ChAT (AB144P, 1/50), mouse anti-parvalbumin (MAB1572,1/500), and goat anti-calretinin (AB1550,1/1000) (Millipore, Burlington, MA); rat anti-CTIP2 (AB18465, 1/100), mouse anti-P62 (AB56416, 1/100), goat anti-TPH2 (AB121013, 1/500), and goat anti-Iba1 (AB5076, 1/100) (Abcam, Cambridge, UK); rabbit anti-synaptophysin (578, 1/100) and rabbit anti-neurofilament (NF575, 1/100) (Eurogentec, Seraing, Belgium); mouse anti-CRYM (AA215-314,1/100, Abnova, Taipei, Taiwan); rabbit anti-GFAP (Z0334, 1/200, Dako, Agilent, Santa Clara, CA); rat anti-TDP-43 (10782-2-AP,1/500, Proteintech, Rosemont, IL); and mouse anti-calbindin (C9848,1/500) and rhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (T0195, 1/500) (Sigma-Aldrich). Lumbar MN were counted on six sections, interneurons on four sections, and serotonergic neurons on one coronal section (bregma –4.72mm). Approximately 100 NMJ were examined per animal. Images were captured using an AxioImager M2 microscope equipped with a structured illumination system (Apotome, Zeiss, Oberkochen, Germany) and a high-resolution B/W camera (Hamamatsu, Iwata, Shizuoka, Japan), and run by the ZEN 2 software (Zeiss).

### Statistical Analysis

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Analyses were performed in GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, San Diego, CA), using Student *t* test, 1-way and 2-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test, the log-rank test (Mantel–Cox), Grubbs' test and Fischer's exact test. Results were considered significant when *p* < 0.05.

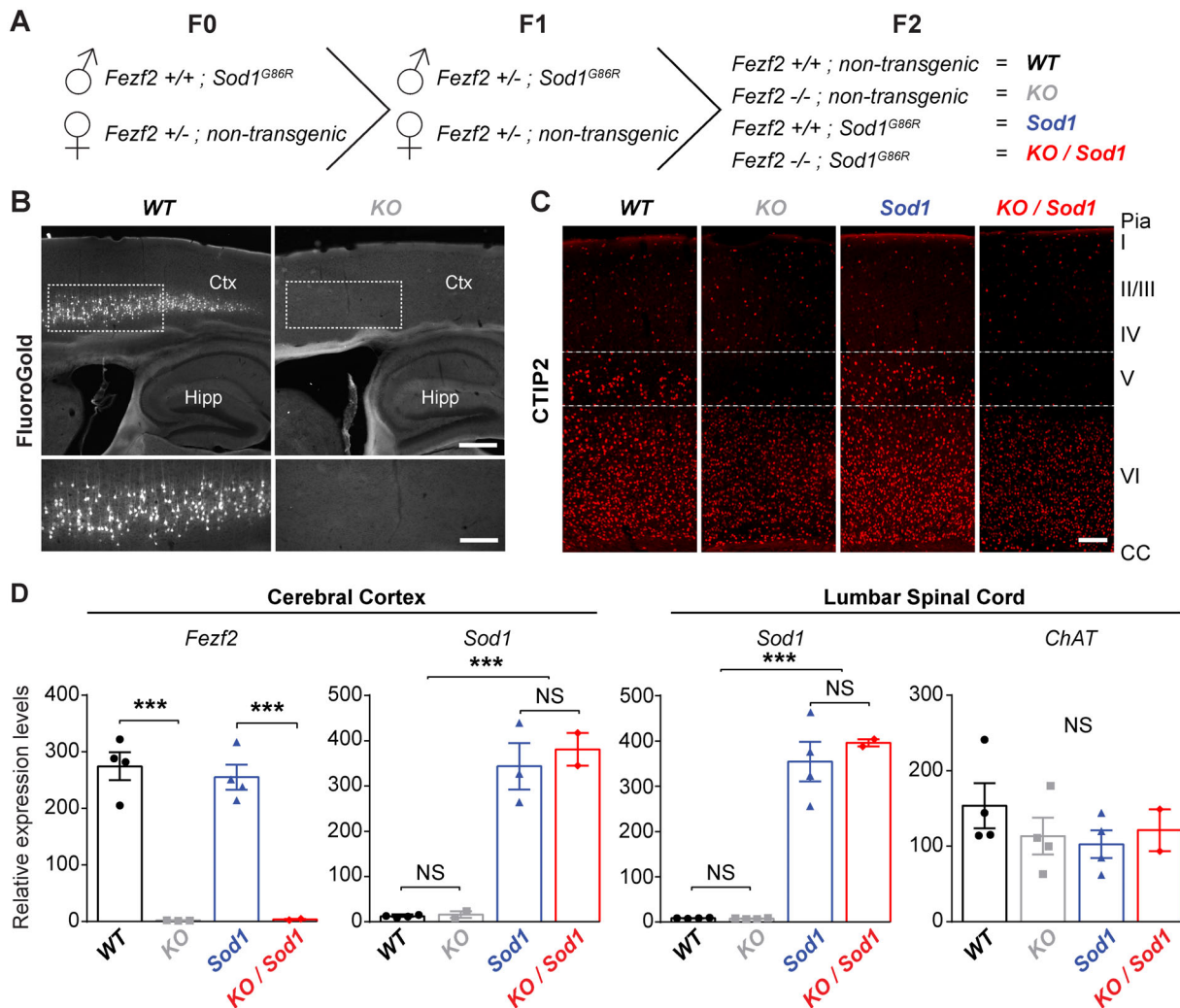
## Results

### Generation of the *Fezf2*<sup>-/-</sup>; *Sod1*<sup>G86R</sup> Mice

To test the contribution of the cerebral cortex to ALS, we generated a mouse line overexpressing the mutant *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene but lacking SubCerPN, by crossbreeding *Sod1*<sup>G86R</sup> to *Fezf2*<sup>-/-</sup> mice. We obtained four genotypes: *Fezf2*<sup>+/+</sup> and non-transgenic (*WT*), *Fezf2*<sup>-/-</sup> and non-transgenic (*KO*), *Fezf2*<sup>+/+</sup> and *Sod1*<sup>G86R</sup> (*Sod1*), and *Fezf2*<sup>-/-</sup> and *Sod1*<sup>G86R</sup> (*KO/Sod1*) (Fig 1). Fluorogold injection into the cervical portion of the dorsal funiculus confirmed the absence of retrogradely labeled CSN, a subpopulation of SubCerPN, in the motor cortex of *KO* mice compared with *WT*. Immunostaining of CTIP2 further confirmed the absence of layer V SubCerPN in *KO* and *KO/Sod1* animals compared with their *WT* and *Sod1* littermates. To verify that absence of *Fezf2* expression had no effect on *Sod1* expression or on spinal MN generation, we ran qPCR analyses. Upregulation of *Sod1* expression was verified in *Sod1* and *KO/Sod1* animals and did not differ between the two genotypes, neither in the cerebral cortex nor in the spinal cord. Expression of the motoneuronal marker *Chat* was not significantly different between any of the four genotypes. Together, the data suggest that *KO/Sod1* mice represent a good model to study the impact of SubCerPN on the onset and progression of the ALS-like phenotype, and to test the corticofugal hypothesis.

### Absence of SubCerPN Delays Disease Onset and Death

To examine the consequences of the absence of projections from the cerebral cortex to its main subcerebral targets, we followed *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their controls (Fig 2). The 75-day-old *KO* and *KO/Sod1* mice were lighter than *WT* and *Sod1* mice, but their body mass index was comparable (data not shown), indicating that *KO* and *KO/Sod1* mice were smaller but not thinner than their *WT* and *Sod1* littermates. As opposed to *WT* and *KO* mice, *Sod1* and *KO/Sod1* mice prematurely stopped gaining weight. Using weight peak as the disease onset, we observed that *KO/Sod1* mice presented a significant delay of disease onset compared with their *Sod1* littermates (median: 107.5 vs 159 days; *p* = 0.0070). Likewise, survival of the *KO/Sod1* mice was increased compared with that of *Sod1* mice (median: 130 vs 183 days; *p* = 0.0083), but the overall disease duration was not significantly different. Finally, the weight loss during the course of the disease was significantly smaller for the *KO/Sod1* mice than for the *Sod1* mice (36.45  $\pm$  1.82 vs 25.07  $\pm$  1.68%; *p* < 0.0001), in accordance with an arrest of weight gain rather than a clear weight loss and an increased survival.



**FIGURE 1:** Generation of a mouse model overexpressing the *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene but lacking all subcerebral projection neurons (SubCerPN), including the corticospinal neurons (CSN). (A) Schematic diagram of the crossbreeding of the *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines to generate four genotypes of interest: WT, KO, *Sod1*, and *KO/Sod1*. (B) Retrograde labeling of the CSN from the spinal cord of KO animals (right) and WT (left), showing absence of CSN in KO mice. *n* = 5 for all genotypes. (C) Representative images of brain coronal sections, at the level of the motor cortex, showing CTIP2 immunolabeling of layer V SubCerPN and of layer VI corticothalamic projection neurons (CTHPN) in WT and *Sod1* mice, and confirming the absence of cortical layer V SubCerPN from the KO and *KO/Sod1* animals. *n* = 3 for all genotypes. (D) Quantitative PCR analysis of *Fezf2*, *Sod1*, and *Chat* expression in the cerebral cortex and spinal cord of 75-day-old animals, indicating that absence of *Fezf2* does not affect *Sod1* or *Chat* expression; 2-way ANOVA; *n* = 4 WT, *n* = 4 KO, *n* = 4 *Sod1*, and *n* = 2 *KO/Sod1*; \*\*\**p* < 0.001. Scale bars: 400μm in upper panels and 200μm in lower panels of B; and 250μm in C. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

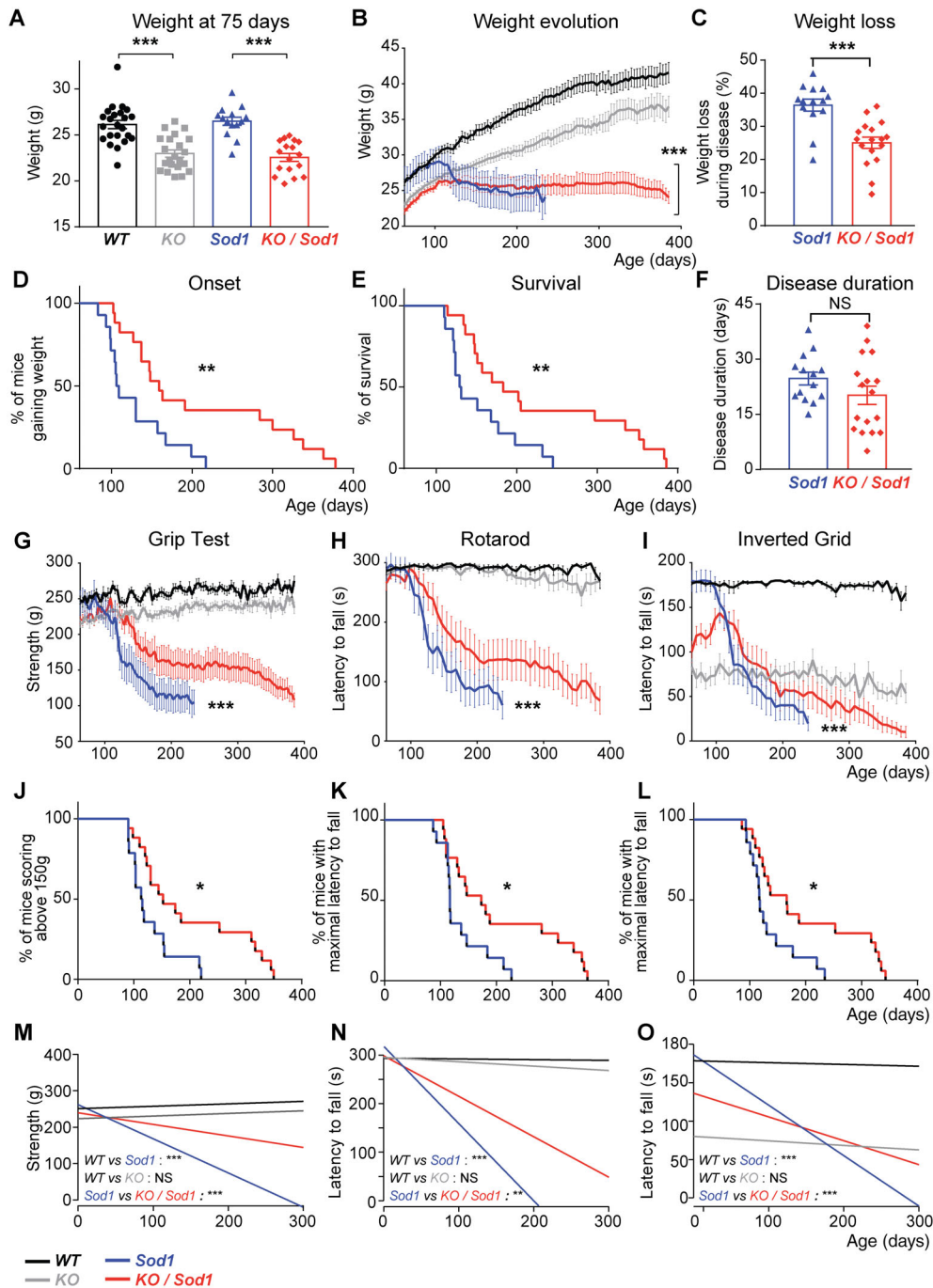
Together, the data indicate that in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS the absence of SubCerPN is beneficial.

### Absence of SubCerPN Attenuates Motor Impairment

Next, we tested whether absence of SubCerPN could ameliorate motor performances and used linear regression analysis with the weight as a covariable to compare the animals both at the beginning and over the course of the experiment (origin and slope, respectively; Table S1). On the grip test and rotarod, *Sod1* and *KO/Sod1* mice rapidly showed reduced performances, but *KO/Sod1* mice were

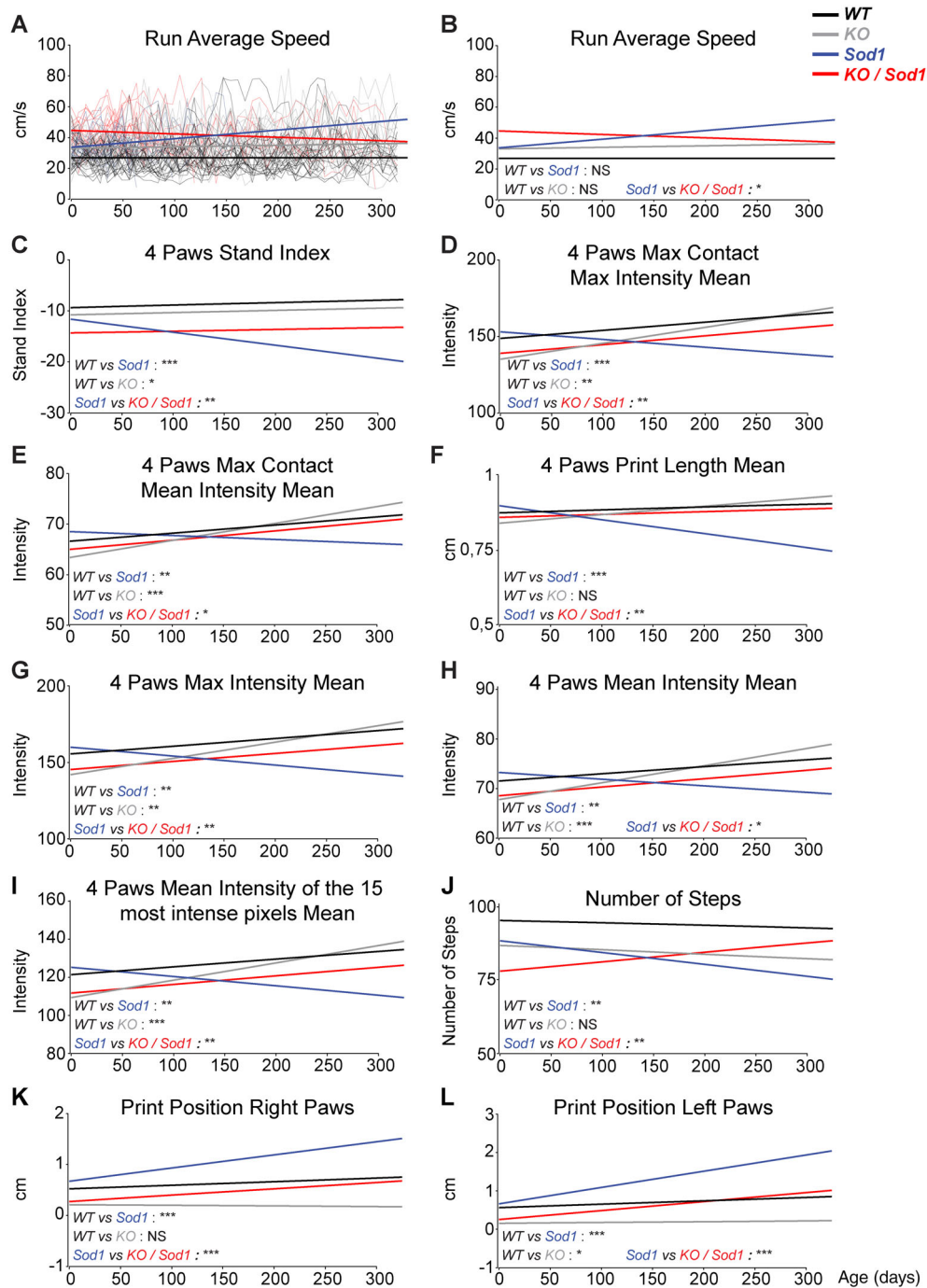
affected later than their *Sod1* littermates and maintained higher performances over time than their *Sod1* littermates (Fig 2). On the inverted grid, *KO* and *KO/Sod1* mice initially displayed more difficulties in opposing their gravitational force compared with WT and *Sod1* mice. Yet, although WT and KO animals maintained their hanging time throughout all the repetitive assessments, *Sod1* and *KO/Sod1* gradually decreased their performances. However, this decrease occurred later and in a more moderate manner in *KO/Sod1* versus *Sod1* animals.

Linear regression analyses of the gait recorded on a CatWalk device using weight and speed as covariates



**FIGURE 2: Absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) delays onset, prevents weight loss, prolongs survival, and slows the decline of motor capacities.** (A) Bar graph representing the average weight of the four groups of mice at the beginning of the survival study (75 days); 1-way ANOVA. (B) Graphical representation of the evolution of the weight over time for the four genotypes. Note that although *Sod1* mice clearly lost weight, *KO/Sod1* mice instead stopped gaining weight; linear mixed effects model. (C) Bar graph representing the percentage of weight lost throughout the course of the disease; Student unpaired t test. (D, E) Kaplan–Meier plots of disease onset, defined as the time when animals stopped gaining weight (D), and survival (E) in days, for *Sod1* and *KO/Sod1* mice; log-rank test (Mantel–Cox). (F) Bar graph representing disease duration in days; Student unpaired t test. (G–I) Graphical representation of motor capacities over time, in days, on the grip strength test (G), the rotarod test (H), and the inverted grid test (I); linear mixed effects model. (J–L) Kaplan–Meier plots of grip strength score >150g (J) and maximal latency to fall from the rotarod (K) or from the inverted grid (L); log-rank test (Mantel–Cox). (M–O) Linear regression analysis conducted using the weight as covariate; the comparisons represented here are those of the slopes. For all data,  $n = 23$  WT,  $n = 22$  KO,  $n = 14$  *Sod1*, and  $n = 17$  *KO/Sod1*; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; NS, nonsignificant. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]





**FIGURE 3: Absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) ameliorates gait parameters recorded on CatWalk. (A–L)** Linear regression analyses were used to model overall evolution of the groups of animals, taking into account the individual progressions of each mouse over time. Weight was used as a covariate in A and B, and weight and speed were used as covariates in C–L. Individual mouse traces were removed from B–L to ease visualization of the regression curves (compare B with A). The comparisons represented here are those of the slopes. For all data, n = 23 WT, n = 22 KO, n = 14 *Sod1*, and n = 17 *KO/Sod1*; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; NS, nonsignificant. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

identified 3 parameters significantly different between *WT* and *KO* animals over time, and not between *WT* and *Sod1* animals, probably reflecting the consequences of the absence of CSN (*WT* versus *KO*; see Table S1). We also identified 15 parameters significantly altered in *Sod1* versus *WT* mice during disease progression (see Table S1).

Amongst them, 10 were also significantly different in *Sod1* versus *KO/Sod1* animals (Fig 3). Of those, two parameters showed opposite effects between absence of *Fesf2* and overexpression of *Sod1*<sup>G86R</sup>, whereas eight parameters instead showed a genuine amelioration of the *Sod1* phenotype in the absence CNS (*KO/Sod1* vs *Sod1*). Overall,

CatWalk analysis indicated that the absence of CSN ameliorated a set parameters affected in *Sod1*<sup>G86R</sup> animals as disease progressed. Together, the data confirmed the beneficial effects of the absence of SubCerPN on motor impairment in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice.

### **Absence of CSN Minimizes Spinal MN Loss and Neuromuscular Junction Denervation without Modifying Other Pathological Hallmarks of ALS**

We also investigated the spinal cord of end-stage animals, for its relevance to ALS but also as the target of CSN. Staining for GFAP and IBA1 revealed astrogliosis and microgliosis in the lumbar spinal cord of *Sod1* and *KO/Sod1* animals, without any difference between the two genotypes (Fig 4). Labeling of the autophagy marker P62/SQTM1 revealed a healthy, homogeneous cytoplasmic staining in both *WT* and *KO* mice and large, stellate-like inclusions in *Sod1* and *KO/Sod1* mice, with similar occurrence and intensity. Immunolabeling and counting of the ChAT<sup>+</sup> MN revealed a mild decrease of their somas in *Sod1* mice, as reported,<sup>21</sup> and maintenance of a bigger pool of MN in *KO/Sod1* versus *Sod1* animals ( $8.456 \pm 0.49$  vs  $6.152 \pm 0.57$ ;  $p = 0.0306$ ). Neuromuscular junction (NMJ) labeling and rating indicated that *KO/Sod1* animals had 2 times as many innervated NMJ as *Sod1* animals by disease end-stage ( $23.8 \pm 4.87\%$  vs  $11.34 \pm 3.12\%$ ;  $p = 0.0239$ ). Overall, the data show that the absence of cortical afferents to the spinal cord partly protects against Wallerian degeneration of the MN without modifying levels of spinal gliosis and dysregulation of autophagy.

### **Neither *Sod1*<sup>G86R</sup> Overexpression nor Absence of SubCerPN Modifies TDP-43 Subcellular Localization**

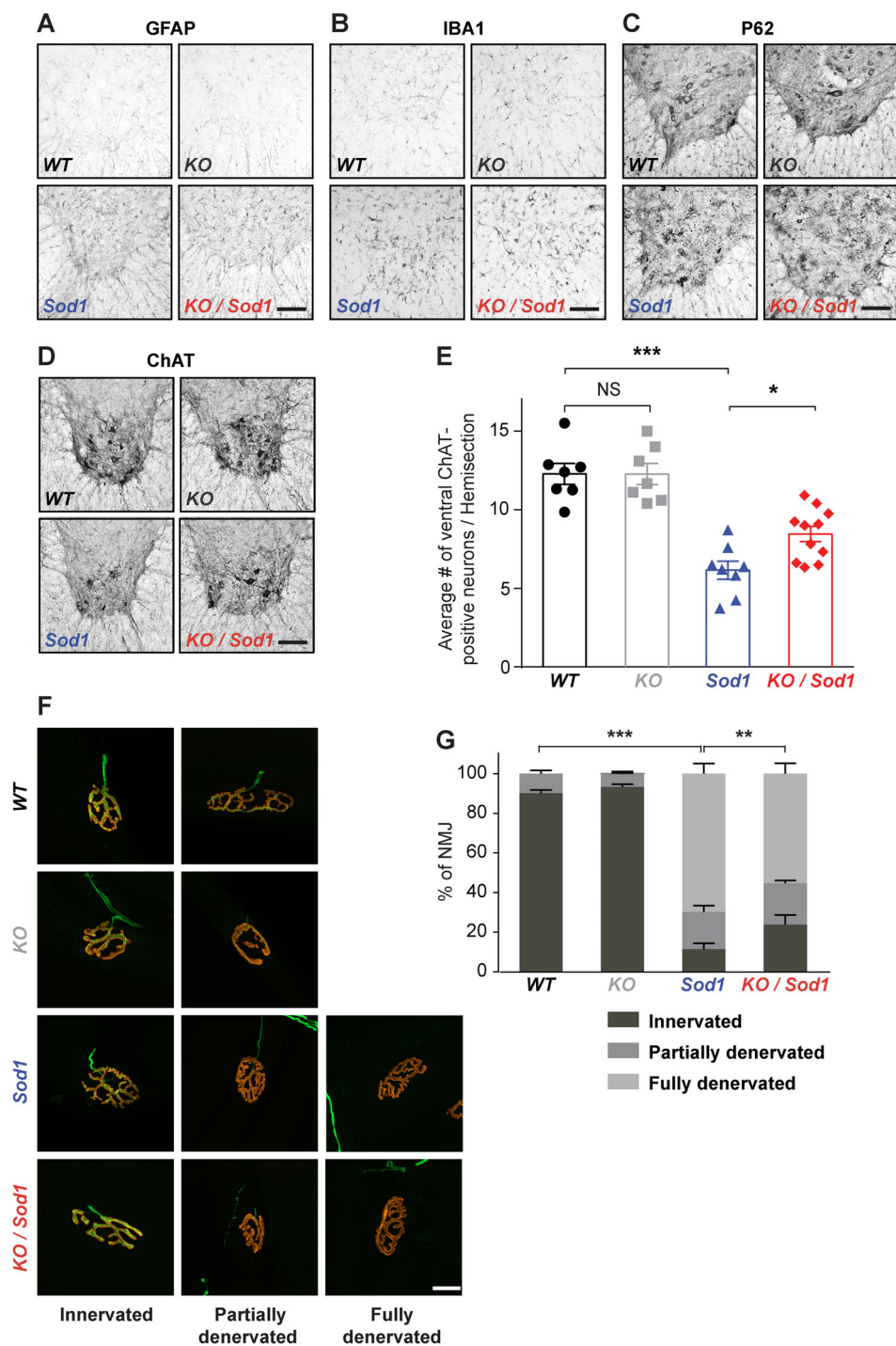
The corticofugal hypothesis of ALS was proposed upon staging of the TDP-43 pathology.<sup>6,7</sup> Although TDP-43 aggregates have not been reported in *SOD1* ALS patients,<sup>24</sup> their putative occurrence in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice has, to our knowledge, not been evaluated. To test whether increased survival and partial protection of MN in *KO/Sod1* animals was correlated with altered TDP-43 subcellular localization, we performed immunolabeling on end-stage animals and controls. Colocalization analyses in CRYM<sup>+</sup> SubCerPN of the motor cortex of *WT* and *Sod1* animals indicated that *Sod1*<sup>G86R</sup> overexpression was not associated with nuclear depletion of TDP-43 or occurrence of TDP-43<sup>+</sup> aggregates (Fig 5). No difference in TDP-43 immunoreactivity could be observed in the surrounding cortical environment either. In the spinal cord, we failed to detect any difference in TDP-43 immunoreactivity in CHAT<sup>+</sup> MN or in their surrounding

environment across genotypes. Together, the data suggest that in the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model of ALS, the detrimental message carried along the corticofugal tracts probably does not take the form of TDP-43<sup>+</sup> aggregates.

