

N° d'ordre : 3288

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DU VIVANT, GEOSCIENCES,

SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par *Laurent JUVIN*

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : *Neurosciences et Neuropharmacologie*

ADAPTABILITE FONCTIONNELLE DES ACTES MOTEURS :
COORDINATIONS PROPRIOSPINALES ET AJUSTEMENTS DES RESEAUX
LOCOMOTEURS CENTRAUX PAR LE TRAITEMENT DES INFORMATIONS SENSORIELLES

Soutenue le : 11 décembre 2006

Après avis de :

M. R. DUBUC, Professeur, Université du Québec, Montréal

M. D. ORSAL, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

M. J.-M. CABELGUEN, Professeur, Université Bordeaux 1

M. J.-R. CAZALETS, Directeur de Recherche au CNRS, Bordeaux

M. R. DUBUC, Professeur, Université du Québec, Montréal

M. D. MORIN, Maître de Conférences, Université Bordeaux 1

M. D. ORSAL, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

Président

Examinateurs

2006

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Bernard Bioulac pour nous avoir accueilli, au début de ma thèse, au sein de l'UMR 5543 "Physiologie et Physiopathologie de la Signalisation Cellulaire". Les projets de recherche que j'ai mené durant ces années doctorales ont pu être développés grâce à cet environnement si particulier que nous avons trouvé dans ce laboratoire et pour cela je tiens à vous renouveler ma gratitude.

Ce travail de thèse n'aurait bien sûr pas eu le jour sans l'expertise scientifique des membres du groupe de Neurobiologie Adaptative des Systèmes Moteurs que je tiens à remercier personnellement tant sur le plan professionnel que humain... Je me dois de rendre hommage au grand "chaman"¹, merci à toi John, *of course* pour tes précieux conseils scientifiques, mais surtout pour ta gentillesse.

Je te remercie du fond du cœur Didier, toi qui auras su me guider (avec patience) d'une rencontre houleuse en TD (si si...) jusqu'à aujourd'hui. Sache que réaliser ma thèse sous ta direction restera l'un des meilleurs "moments" de ma vie.

Merci à vous tous membres du NASM, Denis toi qui allie rigueur scientifique et imitations inimitables, Didier pour tes scripts sans lesquels la majorité de mes analyses n'aurait pas pu être réalisé, Romuald sans qui le "test t" serait resté à mes yeux un test pour rongeurs en quête de "pellets", Marie-jeanne pour ta bonne humeur et ton rire communicatif qui résonne encore dans mes oreilles, Christian pour ta sympathie et ta chaleur Marseillaise et enfin Morgane (la petite dernière) qui m'avait si gentiment initié aux rouages subtils de powerpoint. Sachez que votre joie de vivre m'a énormément apporté tout au long de ces années et que je garderai de vous tous un souvenir impérissable (minimum).

Je suis également très reconnaissant envers les professeurs Réjean Dubuc et Didier Orsal pour m'avoir fait l'honneur de rapporter mon manuscrit de thèse. Je souhaite également remercier le professeur Jean-Marie Cabelguen et le docteur Jean-René Cazalets pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à l'ensemble des membres de l'UMR 5543, travailler au sein de ce laboratoire aura été une réelle chance pour moi. Je souhaite plus particulièrement remercier les "utilisateurs" de la pièce n°9 (Sandrine, Anne, Liliana, Rachida et Jérôme) pour m'avoir si souvent supporté notamment au cours de ces derniers mois et pour avoir fait de mes séances d'étirage un vrai moment de détente... Je n'oublie pas bien sûr Pierre Ciret dont les compétences en électronique m'ont permis de reprendre mes travaux moins d'un mois après notre déménagement.

¹ CHAMAN. Prêtre magicien qui pratique la transe, la divination, les soins médicaux, en relation avec une force supranaturelle avec laquelle il entre en contact au travers d'un voyage mystique (le chaman est spécifique des religions traditionnelles des ethnies de l'Asie septentrionale ; mais on trouve des chamans dans d'autres sociétés, par exemple en Nouvelle-Zélande). (source : <http://fr.wikipedia.org>)

Enfin, je remercie tous les étudiants et amis que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces années Bordelaises. Lionel avec qui j'ai la chance de pouvoir déliurer depuis quelques 24 longues années, je ferais bien un long discours sur l'histoire de notre Amitié, ses hauts et ses bas, mais je sais que tu penses à ce que je pense, alors à quoi bon. Néric que j'ai eu le bonheur de côtoyer au cours de mes dernières années Universitaires, tu es et resteras toujours "the Gleux". Un coucou aux amoureux Aude et David ; Aude, certes nous sommes souvent en désaccord mais tu comprendras que globalement j'avais raison. Merci à toi, Aurore pour ta gentillesse, tu peux être sûre que je garderai une trace de toi (tout au moins sur ma table de manip ☺). Je tiens également à te remercier Temakizushji, à la fois pour ta disponibilité et ta constance au cours de ces années. Mélissa (nos débats autour d'un bon repas me manquent déjà, ou alors c'est nos repas autour d'un bon débat...), Marc & Delphine, merci d'avoir survécu à mes piètres performances au micro ou sur le "dance floor"...Un ch'tit coucou à Aude P., rendez-vous à Montréal. Pour conclure : à tous les accros du resto Jap : "Banzaï...!"

Je dois bien sur rendre hommage à l'un de mes compagnons de "gamelle", Guillaume j'espère que tu auras apprécié autant que moi nos déjeuner au RU, je dois bien avouer que ton approche Newtonienne du rebond du verre aura fortement influencé mes années de thèse... Une grande