### **Absence of CSN Positively Impacts Hyper-Reflexia but Not Spasticity**

In humans, degeneration or lesion of the corticospinal tract results in appearance of the upper motoneuron syndrome,<sup>25</sup> a series of signs that include muscular weakness, decreased motor control, hyper-reflexia, including spasticity, and clonus.<sup>26</sup> In ALS patients, spasticity is typically evaluated using the modified Ashworth Scale, which measures the resistance to a passive soft-tissue stretching performed by the physician.<sup>27</sup> Hyper-reflexia instead is observed clinically as a hyperactive deep tendon reflex and electrophysiologically as an increase of the monosynaptic spinal reflex activity revealed by an increase of the ratio between the short-latency Hoffman's reflex, or H-reflex, to compound muscle action potentials (H/M ratio).<sup>28</sup> In rodents, assessment of the tail long lasting reflex (LLR) after cutaneous stimulation is accepted as a simple method to assess spasticity in awake animals,<sup>29</sup> and the H/M ratio is used to evaluate hyper-reflexia and is correlated with spasticity.<sup>29,30</sup> We reasoned that the mouse line that we generated could contribute to evaluate the role of CSN in the modulation of spinal network excitability involved in hyper-reflexia and spasticity in an ALS-related context.

We ran electromyographic analyses on presymptomatic anesthetized mice to detect the H-reflex upon stimulation of the sciatic nerve and recording of the abductor digiti minimi muscle. We detected an H-reflex in fractions of *Sod1* and *KO/Sod1* groups of animals, but never in the *WT* or *KO* animals (Fig 6). Thus, the H-reflex developed only in *Sod1*<sup>G86R</sup> animals, independently of the presence of CSN and, counterintuitively, the absence of CSN, per se, was not sufficient to trigger an H-reflex. Evaluation of the proportions of animals presenting an H-reflex did not reveal any significant difference between *Sod1* and *KO/Sod1* at this age. However, measurement of the H/M ratio among the animals displaying an H-reflex showed a significant reduction in *KO/Sod1* animals compared with their *Sod1* littermates. This suggests that, at presymptomatic ages, absence of CSN limits hyper-reflexia. To further evaluate spasticity, we assessed the tail LLR in awake and fully paralyzed (end-stage) animals.<sup>22,29,31</sup> *Sod1* and *KO/Sod1* animals could be subdivided into spastic and nonspastic, but the relative proportions of each or intensity of the response to the stimulation were not significantly different between *Sod1* and *KO/Sod1* mice, suggesting that absence of CSN is not sufficient to prevent the manifestation of spasticity in



**FIGURE 4:** Absence of corticospinal neurons (CSN) partly prevents degeneration of the motoneuron (MN) cell bodies and neuromuscular junction (NMJ) dismantlement. (A–D) Representative their immunostaining images of the ventral horn of the lumbar spinal cord from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their age-matched *WT* and *KO* littermates labeled with GFAP (A), IBA1 (B), P62 (C), and choline acetyltransferase (ChAT; D). (E) Bar graph representing the average number of ventral ChAT<sup>+</sup> neurons per lumbar spinal cord hemi-section; 1-way ANOVA; n = 6 *WT*, n = 6 *KO*, n = 8 *Sod1*, and n = 10 *KO/Sod1*. (F) Representative maximum-intensity projection images of z-stacks of typically innervated, partly or fully denervated NMJs from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their age-matched *WT* and *KO* littermates. (G) Bar graph representing the average proportions of innervated (dark gray), partly denervated (medium gray) and fully denervated (light gray) NMJs for each genotype; 2-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test; n = 6 animals per genotype. \*\**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.01, \*\*\*\**p* < 0.001; NS, nonsignificant. Scale bars: 100µm in A–D; 20µm in F. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

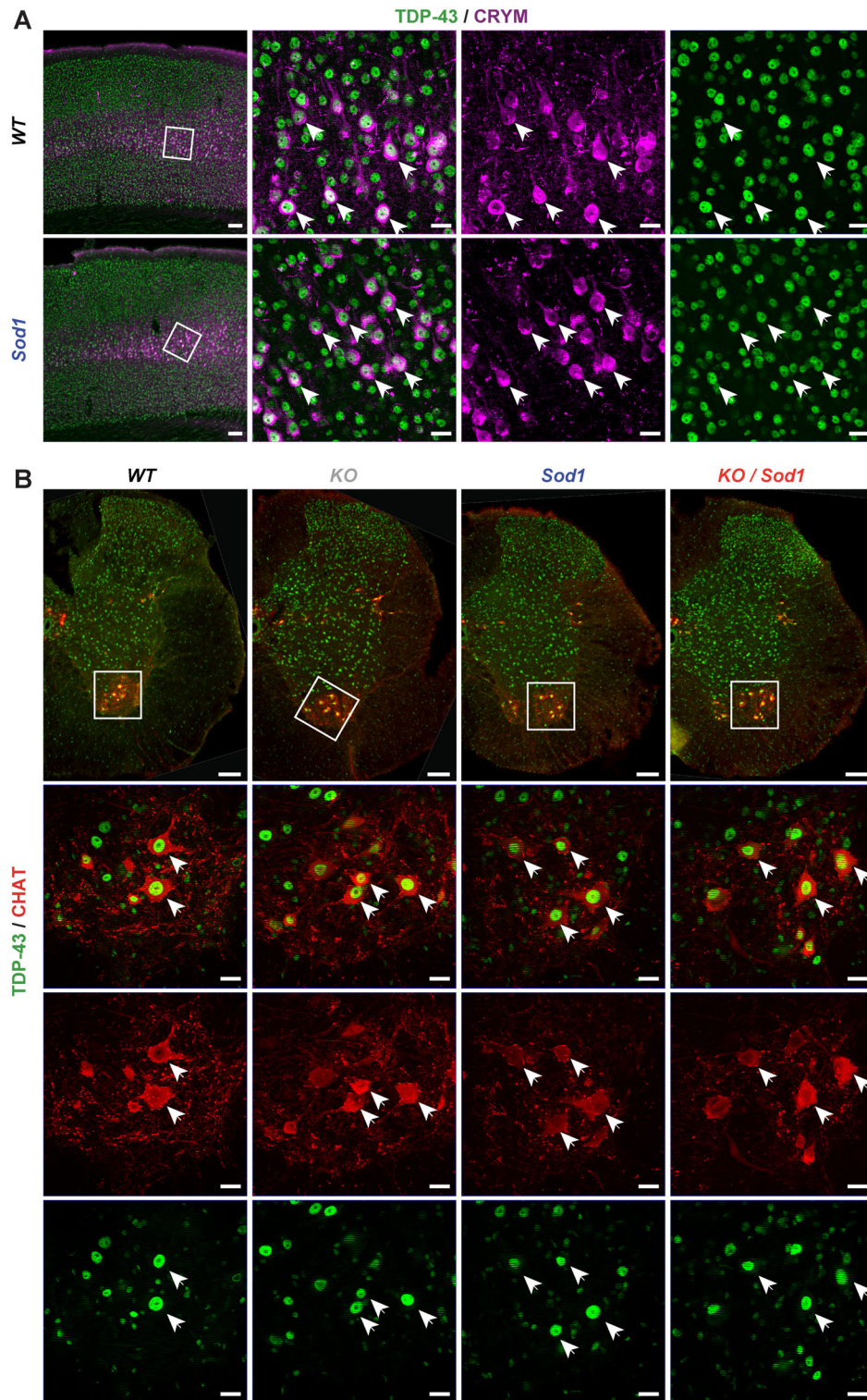


FIGURE 5: TDP-43 subcellular localization is not modified in the absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) or with the expression of *Sod1*<sup>G86R</sup>. (A) Representative images of coronal sections of the motor cortex of end-stage *Sod1* and age-matched *WT* mice, showing nuclear localization of TDP-43<sup>+</sup> (green) in CRYM<sup>+</sup> (purple) SubCerPN. (B) Representative images of lumbar spinal cord hemisections of *Sod1* and *KO/Sod1* mice at end-stage and their age-matched *WT* and *KO* littermates, showing nuclear TDP-43 (green) within ChAT<sup>+</sup> (red) motoneurons. *n* = 5 per genotype. Scale bar: 100 and 20 $\mu$ m in close-ups. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

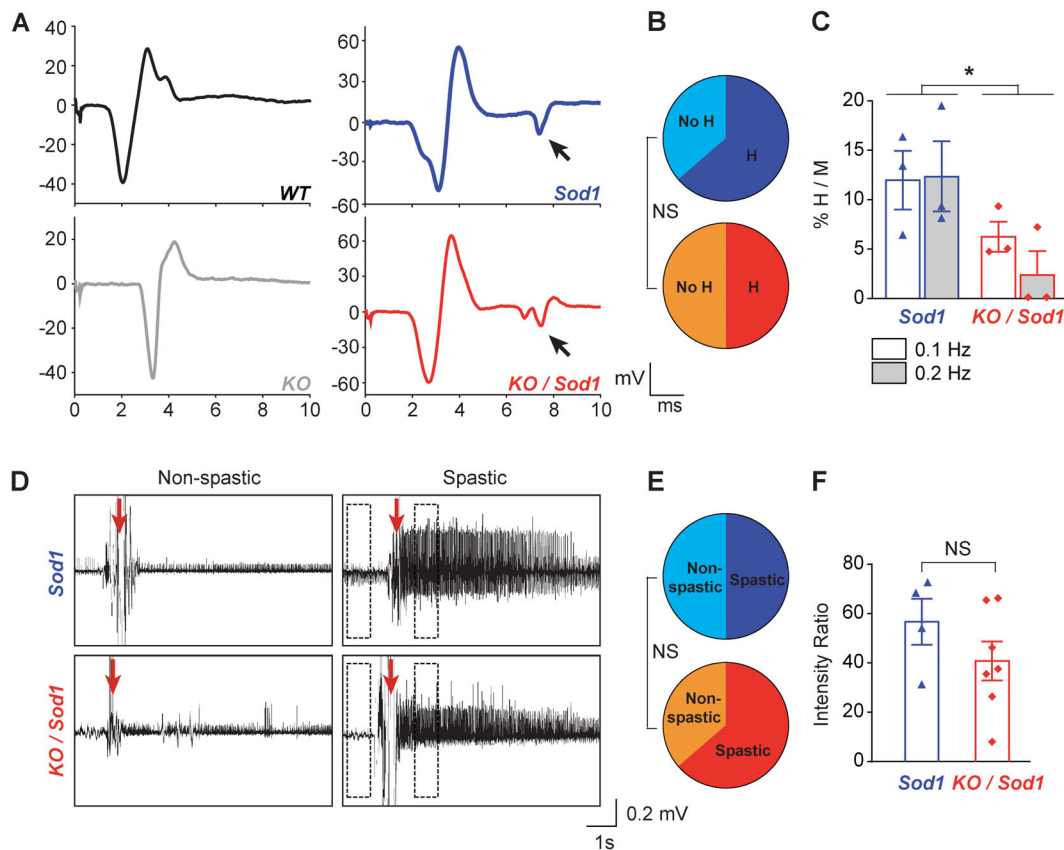
end-stage animals. Together, the data indicate that hyper-reflexia arises presymptomatically in *Sod1*<sup>G86R</sup> mice and that absence of CSN decreases this particular feature of spasticity. In contrast, spasticity assessed by LLR in end-stage *Sod1*<sup>G86R</sup> animals does not appear to be modulated by CSN. In addition to the absence or the gradual loss of CSN, other mechanisms might account for the occurrence of hyper-reflexia and spasticity in mice.

**End-Stage Spasticity is Correlated with Loss of Serotonergic Neurons and of Recurrent Inhibition onto MN**

Emergence of spasticity could arise from altered supraspinal controls, and more particularly serotonergic inputs, and from spinal network rearrangements.<sup>22,31–33</sup> We thus tested whether absence of SubCerPN could affect the population of TPH2<sup>+</sup> neurons present in the raphe

nuclei throughout the course of the disease in *Sod1* and *KO/Sod1* animals compared with controls (Fig 7). As reported,<sup>31</sup> end-stage *Sod1* mice displayed significant loss of TPH2<sup>+</sup> neurons compared with *WT*. Likewise, we observed significant loss of TPH2<sup>+</sup> neurons in end-stage *KO/Sod1* mice compared with *WT*, but no significant difference between *Sod1* and *KO/Sod1* animals. At younger ages, no significant difference could be detected across the different groups of mice. Together, the data indicate that absence of CSN and other SubCerPN does not affect survival of the serotonergic neurons and that occurrence of LLR in end-stage animals could, at least in part, result from the late loss of serotonergic neurons.

To determine whether absence of CSN could affect the populations of inhibitory spinal IN in *KO* and *KO/Sod1* animals compared with controls, we labeled and quantified parvalbumin- (PV), calretinin- (CR) and



**FIGURE 6: Absence of corticospinal neurons (CSN) minimizes presymptomatic hyper-reflexia but not end-stage spasticity. (A)** Representative electromyographic traces of the muscular response of the abductor digiti minimi muscle upon sciatic nerve stimulation. Arrows indicate H-reflex in presymptomatic *Sod1* and *KO/Sod1* mice; n = 6 *WT*, n = 6 *KO*, n = 8 *Sod1*, and n = 10 *KO/Sod1*. **(B)** Pie charts representing the percentage of animals with an H-reflex amongst *Sod1* (top) and *KO/Sod1* (bottom) animals; Fischer exact test. **(C)** Bar graph representing the averaged ratios of the amplitude of the H-reflex and M-wave upon repeated stimulations at 0.1 and 0.2Hz, in *Sod1* and *KO/Sod1* mice; n = 3 *Sod1* and n = 3 *KO/Sod1*; 2-way ANOVA. **(D)** Representative electromyographic recordings of the tail muscle upon stimulation of end-stage, fully paralyzed and awake *Sod1* mice. Spasticity-related tail long-lasting reflex (LLR; right panels) can be observed upon stimulation (red arrow) in subgroups of animals. **(E)** Pie charts representing the percentage with an LLR amongst *Sod1* (top) and *KO/Sod1* (bottom) animals; Fischer exact test; n = 8 *Sod1* and n = 11 *KO/Sod1*. **(F)** Signal-to-noise intensity ratios of the LLR calculated from measurements made in dotted boxes in D; Student unpaired t test; n = 4 *Sod1* and n = 7 *KO/Sod1*; \*p < 0.05. [Color figure can be viewed at www.annalsfneurology.org]

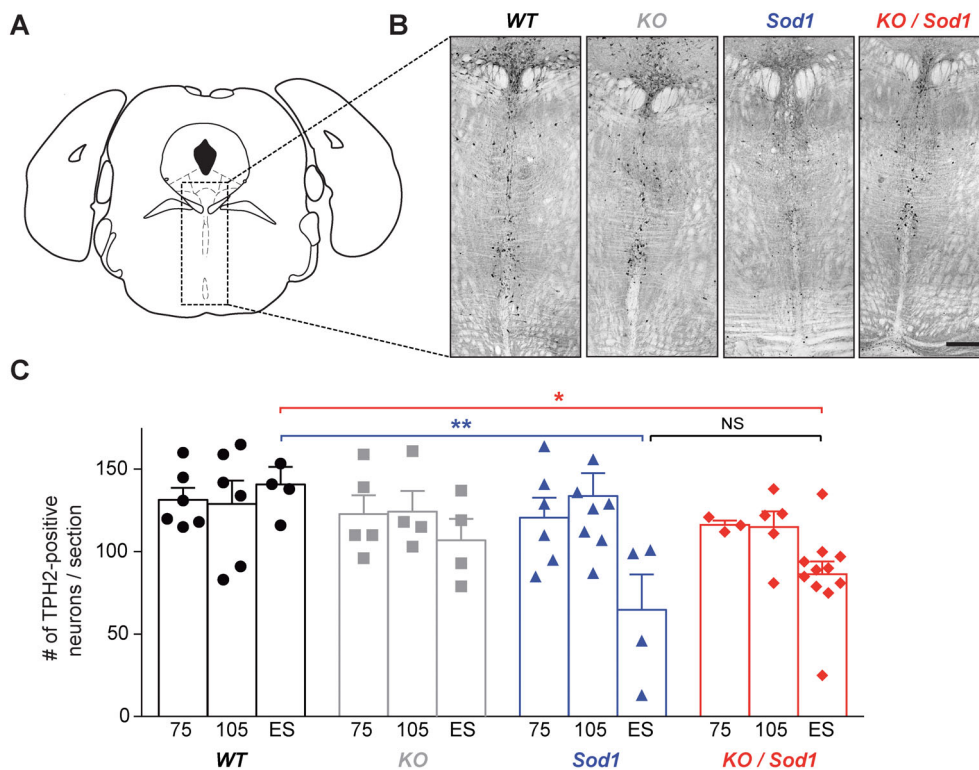
calbindin- (CB) positive IN present in the lumbar spinal cord of 105day-old and end-stage animals and their age-matched control littermates. The populations of PV<sup>+</sup> and CR<sup>+</sup> IN in laminae IV–IX were found to be unchanged across genotypes and ages (Fig 8A–D). In contrast, CB<sup>+</sup> IN present in the ventral horn of the spinal cord, which include the subpopulation of Renshaw cells that exert recurrent inhibition onto MN,<sup>34</sup> were decreased in end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* animals in comparison to their *WT* and *KO* littermates ( $p = 0.0110$  between *KO* and *KO/Sod1* and  $p = 0.0900$  between *WT* and *Sod1*; see Fig 8E,F). Overall, the results indicate that the absence of CSN does not modify the populations of spinal inhibitory IN and that *Sod1*<sup>G86R</sup> transgene expression leads to a late loss of CB<sup>+</sup> IN, which could account for spasticity at late stages of the disease.

## Discussion

In this study, we demonstrated that absence of SubCerPN delayed disease onset, extended survival, and improved clinical conditions of a mouse model of ALS, providing the first experimental arguments in favor of the corticofugal hypothesis.

## Contribution of the Cerebral Cortex and its Outputs to ALS

Although the origin of ALS remains debated,<sup>2</sup> evidence from neurophysiological and pathological studies conducted on patients<sup>4,5</sup> are nourishing a revival of interest in Charcot's initial view of ALS as a primary cortical impairment.<sup>3</sup> Whether disease propagation relies on altered neuronal excitability and subsequent excitotoxicity<sup>5</sup> or on prion-like propagation of misfolded proteins,<sup>7</sup> both schools of thought agree on a common cortical origin and propagation along the corticofugal tracts.<sup>4</sup> However, the hypothesis cannot be tested directly in patients. Although the corticomotoneuronal system has undergone major modifications with evolution,<sup>4</sup> corticothalamic and SubCerPN populations are remarkably well conserved between mice and humans, as opposed to the commissural and associative projection neuron populations.<sup>35</sup> Further support for the appropriateness of rodents to study the cortical contributions to ALS is provided by their ability to recapitulate CSN or SubCerPN degeneration.<sup>8</sup> In the *Sod1*<sup>G86R</sup> mouse model, CSN precedes MN degeneration and NMJ denervation.<sup>11</sup> Thus, rodent models and *Sod1*<sup>G86R</sup> mice in particular seem suitable to assess the contribution of SubCerPN to ALS.

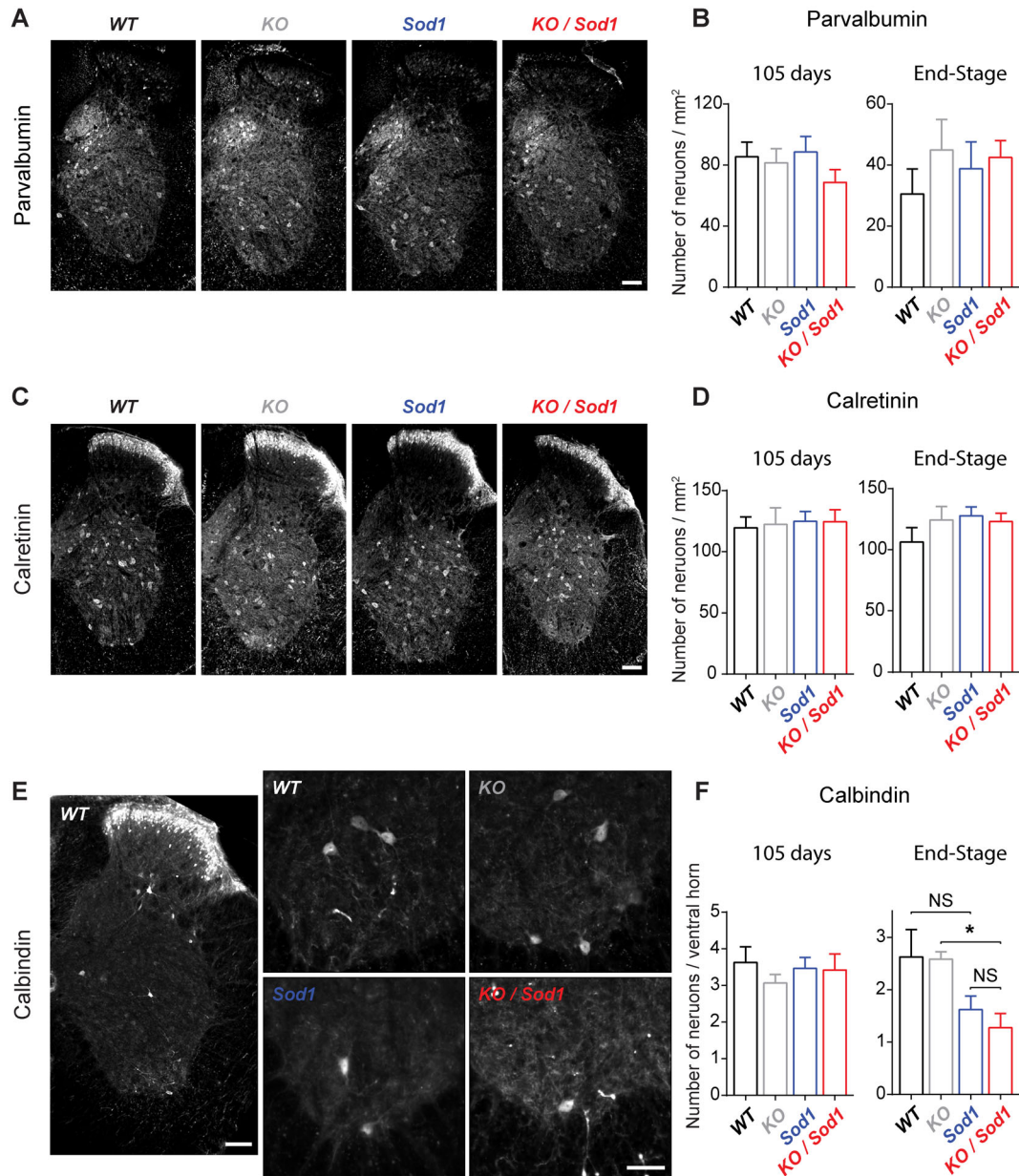


**FIGURE 7:** Absence of subcerebral projection neurons (SubCerPN) does not prevent the late loss of serotonergic neurons in the raphe nuclei. (A) Schematic diagram of the coronal section selected for TPH2<sup>+</sup> neuron labeling and counting. (B) Representative images of TPH2 immunoreactivity in the brainstem (dorsal and median raphe) of end-stage mice. (C) Bar graph representing the average number of TPH2<sup>+</sup> neurons, over time (75 and 105 days and end-stage [ES]), in WT (n = 6, 6, and 4, respectively), KO (n = 5, 4, and 4, respectively), *Sod1* (n = 6, 8, and 4, respectively), and *KO/Sod1* (n = 3, 5, and 11, respectively) mice; 2-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Scale bar: 300 $\mu$ m. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

### Absence of SubCerPN Delays Onset and Extends Survival without Increasing Disease Duration

Crossbreeding of *Sod1*<sup>G86R</sup> and *Fezf2*<sup>-/-</sup> mouse lines generated animals ubiquitously expressing *Sod1*<sup>G86R</sup> but lacking SubCerPN, including CSN, hence challenging the definition of ALS. Absence of SubCerPN delayed disease

onset and increased survival without modifying disease duration. The results are highly reminiscent of an elegant study by Thomsen and colleagues,<sup>36</sup> who knocked down *SOD1*<sup>G93A</sup> in the posterior motor cortex of transgenic rats using AAV9–SOD1–shRNA injections and reported delayed disease onset, extended survival and unchanged disease duration. The similarity of these and our results is



**FIGURE 8:** Population of Renshaw cells decreases in end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice. (A, C, E) Representative images of lumbar spinal cord hemi-sections from end-stage *Sod1* and *KO/Sod1* mice and their age-matched WT and KO littermates labeled with parvalbumin (A), calretinin (C), and calbindin (E) antibodies. (B, D) Bar graphs representing the average number of parvalbumin-positive (B) or calretinin-positive (D) inhibitory interneurons (IN) per square millimeter in laminae IV–IX of lumbar spinal cord of 105-day-old and end-stage animals. (F) Bar graph representing the average number of calbindin-positive IN in the ventral horn of lumbar spinal cord of 105-day-old and end-stage animals. For 105-day-old and end-stage WT ( $n = 6$  and  $5$ , respectively), KO ( $n = 4$  and  $6$ , respectively), *Sod1* ( $n = 7$  and  $7$ , respectively), and *KO/Sod1* ( $n = 6$  and  $11$ , respectively); 1-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test; \* $p < 0.05$ . Scale bars:  $100\mu\text{m}$  in A, C, and the left panel of E;  $50\mu\text{m}$  in the close-ups of E. [Color figure can be viewed at [www.annalsofneurology.org](http://www.annalsofneurology.org)]

remarkable given the differences in the approaches. Together, the two studies suggest that absence of diseased CSN or instead maintenance of genetically corrected CSN might be equally beneficial and that *Sod1/SOD1* mutant transgene-expressing CSN might be detrimental to their downstream targets. Yet, it is worth mentioning that AAV9 is likely to have targeted all types of cortical excitatory and inhibitory neurons, potentially contributing to correct cortical circuit dysfunctions such as those reported in *Sod1<sup>G93A</sup>* and *TDP-43<sup>A315T</sup>* mouse models of ALS.<sup>8</sup> Cell type-specific genetic ablation experiments could provide further information on the contribution of individual neuronal and glial populations to cortical circuit dysfunction and consequences for corticofugal targets. Such approaches allow better definition of the contributions of MN, microglia, astrocytes, and muscles to ALS onset and progression.<sup>37</sup> Together, these studies and ours indicate that the cerebral cortex and SubCerPN might be involved in disease onset, whereas MN and glia might modulate disease progression.

#### **Absence of CSN Improves Motor Performances and Minimizes MN Degeneration**

Although *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice lack CSN and other SubCerPN and display altered cortical development,<sup>13,14,17</sup> they remarkably do not present any major motor phenotype. In mice, CSN make mostly indirect or polysynaptic connections and few direct or monosynaptic connections onto MN.<sup>38</sup> It is possible that in *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice the majority of indirect connections are less affected, or better compensated, and the minority of direct connections are more affected but translate into a phenotype that is harder to reveal. In the *Celsr3/Emx1* mice, CST genetic ablation is correlated with increased numbers of rubrospinal and monoaminergic projections to the spinal cord.<sup>39</sup> Although the *Celsr3/Emx1* mice display proper locomotion, they show difficulties in fine motor tests.<sup>39</sup> In the present study, we found that *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice, although smaller and lighter than controls, performed less well on the inverted grid test, possibly owing to defects in proper grip to the grid. In addition, the sensitive CatWalk gait analysis device revealed decreased performances of *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice. Together, these data indicate that *Fezf2<sup>-/-</sup>* mice do present a discrete motor phenotype, which could possibly be further revealed by dedicated fine motor tests. Importantly, we found that absence of CSN and other SubCerPN improved the motor phenotype of the *Sod1<sup>G86R</sup>* mice and limited the denervation of the NMJ and ultimate loss of MN. This indicates that, although CSN might not be of great importance for locomotion in rodents, or their agenesis well compensated by other descending tracts, their presence in a context of ALS is

detrimental to their downstream MN targets, whether direct or indirect.

#### **Absence of CSN Limits Hyper-Reflexia**

Absence of SubCerPN in *Sod1<sup>G86R</sup>* mice ameliorated hyper-reflexia, a feature of the upper motoneuron syndrome.<sup>26</sup> The absence of H-reflex recording in *WT* animals does not rule out the existence of a small-amplitude H-reflex in these animals, below the detection threshold, as already observed.<sup>30</sup> In contrast, the presence of an H-reflex in subgroups of presymptomatic *Sod1* animals suggests that hyper-reflexia precedes the appearance of motor symptoms in these animals and is correlated with the presymptomatic degeneration of the CSN.<sup>11</sup> Absence of an H-reflex in *KO* animals suggests that developmental absence of CSN and other SubCerPN could have been compensated by other supraspinal controls or by spinal network rearrangements, or both. Finally, decreased H/M ratios in *KO/Sod1* compared with *Sod1* animals indicate decreased hyper-reflexia and possible mitigation of the upper motoneuron syndrome in the absence of CSN and other SubCerPN. In contrast, LLR of the tail muscle of fully paralyzed end-stage mice was neither prevented nor even slightly modulated by absence of SubCerPN. But given that evaluation of the LLR can be performed only in paralyzed animals, our study did not allow us to test whether spasticity could have arisen later in *KO/Sod1* than in *Sod1* mice. Supraspinal controls, and more particularly serotonergic inputs, and spinal network rearrangements could account for the emergence of spasticity.<sup>22,31-33</sup> We failed to detect any difference in TPH2<sup>+</sup> serotonergic neurons in the raphe nuclei and in PV<sup>+</sup>, CR<sup>+</sup>, and CB<sup>+</sup> inhibitory spinal IN at the time when presymptomatic hyper-reflexia was detected. However, an altered contribution of these neuronal populations to spinal circuits at this presymptomatic age could take the form of neuronal plasticity, which we did not test. At disease end-stage, we observed decreased amounts of serotonergic neurons in the raphe nuclei and of CB<sup>+</sup> IN in the ventral spinal cord of *Sod1* mice, in accordance with formerly published work,<sup>22,30,31,34</sup> and no difference between *Sod1* and *KO/Sod1* mice, suggesting that both mechanisms could account for the emergence of the LLR in these transgenic animals.

#### **Possible Propagation Mechanisms and Perspectives**

We demonstrated that absence of SubCerPN was beneficial in a mouse model of ALS, suggesting that major corticofugal projections might be detrimental to their downstream targets in the context of ALS. But whether corticofugal propagation of the disease relies on prion-like



transmission of misfolded proteins<sup>7</sup> or on altered neuronal excitability and subsequent excitotoxicity<sup>5</sup> remains an open question. As opposed to most ALS patients and like *SOD1* patients, *Sod1*<sup>G86R</sup> mice do not seem to present any TDP-43 pathology. However, they do present P62<sup>+</sup> aggregates, and the presence of misfolded proteins remains possible. Nevertheless, we did not observe any difference in P62 staining between *KO/Sod1* and *Sod1* animals that could be correlated with the extended survival of the double transgenic mice. In a recent study, we genetically ablated the *SOD1*<sup>G37R</sup> transgene from corticofugal projection neurons. This was sufficient to prevent CSN degeneration in a cell-autonomous manner but had no impact on disease onset and survival, ruling out a major contribution of misfolded protein propagation from the corticofugal neurons to their targets on disease occurrence and progression in this mouse model.<sup>40</sup> On the contrary, knock-down of the *SOD1*<sup>G93A</sup> mutant transgene in the posterior motor cortex of a rat model of ALS using AAV9 delayed disease onset and extended survival.<sup>36</sup> It is possible that this beneficial effect arose from targeting cortical IN that modulate the excitability and activity of corticofugal neurons.<sup>41</sup> Given the reported alterations in excitability of cortical neuron populations in different mouse models of the disease,<sup>8,42</sup> comparison between silencing and genetic ablation of adult corticofugal neurons would be particularly informative to gain a better understanding of the mechanism by which these neurons might contribute to disease onset and progression. Finally, deep molecular analysis of CSN dysfunction in ALS<sup>11</sup> might in the future provide a better understanding of the role of the cerebral cortex and its outputs to ALS and potentially unravel new therapeutic targets.

## Acknowledgment

The work has been supported by a European Research Council (ERC) starting grant (#639737), a Marie Skłodowska-Curie career integration grant (#618764), an “Association Française contre les Myopathies” (AFM)-Telethon trampoline grant (#16923), a “Fédération pour la Recherche sur le Cerveau” (FRC) grant, and a Neurex grant to C.R., PhD fellowships from the French Ministry of Research to T.B., C.B., and A.B., and from the “Association de Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique” (ARSLA) to C.B., and by a postdoctoral fellowship from the AFM-Telethon to J.C.Z. (#21993).

We are extremely thankful to Véronique Marchand-Pauvert, Pascal Branchereau, Pierre Veinante, and Luc Dupuis for critical reading of the manuscript and insightful comments.

## Author Contributions

T.B., C.B., M.C.-E., and C.R. contributed to the conception and design of the study; all authors contributed to the acquisition and analysis of the data; T.B., C.B., F.L., M.C.-E., and C.R. contributed to drafting the text and preparing the figures.

## Potential Conflicts of Interest

Nothing to report.

## References

1. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2017;377:162–172.
2. Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread. *Neurology* 2009;73:805–811.
3. Charcot JM. *Sclérose latérale amyotrophique: oeuvres complètes*. Paris: Bureaux du Progrès Medical, 1874.
4. Eisen A, Braak H, Del Tredici K, et al. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88:917–924.
5. Vucic S, Kiernan MC. Transcranial magnetic Stimulation for the assessment of neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 2017; 14:91–106.
6. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2013;74: 20–38.
7. Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis—a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol* 2013;9:708–714.
8. Brunet A, Stuart-Lopez G, Burg T, et al. Cortical circuit dysfunction as a potential driver of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Neurosci* 2020;14:363.
9. Mancinelli S, Lodato S. ScienceDirectDecoding neuronal diversity in the developing cerebral cortex: from single cells to functional networks. *Curr Opin Neurobiol* 2018;53:146–155.
10. Tomassy GS, Lodato S, Trayer-Gibson Z, Arlotta P. Development and regeneration of projection neuron subtypes of the cerebral cortex. *Sci Prog* 2010;93:151–169.
11. Marques C, Fischer M, Keime C, et al. Early alterations of RNA metabolism and splicing from adult corticospinal neurons in an ALS mouse model. *bioRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/667733>.
12. Zhang Q, Mao C, Jin J, et al. Side of limb-onset predicts laterality of gray matter loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–11.
13. Hirata T, Suda Y, Nakao K, et al. Zinc finger gene-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Dev Dyn* 2004;230:546–556.
14. Molyneaux BJ, Arlotta P, Hirata T, et al. Fez1 is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 2005;47: 817–831.
15. Rouaux C, Arlotta P. Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nat Cell Biol* 2013; 15:214–221.
16. Rouaux C, Arlotta P. Fezf2 directs the differentiation of corticofugal neurons from striatal progenitors in vivo. *Nat Neurosci* 2010;13: 1345–1347.

17. Lodato S, Rouaux C, Quast KB, et al. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* 2011;69:763–779.
18. Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, et al. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 1995;92:689–693.
19. Burg T, Bichara C, Scekcic-Zahirovic J, et al. Absence of subcerebral projection neurons delays disease onset and extends survival in a mouse model of ALS. *bioRxiv* 2019. <https://doi.org/10.1101/849935>.
20. Scekcic-Zahirovic J, Oussini El H, Mersmann S, et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2017;133:887–906.
21. Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, et al. Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 2007;27:5535–5545.
22. Oussini El H, Scekcic-Zahirovic J, Verduyck P, et al. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2017;82:444–456.
23. Lee S, Toda T, Kiyama H, Yamashita T. Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell Death Dis* 2014; e1007:1–9.
24. Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007;61:427–434.
25. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 2004.
26. Ivanhoe CB, Reistetter TA. Spasticity. *Am J Phys Med Rehabil* 2004; 83:S3–S9.
27. Ashworth NL, Satkunam LE, Deforge D. Treatment for spasticity in amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;2:CD004156.
28. Simon NG, Lin CSY, Lee M, et al. Segmental motoneuronal dysfunction is a feature of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 2015;126:828–836.
29. Bennett DJ, Gorassini M, Sanelli L, et al. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1999;16:69–84.
30. Modol L, Mancuso R, Ale A, et al. Differential effects on KCC2 expression and spasticity of ALS and traumatic injuries to motoneurons. *Front Cell Neurosci* 2014;8:7.
31. Dentel C, Palamiuc L, Henriques A, et al. Degeneration of serotonergic neurons in amyotrophic lateral sclerosis: a link to spasticity. *Brain* 2013;136:483–493.
32. Martin LJ, Chang Q. Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 2011;45:30–42.
33. Mukherjee A, Chakravarty A. Spasticity mechanisms – for the clinician. *Front Neurol* 2010;1:149.
34. Wootz H, FitzSimons-Kantamneni E, Larhammar M, et al. Alterations in the motor neuron-rensshaw cell circuit in the Sod1G93A mouse model. *J Comp Neurol* 2013;521:1449–1469.
35. Miller DJ, Bhaduri A, Sestan N, Kriegstein A. ScienceDirectShared and derived features of cellular diversity in the human cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 2019;56:117–124.
36. Thomsen GM, Gowing G, Latter J, et al. Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 2014;34:15587–15600.
37. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761–772.
38. D'Acunzo P, Badaloni A, Ferro M, et al. A conditional transgenic reporter of presynaptic terminals reveals novel features of the mouse corticospinal tract. *Front Neuroanat* 2014;7:1–12.
39. Han Q, Cao C, Ding Y, et al. Plasticity of motor network and function in the absence of corticospinal projection. *Exp Neurol* 2015;267: 194–208.
40. Scekcic-Zahirovic J, Fischer M, Lopez GS, et al. Genetic ablation of SOD1<sup>G37R</sup> selectively from corticofugal projection neurons protects corticospinal neurons from degeneration without affecting ALS onset and progression. *bioRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.01.09.900944>.
41. Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic interneurons in the Neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 2016;91:260–292.
42. Gunes ZI, Kan VWY, Ye XQ, Liebscher S. Exciting complexity: the role of motor circuit elements in ALS pathophysiology. *Front Neurosci* 2020;14:573.

### III. Publication projet « cholinergique »

Au cours de ma thèse, j'ai prêté main forte au Dr. Dhanasobhon lorsqu'il effectuait ses expériences de thèse, principalement en réalisant des séries de contrôles, notamment après son départ de l'institut. Son travail a donné lieu à un article en cours de soumission et à une publication sur Biorxiv.

(Dhanasobhon et al 2020, biorxiv)

**Abstract**

1 Endogenous acetylcholine (ACh) is an important modulator of nociceptive sensory processing in the  
2 spinal cord. An increased level of spinal ACh induces analgesia both in humans and rodents, while  
3 interfering with cholinergic signaling reveals the existence of a basal tone of spinal ACh modulating  
4 nociceptive responses in naïve animals. Whether this tone is still present in neuropathic animals is  
5 controversial, as well as, more generally, the plasticity undergone by the spinal endogenous  
6 cholinergic system. We have addressed these issues in mice through behavioral experiments,  
7 histology, in vitro and in vivo electrophysiology, in the cuff model of peripheral neuropathy. Our  
8 behavior experiments demonstrate the persistence, and even increased impact of the analgesic  
9 cholinergic tone acting through nicotinic receptors in cuff animals. The neuropathy does not affect  
10 the number of dorsal horn cholinergic neurons, proposed to be the source of spinal ACh, neither  
11 specifically the frequency of their synaptic inputs nor other electrophysiological properties. The  
12 alterations thus appear to be in the neurons receiving the cholinergic signaling, which is confirmed by  
13 the fact that subthreshold doses of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors in sham animals become  
14 anti-allodynic in cuff mice. Our results demonstrate that endogenous cholinergic signaling can be  
15 manipulated to relieve mechanical allodynia in animal models of peripheral neuropathy. Until now,  
16 AChE inhibitors have mainly been used in the clinics in situations of acute pain (parturition or post-  
17 operative). The fact that lower doses (thus with fewer side effects) could be efficient in chronic pain  
18 conditions opens new avenues for the treatment of neuropathic pain.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Enhanced analgesic cholinergic tone after neuropathy

Dhanasak Dhanasobhon<sup>1,2</sup>, Maria-Carmen Medrano<sup>1,2</sup>, Yunuen Moreno-Lopez<sup>1,2</sup>, Sehzat Kavraal<sup>1,2</sup>, Charlotte Bichara<sup>1,2</sup>, Rémy Schlichter<sup>1,2</sup>, Perrine Inquimbert<sup>1,2</sup>, Ipek Yalcin<sup>1,2</sup>, and Matilde Cordero-Erausquin<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, 67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>3</sup> University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), Strasbourg, France

Number of pages: 28

Number of figures: 8

Supplementary Digital Content: 1

\*Corresponding author: Matilde Cordero-Erausquin, PhD, HDR, CR1 CNRS

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives - CNRS UPR 3212

8 allée du Général Rouvillois, 67000 Strasbourg cedex, France

Tel: (+33) 3 88 45 66 60/ Fax: (+33) 3 88 60 16 64

e-mail : [cordero@unistra.fr](mailto:cordero@unistra.fr)

## 1. Introduction

1  
2 Endogenous acetylcholine (ACh) is an important modulator of nociceptive sensory processing in the  
3 spinal cord. Epidural administration of neostigmine, an acetylcholinesterase (AChE) inhibitor that  
4 induces an increase in ACh spinal level by preventing its degradation, produces pain relief for child  
5 birth and post-operation pain in clinics [12]. In rodents, local spinal injection of AChE inhibitors (by  
6 intrathecal injections, or i.t.) similarly produces analgesia to thermal or chemical noxious stimulation  
7 [7; 10; 18; 33; 36]. The analgesic effect of endogenous ACh is not only observed when its level is  
8 artificially increased (by AChE antagonists), but also with its physiological levels. Indeed, impairment  
9 of cholinergic signaling by locally antagonizing ACh receptors (nicotinic or muscarinic) or by knocking-  
10 down the  $\beta 2$  subunit of nAChRs induces hyperalgesia and/or allodynia in rodents [17; 49; 61; 66]. This  
11 suggests that a basal “tone” of spinal ACh modulates the nociceptive threshold.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 A dense plexus of cholinergic processes (composed of both dendrites and axons) lies in laminae (L)  
21 II-III of the dorsal horn (DH) of rodents [3; 31]. Within this plexus, cholinergic dendrites receive  
22 synaptic contacts from primary afferents, and cholinergic axons make presynaptic contacts onto them  
23 [39; 50], offering a potential substrate for sensory modulation. In rodents, sparse cholinergic neurons  
24 with extended ramification, are located in lamina III-IV and have been proposed to be the source of this  
25 plexus. They could therefore be responsible for cholinergic analgesia [31]. Interestingly, we have  
26 demonstrated that a similar cholinergic population exists in the dorsal horn of macaque monkeys, with  
27 comparable localization, density and most importantly, synaptology [42]. The behavioral and  
28 anatomical similarities have confirmed that mice are a valuable model to study cholinergic analgesia.  
29 But how this population of cholinergic interneurons ultimately impacts nociceptive behavior is still  
30 unknown.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 AChE inhibitors are used in the clinics only in a context of acute pain. Yet chronic pain is also a  
40 devastating and widespread problem, inadequately treated according to two-thirds of chronic pain  
41 sufferers [5]. How the endogenous spinal cholinergic control of analgesia evolves in situations of  
42 chronic pain in primate is unknown, and data on rodents are scarce and at times contradictory. While  
43 Rashid and Ueda have proposed that the cholinergic tone is disrupted in neuropathic animals as shown  
44 by the loss of effect of the i.t. injection of a nicotinic antagonist [49], i.t. injections of AChE antagonists  
45 still have an analgesic effect [20; 25; 26; 55] suggesting that ACh is still locally available to affect  
46 sensory processing. The dorsal horn of the spinal cord is a site for numerous forms of plasticity occurring  
47 during chronic pain [56], and it was recently demonstrated that synaptic inputs or intrinsic properties of  
48 several interneuronal populations are altered during the neuropathy [8; 21; 43; 44]. How the cholinergic  
49 population, and more generally the spinal cholinergic analgesia, is affected in chronic pain models  
50 remained to be evaluated and was the main goal of this study. Accordingly, we have combined  
51 behavioral, histological, *in vivo* and *in vitro* electrophysiological recordings to improve our  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

understanding of spinal cholinergic analgesia. We specifically addressed the question of its plasticity in conditions of chronic pain, and of potential underlying mechanisms.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 2. Material and methods

### 2.1 Animals

This study utilized male wild-type and transgenic CD1 and C57BL/6 mice between 3 – 10 weeks. Two different transgenic lines have been used: ChAT::EGFP CD1 [57] and  $\beta 2^*$ -nAChR knock-out (KO) C57BL/6J mice [45]. The animals were group-housed between two to six animals per cage and maintained on a 12-hour light/dark cycles with food and water provided *ad libitum*. The animal facility Chronobiotron UMS3415 is registered for animal experimentation under the Animal House Agreement B6748225. All protocols were approved by the “Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg” (CREMEAS, CEEA35) and the Ministère de l’enseignement supérieur, de la recherche et de l’innovation under the reference 02729.01.

### 2.2 Cuff surgery and behavioral assessment

The cuff model is used to induce neuropathic pain in mice [4]. The surgery was carried out under ketamine (1  $\mu$ l/g- Imalgene1000, Merial), azepromazin (0,60  $\mu$ l/g - Calmivet, Vetoquinol) and medetomidine (1,18  $\mu$ l/g - Domitor, Orion pharma/Elanco) anesthesia. The surgery was performed as previously described [62]. Briefly, a 2 mm section of split PE-20 polyethylene tubing (Harvard apparatus, Les Ulis, France) was placed around the right common branch of sciatic nerve in the cuff mice group. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure without cuff implantation. After performing the surgery, Atipamezol chlorhydrate (Antisedan, Orion pharma/Vetoquinol) mix (10  $\mu$ l/g of animal), an antidote to medetomidine, was provided to speed up the recovery from the anesthesia. After a one-week recovery period, the neuropathic phenotype was assessed with von Frey tests.

Intrathecal (i.t.) injections were performed under gaseous anesthesia (3% Isoflurane for induction and 2% for maintenance) as previously described [61]. We assessed the role of spinal cholinergic modulation on mechanical transmission in naïve and neuropathic CD1 mice with von Frey filaments [63]. Mice were habituated for 15 minutes in clear Plexiglas boxes (7cm x 9 cm x 7 cm) on an elevated mesh screen. Filaments of increasing diameter were slowly brought to the plantar surface of each hind paw and removed after a slight bent. The mechanical threshold is determined as the first filament inducing at least three withdrawals out of five consecutive trials. The results were expressed in grams. For naïve animals, the left and right paw data were averaged for each time point. The mice were tested prior to injection or surgery to establish the baselines. A minimum of three tests were performed over 3 to 7 days to determine the mechanical withdrawal threshold. Motor coordination was tested using a rotarod (Bioseb). Mice were trained on 2 consecutive days where they ran at constant speed of 8 and 16 rotations per minute (rpm) without falling for at least 60 secs. On the experimental day, the rod was programmed to accelerate from 0 to 40 rpm over 300 s. Each mouse was allowed three trials where the average rpm



1 and time at the point of failure was recorded to establish the baseline. Subsequently, mecamylamine was  
2 intrathecally injected and the mice were tested again 3 times starting after 15 min post-injection.  
3

### 4 2.3 In vitro electrophysiological recordings 5

6 In vitro patch-clamp recordings were performed from ChAT::EGFP CD1 mice, 7 to 24 days post-  
7 surgery (sham or cuff); the investigator was not blind to the group. The mice were anesthetized with a  
8 mix of i.p. ketamine (200mg/kg - Imalgene 1000, Merial) and xylazine (20 mg/kg - Rompun 2%, Bayer).  
9 The animals were transcardially perfused for approximately 3 minutes with ice-cold sucrose-based  
10 Artificial Cerebral Spinal Fluid (ACSF) composed of (in mM): 252 Sucrose, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>,  
11 10 Glucose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 kynurenic acid, continuously bubbled with carbogen (95%  
12 O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>). Two approaches were used to extract the spinal cord: hydraulic extrusion [9] or  
13 laminectomy [14]. A 200 to 300 µm horizontal slice (HS) was performed, containing the first four  
14 laminae of the DH. We also performed 350 to 400 µm thick transverse slices (TS). The slices were  
15 allowed a one-hour recovery period prior to recording at room temperature in oxygenated ACSF  
16 containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glucose, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 Cholinergic neurons were identified by the presence of the enhanced green fluorescent protein (EGFP)  
27 produced under the control of the cholineacetyltransferase (ChAT) promoter. Cells were recorded in the  
28 lumbar cord, in the area corresponding to termination of the sciatic nerve (end of L3 – L6 spinal  
29 segments). In HS, LIII/IV was identified by few ChAT::EGFP neurons located on the surface of the first  
30 slice (positioned upside-down). In TS, LIII/IV was identified as the laminae just ventral to the  
31 translucent substantia gelatinosa (LII), or ventral to the EGFP+ cholinergic plexus [31]. For voltage  
32 clamp experiments, a cesium (Cs) based intracellular solution was used (in mM): 80 Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 KCl, 2  
33 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Biocytin (pH = 7.3). The cells were maintained at -60 mV and 0 mV for  
34 excitatory and inhibitory post-synaptic currents respectively. For current clamp recordings, a K-based  
35 intracellular solution was used (in mM): 136 CH<sub>3</sub>KO<sub>3</sub>S, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Biocytin. For both  
36 intracellular solutions, the liquid junction potential was not corrected. The recordings were made  
37 through the Axopatch 200A (Axon instruments) or the Multiclamp 700A (Molecular devices). The  
38 current traces were filtered at 5 kHz before digitalization via a digitizer (BNC-2110, National  
39 Instruments) at 20 kHz. Data acquisition was performed using WinEDR and WinWCP softwares  
40 (Strathclyde Electrophysiology Software, John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 For voltage clamp, the synaptic events (recorded over a 5-minute period) were detected with the  
53 threshold search method with WinEDR software. The threshold was set, for miniature and spontaneous  
54 EPSCs, to absolute amplitudes  $\geq 2$  pA and a duration  $\geq 1.25$  ms. For miniature and spontaneous IPSCs,  
55 the thresholds were set to absolute amplitudes  $\geq 3$  pA and a duration  $\geq 1.75$  ms. A baseline track-time  
56 of 5 ms was implemented prior to each event. Following the automatic detection by the software, all  
57  
58  
59  
60  
61

1 captured events were inspected individually, and only events that possessed a quick rise followed by an  
2 exponential decay were kept. The absolute frequency is calculated as the number of events over the total  
3 duration of the recording. The peak amplitudes were measured for accepted events via semi-automated  
4 procedures in WinWCP. However, individual events were excluded if they contained overlapping events  
5 or had an unstable baseline. The frequency and amplitude of currents were analyzed over a 5-minute  
6 duration. For current clamp, the firing patterns were classified as previously reported [47].  
7  
8  
9

#### 10 2.4 In vivo electrophysiological recordings

11 In vivo electrophysiological recordings were performed from ChAT::EGFP CD1 mice, 8 to 21 days  
12 post-surgery (sham or cuff); the investigator was not blind to the group. The mice were anesthetized  
13 with urethane (2.5 g/ kg, i.p.) and the trachea was cannulated. Rectal temperature was continuously  
14 monitored, and the animal was maintained at 35.5°C using a heating pad (TC-1000; Bioseb). The mouse  
15 was placed in a stereotaxic and spinal frame with 2 clamps fixed on its vertebra to immobilize the  
16 vertebral column. A laminectomy was performed to expose L3-L5 segments of the spinal cord, and a  
17 small chamber (approximately 0.1 ml) was created with 2% agar around the exposed lumbar spinal cord.  
18 After removal of the dura, the spinal cord was covered with saline (NaCl 0.9%) or with drugs diluted in  
19 saline (see below).  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28  
29 Single-unit extracellular recordings from spinal dorsal horn neurons were performed as previously  
30 described [30]. Only neurons responding to mechanical stimulation of the ipsilateral hind paw were  
31 included in this study. Recordings were made with a glass electrode (Harvard Apparatus, Holliston,  
32 MA) filled with 0.5M CH<sub>3</sub>COOK (resistance: 15-25 mV). A motorized micromanipulator (Narishige,  
33 Tokyo, Japan) was used to gradually descend the electrode with 4-mm steps until the single-unit activity  
34 of a neuron was recorded. The recording electrode was inserted at depths  $\leq 500$   $\mu$ m from the surface of  
35 the spinal cord (corresponding to lamina I to V). The signal was amplified (IR-183; Cygnus Technology,  
36 Delaware Water Gap, PA), filtered at 0.3 to 3 kHz (Brownlee amplifier; AutoMate Scientific, Berkeley,  
37 CA), and digitized at 20 kHz with a MICRO3-1401 (CED, Cambridge, United Kingdom). Data were  
38 analyzed offline with Spike 2 software (CED). The cutaneous receptive field of the recorded neuron was  
39 identified by touching the ipsilateral hind paw. The response to a non-nociceptive mechanical stimulus,  
40 touch, and to a nociceptive one, pinch, was determined as described before [30]). The touch stimulus  
41 was applied by brushing the skin with a camel's hair brush for 10 seconds (8-10 times). The pinch  
42 stimulus was applied by means of small serrated forceps (Graefe forceps; Fine Scientific Tools,  
43 Vancouver, Canada) for 10 seconds.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 Mecamylamine hydrochloride (nicotinic receptor antagonist; Sigma (St. Louis, MO, USA)) was applied  
56 directly at the surface of the dorsal horn using the agar chamber described above. Stock solutions were  
57 first prepared in water at 100x their final concentration, stored at -20 °C and, on the day of the  
58  
59  
60  
61

1 experiment, diluted in saline to their final concentration. The drug was applied topically onto the  
2 recording site of the spinal cord after careful removal of saline of the pool. Ten minutes following drug  
3 application, the response of neurons to the mechanical stimuli was tested [30]. All solutions were applied  
4 at 34-35°C.  
5

## 6 7 8 2.5 Tissue fixing and staining 9

10 ChAT::EGFP mice were transcardially perfused under pentobarbital (Ceva Sante Animal, 54.7mg/ml,  
11 i.p. injection) with 0.1M phosphate buffer (PB, pH 7.4) followed by 4% Paraformaldehyde (PFA) in PB  
12 for 15 minutes. The lumbar part of the spinal cord was sliced in 40µm-thick transverse sections using a  
13 vibrating blade microtome (VT 1000S, Leica, Rueil-Malmaison, France), and serially collected in wells.  
14 The sections were washed three times with PBS and saturated with PBS/ 0.5% Triton X-100/ 5% donkey  
15 serum at room temperature for 45 minutes. The sections were incubated at room temperature overnight  
16 in PBS/ 0.5% Triton X-100/ 1% donkey serum with a goat polyclonal ChAT antibody (1:500 dilution,  
17 Chemicon Millipore, AB 144P). The goat polyclonal anti-ChAT antibody stains a single band of 68–70  
18 kDa apparent molecular weight on Western blot analysis of mouse brain lysate (manufacturer's technical  
19 information). The specificity of this antibody for the antigen has been determined by preadsorption with  
20 the appropriate purified protein as described by others [51], indicating that after preadsorption there was  
21 no staining. The staining pattern that we obtained was identical to that used in previous studies in the  
22 spinal dorsal horn by us and others [3; 31; 39; 42]. After three PBS washes, the slides were incubated  
23 with a CY3 anti-goat antibody (1:400 dilution, Jackson Immunoresearch) for 2 hr. The sections were  
24 finally washed three times with PBS and mounted with fluorescent mounting media (Dako, Les Ulis,  
25 France). Slides were examined under fluorescence using a microscope (Leica) and the 30 sections  
26 centered on the lumbar 4 / lumbar 5 border were identified [58]. From these 30 sections, we performed  
27 a systematic sampling by considering every second section (i.e. 15x 40µm-thick sections, located at 80  
28 µm intervals, centered at L4/L5): on both the contralateral and ipsilateral DH, we counted the number  
29 of EGFP+ neurons (indicating the expression of the ChAT::EGFP transgene), the number of CY3+  
30 neurons (indicating the binding of the anti-ChAT antibody), and checked whether these two  
31 fluorophores colocalized (the very low density of cholinergic neurons allows colocalization studies with  
32 an epifluorescence microscope) .  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

## 49 50 2.6 Statistics 51

52 The statistical analysis was performed with the statistical software R (version 3.4.1) in conjunction with  
53 Graphpad software (Prism 7 for Mac, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). For *in vitro*  
54 data, almost all statistical comparisons for frequency, amplitude and cell properties, considering the  
55 various dependent variables, were made with the ANOVA function. The original or transformed (log or  
56 inverse function) datasets were verified to show a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test).  
57 For post-hoc comparisons, interactions with only one or two variables were made with the Bonferroni  
58  
59  
60  
61

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

test with multi-comparison correction. A more complex 3x3x3 contingency table was performed online at <http://vassarstats.net> (Log-Linear Analysis for an AxBxC Contingency Table found under *Frequency data* tab) for firing pattern, rebound spike observations and rheobase. For *in vivo* and *in vitro* data passing requirements for parametric tests, statistical evaluation was carried out with repeated measures 2-way ANOVA. In addition, the depths for *in vivo* recordings were compared with unpaired t-test, and the number of labelled cell (histology data) with a 2-way ANOVA.

As the von Frey data is a discrete ordinal data, it did not pass the conditions to use parametric tests. For more than 2 time points, we thus analyzed it using the non-parametric test “nparLD”, provided as a plug-in by the statistical software R [37]. nparLD provides an ANOVA type multiple-factor analysis taking into account a longitudinal variable (time) along with multiple dependent (right vs left paw) and independent (surgery; drug treatment) variables. The Bonferroni test was also used for post-hoc multi-comparisons against saline. For the  $\beta 2$  KO mice, we used Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison. The rotarod experiments were statistically assessed using unpaired t-test.

The significance level was set at  $P < 0.05$  and data were expressed as mean  $\pm$  SEM for graphs.

### 3. Results

#### 3.1 Behavioral effect of cholinergic modulation onto mechanical responses

We first characterized the dose- dependent effect of spinal cholinergic modulation onto transmission of mechanical information in naïve CD1 mice. For this purpose, the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was evaluated with the von Frey test, before and after i.t. injection of the AChE inhibitor physostigmine. Physostigmine (15 nmol, i.t), produced a long-lasting increase in the mechanical withdrawal threshold while lower doses (1.5-7.5 nmol) were without effect (Fig. 1A; statistics are presented in the figure legends, and, when needed, first order comparisons are illustrated in the Supplemental Digital Content; here Suppl. Fig. 1 illustrates the first order drug concentration effect of i.t. Physostigmine on the Von Frey test). This indicates that ACh is endogenously released and its level in the spinal cord closely controlled by AChE. We thus confirm that, if its concentration is increased (by inhibiting its hydrolysis), ACh reaches downstream targets, activating a spinal circuit leading to analgesia.

In order to investigate whether this cholinergic analgesic mechanism is active in baseline physiological conditions, we interfered with it by blocking cholinergic nicotinic receptors. We thus injected the non-specific nicotinic antagonist mecamylamine (10-400 nmol, i.t.) and tested at different time points after the injection (Fig.1B). Mecamylamine induced a dose- and time-dependent reduction in the PWT: for all doses, the PWT was statistically reduced as soon as 15 min post-injection, and for all but the 10 nmol dose, the effect lasted for more than two hours. In the 15 min – 2 hours time window, there was no significant difference between the three higher doses (at each time point, 400 nmol or 100 nmol vs. 20 nmol :  $p>0.99$ , Bonferroni's multiple comparisons test) suggesting that the effect already plateaued with 20 nmol mecamylamine. 150 minutes after the injection, however, animal that had received 20 nmol of mecamylamine had a PWT statistically different from the one of animals that had received 100 or 400 nmol mecamylamine (20 nmol vs. 100 nmol,  $p=0.0007$  ; 20 nmol vs. 400 nmol,  $p=0.0001$ , Bonferroni's multiple comparisons test). Indeed, the allodynia evoked by 10 nmol mecamylamine had faded away after 150 minutes, while it was still present in the 20, 100 and 400 nmol injection groups (comparisons with saline presented in Fig. 1B). This suggests that the cholinergic analgesic mechanism is active in baseline physiological conditions, either because ACh is continuously released and activating downstream circuits, or because it is released as a consequence of the mechanical stimulation. Whatever the underlying cause, the pharmacological effect of a nicotinic antagonist defines the presence of an analgesic spinal cholinergic tone, acting via nicotinic receptors.

High concentrations of mecamylamine are known to have potentially non-specific effects [29; 38]. We used  $\beta 2$  nicotinic knock-out mice ( $\beta 2$  KO) to confirm that the highest dose of mecamylamine used (400 nmol) was acting specifically through inhibition of nAChR receptors (Supplemental Digital Content;

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Suppl. Fig. 2A illustrates that 400 nmol mecamlamine induces a marked reduction of the PWT in WT animals, but not on  $\beta 2$  KO mice ). Moreover, we observed that this high concentration of mecamlamine did not affect motor- coordination as evaluated by the rotarod test in naive mice (Supplemental Digital Content; Suppl. Fig. 2B illustrates the absence of effect of 400 nmol mecamlamine on the rotarod test), suggesting that the observed modulation strictly involved mechanical sensory processing.

### 3.2 The spinal cholinergic tone is present after neuropathy

We then investigated the alteration of this analgesic cholinergic tone in a mouse model of neuropathy. We used the cuff model and analyzed the effect of i.t. injection of mecamlamine (10-400 nmol) on the PWT of sham and cuff mice. For the ipsilateral, but not the contralateral, paw there was a significant interaction between Surgery, Time and Drug ( $p = 0.0354$ ), indicating that the neuropathy modified the response of the ipsilateral paw to mecamlamine.

Mecamlamine induced a dose-dependent reduction in the mechanical withdrawal threshold of the contralateral hindpaw in sham and cuff mice (Fig. 2A Top, in sham, for all doses of mecamlamine vs. saline at 15 min,  $p < 0.0001$  in post-hoc tests; in cuff, similar comparison yielded to  $p < 0.0001$  for the 20 nmol, 100 nmol and 400 nmol mecamlamine doses, and  $p = 0.0257$  for the 10 nmol dose, Bonferroni's multiple comparisons test). For the ipsilateral hindpaw, 10 and 20 nmol was ineffective in cuff as opposed to sham groups (Fig. 2A Bottom, post-hoc tests at 15 min, drug vs. saline:  $p = < 0.0001$  for 10 and 20 nmol mecamlamine in sham and respectively  $p > 0.99$  and  $p = 0.159$  in cuff; Bonferroni's multiple comparisons test). The mechanical allodynia observed in cuff animals was exacerbated when higher doses were injected (Fig. 2A; post-hoc tests at 15 min, in cuff mice: for 100 nmol mecamlamine vs. saline,  $p = 0,0017$  and for 400 nmol mecamlamine vs. saline,  $p < 0.0001$ ; Bonferroni's multiple comparisons test). Analysis of the dose-response curve demonstrates a shift to the right in cuff mice, with higher doses being necessary to obtain a significant effect (Fig. 2B; Ipsilateral side - Least square fit,  $p < 0.001$ ). Thus the spinal cholinergic tone is still present in cuff animals, involving nAChRs and affecting mechanical responses. The shift to the right of the mecamlamine dose-response curves further suggests that the cholinergic tone might be increased by the pathology, either because more ACh is released or because endogenous ACh has an increased effect on its post-synaptic targets. We next investigated these two possibilities.

### 3.3 Plasticity of LIII/IV cholinergic interneurons during neuropathy

Lamina III-IV cholinergic neurons are the most plausible source of the spinal cholinergic tone. We thus closely analyzed this population in sham and neuropathic mice to test the hypothesis that the release of ACh could be increased following the neuropathy. In particular, we assessed 3 different criteria: (1)

1 synaptic inputs, (2) active and passive electrophysiological properties, and (3) number of cholinergic  
2 interneurons.

### 3 4 3.3.1 Synaptic inputs to lamina II and lamina III-IV interneurons 5

6  
7 We then assessed whether DH cholinergic neurons could be differentially activated in sham vs. cuff by  
8 comparing the synaptic inputs received by these neurons in these two conditions. Cholinergic  
9 interneurons are located in lamina III-IV, and best preserved in horizontal sections [31]. However, we  
10 first performed a set of recordings of lamina II neurons in transverse slices, in order to put our results in  
11 context with the literature, mostly focusing on this layer. Indeed, while the cuff model of mouse  
12 peripheral neuropathy has been well described in behavioral terms [4; 60], we were the first to analyze  
13 the plasticity occurring in the spinal cord with electrophysiology *in vivo* [30] and now *in vitro*.  
14 Recordings were performed in the ipsilateral (to cuff insertion) DH in the presence of 0.5  $\mu$ M TTX (Fig.  
15 3A). The frequency of miniature IPSCs was lower in cuff mice compared to sham controls, whereas the  
16 frequency of miniature EPSCs was unchanged (Fig. 3B). The amplitude for miniature currents (either  
17 EPSC or IPSCs) were similar for sham and cuff mice (Fig. 3B). Thus only the frequency of mIPSCs is  
18 modified in lamina II neurons in cuff animals, similarly to what is observed in the spared nerve or  
19 chronic constriction injury models [23; 34].  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29  
30 We then moved to lamina III-IV and to horizontal slices to record spontaneous and miniature EPSCs  
31 and IPSCs from ChAT::EGFP and non-EGFP (unidentified) neurons in their close vicinity in sham and  
32 cuff mice (Fig. 4A). For EPSCs, there were no significant difference between the groups. For IPSCs,  
33 there was on average more inhibition in cuff vs. sham mice (not specific to any neuronal population  
34 under study, or to any type of current, spontaneous vs. miniatures), and cholinergic neurons had on  
35 average less inhibitory inputs than non-cholinergic ones (whether in sham or in cuff mice) (see Suppl.  
36 Fig. 3, Supplemental Digital Content, which illustrates the effect of first order factors on the frequency  
37 of synaptic currents). There was therefore no change of inputs frequency that was specific to cholinergic  
38 neurons after neuropathy (Fig. 4B). We compared with a similar approach the amplitude of miniature  
39 EPSC and IPSC in the different neurons and animals, and observed no significant difference between  
40 groups (Fig. 4C).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49  
50 These recordings reveal an increase in the frequency of inhibitory inputs that is not specific to lamina  
51 III-IV cholinergic neurons as it is also observed in non-EGFP neurons in the same laminae, while lamina  
52 II neurons experience a decrease of the frequency of IPSCs. The increased frequency of inhibitory  
53 currents would argue, if anything, that cholinergic neurons are less prone to firing (and releasing ACh)  
54 in neuropathic conditions. In order to test this hypothesis, we next compared the capacity of cholinergic  
55 neurons to be excited by direct depolarization in sham vs. cuff mice.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62

### 3.3.2 *Active and passive electrophysiological properties*

1  
2 We analyzed the firing patterns of recorded neurons after injection of depolarizing currents, and  
3 classified their discharge profiles as either “tonic”, “single-spike”, or “phasic” (cf. Methods, Fig.  
4 5A1). There was no statistical difference between ChAT::EGFP and non-EGFP neurons concerning the  
5 proportion of the different firing patterns in the two different animal groups (Fig. 5B). A fraction of  
6 recorded neurons presented spontaneous ongoing firing at rest (rheobase of 0pA, Fig. 5C) but their  
7 proportion was not different between types of neurons (ChAT::EGFP vs. non-EGFP) or type of surgery  
8 (sham vs. cuff) (3x3x3 contingency table,  $p = 0.2674$ ). Specifically, 2 out of 6 ChAT::EGFP neurons  
9 (33.3%) were spontaneously active in sham mice, but none out of 8 (0%) in cuff, while 1 out of 7 non-  
10 ChAT neurons (14.2%) was spontaneously active in sham mice vs. 2 out 6 (33.3%) in cuff mice. There  
11 also was no statistical difference in the rheobase in the different groups (Fig. 5C). We compared the  
12 input-output properties of the different neurons (measured as mean instantaneous firing frequency  
13 induced by an increasing depolarizing current, Fig. 5D). On average, there was no effect of the surgery  
14 on the instantaneous firing frequencies, but there was an effect of the intensity of the injected current,  
15 as well as of the type of neurons: ChAT::EGFP vs. non-EGFP neurons (see Suppl. Fig. 4, Supplemental  
16 Digital Content, which illustrates the effect of first order factors on the mean instantaneous frequencies  
17 of spikes induced by current injections) . Moreover, there was an interaction between the response to  
18 different injected currents and the type of neurons, as non-EGFP neurons fired more than ChAT::EGFP  
19 neurons when large currents were injected (120 to 180 pA). There was no interaction of these factors  
20 with the surgery, suggesting that the input-output properties of the neurons were not affected by the  
21 surgery. We also investigated the passive membrane properties of recorded neurons. There was no  
22 difference among groups (ChAT::EGFP or non-EGFP neurons, sham or cuff) in the resting potential  
23 (Fig. 5C), the input resistance (Fig 5C) or the amplitude of a sag current (Fig. 5A2, 5E).

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40 Altogether, these measures indicate that the network plasticity observed in slices obtained from cuff  
41 mice does not alter the excitability of cholinergic neurons.

### 3.3.3 *Number of cholinergic interneurons*

42  
43  
44  
45  
46  
47 There is an on-going debate on whether there is a loss of neurons in the DH that would contribute to the  
48 development of hyperalgesia or allodynia following neuropathy. Therefore, we investigated whether  
49 DH cholinergic interneurons were affected. We have previously shown that ChAT::EGFP mice are a  
50 good model for studying DH cholinergic neurons [31]. Here, we took every second section from L4 –  
51 L5 spinal segments into account, and confirmed that all lamina III-IV EGFP+ are ChAT immunoreactive  
52 ( $n=62$  neurons in 2 sham mice and  $n=56$  neurons in 2 cuff mice); similarly, we could observe EGFP  
53 fluorescence in the vast majority of DH ChAT immunoreactive neurons (62 out of 63 neurons in 2 sham  
54 mice and 56 out of 56 neurons in 2 cuff mice). We compared the number of EGFP+ neurons in the



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

contralateral and ipsilateral DH of adult ChAT::EGFP+ mice two weeks after surgery (Fig. 6). On the ipsilateral dorsal horn, there was no statistical difference between the number of ChAT::EGFP+ neurons per 40  $\mu\text{m}$  thick sections in sham (on average  $2.13 \pm 0.38$  neurons) vs. cuff ( $2.07 \pm 0.38$  neurons). This ruled out a change in the number of DH cholinergic neurons after neuropathy.

### 3.4 Changes in the downstream network responding to the cholinergic tone

As we found no evidence of specific increased excitation or excitability of DH cholinergic neurons in neuropathic animals, nor a change in neuronal density, we next asked whether the increased impact of the cholinergic tone in these animals could be explained by modifications in direct or indirect targets of cholinergic neurons, i.e. downstream of the tone itself. The cholinergic tone has never yet been described in *in vivo* electrophysiological recordings, nor its consequences on the response of DH neurons to tactile stimulation. We thus first studied these aspects by recording DH neurons *in vivo* in sham and cuff animals to identify a potential substrate to the antinociceptive cholinergic tone and its plasticity, and then turned to pharmacological behavioral experiments.

#### 3.4.1 A neuronal substrate for the antinociceptive cholinergic tone

We performed *in vivo* electrophysiological recordings of lumbar DH neurons in sham and neuropathic animals within the second and third week after surgery. Neurons were selected for their localization in the DH (Fig. 7A) and their response to mechanical stimulation of the hindpaw, either non-nociceptive (touch) and/or nociceptive (pinch) (see methods and [30]). Local application of 100  $\mu\text{M}$  mecamylamine (on the spinal cord) induced an increased response to mechanical stimulation in neurons recorded from both sham and cuff mice (Fig. 7B). The recorded neurons spanned many DH laminae (Fig. 7A) and the response amplitudes showed high variability, precluding the identification of a potential differential effect of mecamylamine in sham vs. cuff mice. These recordings however demonstrate for the first time *in vivo* the presence of a spinal cholinergic tone, acting through nicotinic receptors, attenuating mechanical responses. This could be a substrate for the antinociceptive spinal cholinergic tone observed in behavioral experiments.

#### 3.4.2 Effect of an AChE inhibitor in neuropathic animals

In order to evaluate a potential change of the network downstream of the cholinergic tone, we turned back to behavioral experiments and compared the effect of endogenous spinal ACh in sham and cuff mice by i.t. injection an AChE inhibitor. Physostigmine effect on the contralateral paw was not affected by the surgery (Fig. 8A). For the ipsilateral paw in contrast, the surgery modified the response to physostigmine: in neuropathic mice, 7.5 nmol physostigmine injected i.t. was able to alleviate the mechanical allodynia of the ipsilateral paw while it was ineffective to increase PWT in sham animals (Fig. 8A, at 15 min: 7.5 nmol physostigmine vs. saline  $p < 0.0001$  in cuff and  $p > 0.99$  in sham;

Bonferroni's multiple comparisons test). The 15 nmol dose however was analgesic for both paws in both sham and cuff mice (Fig. 8A, 15 min: drug vs. saline  $p < 0.0001$  for both sham and cuff; Bonferroni's multiple comparisons test). The dose response curve demonstrates that physostigmine differentially affected the relative mechanical response in the ipsilateral (but not contralateral) paw of cuff vs. sham (Fig. 8B). This favors the hypothesis of a post-synaptic plasticity affecting the downstream players of cholinergic transmission (i.e. post-synaptic receptors).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

#### 4. Discussion

1  
2 In this study, we performed an in depth analysis of the antinociceptive spinal cholinergic tone. We  
3 demonstrated the persistence and even increased impact of this tone in a model of neuropathic pain,  
4 and ruled out changes in lamina III-IV cholinergic neurons as a source of this plasticity. Instead, our  
5 data show an increase in the sensitivity of downstream targets to spinal ACh. Low doses of AChE  
6 inhibitors, without any effect in control mice, are analgesics in cuff mice which may open new  
7 avenues for therapeutical relief of neuropathic pain conditions.  
8  
9

10  
11  
12 The existence of a “spinal cholinergic tone” has been proposed in the early 1990’s and confirmed since  
13 then [48; 49; 66] to describe an endogenous mechanism whose presence is revealed by a  
14 pharmacological effect of cholinergic antagonists. Although the term is reminiscent of the word “tonic”,  
15 it gives no inference on the way ACh is released: either repetitively (through the “tonic firing” of a  
16 cholinergic neuron), or phasically (upon a specific stimulation, e.g. nociceptive stimulation [13]). We  
17 here similarly define the “cholinergic tone” through the allodynic effect of i.t. mecamylamine injection,  
18 suggesting that in basal conditions ACh has an ongoing (or provoked) analgesic effect.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 The cuff, a neuropathic pain model chosen for this study, was originally developed for rats [35] and then  
27 adapted for mice [4]. In a previous study, we characterized by *in vivo* recordings the loss of inhibitory  
28 tone in the spinal DH in this model [30]. We provide here for the first time *in vitro* recordings in the  
29 spinal cord of these mice and observed a reduction in the frequency, but not amplitude, of miniature  
30 GABA-A currents in lamina II similar to that reported in the spared nerve injury (SNI) and chronic  
31 constriction injury (CCI) models [23; 34]. However, we observed no change in the frequency for  
32 mEPSCs while a reduction is reported in a study focusing on GABAergic interneurons in the CCI model  
33 [27]. Whether this difference is due to a difference in the model, or to the fact that the Leitner et al. study  
34 focuses only on GABAergic neurons remains to be established. Importantly, all of our experiments were  
35 conducted from the first up to the third week after cuff surgery, a time window where the allodynia  
36 phenotype is robustly established but where anxiodepressive-like behaviors are not yet present [4; 60].  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 A previous study exploring the plasticity of the spinal cholinergic tone used the partial ligation of the  
47 sciatic nerve model, and analyzed the thermal paw withdrawal [49]. They showed that i.t. injection of  
48 10 nmol mecamylamine had no effect in the injured mice, but higher doses were not tested. In the von  
49 Frey mechanical test, we similarly found that 10 nmol mecamylamine was without effect but higher  
50 doses exacerbated the allodynia, demonstrating a shift to the right of the dose-response curve of the  
51 antagonist. Therefore, rather than a loss of cholinergic tone, our results suggest that its impact is  
52 actually increased by the neuropathy.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 We also investigated the possible sources of this plasticity. Our previous studies concluded that spinal  
2 lamina III-IV cholinergic neurons were the main source of ACh at this level and that their morphology  
3 and projections were well suited to impact nociceptive processing, both in rodents and in primates [31;  
4 42]. These cholinergic interneurons are also GABAergic [31; 32], and the existence of GABAergic cell  
5 death after peripheral neuropathy and its contribution to mechanical allodynia has been proposed  
6 although controversially debated [22; 46; 54]. We [31] found no difference in the number of  
7 ChAT::EGFP neurons following neuropathy. Other morphological alterations could exist, such as a  
8 reduction in the number of appositions onto post-synaptic targets, as demonstrated for parvalbumin (PV)  
9 interneurons [44]. The decreased innervation of PV neurons onto PKC-gamma neurons induces a  
10 decreased feed-forward inhibition that ‘gates’ the transmission of non-noxious information into  
11 nociceptive circuits, and is proposed to be a substrate of mechanical allodynia [44]; numerous studies  
12 illustrate the synaptic plasticity occurring in this feed-forward network [1; 2; 8; 15; 21; 28; 43], but the  
13 position of cholinergic neurons with respect to this network is yet unknown [11]. In the cuff model, we  
14 observed a decrease in inhibition in lamina II neurons, some of which could be inhibitory neurons  
15 projecting to deeper laminae [52]. Their disinhibition could thus explain the increased frequency of  
16 inhibitory currents observed in laminae III-IV. This however does not translate into decreased  
17 excitability, indicating that the release of ACh might not be significantly impaired. Membrane properties  
18 of these neurons were unchanged in neuropathic animals, similarly to what has been reported for LIII  
19 (GAD67 or not) or LII GABAergic neurons [16; 53]. Thus changes in membrane excitability or altered  
20 firing patterns in the spinal cord dorsal horn are unlikely causes for the alterations underlying  
21 neuropathic pain or for the observed plasticity of the cholinergic tone.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 We then explored downstream mechanisms, i.e. cholinergic responsive elements of the spinal nociceptive  
37 network. Rat cervical projection neurons were known to have an increased response to mechanical  
38 stimulation after topical application of an AChE inhibitor [6]. Using similar *in vivo* recordings in mice,  
39 but on unidentified DH neurons, our study illustrates that a nicotinic antagonist has the opposite effect,  
40 demonstrating for the first time a potential substrate of the analgesic cholinergic tone *in vivo*. Our  
41 recordings also show that this tone is still present after cuff injury, but reveal no alteration after  
42 neuropathy.  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 To finally identify the plasticity that could explain the increased impact of the cholinergic tone in cuff  
50 mice, we analyzed the analgesic properties of increasing i.t. doses of an AChE inhibitor, physostigmine,  
51 with the von Frey test. These experiments demonstrated a shift to the left of the dose response curve of  
52 this drug since doses that were subthreshold in sham mice returned the PWT in the cuff to pre-surgery  
53 levels. This is reminiscent of data obtained in the rat after systemic (i.p.) injection of another AChE  
54 antagonist in the spared nerve injury model [24]. Similar observations of subthreshold (in naïve animals)  
55 intrathecal doses of AChE antagonist being anti-hyperalgesic after SNL are reported for the thermal  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 sensory modality in mice [10; 36; 55]. Interestingly, nicotinic agonists also have analgesic properties  
2 after i.t. injection in the PNL mouse model, both in mechanical and thermal tests, at doses (10 nmol  
3 nicotine, 0.3 nmol epibatidine) inefficient in sham mice [49]. This, together with our results, strongly  
4 suggests that major changes occur at the receptor level, either in density or in composition. Alterations  
5 in the expression of nAChRs subunits ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  and  $\beta 2$ ) have indeed been reported in neuropathic  
6 conditions, either in mice or rats [59; 64]. A specific study of alterations of nAChRs on the DH targets  
7 of cholinergic neurons should help elucidate the changes occurring in the mouse cuff model and possibly  
8 explaining the plasticity of the cholinergic tone.  
9

10  
11  
12  
13  
14 In this study, we have focused on the spinal nicotinic tone because we have revealed the cholinergic  
15 tone through antagonization of nAChRs by mecamylamine. Other antagonists targeting more  
16 specifically [40]  $\alpha 4\beta 2$  or  $\alpha 3\beta 2^*/\alpha 6\beta 2^*$  nAChRs have been shown to have a similar effect in mice or  
17 rats [48; 49; 61; 65]. In addition, the allodynic effect of nicotinic antagonists is lost in nAChR  $\beta 2$  knock-  
18 out mice (this study and [61]), further confirming the involvement of  $\beta 2$ -containing nAChRs. In  
19 contrast,  $\alpha 7^*$  nAChRs do not seem to be involved in the cholinergic tone in mice [48; 49; 61]. However,  
20 it should be noted that the increased ACh level induced by AChE inhibition could act both on nicotinic  
21 and muscarinic post-synaptic receptors. In naïve rats, the analgesic effect of neostigmine on thermal  
22 responses has been shown to be mediated by muscarinic receptors in males but muscarinic and nicotinic  
23 receptors in females [10; 26]. However muscarinic antagonists had no effect on von Frey responses  
24 when injected i.t. in naïve mice [19 ; 41], suggesting that there might be species or sensory modality  
25 differences.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 In this study, we have demonstrated that the spinal cholinergic tone modulating nociceptive responses  
37 was still present, and even more efficient, after peripheral nerve injury. Our data do not support a change  
38 in the number or electrophysiological properties of dorsal horn cholinergic interneurons, but rather favor  
39 a modification occurring at the post-synaptic site. Overall, the increased analgesic effect of i.t. AChE  
40 antagonists in neuropathic conditions is promising. Until now, AChE inhibitors have mainly been used  
41 in the clinics in situations of acute pain (parturition or post-operative [12]). The fact that lower doses  
42 (thus with fewer side effects) could be efficient in chronic pain conditions opens new avenues for the  
43 treatment of neuropathic pain.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Acknowledgements:**

We gratefully acknowledge the support from the University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) and ANR- 13-JSV4-0003-01 GRANT to MCE. DD is the recipient of a Region Alsace doctoral fellowship, YML of a Fondation pour la Recherche Médicale post-doctoral fellowship, and SK was supported by the NeuroTime Erasmus Mundus Joint Doctorate Neuroscience PhD program (funded by the European Commission), and CB a recipient of a fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. The authors express their gratitude towards J.L. Rodeau for his expert assistance on the statistical approaches, Philippe Isope and Yves De Koninck for critical readings; and Sophie Reibel-Foisset and the Chronobiotron (UMS 3415, Centre National de la Recherche Scientifique) for mice handling.

**Conflict of Interest:**

The authors have no conflicts of interest to declare.

## References:

- [1] Abraira VE, Kuehn ED, Chirila AM, Springel MW, Toliver AA, Zimmerman AL, Orefice LL, Boyle KA, Bai L, Song BJ, Bashista KA, O'Neill TG, Zhuo J, Tsan C, Hoynoski J, Rutlin M, Kus L, Niederkofler V, Watanabe M, Dymecki SM, Nelson SB, Heintz N, Hughes DI, Ginty DD. The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 2017;168(1-2):295-310 e219.
- [2] Alba-Delgado C, El Khoueiry C, Peirs C, Dallel R, Artola A, Antri M. Subpopulations of PKCgamma interneurons within the medullary dorsal horn revealed by electrophysiologic and morphologic approach. *Pain* 2015;156(9):1714-1728.
- [3] Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology* 1984;229(3):329-346.
- [4] Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M. Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* 2008;12(5):591-599.
- [5] Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 2006;10(4):287-333.
- [6] Chen SR, Pan HL. Activation of muscarinic receptors inhibits spinal dorsal horn projection neurons: role of GABAB receptors. *Neuroscience* 2004;125(1):141-148.
- [7] Chen SR, Pan HL. Spinal GABAB receptors mediate antinociceptive actions of cholinergic agents in normal and diabetic rats. *Brain Res* 2003;965(1-2):67-74.
- [8] Cheng L, Duan B, Huang T, Zhang Y, Chen Y, Britz O, Garcia-Campmany L, Ren X, Vong L, Lowell BB, Goulding M, Wang Y, Ma Q. Identification of spinal circuits involved in touch-evoked dynamic mechanical pain. *Nat Neurosci* 2017;20(6):804-814.
- [9] Chery N, De Koninck Y. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1999;19(17):7342-7355.
- [10] Chiari A, Tobin JR, Pan HL, Hood DD, Eisenach JC. Sex differences in cholinergic analgesia I: a supplemental nicotinic mechanism in normal females. *Anesthesiology* 1999;91(5):1447-1454.
- [11] Cordero-Erausquin M, Inquimbert P, Schlichter R, Hugel S. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuroscience* 2016:S0306-4522(0316)30421-30423.
- [12] Eisenach JC. Epidural neostigmine: will it replace lipid soluble opioids for postoperative and labor analgesia? *Anesth Analg* 2009;109(2):293-295.
- [13] Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *Anesth Analg* 1996;82(3):621-626.
- [14] Flynn JR, Brichta AM, Galea MP, Callister RJ, Graham BA. A horizontal slice preparation for examining the functional connectivity of dorsal column fibres in mouse spinal cord. *J Neurosci Methods* 2011;200(2):113-120.
- [15] Foster E, Wildner H, Tudeau L, Haueter S, Ralvenius WT, Jegen M, Johannssen H, Hosli L, Haenraets K, Ghanem A, Conzelmann KK, Bosl M, Zeilhofer HU. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* 2015;85(6):1289-1304.
- [16] Gassner M, Leitner J, Gruber-Schoffnegger D, Forsthuber L, Sandkuhler J. Properties of spinal lamina III GABAergic neurons in naive and in neuropathic mice. *Eur J Pain* 2013;17(8):1168-1179.
- [17] Hama A, Menzaghi F. Antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury. *Brain Res* 2001;888(1):102-106.

- 1 [18] Hartvig P, Gillberg PG, Gordh T, Jr., Post C. Cholinergic mechanisms in pain and analgesia. *Trends*  
2 *PharmacolSci* 1989;Suppl:75-79.
- 3 [19] Honda K, Koga K, Moriyama T, Koguchi M, Takano Y, Kamiya HO. Intrathecal alpha2  
4 adrenoceptor agonist clonidine inhibits mechanical transmission in mouse spinal cord via  
5 activation of muscarinic M1 receptors. *NeurosciLett* 2002;322(3):161-164.
- 6 [20] Hwang JH, Hwang KS, Leem JK, Park PH, Han SM, Lee DM. The antiallodynic effects of intrathecal  
7 cholinesterase inhibitors in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 1999;90(2):492-  
8 499.
- 9 [21] Imlach WL, Bhola RF, Mohammadi SA, Christie MJ. Glycinergic dysfunction in a subpopulation of  
10 dorsal horn interneurons in a rat model of neuropathic pain. *Sci Rep* 2016;6:37104.
- 11 [22] Inquimbert P, Moll M, Latremoliere A, Tong CK, Whang J, Sheehan GF, Smith BM, Korb E, Athie  
12 MCP, Babaniyi O, Ghasemlou N, Yanagawa Y, Allis CD, Hof PR, Scholz J. NMDA Receptor  
13 Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent  
14 Pain after Peripheral Nerve Injury. *Cell Rep*;23(9):2678-2689.
- 15 [23] Iura A, Takahashi A, Hakata S, Mashimo T, Fujino Y. Reductions in tonic GABAergic current in  
16 substantia gelatinosa neurons and GABAA receptor delta subunit expression after chronic  
17 constriction injury of the sciatic nerve in mice. *Eur J Pain* 2016;20(10):1678-1688.
- 18 [24] Kimura M, Hayashida K, Eisenach JC, Saito S, Obata H. Relief of hypersensitivity after nerve injury  
19 from systemic donepezil involves spinal cholinergic and gamma-aminobutyric acid  
20 mechanisms. *Anesthesiology* 2013;118(1):173-180.
- 21 [25] Lavand'homme P, Pan HL, Eisenach JC. Intrathecal neostigmine, but not sympathectomy,  
22 relieves mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*  
23 1998;89(2):493-499.
- 24 [26] Lavand'homme PM, Eisenach JC. Sex differences in cholinergic analgesia II: differing mechanisms  
25 in two models of allodynia. *Anesthesiology* 1999;91(5):1455-1461.
- 26 [27] Leitner J, Westerholz S, Heinke B, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Jager T, Gruber-  
27 Schoffnegger D, Braun K, Sandkuhler J. Impaired excitatory drive to spinal GABAergic neurons  
28 of neuropathic mice. *PLoS One* 2013;8(8):e73370.
- 29 [28] Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun YY, Ji RR, Xiong L. A feed-forward  
30 spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J Clin Invest*  
31 2013;123(9):4050-4062.
- 32 [29] McDonough JH, Jr., Shih TM. A study of the N-methyl-D-aspartate antagonistic properties of  
33 anticholinergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;51(2-3):249-253.
- 34 [30] Medrano MC, Dhanasobhon D, Yalcin I, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. Loss of inhibitory  
35 tone on spinal cord dorsal horn spontaneously and nonspontaneously active neurons in a  
36 mouse model of neuropathic pain. *Pain* 2016;157(7):1432-1442.
- 37 [31] Mesnage B, Gaillard S, Godin A, Rodeau JL, Hammer M, von Engelhardt J, Wiseman P, De  
38 Koninck Y, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. Morphological and functional characterization  
39 of cholinergic interneurons of the dorsal horn of the mouse spinal cord. *J Comp Neurol*  
40 2011;519(16):3139-3158.
- 41 [32] Miles GB, Hartley R, Todd AJ, Brownstone RM. Spinal cholinergic interneurons regulate the  
42 excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(7):2448-  
43 2453.
- 44 [33] Miranda HF, Sierralta F, Pinaridi G. Neostigmine interactions with non steroidal anti-  
45 inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 2002;135(7):1591-1597.
- 46 [34] Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury  
47 promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal  
48 cord. *J Neurosci* 2002;22(15):6724-6731.
- 49 [35] Mosconi T, Kruger L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a  
50 painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain*  
51 1996;64(1):37-57.



- 1 [36] Naguib M, Yaksh TL. Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and  
2 isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems.  
3 *Anesthesiology* 1994;80(6):1338-1348.
- 4 [37] Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietschke F. nparLD: An R Software Package for the  
5 Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. *Journal of Statistical*  
6 *Software* 2012;50(12):23.
- 7 [38] O'Dell TJ, Christensen BN. Mecamylamine is a selective non-competitive antagonist of N-methyl-  
8 D-aspartate- and aspartate-induced currents in horizontal cells dissociated from the catfish  
9 retina. *Neurosci Lett* 1988;94(1-2):93-98.
- 10 [39] Olave MJ, Puri N, Kerr R, Maxwell DJ. Myelinated and unmyelinated primary afferent axons form  
11 contacts with cholinergic interneurons in the spinal dorsal horn. *Exp Brain Res*  
12 2002;145(4):448-456.
- 13 [40] Papke RL, Sanberg PR, Shytle RD. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic  
14 receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297(2):646-656.
- 15 [41] Paqueron X, Conklin D, Eisenach JC. Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but  
16 not thermal nociception after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 2003;99(1):199-204.
- 17 [42] Pawlowski SA, Gaillard S, Ghorayeb I, Ribeiro-da-Silva A, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. A  
18 novel population of cholinergic neurons in the macaque spinal dorsal horn of potential  
19 clinical relevance for pain therapy. *J Neurosci* 2013;33(9):3727-3737.
- 20 [43] Peirs C, Williams SP, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, Goldring AC, Hioki H, Liu Z, Marell  
21 PS, Seal RP. Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 2015;87(4):797-812.
- 22 [44] Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan LY,  
23 Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R. Dorsal Horn Parvalbumin Neurons  
24 Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell Rep* 2015;13(6):1246-1257.
- 25 [45] Picciotto M, Zoli M, Lina C, Bessis A, Lallemand Y, Lenovere N, Vincent P, Merlo-Pich E, Brulet P,  
26 Changeux JP. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine  
27 receptor in the brain. *Nature* 1995;374:65-67.
- 28 [46] Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III  
29 of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 2004;111(1-  
30 2):144-150.
- 31 [47] Prescott SA, De Koninck Y. Four cell types with distinctive membrane properties and  
32 morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. *J Physiol* 2002;539:817-  
33 836.
- 34 [48] Rashid MH, Furue H, Yoshimura M, Ueda H. Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of  
35 nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. *Pain*  
36 2006;125(1-2):125-135.
- 37 [49] Rashid MH, Ueda H. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its  
38 spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res* 2002;953(1-2):53-62.
- 39 [50] Ribeiro-da-Silva A. Substantia Gelatinosa of the Spinal Cord. In: G Paxinos, editor. *The Rat*  
40 *Nervous System*, Vol. Third. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. pp. 129-148.
- 41 [51] Rico B, Cavada C. A population of cholinergic neurons is present in the macaque monkey  
42 thalamus. *Eur J Neurosci* 1998;10(7):2346-2352.
- 43 [52] Santos SF, Rebelo S, Derkach VA, Safronov BV. Excitatory interneurons dominate sensory  
44 processing in the spinal substantia gelatinosa of rat. *J Physiol* 2007;581(Pt 1):241-254.
- 45 [53] Schoffnegger D, Heinke B, Sommer C, Sandkuhler J. Physiological properties of spinal lamina II  
46 GABAergic neurons in mice following peripheral nerve injury. *J Physiol* 2006;577(Pt 3):869-  
47 878.
- 48 [54] Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall  
49 RE, Woolf CJ. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the  
50 loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*  
51 2005;25(32):7317-7323.

- 1 [55] Takasu K, Honda M, Ono H, Tanabe M. Spinal alpha(2)-adrenergic and muscarinic receptors and  
2 the NO release cascade mediate supraspinally produced effectiveness of gabapentin at  
3 decreasing mechanical hypersensitivity in mice after partial nerve injury. *BrJPharmacol*  
4 2006;148(2):233-244.
- 5 [56] Tsuda M, Koga K, Chen T, Zhuo M. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in  
6 the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. *J Neurochem* 2017;141(4):486-498.
- 7 [57] von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, Monyer H. Functional characterization of  
8 intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *JNeurosci* 2007;27(21):5633-5642.
- 9 [58] Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, Heise C. Atlas of the Mouse Spinal Cord. In: GP Charles  
10 Watson, Gulgun Kayalioglu, editor. *The Spinal Cord: Academic Press, 2009.* pp. 308-379.
- 11 [59] Wieskopf JS, Mathur J, Limapichat W, Post MR, Al-Qazzaz M, Sorge RE, Martin LJ, Zaykin DV,  
12 Smith SB, Freitas K, Austin JS, Dai F, Zhang J, Marcovitz J, Tuttle AH, Slepian PM, Clarke S,  
13 Drenan RM, Janes J, Al Sharari S, Segall SK, Aasvang EK, Lai W, Bittner R, Richards CI, Slade  
14 GD, Kehlet H, Walker J, Maskos U, Changeux JP, Devor M, Maixner W, Diatchenko L, Belfer I,  
15 Dougherty DA, Su AI, Lummis SC, Imad Damaj M, Lester HA, Patapoutian A, Mogil JS. The  
16 nicotinic alpha6 subunit gene determines variability in chronic pain sensitivity via cross-  
17 inhibition of P2X2/3 receptors. *Sci Transl Med* 2015;7(287):287ra272.
- 18 [60] Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier MJ, Barrot M. A time-  
19 dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol Psychiatry*  
20 2011;70(10):946-953.
- 21 [61] Yalcin I, Charlet A, Cordero-Erausquin M, Tessier LH, Picciotto MR, Schlichter R, Poisbeau P,  
22 Freund-Mercier MJ, Barrot M. Nociceptive thresholds are controlled through spinal beta(2)-  
23 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Pain* 2011;152(9):2131-2137.
- 24 [62] Yalcin I, Megat S, Barthas F, Waltisperger E, Kremer M, Salvat E, Barrot M. The sciatic nerve  
25 cuffing model of neuropathic pain in mice. *J Vis Exp* 2014(89).
- 26 [63] Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Waltisperger E, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M.  
27 Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp*  
28 *Neurol* 2010;221(1):115-121.
- 29 [64] Yang L, Zhang FX, Huang F, Lu YJ, Li GD, Bao L, Xiao HS, Zhang X. Peripheral nerve injury induces  
30 trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal  
31 cord. *Eur J Neurosci* 2004;19(4):871-883.
- 32 [65] Young T, Wittenauer S, McIntosh JM, Vincler M. Spinal alpha3beta2\* nicotinic acetylcholine  
33 receptors tonically inhibit the transmission of nociceptive mechanical stimuli. *Brain Res*  
34 2008;1229:118-124.
- 35 [66] Zhuo M, Gebhart GF. Tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain*  
36 1991;46(2):211-222.
- 37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Figure 1: Time course of the effect of cholinergic drugs on mechanical threshold and motor coordination in naive animals.**

A: Effect of i.t. injection of an AChE inhibitor, physostigmine, on the paw withdrawal threshold in the Von Frey test. 15 nmol physostigmine produced an analgesic effect in naive mice (Saline 0.9% group = 5 mice| Each drug group = 5 mice, Drug effect:  $p=2.43e-3$ , nparLD). \*\*  $p < 0.01$  mean of PHY 15 nmol vs. mean of saline, Bonferroni's multiple comparisons test.

B: Effect of i.t. injection of a nicotinic antagonist, mecamlamine, on the paw withdrawal threshold in the Von Frey test. Mecamlamine induced mechanical allodynia at 10, 20, 100 and 400 nmol in naive CD1 mice (Saline 0.9% group = 7 mice| Each drug group = 5 mice, Drug-Time interaction:  $p = 3.30e-12$ ). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , vs. saline, Bonferroni's multiple comparisons test. In 1B, the bottom asterisks concern the two higher doses.

**Figure 2: Mecamlamine shows that a spinal cholinergic tone is still present after neuropathy**

A: Time course of the effect of intrathecal mecamlamine on mechanical threshold of sham and cuff mice (Sham: Saline 0.9%, Mecamlamine 10nmol, 20nmol, 100nmol = 5 mice per group | 400 nmol = 4 mice; Cuff: Saline 0.9%, Mecamlamine 20nmol, 100nmol and 400nmol = 5 mice per group | 10 nmol = 4 mice). For the contralateral side (Top panels), there was a significant effect of the Drug (saline, 10-400 nM mecamlamine,  $p = 1.901e-19$ , nparLD) and Time (0, 15 and 150 min post i.t. injection,  $p = 1.95e-67$ , nparLD) but not of the Surgery (sham vs. cuff,  $p = 0.702$ , nparLD), as well as a significant interaction between Drug and Time ( $p = 1.79e-16$ , nparLD). For the ipsilateral side (Bottom panels), there was a significant effect of Surgery ( $p = 8.64e-19$ ), Drug ( $p = 6.36e-15$ ) and Time ( $p = 3.07e-53$ ), as well as a significant interaction between Drug and Time ( $p = 1.94e-16$ ) and between Surgery, Time and Drug ( $p = 0.0354$ ). While treatment with 10 and 20 nmol mecamlamine had no effect, 100 and 400 nmol mecamlamine further potentiated the mechanical allodynia in the ipsilateral paw. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs. saline, Bonferroni's multiple comparisons test.

B: Dose response curve of mecamlamine on responses of sham and cuff animals. Neuropathy induced a shift to the right to the response to mecamlamine (Ipsilateral side: sham vs. cuff  $p < 0.001$ ; Least square fit).

**Figure 3: In vitro electrophysiological characterization of the cuff model**

A: Representative patch-clamp recordings from LII neurons illustrating miniature excitatory (mEPSC, at -60 mV) and inhibitory (mIPSC, at 0 mV) postsynaptic currents

1 B: (left) Frequency changes in mEPSC and mIPSC recorded LII neurons (Sham: 8 cells from 4 mice |  
2 Cuff: 5 cells from 3 mice): a reduction was observed in mIPSCs frequency (Right) but not mEPSCs  
3 (Left) in cuff mice (respectively,  $p = 0.042$  and  $p = 0.586$ ; Kolmogorov-Smirnov test). (right) Analysis  
4 of the amplitude of the same currents demonstrates no effect of the surgery (mEPSC:  $p = 0.0793$ ;  
5 mIPSC:  $p = 0.0793$ ; Kolmogorov-Smirnov test)  
6  
7  
8

9 **Figure 4: Number and synaptic inputs to Dorsal Horn cholinergic interneurons in sham and cuff**  
10 **mice**  
11

12 A: Representative in vitro patch-clamp recordings from LIII/IV ChAT::EGFP (top) and non-EGFP  
13 (bottom) neurons, in Sham and Cuff mice. Recordings are performed at 0 mV to record IPSCs and -60  
14 mV to observe EPSCs. A1 : spontaneous excitatory (sEPSC) and inhibitory (sIPSC) postsynaptic  
15 currents, A2 : miniature mEPSC and mIPSC currents.  
16  
17  
18  
19  
20

21 B: Frequency of spontaneous (left) and miniature (right) EPSCs (top) and IPSCs (bottom) recorded in  
22 ChAT::EGFP and non-EGFP cells in horizontal slices of sham and cuff mice (Sham: spontaneous  
23 currents - ChAT::EGFP+ = 13 cells and non-EGFP = 11 cells from 9 mice | miniature currents -  
24 ChAT::EGFP+ = 5 cells and non-EGFP = 7 cells from 4 mice; Cuff: spontaneous currents -  
25 ChAT::EGFP+ = 8 cells and non-EGFP = 10 cells from 8 mice| miniature currents - ChAT::EGFP+ =  
26 7 cells and non-EGFP = 6 cells from 3 mice). The distribution of frequencies being non-normal, their  
27 log10 was taken to perform the ANOVA. There was no statistical difference in EPSCs frequencies  
28 between groups (ChAT::EGFP+ vs. non-EGFP, Sham vs. Cuff, spontaneous vs. miniature). For IPSCs,  
29 main effects were significant: neuron (ChAT::EGFP vs. non-EGFP,  $p = 0.000179$ , 2-way ANOVA),  
30 surgery (sham vs. cuff,  $p = 0.004616$ , 2-way ANOVA) and type of current (spontaneous vs. miniatures,  
31  $p = 1.051e-3$ , 2-way ANOVA).  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

41 C: Amplitude of miniature EPSC and IPSC of ChAT::EGFP+ and Non-EGFP+ neurons in sham and  
42 cuff mice (Sham: ChAT::EGFP+ = 4 cells and non-EGFP = 7 cells from 4 mice; Cuff: ChAT::EGFP+  
43 = 7 cells and non-EGFP = 5 cells from 3 mice). Data was normalized through inversion. There was no  
44 significant difference between groups for mEPSCs (ANOVA). There was a significant Surgery-Neuron  
45 interaction for mIPSCs amplitude ( $p = 0.0437$ ) although this was not confirmed by post-hoc analysis.  
46  
47  
48  
49  
50

51 **Figure 5: Active and passive properties of laminae III/IV ChAT::EGFP+ and Non-EGFP cells in**  
52 **sham and cuff mice.**  
53

54 A: (A1) Recording illustrating 3 different types of firing patterns, observed after injection of 90 pA  
55 depolarizing current: tonic, single-spike and phasic, (A2) Example of a response to a hyperpolarizing  
56 current showing post-inhibitory rebound. Arrow: hyperpolarizing “sag.”  
57  
58  
59  
60  
61

1 B: The distribution of different firing patterns is not different in the two neuronal populations or as a  
2 consequence of the surgery. Surgery-Neuron-Firing pattern interaction:  $p = 0.6697$ , 3x3x3 contingency  
3 tables.  
4

5  
6 C: Electrophysiological properties of ChAT::EGFP and Non-EGFP cells (Sham: From 3 mice,  
7 ChAT::EGFP+ = 6 cells and non-EGFP = 7 cells; Cuff: From 3 mice, ChAT::EGFP+ = 8 cells and  
8 non-EGFP = 6 cells): Rheobase (3x3x3 contingency tables,  $p = 0.3765$ ), Resting membrane potential  
9 [RMP] ( $p = 0.2706$ , Surgery-Neuron interaction:  $p = 0.253$ ) and Input resistance ( $p = 0.9191$ , 2way-  
10 ANOVA) were unaltered in both populations following neuropathy.  
11  
12  
13  
14

15 D: Mean Instantaneous frequencies of spikes in function of the injected current, recorded in  
16 ChAT::EGFP and Non-EGFP neurons, is similar in sham and cuff animals (Sham: From 3 mice,  
17 ChAT::EGFP+ = 6 cells and non-EGFP = 7 cells; Cuff: From 3 mice, ChAT::EGFP+ = 8 cells and  
18 non-EGFP = 6 cells). There was a significant effect of neuron type (ChAT::EGFP vs. non-EGFP,  $p =$   
19  $1.15e-2$ , nparLD), current injected (between 0 - 180pA,  $p = 3.91e-84$ , nparLD) and a neuron:current  
20 injected interaction (comparing different injected currents in ChAT::EGFP and non-EGFP,  $p = 2.30e-$   
21  $2$ , nparLD); details in suppl. Fig. 4, Supplementary Digital Content. There was no Surgery-Neuron-  
22 depolarizing current interaction:  $p = 7.53e-01$ , nparLD.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 E: Sag amplitude, expressed as a % of the maximum hyperpolarization of the trace. There was no  
31 observable differences in the sag amplitudes (Sham: From 3 mice, ChAT::EGFP+ = 6 cells and non-  
32 EGFP = 7 cells; Cuff: From 3 mice, ChAT::EGFP+ = 8 cells and non-EGFP = 6 cells, 2way-ANOVA,  
33  $p = 0.8439$ ).  
34  
35  
36  
37

### 38 **Figure 6: The number of DH cholinergic interneurons is unaltered after cuff surgery**

39  
40  
41 A: Representative illustration of endogenous ChAT::EGFP and anti-ChAT labeling in the ipsilateral  
42 dorsal horn of a cuff mouse. The arrowhead denotes overlapping signals (scale = 100  $\mu$ m).  
43  
44

45 B: Quantification of the total number of DH cholinergic interneurons (ChAT::EGFP fluorescence) in  
46 the lumbar (L4-L5) cord of sham and cuff mice (N for Sham and Cuff = 2 mice, 15 sections per mouse,  
47 25 - 31 cells in total per mouse). There is no significant difference between groups (Contralateral side-  
48 Surgery-Staining interaction:  $p = 0.329$ ; 2-way ANOVA | Ipsilateral side- Surgery-Staining interaction:  
49  $p > 0.99$ ; 2-way ANOVA).  
50  
51  
52  
53  
54

### 55 **Figure 7: Touch and pinch responses in spinal dorsal horn neurons are modulated by endogenous** 56 **acetylcholine via nicotinic receptors.** 57 58 59 60 61

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

A: Representative *in vivo* extracellular recording from a Sham animal dorsal horn neuron responding to Touch and Pinch (10s stimulation of the hindpaw) in control conditions (left) and after local application of 100  $\mu$ M Mecamylamine at the surface of the cord (right).

B: The depth of recorded DH neurons was similar in sham ( $274.4 \pm 41.06 \mu\text{m}$ ) and cuff ( $279.0 \pm 29.33 \mu\text{m}$ ) mice (sham vs cuff:  $p = 0.9353$ ; unpaired t-test).

C: Mecamylamine increased the intensity of the response of spinal dorsal horn neurons to mechanical stimulation in sham (7 cells from 3 mice, Drug effect:  $p = 0.0202$ ; repeated-measures 2 way ANOVA) and cuff mice (5 cells from 3 mice, Drug effect:  $p = 0.0160$ ; repeated-measures 2 way ANOVA).

### Figure 8: Physostigmine unravels downstream changes to spinal cholinergic tone after neuropathy

A: Time course of the effect of intrathecal physostigmine on the mechanical threshold of sham and cuff mice (Sham: Saline 0.9%, Phy 1.5nmol group = 5 mice | Phy 7.5nmol group = 6 mice | Phy 15nmol group = 4 mice; Cuff: Saline 0.9%, Phy 1.5nmol group = 5 mice | Phy 7.5nmol group = 6 mice | Phy 15nmol group = 3 mice ). (Top) Contralateral PWT was reduced in a dose- and time- dependent manner in sham and cuff mice: significant effect of Drug ( $p = 9.01\text{e-}7$ ) and Time ( $p = 1.72\text{e-}4$ ) but not of Surgery ( $p = 0.521$ ), and significant interaction between Drug and Time ( $p = 3.91\text{e-}8$ , nparLD). (Bottom) Idem for the ipsilateral paw: significant effect of Surgery ( $p = 3.44\text{e-}78$ ), Drug ( $p = 6.26\text{e-}22$ ) and Time ( $p = 5.38\text{e-}26$ ), as well as significant interaction between Drug and Time ( $p = 4.80\text{e-}25$ ) and between Surgery, Time and Drug ( $p = 6.53\text{e-}5$ ). The 7,5 nmol physostigmine dose was subthreshold in sham but produced profound anti-allodynia in cuff. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$ , and \*  $p < 0.05$ , vs. saline, Bonferroni's multiple comparisons test.

B: Dose response curve of physostigmine on PWT of neuropathic animals. The neuropathy induced a shift to the left to the effect of Physostigmine (Ipsilateral side: cuff vs. sham  $p < 0.001$ ; Least square fit)

### List of Supplemental Digital Content:

- Supplementary Digital Content [.pdf]
  - Suppl. Fig 1. Statistical analysis of the effect of i.t. Physostigmine on the Von Frey test.
  - Suppl. Fig. 2. Controls for the effect of 400 nmol mecamylamine
  - Suppl. Fig. 3: Statistical analysis of the frequency of synaptic currents in DH lamina III-IV neurons (horizontal slices, sham and cuff mice)
  - Suppl. Fig. 4. Statistical analysis of the mean instantaneous frequencies of spikes induced by current injections (horizontal slices, sham and cuff mice)

## Enhanced analgesic cholinergic tone after neuropathy

### Summary

A pharmacological and electrophysiological approach demonstrates that the spinal analgesic cholinergic tone is increased, as well as the effect of acetylcholinesterase inhibitors, in a mouse model of neuropathic pain.

Figure 1

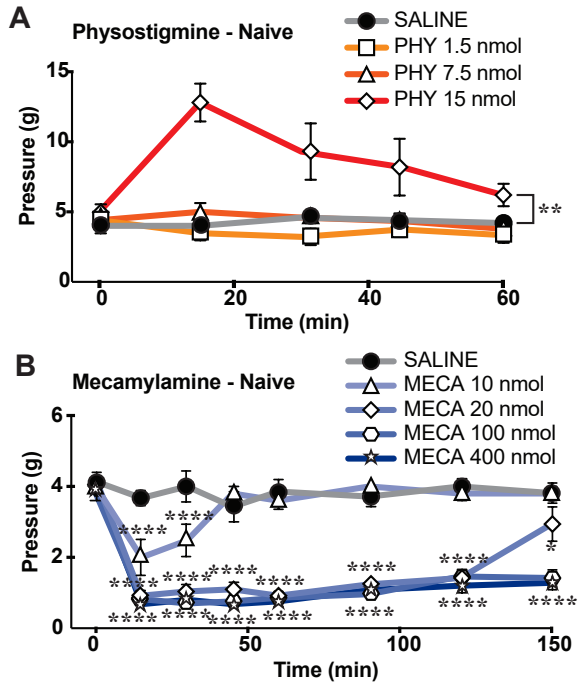


Figure 1: Time course of the effect of cholinergic drugs on mechanical threshold in naive animals.



Figure 2

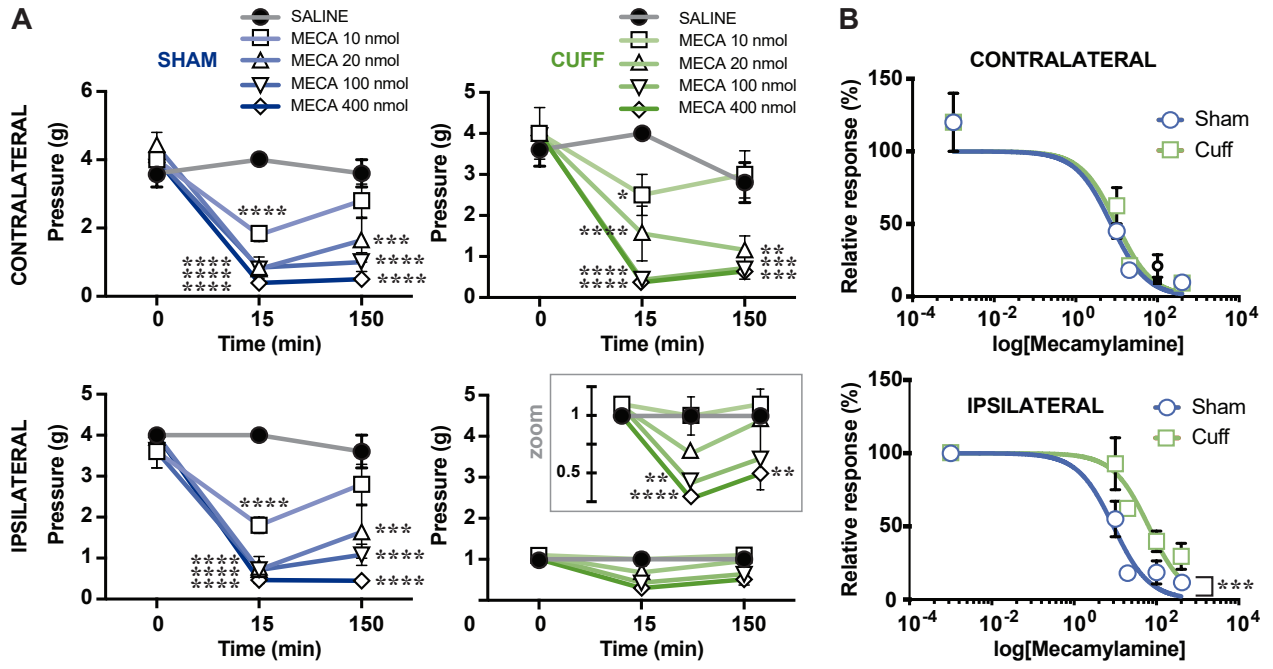


Figure 2: Mecamylamine shows that a spinal cholinergic tone is still present after neuropathy

Figure 3

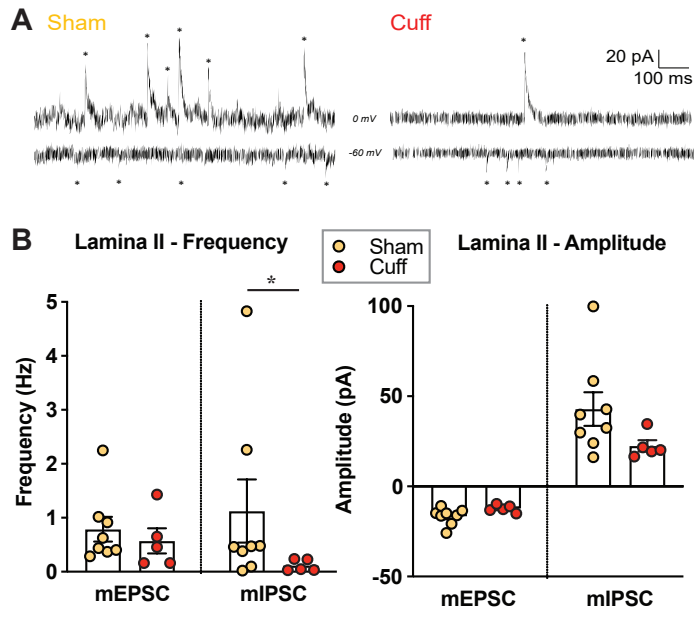


Figure 3: In vitro electrophysiological characterization of the cuff model

Figure 4

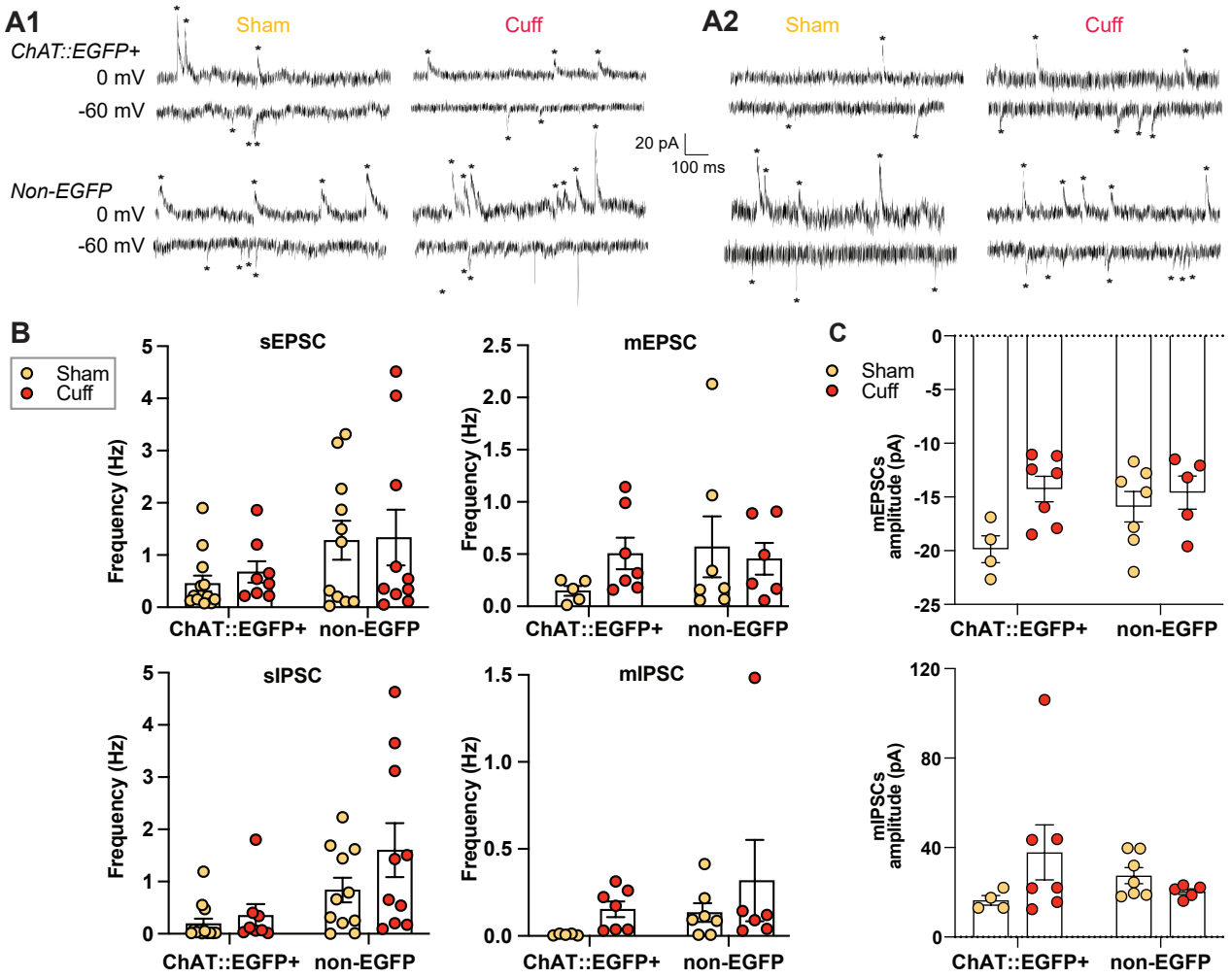


Figure 4: Number and synaptic inputs to Dorsal Horn cholinergic interneurons in sham and cuff mice

Figure 5

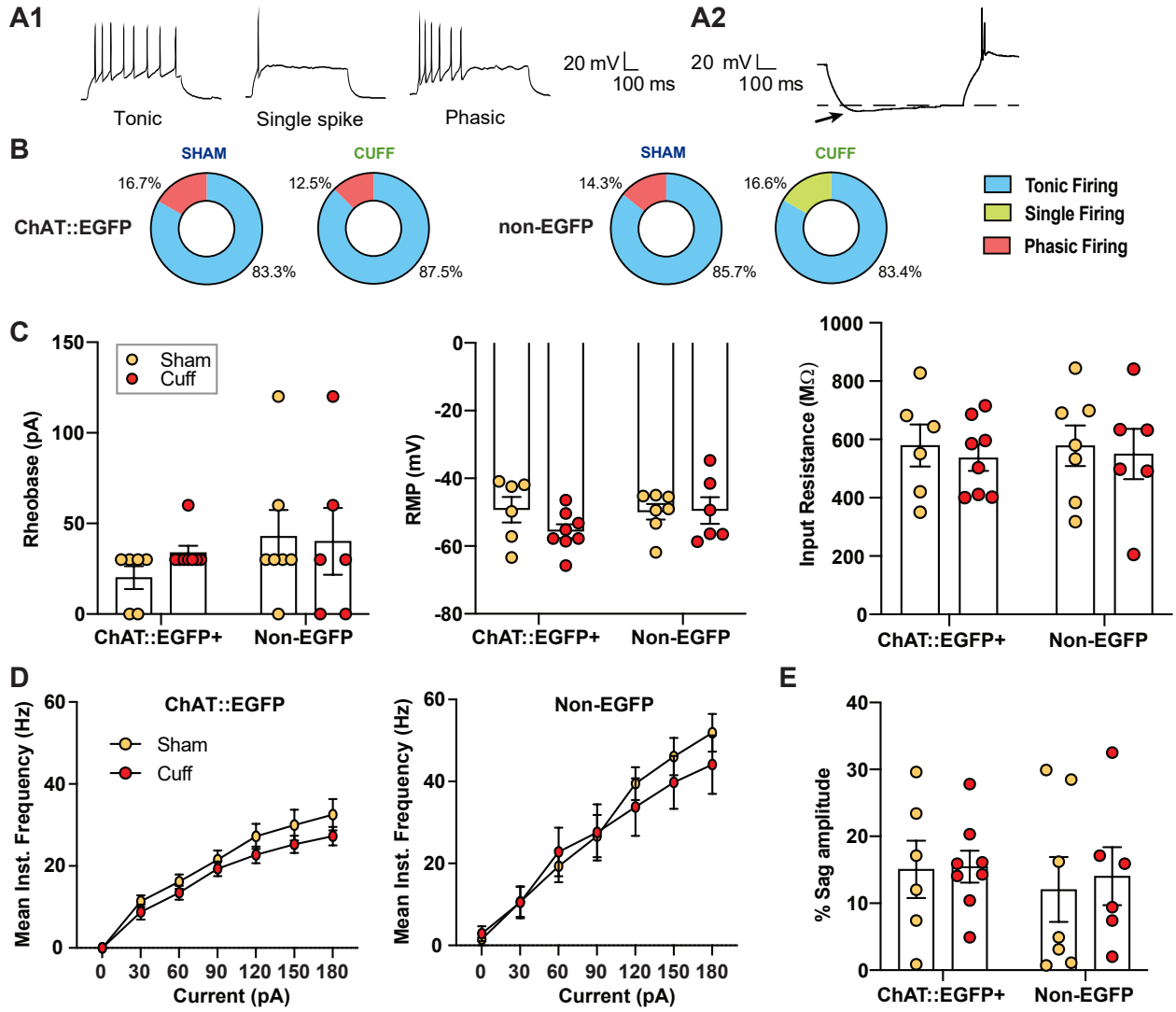


Figure 5: Active and passive properties of lamine III/IV ChAT::EGFP+ and Non-EGFP cells in sham and cuff mice.

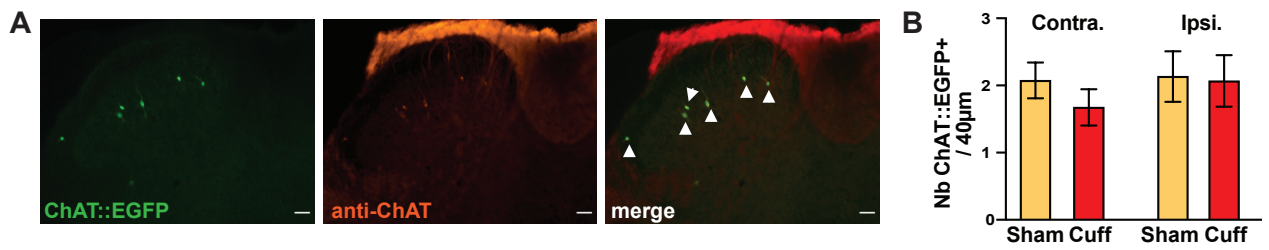
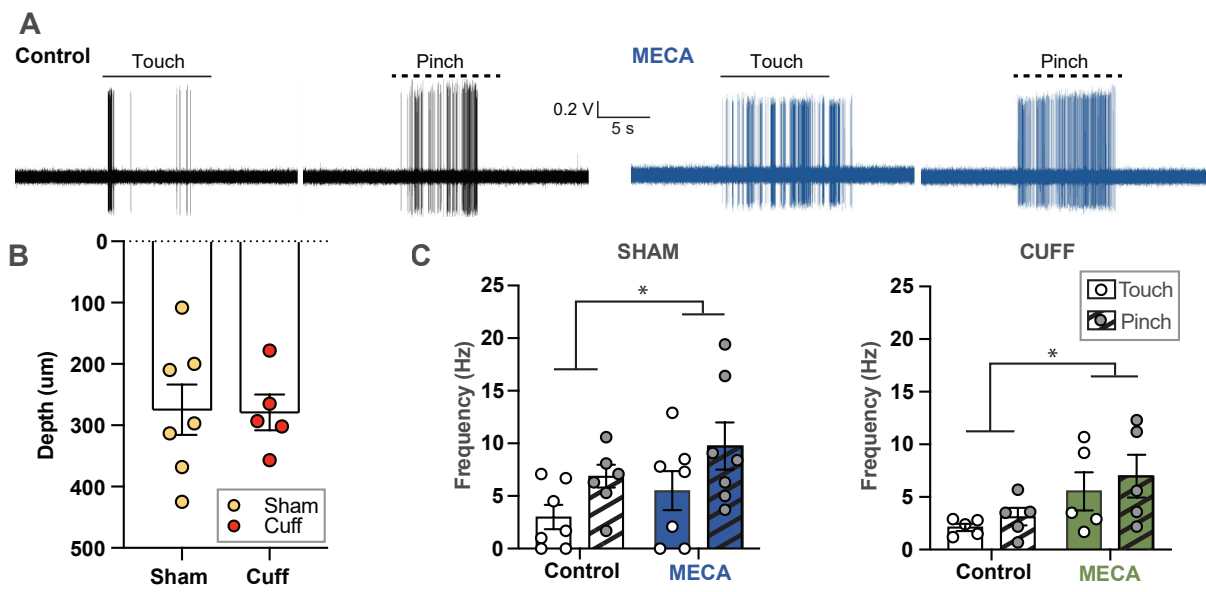


Figure 6: The number of DH cholinergic interneurons is unaltered after cuff surgery



**Figure 7: Touch and pinch responses in spinal dorsal horn neurons are modulated by endogenous acetylcholine via nicotinic receptors.**

Figure 8

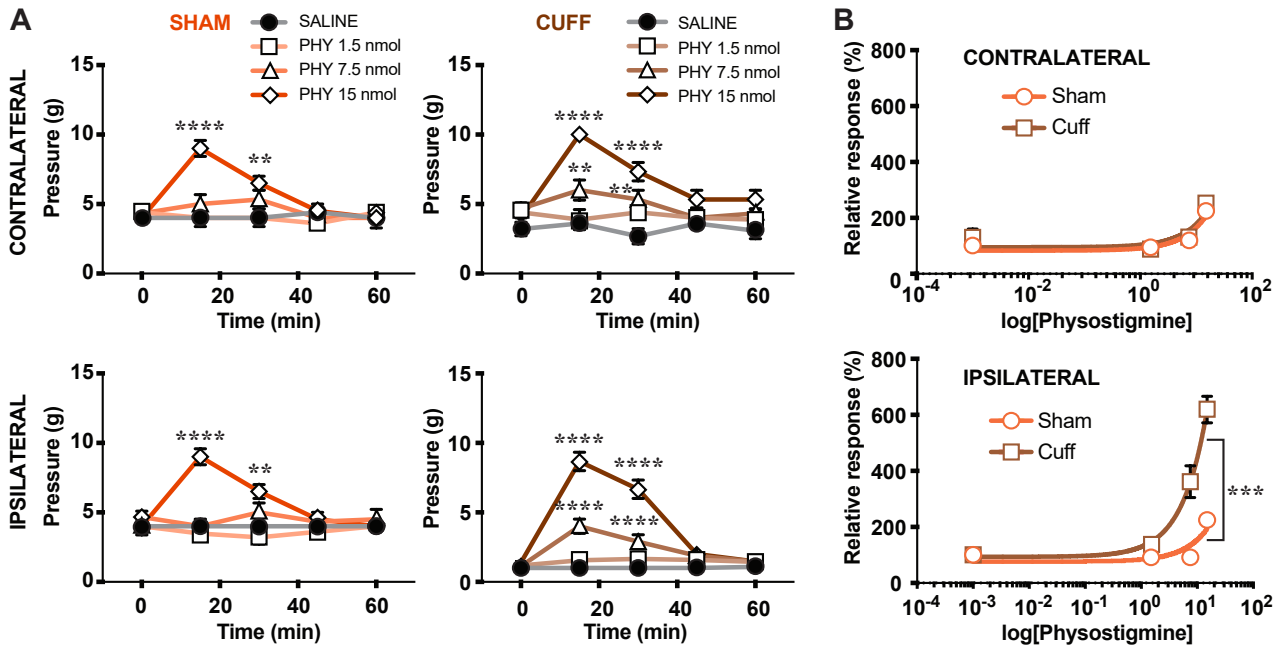
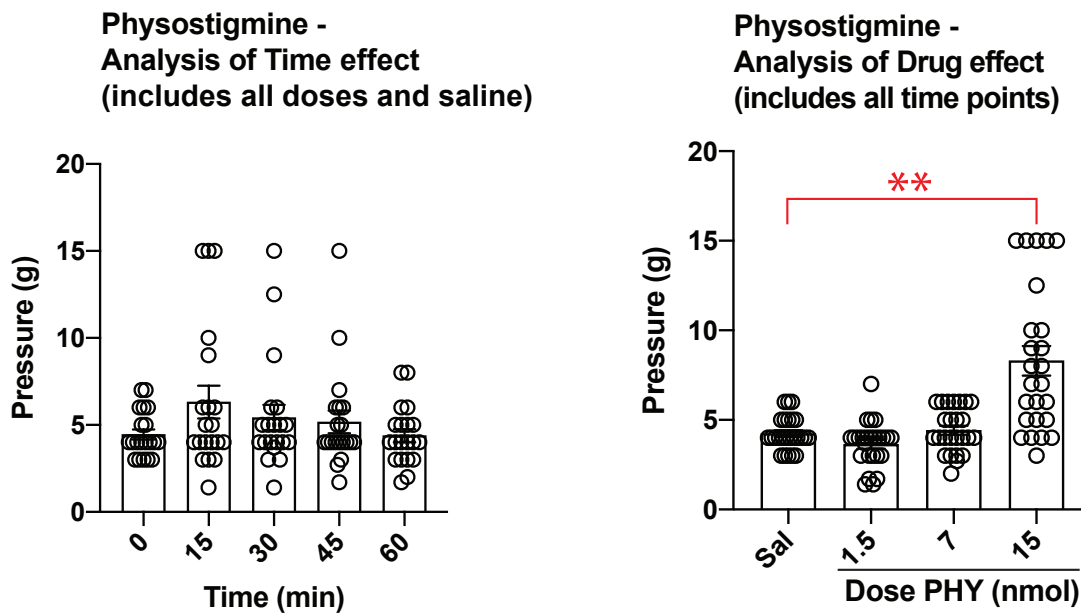


Figure 8: Physostigmine unravels downstream changes to spinal cholinergic tone after neuropathy

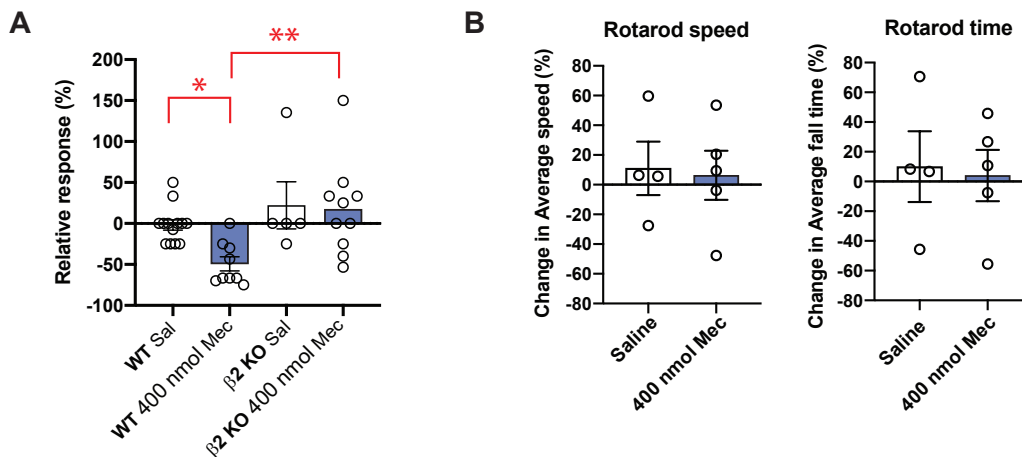


**Suppl. Fig. 1:**

**Statistical analysis of the effect of i.t. Physostigmine on the Von Frey test.**

Shown are the analysis of the two factors: Time (left) and Drug (right). There was no statistical effect of Time, but an effect of Drug (Saline 0.9% group = 5 mice| Each drug group = 5 mice;  $p=2.43e-3$ , nparLD). \*\*  $p < 0.01$  Bonferroni's multiple comparisons test.





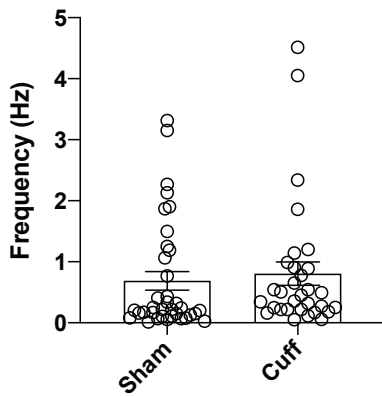
**Suppl. Fig. 2:  
Controls for the effect of 400 nmol mecamlamine**

**A:** Effect of i.t. injection of 400 nmol mecamlamine, on the paw withdrawal threshold in the Von Frey test in WT and  $\beta 2^*$  nAChR knock-out ( $\beta 2$  KO) C57BL/6 mice (WT: Saline 0.9% group = 13 mice | Drug group = 9 mice;  $\beta 2$ KO: Saline 0.9% group = 5 mice | Drug group = 10 mice,  $p = 0.0024$ , Kruskal-Wallis test). The relative response is calculated as a % of change of the baseline (time = 0, before any injection) measured 15 min after the injection of saline or drug. Due to difficulties in breeding of  $\beta 2$  2KOs, this is the only experiment containing both males and females (WT: Saline 0.9% group = 10M+3F | Drug group = 8M+2F ;  $\beta 2$ KO: Saline 0.9% group = 2M + 3F | Drug group = 5M+5F) ; no difference was found with univariate analysis between sexes ( $p = 0.118$ , nparLD).

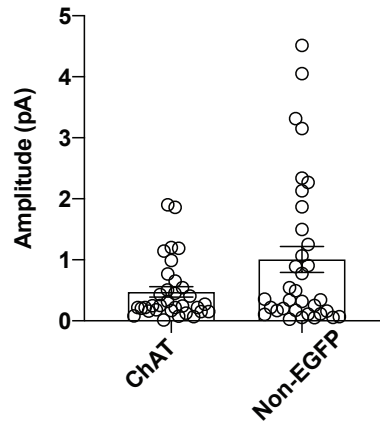
Mecamlamine induced mechanical allodynia at 400 nmol in WT ( $p = 0.01$ , Dunn's multiple comparison test) but not  $\beta 2$  KO mice ( $p > 0.99$ , Dunn's multiple comparison test). Moreover, the effect of mecamlamine had a different effect in WT vs.  $\beta 2$  KO mice ( $p = 0.0029$ , Dunn's multiple comparison test).

**B:** Effect of i.t. injection of 400 nmol mecamlamine on rotarod performances, expressed as a % of change of the baseline (time = 0, before any injection) measured 15 min after the injection of saline or drug. Mecamlamine did not change speed of fall or time of fall in naïve CD1 mice (Saline 0.9% group = 4 mice | Mecamlamine group = 5 mice, Speed:  $p = 0.856$ , Time:  $p = 0.841$ , unpaired t-test).

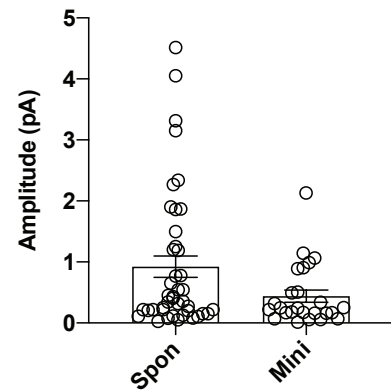
**EPSCs frequency -  
Analysis of Surgery effect  
(includes minis and spont,  
ChAT and non-EGFP neurons)**



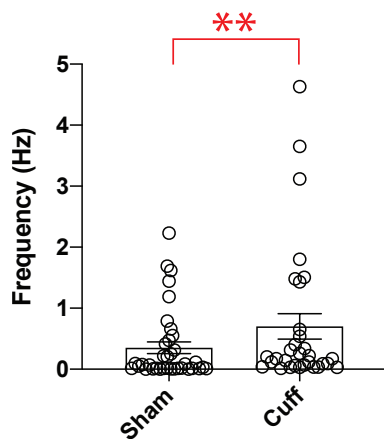
**EPSCs frequency -  
Analysis of Neuron effect  
(includes minis and spont,  
Sham and cuff)**



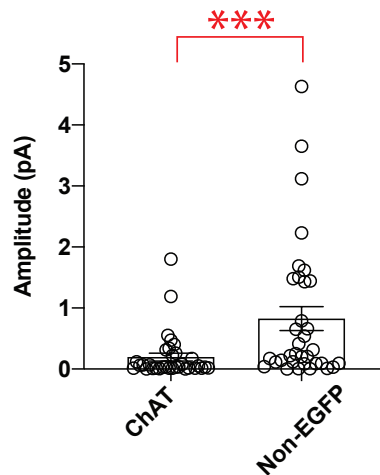
**EPSCs frequency -  
Analysis of Type of current  
effect (includes sham and cuff,  
ChAT and non-EGFP neurons)**



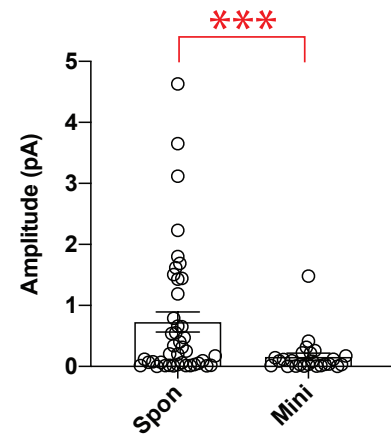
**IPSCs frequency -  
Analysis of Surgery effect  
(includes minis and spont,  
ChAT and non-EGFP neurons)**



**IPSCs frequency -  
Analysis of Neuron effect  
(includes minis and spont,  
Sham and cuff)**



**IPSCs frequency -  
Analysis of Type of current  
effect (includes sham and cuff,  
ChAT and non-EGFP neurons)**



**Suppl. Fig. 3:**

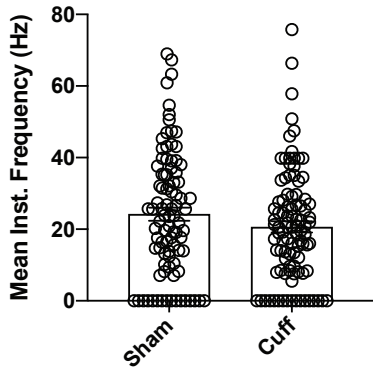
**Statistical analysis of the frequency of synaptic currents in DH lamina III-IV neurons (horizontal slices, sham and cuff mice)**

Shown are the analysis of the three factors: surgery (left), type of neuron (ChAT::EGFP or non-ChAT, middle) and type of current (spontaneous vs. miniature, right), for EPSCs (top) and IPSCs (bottom). Same N as in Fig. 4.

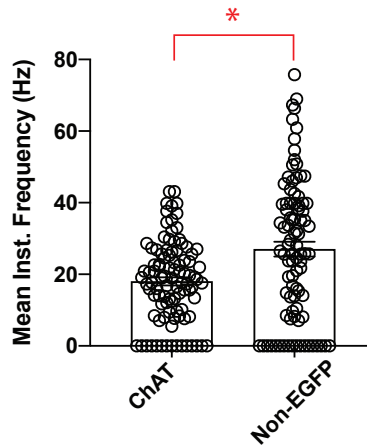
There was no statistical difference in EPSCs frequencies between groups.

For IPSCs, main effects were significant: neuron (ChAT::EGFP vs. non-EGFP,  $p = 0.000179$ , 2-way ANOVA), surgery (sham vs. cuff,  $p = 0.004616$ , 2-way ANOVA) and type of current (spontaneous vs. miniatures,  $p = 1.051e-3$ , 2-way ANOVA).

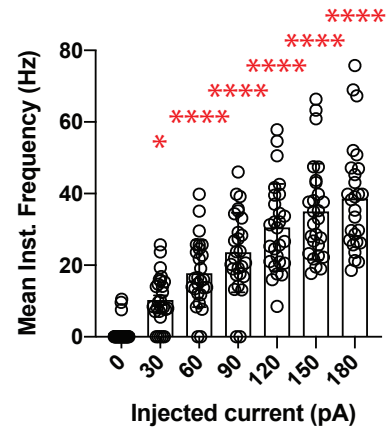
**Firing inst. frequency -  
Analysis of Surgery effect  
(includes all inj. currents,  
ChAT and non-EGFP neurons)**



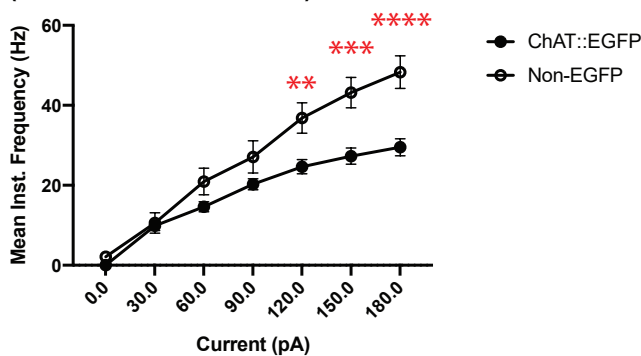
**Firing inst. requeryency -  
Analysis of Neuron effect  
(includes all inj. currents,  
Sham and cuff)**



**Firing inst. frequency -  
Analysis of injected currents  
effect (includes sham and cuff,  
ChAT and non-EGFP neurons)**



**Firing inst. requeryency -  
Analysis of Neuron effect as a function of inj. current  
(includes Sham and cuff)**



**Suppl. Fig. 4:**

**Statistical analysis of the mean instantaneous frequencies of spikes induced by current injections (horizontal slices, sham and cuff mice)**

**Top:** Shown are the analysis of the three factors: surgery (left), type of neuron (ChAT:EGFP or non-ChAT, middle) and injected current (0-180 pA, right). Same N as in Fig. 5. Main effects were significant: neuron (ChAT::EGFP vs. non-EGFP,  $p = 1.15e-2$ , nparLD), current injected (between 0 - 180pA,  $p = 3.91e-84$ , nparLD). Post-hoc analysis for current injection vs. 0 pA: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . Not illustrated in the graph, comparisons vs. 30 pA:

$p < 0.001$  for 90 pA, and  $p < 0.0001$  for 120 to 180 pA; comparisons vs. 60 pA:  $p < 0.001$  for 120 pA, and  $p < 0.0001$  for 150-180 pA; comparisons vs. 90 pA:  $p < 0.01$  for 150 pA, and  $p < 0.0001$  for 180 pA)

**Bottom:** There was an interaction between the factors Neuron and Current injected ( $p = 2.30e-2$ , nparLD). \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$  vs. ChAT::EGFP neurons, Bonferroni's multiple comparisons test.

## Bibliographie

- Abdelmoumène M, Besson J-M, Aléonard P. 1970. Cortical areas exerting presynaptic inhibitory action on the spinal cord in cat and monkey. *Brain Research* 20: 327–29
- Abraira VE, Kuehn ED, Chirila AM, Springel MW, Toliver Aa, et al. 2017. The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 168: 295-310.e19
- Akay T. 2020. Sensory Feedback Control of Locomotor Pattern Generation in Cats and Mice. *Neuroscience*
- Akay T, Tourtellotte WG, Arber S, Jessell TM. 2014. Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16877-82
- Alaynick Wa, Jessell TM, Pfaff SL. 2011. SnapShot: Spinal cord development. *Cell* 146: 178.e1
- Alstermark B, Isa T, Pettersson LG, Sasaki S. 2007. The C3-C4 propriospinal system in the cat and monkey: a spinal pre-motoneuronal centre for voluntary motor control. *Acta Physiol (Oxf)* 189: 123-40
- Alstermark B, Lundberg A, Norrsell U, E. S. 1981. Integration in Descending Motor Pathways Controlling the Forelimb in the Cat. *Exp Brain Res*
- Alstermark B, Pettersson LG. 2014. Skilled reaching and grasping in the rat: lacking effect of corticospinal lesion. *Front Neurol* 5: 103
- Andersen P, Eccles JC, Schmidt RF. 1962a. Presynaptic Inhibition in the Cuneate Nucleus. *Nature* 194: 741-43
- Andersen P, Eccles JC, Sears TA. 1962b. Presynaptic Inhibitory Actions: Presynaptic Inhibitory Action of Cerebral Cortex on the Spinal Cord. *Nature* 194: 740–41
- Andersen P, Eccles JC, Sears TA. 1963. Cortically evoked depolarization of primary afferent fibers in the spinal cord. *J Neurophysiol*
- Arshavsky YI, Orlovsky GN, Pavlova GA, Perret C. 1978. Messages conveyed by descending tracts during scratching in the cat. II. Activity of rubrospinal neurons. *Brain Research* 159: 111-23
- Azim E, Alstermark B. 2015. Skilled forelimb movements and internal copy motor circuits. *Curr Opin Neurobiol* 33: 16-24

- Azim E, Jiang J, Alstermark B, Jessell TM. 2014. Skilled reaching relies on a V2a propriospinal internal copy circuit. *Nature* 508: 357-63
- Barmack NH. 2003. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Research Bulletin* 60: 511-41
- Beloozerova IN, Sirota MG. 1993. The role of the motor cortex in the control of accuracy of locomotor movements in the cat. *Journal of physiology* 461: 1-25
- Betley JN, Wright CV, Kawaguchi Y, Erdelyi F, Szabo G, et al. 2009. Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit. *Cell* 139: 161-74
- Bieler L, Grassner L, Zaunmair P, Kreutzer C, Lampe L, et al. 2018. Motor deficits following dorsal corticospinal tract transection in rats: voluntary versus skilled locomotion readouts. *Heliyon* 4: 540
- Bortoff GA, Strick PL. 1993. Corticospinal Terminations in Two New-World Primates: Further Evidence That Corticomotoneuronal Connections Provide Part of the Neural Substrate for Manual Dexterity. *The Journal of Neuroscience* 13: 5105-19
- Bosco G, Poppele RE. 2001. Proprioception From a Spinocerebellar Perspective. *Physiological reviews* 81: 539-68
- Bourane S, Grossmann KS, Britz O, Dalet A, Del Barrio MG, et al. 2015. Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160: 503-15
- Bouvier J, Caggiano V, Leiras R, Caldeira V, Bellardita C, et al. 2015. Descending Command Neurons in the Brainstem that Halt Locomotion. *Cell* 163: 1191-203
- Brockett EG, Seenan PG, Bannatyne BA, Maxwell DJ. 2013. Ascending and descending propriospinal pathways between lumbar and cervical segments in the rat: evidence for a substantial ascending excitatory pathway. *Neuroscience* 240: 83-97
- Brownstone RM, Bui TV. 2010. Spinal interneurons providing input to the final common path during locomotion. *Progress in Brain Research* 187: 81-95
- Bui TV, Akay T, Loubani O, Hnasko TS, Jessell TM, Brownstone RM. 2013. Circuits for Grasping: Spinal dl3 Interneurons Mediate Cutaneous Control of Motor Behavior. *Neuron* 78: 191-204
- Burger C, Nguyen FN, Deng J, Mandel RJ. 2005. Systemic mannitol-induced hyperosmolality amplifies rAAV2-mediated striatal transduction to a greater extent than local co-infusion. *Mol Ther* 11: 327-31

- Burke D, Ashby P. 1971. Are Spinal "Presynaptic" Inhibitory Mechanisms Suppressed in Spasticity? *Journal of the neurological Sciences* 15: 321-26
- Caggiano V, Leiras R, Goni-Erro H, Masini D, Bellardita C, et al. 2018. Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. *Nature* 553: 455-60
- Carmel JB, Martin JH. 2014. Motor cortex electrical stimulation augments sprouting of the corticospinal tract and promotes recovery of motor function. *Front Integr Neurosci* 8: 51
- Carpenter D, Lundberg A, Norrsell U. 1963. Primary Afferent Depolarization Evoked from the Sensorimotor Cortex. *Acta physiol. scand.* 59: 126-42
- Cattaert D, El Manira A. 1999. Shunting versus Inactivation: Analysis of Presynaptic Inhibitory Mechanisms in Primary Afferents of the Crayfish. *The Journal of Neuroscience* 19: 6079–89
- Cattaert D, El Manira A, Clarac F. 1992. Direct Evidence for Presynaptic Inhibitory Mechanisms in Crayfish Sensory Merents. *Journal of neurophysiology* 67: 610-24
- Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P. 2007. Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nature Protocols*
- Chabrol FP, Blot A, Mrcic-Flogel TD. 2019. Cerebellar Contribution to Preparatory Activity in Motor Neocortex. *Neuron* 103: 506-19 e4
- Chiu YA, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, et al. 1995. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular and Cellular Neurosciences* 6: 349-62
- Choi JT, Jensen P, Nielsen JB, Bouyer LJ. 2016. Error signals driving locomotor adaptation: cutaneous feedback from the foot is used to adapt movement during perturbed walking. *J Physiol* 594: 5673-84
- Clark RM, Blizzard CA, Young KM, King AE, Dickson TC. 2017. Calretinin and Neuropeptide Y interneurons are differentially altered in the motor cortex of the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Sci Rep* 7: 44461
- Côté MP, Murray LM, Knikou M. 2018. Spinal control of locomotion: Individual neurons, their circuits and functions. In *Frontiers in Physiology*
- Courtine G, Bunge MB, Fawcett JW, Grossman RG, Kaas JH, et al. 2007. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nat Med* 13: 561-6

- Courtine G, Gerasimenko Y, van den Brand R, Yew A, Musienko P, et al. 2009. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat Neurosci* 12: 1333-42
- Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, et al. 2008. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med* 14: 69-74
- Cowley KC, Zaporozhets E, Schmidt BJ. 2010. Propriospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat. *Ann N Y Acad Sci* 1198: 42-53
- Crone SA, Quinlan KA, Zagoraoui L, Droho S, Restrepo CE, et al. 2008. Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron* 60: 70-83
- Crone SA, Zhong G, Harris-Warrick R, Sharma K. 2009. In mice lacking V2a interneurons, gait depends on speed of locomotion. *J Neurosci* 29: 7098-109
- D'Acunzo P, Badaloni A, Ferro M, Ripamonti M, Zimarino V, et al. 2014. A conditional transgenic reporter of presynaptic terminals reveals novel features of the mouse corticospinal tract. *Front Neuroanat* 7: 50
- Dal Canto MC, Gurney ME. 1994. Development of Central Nervous System Pathology in a Murine Transgenic Model of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American journal of Pathology* 145: 1271-79
- Darmohray DM, Jacobs JR, Marques HG, Carey MR. 2019. Spatial and Temporal Locomotor Learning in Mouse Cerebellum. *Neuron* 102: 217-31 e4
- Delwaide PJ, Figiel C, Richelle C. 1977. Effects of postural changes of the upper limb on reflex transmission in the lower limb. Cervicolumbar reflex interactions in man. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 40: 616-21
- Dietz V. 2002. Do human bipeds use quadrupedal coordination? *TRENDS in Neurosciences* 25: 462-67
- DiGiovanna J, Dominici N, Friedli L, Rigosa J, Duis S, et al. 2016. Engagement of the Rat Hindlimb Motor Cortex across Natural Locomotor Behaviors. *J Neurosci* 36: 10440-55
- Drew T, Rossignol S. 1987. A Kinematic and Electromyographic Study of Cutaneous Reflexes Evoked From the Forelimb of Unrestrained Walking Cats. *Journal of neurophysiology* 57: 1160-84

- Duenas SH, Rudomin P. 1988. Excitability changes of ankle extensor group Ia and Ib fibers during fictive locomotion in the cat. *Exp Brain Res* 70: 15-25
- Ebbesen CL, Brecht M. 2017. Motor cortex - To act or not to act? In *Nature Reviews Neuroscience*
- Eccles J. C. ERM, Magni F. . 1961. Central inhibitory action attributable to presynaptic depolarization produced by muscle afferent volleys. *J. Physiol.*
- Eccles JC, Oscarsson O, Willis WD. 1961. Synaptic action of group I and II afferent fibres of muscle on the cells of the dorsal spinocerebellar tract. *J. Physiol.* 158: 517-43
- Eccles JC, Schmidt RF, Willis WD. 1962. Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *Journal of physiology* 161: 282-97
- Eccles RM, Lundberg A. 1958. Integrative pattern of Ia synaptic actions on motoneurons of hip and knee muscles. *J. Physiol.* 144: 271-98
- Eccles RM, Lundberg A. 1959. Supraspinal control of interneurons mediating spinal reflexes. *J. Physiol.* 147: 565-84
- Economo MN, Viswanathan S, Tasic B, Bas E, Winnubst J, et al. 2018. Distinct descending motor cortex pathways and their roles in movement. *Nature* 563: 79-84
- Eisen A, Braak H, Del Tredici K, Lemon R, Ludolph AC, Kiernan MC. 2017. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88: 917-24
- Eisen A, Kim S, Pant B. 1992. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Phylogenetic Disease Of The Corticomotoneuron? *Muscle & nerve* 15: 219-28
- Eklof-Ljunggren E, Haupt S, Ausborn J, Dehnicsh I, Uhlen P, et al. 2012. Origin of excitation underlying locomotion in the spinal circuit of zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5511-6
- Enoka RM, Pearson KG. 2013. The Motor Unit and Muscle Action In *Principles Of Neural Science, Fifth Edition*, pp. 768-89
- Esposito MS, Capelli P, Arber S. 2014. Brainstem nucleus MdV mediates skilled forelimb motor tasks. *Nature* 508: 351-6
- Fierro B, Raimondo D, Modica A. 1991. F-wave study at different stimulation rates. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 6: 357-60
- Fink AJP, Croce KR, Huang ZJ, Abbott LF, Jessell TM, Azim E. 2014. Presynaptic inhibition of spinal sensory feedback ensures smooth movement. *Nature*



- Flynn JR, Graham BA, Galea MP, Callister RJ. 2011. The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury. *Neuropharmacology* 60: 809-22
- Fogarty MJ, Mu EW, Noakes PG, Lavidis NA, Bellingham MC. 2016. Marked changes in dendritic structure and spine density precede significant neuronal death in vulnerable cortical pyramidal neuron populations in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 4: 77
- Galinañes GL, Bonardi C, Huber D. 2018. Directional Reaching for Water as a Cortex-Dependent Behavioral Framework for Mice. *Cell Rep* 22: 2767-83
- Gao WJ, Zheng ZH. 2004. Target-specific differences in somatodendritic morphology of layer V pyramidal neurons in rat motor cortex. *J Comp Neurol* 476: 174-85
- Garcia-Rill E, Skinner RD. 1987. The mesencephalic locomotor region I. Activation of a medullary projection site. *Brain Research* 411: 1-12
- Gardner EP, Johnson KO. 2013. The Somatosensory System: Receptors and Central Pathways In *Principles Of Neural Science, Fifth Edition*, pp. 476-95
- Gatto G, Goulding M. 2018. Locomotion Control: Brainstem Circuits Satisfy the Need for Speed. *Curr Biol* 28: R256-R59
- Genc B, Jara JH, Lagrimas AK, Pytel P, Roos RP, et al. 2017. Apical dendrite degeneration, a novel cellular pathology for Betz cells in ALS. *Sci Rep* 7: 41765
- Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, et al. 2006. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440: 215-9
- Gossard JP, Cabelguen JM, Rossignol S. 1990. Phase-dependent modulation of primary afferent depolarization in single cutaneous primary afferents evoked by peripheral stimulation during fictive locomotion in the cat.
- Goulding M. 2009. Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nat Rev Neurosci* 10: 507-18
- Graham B, Redman S. 1994. A Simulation of Action Potentials in Synaptic Boutons During Presynaptic Inhibition. *Journal of neurophysiology* 71: 538-48
- Graziano MSA, Taylor CSR, Moore T. 2002. Complex Movements Evoked by Microstimulation of Precentral Cortex. *Neuron* 34: 841-51
- Grillner S. 2006. Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron* 52: 751-66

- Grillner S, Jessell TM. 2009. Measured motion: searching for simplicity in spinal locomotor networks. *Curr Opin Neurobiol* 19: 572-86
- Grillner S, Zangger P. 1979. On the Central Generation of Locomotion in the Low Spinal Cat. *Experimental Brain Research* 34: 241-61
- Gu Z, Kalambogias J, Yoshioka S, Han W, Li Z, et al. 2017. Control of species-dependent cortico-motoneuronal connections underlying manual dexterity. *Science*
- Guo JZ, Graves AR, Guo WW, Zheng J, Lee A, et al. 2015. Cortex commands the performance of skilled movement. *Elife* 4: e10774
- Guo ZV, Inagaki HK, Daie K, Druckmann S, Gerfen CR, Svoboda K. 2017. Maintenance of persistent activity in a frontal thalamocortical loop. *Nature* 545: 181-86
- Hantman AW, Jessell TM. 2010. Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal corollary circuit. *Nat Neurosci* 13: 1233-9
- Harrison M, O'Brien A, Adams L, Cowin G, Ruitenberg MJ, et al. 2013. Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *NeuroImage* 68: 22-29
- Heffner R, Masterton B. 1975. Variation in form of the pyramidal tract and its relationship to digital dexterity. *Brain Behav Evol* 12: 161-200
- Hira R, Terada S-I, Kondo M, Matsuzaki M. 2015. Distinct Functional Modules for Discrete and Rhythmic Forelimb Movements in the Mouse Motor Cortex. *Journal of Neuroscience*
- Hochman S, Shreckengost J, Kimura H, Quevedo J. 2010. Presynaptic inhibition of primary afferents by depolarization: observations supporting nontraditional mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1198: 140-52
- Horn KM, Pong M, Batni SR, Levy SM, Gibson AR. 2000. Functional Specialization Within the Cat Red Nucleus. *J Neurophysiol* 87: 469-77
- Huang CC, Sugino K, Shima Y, Guo C, Bai S, et al. 2013. Convergence of pontine and proprioceptive streams onto multimodal cerebellar granule cells. *Elife* 2: e00400
- Hultborn H, Illert M, Santi M. 1976. Convergence on Interneurones Mediating the Reciprocal Ia Inhibition of Motoneurones III. Effects from supraspinal pathways. *Acta physiol. scand.* 96: 368-91
- Illert M, Lundberg A, Tanaka R. 1977. Integration in Descending Motor Pathways Controlling the Forelimb in the Cat 3. Convergence on Propriospinal Neurones Transmitting Disynaptic Excitation from the Corticospinal Tract and Other Descending Tracts. *Experimental Brain Research* 29: 323-46

- Jankowska E. 1992. Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Progress in Neurobiology* 38: 335-78
- Jia M, Njapo SA, Rastogi V, Hedna VS. 2015. Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs* 29: 153-62
- Jiménez I, Rudomin P, Solodkin M. 1988. PAD patterns of physiologically identified afferent fibres from the medial gastrocnemius muscle. *Exp Brain Res* 71: 643-57
- Johal J, Loukas M, Oskouian RJ, Tubbs RS. 2018. The early history of our understanding of the functions of the spinal cord. *Childs Nerv Syst* 34: 2123-25
- Kamiyama T, Kameda H, Murabe N, Fukuda S, Yoshioka N, et al. 2015. Corticospinal tract development and spinal cord innervation differ between cervical and lumbar targets. *J. Neurosci.* 35: 1181-91
- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, et al. 2001. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104: 933-46
- Kandel E, Schwartz J, Jessell TM. 2013. 2000 Principles Of Neural Science-McGraw-Hill Medical (2000). *Igarss 2014*: 1-5
- Karadimas SK, Satkunendrarajah K, Laliberte AM, Ringuette D, Weisspapier I, et al. 2019. Sensory cortical control of movement. *Nat Neurosci* 23: 75-84
- Kawai R, Markman T, Poddar R, Ko R, Fantana AL, et al. 2015. Motor cortex is required for learning but not for executing a motor skill. *Neuron* 86: 800-12
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, et al. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377: 942-55
- Kim J, Hughes EG, Shetty AS, Arlotta P, Goff LA, et al. 2017a. Changes in the Excitability of Neocortical Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Not Specific to Corticospinal Neurons and Are Modulated by Advancing Disease. *J Neurosci* 37: 9037-53
- Kim LH, Sharma S, Sharples SA, Mayr KA, Kwok CHT, Whelan PJ. 2017b. Integration of Descending Command Systems for the Generation of Context-Specific Locomotor Behaviors. *Front Neurosci* 11: 581
- King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MT, Vickers JC. 2016. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol* 275 Pt 1: 162-71

- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, et al. 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466: 622-6
- Kriellaars DJ, Brownstone RM, Noga BR, Jordan LM. 1994. Mechanical Entrainment of Fictive Locomotion in the Decerebrate Cat. *Journal of neurophysiology* 71: 2074-86
- Kuypers HGJM. 1982. A New Look at the Organization of the Motor System. *Progress in Brain Research* 57: 381-403
- LaBella LA, Niechaj A, Rossignol S. 1992. Low-threshold, short-latency cutaneous reflexes during fictive locomotion in the "semi-chronic" spinal cat. *Exp Brain Res* 91: 236-48
- Lai HC, Seal RP, Johnson JE. 2016. Making sense out of spinal cord somatosensory development. *Development* 143: 3434-48
- Laliberte AM, Goltash S, Lalonde NR, Bui TV. 2019. Propriospinal Neurons: Essential Elements of Locomotor Control in the Intact and Possibly the Injured Spinal Cord. *Front Cell Neurosci* 13: 512
- Lamotte d'incamps B, Meunier C, Monnet M-L, Jami L, Zytnicki D. 1998. Reduction of Presynaptic Action Potentials by PAD: Model and Experimental Study. *Journal of Computational Neuroscience* 5: 141-56
- Lavoie S, Trevor D. 2002. Discharge Characteristics of Neurons in the Red Nucleus During Voluntary Gait Modifications: A Comparison with the Motor Cortex. *J Neurophysiol* 88: 1791-814
- Lee S, Toda T, Kiyama H, Yamashita T. 2014. Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell death & disease*
- Lemon RN. 2008. Descending Pathways in Motor Control. *Annual Review of Neuroscience* 31: 195-218
- Leroy T, Brown J. 1971. Projections and Termination of the Corticospinal Tract in Rodents. *Exp. Brain Res.* 13: 432--50
- Leyton ASF, Sherrington CS. 1917. Observations on the excitable cortex of the chimpanzee, orang-utan, and gorilla. *Journal of experimental physiology* 11: 135-222
- Li C-X, Waters RS. 1991. Organization of the mouse motor cortex studied by retrograde tracing and intracortical microstimulation (ICMS) mapping. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 18: 28-38

- Liang H, Paxinos G, Watson C. 2012. The red nucleus and the rubrospinal projection in the mouse. *Brain Struct Funct* 217: 221-32
- Libbrecht S, Van den Haute C, Malinouskaya L, Gijbbers R, Baekelandt V. 2017. Evaluation of WGA–Cre-dependent topological transgene expression in the rodent brain. *Brain Structure and Function* 222: 717–33
- Liu J, Akay T, Hedlund PB, Pearson KG, Jordan LM. 2009. Spinal 5-HT7 receptors are critical for alternating activity during locomotion: in vitro neonatal and in vivo adult studies using 5-HT7 receptor knockout mice. *J Neurophysiol* 102: 337-48
- Liu J, Jordan LM. 2005. Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT7 and 5-HT2A receptors. *J Neurophysiol* 94: 1392-404
- Liu Y, Latremoliere A, Li X, Zhang Z, Chen M, et al. 2018. Touch and tactile neuropathic pain sensitivity are set by corticospinal projections. *Nature* 561: 547-50
- Ljunggren EE, Haupt S, Ausborn J, Ampatzis K, El Manira A. 2014. Optogenetic activation of excitatory premotor interneurons is sufficient to generate coordinated locomotor activity in larval zebrafish. *J Neurosci* 34: 134-9
- Lopez-Bendito G, Sturgess K, Erdelyi F, Szabo G, Molnar Z, Paulsen O. 2004. Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb Cortex* 14: 1122-33
- Lorenzo LE, Ramien M, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A. 2008. Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol* 508: 592-604
- Low LK, Liu XB, Faulkner RL, Coble J, Cheng HJ. 2008. Plexin signaling selectively regulates the stereotyped pruning of corticospinal axons from visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8136-41
- Lundberg A. 1964. Supraspinal Control of Transmission in Reflex Paths to Motoneurons and Primary Afferents. 12: 197-221
- MacKinnon CD. 2018. Sensorimotor anatomy of gait, balance, and falls. *Handb Clin Neurol* 159: 3-26
- Maekawa S, Al-Sarraj S, Kibble M, Landau S, Parnavelas J, et al. 2004. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain* 127: 1237-51
- Magendie F. 1822. Expériences sur les fonctions des racines des nerfs rachidiens. *Journal de physiologie expérimentale et pathologique*: 276–9

- Mao T, Kusefoglou D, Hooks BM, Huber D, Petreanu L, Svoboda K. 2011. Long-range neuronal circuits underlying the interaction between sensory and motor cortex. *Neuron* 72: 111-23
- Martin JH, Ghez C. 1988. Red nucleus and motor cortex parallel motor systems for the initiation and control of skilled movement. *Behavioural Brain Research* 28: 217-23
- Maxwell DJ, Belle MD, Cheunsuang O, Stewart A, Morris R. 2007. Morphology of inhibitory and excitatory interneurons in superficial laminae of the rat dorsal horn. *The Journal of physiology* 584: 521-33
- McComas AJ. 2016. Hypothesis: Hughlings Jackson and presynaptic inhibition: is there a big picture? *J Neurophysiol* 116: 41-50
- Mendell LM. 2014. Constructing and deconstructing the gate theory of pain. *Pain* 155: 210-6
- Mesnager B, Gaillard S, Godin AG, Rodeau J-L, Hammer M, et al. 2011. Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord. *The Journal of comparative neurology* 519: 3139-58
- Mesrati F, Vecchierini MF. 2004. F-waves: neurophysiology and clinical value. *Neurophysiol Clin* 34: 217-43
- Meunier S, Pierrot-Deseilligny E. 1989. Gating of the afferent volley of the monosynaptic stretch reflex during movement in man. *Journal of Physiology* 419: 753-63
- Miles GB, Hartley R, Todd AJ, Brownstone RM. 2007. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2448-53
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 66: 355-474
- Miller S, Van Der Burg J, Van Der Meché FGA. 1975. Coordination of movements of the hindlimbs and forelimbs in different forms of locomotion in normal and decerebrate cats. *Brain Res* 91: 217-37
- Miri A, Warriner CL, Seely JS, Elsayed GF, Cunningham JP, et al. 2017. Behaviorally Selective Engagement of Short-Latency Effector Pathways by Motor Cortex. *Neuron*
- Moreno-Lopez Y, Olivares-Moreno R, Cordero-Erausquin M, Rojas-Piloni G. 2016. Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat* 10: 24
- Moreno-Lopez Y, Perez-Sanchez J, Martinez-Lorenzana G, Condes-Lara M, Rojas-Piloni G. 2013. Cortical presynaptic control of dorsal horn C-afferents in the rat. *PLoS One* 8: e69063

- Morris R, Vallester KK, Newton SS, Kearsley AP, Whishaw IQ. 2015. The differential contributions of the parvocellular and the magnocellular subdivisions of the red nucleus to skilled reaching in the rat. *Neuroscience* 295: 48-57
- Muir GD, Whishaw IQ. 1999. Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behavioural Brain Research*
- Murabe N, Mori T, Fukuda S, Isoo N, Ohno T, et al. 2018. Higher primate-like direct corticomotoneuronal connections are transiently formed in a juvenile subprimate mammal. *Sci Rep* 8: 16536
- Nathan PW, Smith M, Deacon P. 1996. Vestibulospinal, reticulospinal and descending propriospinal nerve fibres in man. *Brain* 119: 1809–33
- Ni Y, Nawabi H, Liu X, Yang L, Miyamichi K, et al. 2014. Characterization of long descending premotor propriospinal neurons in the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 9404-17
- Noga BR, Kriellaars DJ, Brownstone RM, Jordan LM. 2003. Mechanism for Activation of Locomotor Centers in the Spinal Cord by Stimulation of the Mesencephalic Locomotor Region. *J Neurophysiol* 90: 1464–78
- Olivares-Moreno R, Moreno-Lopez Y, Concha L, Martinez-Lorenzana G, Condes-Lara M, et al. 2017. The rat corticospinal system is functionally and anatomically segregated. *Brain Struct Funct* 222: 3945-58
- Oswald MJ, Tantirigama ML, Sonntag I, Hughes SM, Empson RM. 2013. Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Front Cell Neurosci* 7: 174
- Oudega M, Perez MA. 2012. Corticospinal reorganization after spinal cord injury. *J Physiol* 590: 3647-63
- Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Guzel M, Brown RH, Jr., Macklis JD. 2011. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31: 4166-77
- Paixao S, Loschek L, Gaitanos L, Alcala Morales P, Goulding M, Klein R. 2019. Identification of Spinal Neurons Contributing to the Dorsal Column Projection Mediating Fine Touch and Corrective Motor Movements. *Neuron*
- Pawlowski Sa, Gaillard S, Ghorayeb I, Ribeiro-da-Silva a, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. 2013. A Novel Population of Cholinergic Neurons in the Macaque Spinal Dorsal Horn

- of Potential Clinical Relevance for Pain Therapy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 3727-37
- Pearson KG, Ramirez JM, Jiang W. 1992. Entrainment of the locomotor rhythm by group Ib afferents from ankle extensor muscles in spinal cats. *Exp Brain Res* 90: 557-66
- Penfield W, Boldrey E. 1937. somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *A Journal of Neurology* 60, 389-443
- Person AL. 2019. Corollary Discharge Signals in the Cerebellum. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 4: 813-19
- Philips T, Rothstein JD. 2015. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol* 69: 5 67 1-5 67 21
- Quevedo J, Eguibar JR, Jimenez I, Rudomin P. 1995. Raphe magnus and reticulospinal actions on primary afferent depolarization of group I muscle afferents in the cat. *Journal of Physiology* 482: 623-40
- Ravits J, Paul P, Jorg C. 2007. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* 68: 1571-5
- Reed WR, Shum-Siu A, Onifer SM, Magnuson DS. 2006. Inter-enlargement pathways in the ventrolateral funiculus of the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 142: 1195-207
- Reed WR, Shum-Siu A, Whelan A, Onifer SM, Magnuson DS. 2009. Anterograde labeling of ventrolateral funiculus pathways with spinal enlargement connections in the adult rat spinal cord. *Brain Res* 1302: 76-84
- Rexed B. 1952. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 96: 414-95
- Rexed B. 1954. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 100
- Ribeiro-Da-Silva A, Cuello CA. 1990. Choline Acetyltransferase-Immunoreactive Profiles Are Presynaptic to Primary Sensory Fibers in the Rat Superficial Dorsal Horn. *Journal of Comparative Neurology* 295: 370-38
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, et al. 1999. The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251-55
- Roseberry TK, Lee AM, Lalive AL, Wilbrecht L, Bonci A, Kreitzer AC. 2016. Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. *Cell* 164: 526-37
- Rossignol S, Dubuc R, Gossard JP. 2006. Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86: 89-154



- Roudaut Y, Lonigro A, Coste B, Hao J, Delmas P, Crest M. 2012. Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels (Austin, Tex.)* 6: 234-45
- Rudomin P. 1990. Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in the mammalian spinal cord. *TINS* 13
- Rudomin P, Schmidt RF. 1999. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. In *Experimental Brain Research*, pp. 1-37
- Rudomin P, Solodkin M, Jiménez I. 1986. PAD and PAH Response Patterns of Group Ia- and Ib-Fibers to Cutaneous and Descending Inputs in the Cat Spinal Cord. *Journal of neurophysiology* 56: 987-1006
- Russo RE, Delgado-Lezama R, Hounsgaard J. 2000. Dorsal root potential produced by a TTX-insensitive micro-circuitry in the turtle spinal cord. *Journal of Physiology* 528: 115–22
- Ryczko D, Dubuc R. 2013. The Multifunctional Mesencephalic Locomotor Region. *Current Pharmaceutical Design*, 19: 4448-70
- Saba L, Viscomi MT, Caioli S, Pignataro A, Bisicchia E, et al. 2016. Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cereb Cortex* 26: 1512-28
- Sakla FB. 1969. Quantitative Studies on the Postnatal Growth of the Spinal Cord and the Vertebral Column of the Albino Mouse. *Journal of Comparative Neurology* 136: 237-52
- Sasaki S, Iwata M. 1999. Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 268: 29-32
- Sathyamurthy A, Barik A, Dobrott CI, Matson KJE, Stoica S, et al. 2020. Cerebellospinal Neurons Regulate Motor Performance and Motor Learning. *Cell Rep* 31: 107595
- Seki K, Fetz EE. 2012. Gating of sensory input at spinal and cortical levels during preparation and execution of voluntary movement. *J Neurosci* 32: 890-902
- Seki K, Perlmutter SI, Fetz EE. 2003. Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement. *Nature Neuroscience* 6: 1309–16
- Shadmehr R, Smith MA, Krakauer JW. 2010. Error correction, sensory prediction, and adaptation in motor control. *Annu Rev Neurosci* 33: 89-108
- Shibuya K, Park SB, Geevasinga N, Menon P, Howells J, et al. 2016. Motor cortical function determines prognosis in sporadic ALS. *Neurology* 87: 513-20



- Shumway-Cook A, Woollacott MH. 2007. Motor control, third edition: Issues and Theories.
- Stanfield BB. 1992. The development of the corticospinal projection. *Progress in Neurobiology* 38: 169-202
- Starkey ML, Barritt AW, Yip PK, Davies M, Hamers FP, et al. 2005. Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol* 195: 524-39
- Stepien AE, Tripodi M, Arber S. 2010. Monosynaptic Rabies Virus Reveals Premotor Network Organization and Synaptic Specificity of Cholinergic Partition Cells. *Neuron* 68: 456-72
- Stokke MF, Nissen UV, Glover JC, Kiehn O. 2002. Projection patterns of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of the neonatal rat. *J Comp Neurol* 446: 349-59
- Stuart GJ, Redman SJ. 1992. The role of gabaa and gabab receptors in presynaptic inhibition of ia epsps in cat spinal motoneurons. *Journal of Physiology* 447: 675-92
- Svoboda K, Li N. 2018. Neural mechanisms of movement planning: motor cortex and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 49: 33-41
- Swinnen B, Robberecht W. 2014. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10: 661-70
- Tahayori B, Koceja DM. 2012. Activity-dependent plasticity of spinal circuits in the developing and mature spinal cord. *Neural Plast* 2012: 964843
- Takeoka A, Arber S. 2019. Functional Local Proprioceptive Feedback Circuits Initiate and Maintain Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury. *Cell Rep* 27: 71-85 e3
- Taylor JP, Brown RH, Jr., Cleveland DW. 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539: 197-206
- Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, et al. 2011. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex* 21: 865-76
- Terashima T. 1995. Anatomy, development and lesion-induced plasticity of rodent corticospinal tract. *Neuroscience Research* 22: 139- 161
- Todd AJ. 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11: 823-36
- Tohyama T, Kinoshita M, Matsui R, Kato S, Isa K, et al. 2017. Contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after the corticospinal tract lesion in the monkey Behavioral analysis. 100

- Tuthill JC, Azim E. 2018. Proprioception. *Curr Biol* 28: R194-R203
- Ueno M, Nakamura Y, Li J, Gu Z, Niehaus J, et al. 2018. Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Rep* 23: 1286-300 e7
- Vahlsing HL, Feringa ER. 1980. A Ventral Uncrossed Corticospinal Tract in the Rat. *Experimental neurology* 70: 282-87
- Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2005. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2: 147-59
- Van Kan PLE, Mccurdy ML. 2000. Role of Primate Magnocellular Red Nucleus Neurons in Controlling Hand Preshaping During Reaching to Grasp. *The American Physiological Society*
- Vogelaar CF, Estrada V. 2016. Experimental Spinal Cord Injury Models in Rodents: Anatomical Correlations and Assessment of Motor Recovery.
- von Engelhardt J, Eliava M, Meyer aH, Rozov a, Monyer H. 2007. Functional Characterization of Intrinsic Cholinergic Interneurons in the Cortex. *Journal of Neuroscience* 27: 5633-42
- Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC. 2008. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131: 1540-50
- Wagle-Shukla A, Ni Z, Gunraj CA, Bahl N, Chen R. 2009. Effects of short interval intracortical inhibition and intracortical facilitation on short interval intracortical facilitation in human primary motor cortex. *J Physiol* 587: 5665-78
- Wall PD. 1958. Excitability changes in afferent fibre terminations and their relation to slow potentials. *J. Physiol.* 142: 1-21
- Wall PD, Lidierth M. 1997. Five Sources of a Dorsal Root Potential: Their Interactions and Origins in the Superficial Dorsal Horn. *The American Physiological Society* 78: 860–71
- Walmsley B, Graham B, Nicol MJ. 1995. Serial E-M and Simulation Study of Presynaptic Inhibition Along a Group Ia Collateral in the Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* 74: 616-23
- Wang-Bennett LT, Glantz RM. 1985. Presynaptic inhibition in the crayfish brain II. Morphology and ultrastructure of the terminal arborization. *J Comp Physiol A* 156: 605-17

- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzakia H, et al. 2002. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Developmental Brain Research* 139: 59–66
- Wang X, Liu Y, Li X, Zhang Z, Yang H, et al. 2017. Deconstruction of Corticospinal Circuits for Goal-Directed Motor Skills. *Cell* 171: 440-55 e14
- Watson AHD, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. 1991. GABA and glutamate-like immunoreactivity in processes presynaptic to afferents from hair plates on the proximal joints of the locust leg. *Journal of Neurocytology* 20: 796-809
- Watson C, Harvey AR. 2009. Projections from the Brain to the Spinal Cord. *The Spinal Cord*
- Weidner N, Ner A, Salimi N, Tuszynski MH. 2001. Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3513-8
- Welniarz Q, Dusart I, Roze E. 2016. The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Developmental neurobiology*
- Whelan PJ. 1996. Control of locomotion in the decerebrate cat. *Progress in Neurobiology* 49: 481-515
- Whishaw IQ, Pellis SM, Gomy B, Kolb B, Tetzlaff W. 1993. Proximal and distal impairments in rat forelimb use in reaching follow unilateral pyramidal tract lesions. *Behavioural Brain Research* 56: 59-76
- Windhorst U. 2007. Muscle proprioceptive feedback and spinal networks. *Brain Research Bulletin* 73: 155-202
- Witney AG, Wing A, Thonnard JL, Smith AM. 2004. The cutaneous contribution to adaptive precision grip. *Trends Neurosci* 27: 637-43
- Wolpert DM, Kawato M. 1998. Multiple paired forward and inverse models for motor control. *Neural Networks* 11: 1317–29
- Wolpert DM, Miall RC, Kawato M. 1998. Internal models in the cerebellum. *Trends in Cognitive Sciences* 2: 338-47
- Yang HW, Lemon RN. 2003. An electron microscopic examination of the corticospinal projection to the cervical spinal cord in the rat: lack of evidence for cortico-motoneuronal synapses. *Exp Brain Res* 149: 458-69
- Yasvoina MV, Genc B, Jara JH, Sheets PL, Quinlan KA, et al. 2013. eGFP Expression under UCHL1 Promoter Genetically Labels Corticospinal Motor Neurons and a Subpopulation of

- Degeneration-Resistant Spinal Motor Neurons in an ALS Mouse Model. *Journal of Neuroscience* 33: 7890-904
- Zagoraiou L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM, Miles GB. 2009. A Cluster of Cholinergic Premotor Interneurons Modulates Mouse Locomotor Activity. *Neuron* 64: 645-62
- Zang DW, Cheema SS. 2002. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1G93A G1H transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis *Neuroscience Letters* 332 99–102
- Zaporozhets E, Cowley KC, Schmidt BJ. 2011. Neurochemical excitation of propriospinal neurons facilitates locomotor command signal transmission in the lesioned spinal cord. *J Neurophysiol* 105: 2818-29
- Zelenin PV, Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG. 2010. Activity of red nucleus neurons in the cat during postural corrections. *J Neurosci* 30: 14533-42
- Zhang W, Zhang L, Liang B, Schroeder D, Zhang ZW, et al. 2016. Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* 19: 557-59



## Caractérisation de la voie cortico-spinale et son implication dans l'intégration sensori-motrice

### Résumé

Un mouvement coordonné repose non seulement sur une commande motrice appropriée, mais aussi sur l'analyse en direct des informations multi-sensorielles reçues. Le tractus cortico-spinal (CST) est soupçonné d'être responsable de ces fonctions. Le but de ma thèse a été de comprendre comment le contrôle cortical des entrées sensorielles s'organise autour de la commande motrice pour produire des comportements coordonnés.

En étudiant les voies corticofuges, nous avons découvert que les contrôles moteur et sensoriel proviennent de la même zone corticale mais suivent ensuite des voies séparées. Nous avons montré que la commande motrice des membres postérieurs est principalement relayée par les centres moteurs supra-spinaux sous-corticaux, et n'est que partiellement encodée par le CST via un relais proprio-spinal rostral. En revanche, les neurones cortico-spinaux sont essentiels pour le contrôle sensoriel, qu'ils réalisent directement par l'intermédiaire d'une population d'interneurones lombaires. Cette nouvelle compréhension des fonctions de la voie cortico-spinale est fondamentale pour l'appréhension des maladies affectant le CST.

### Summary

A coordinated movement relies not only on a proper motor command, but also on the online analysis of a constant multi-sensory feedback. It has recently been hypothesized that the corticospinal tract (CST) could be responsible for such functions. The goal of my thesis was to unravel how the cortical filtering of sensory inputs hinges on the cortical motor command to produce well-coordinated behaviors.

By sequentially investigating different stages of the corticofugal circuits, we found that both the motor and sensory control both originate from the same cortical area but then follow segregated paths. We showed that the hindlimb motor command is mainly relayed through subcortical supraspinal motor centers, and is only partly encoded by the CST via a propriospinal relay in the rostral spinal cord. In contrast, corticospinal neurons are essential for sensory control and execute it directly through a population of lumbar interneurons. This new understanding of the functions of the CST is fundamental for the study of diseases such as amyotrophic lateral sclerosis.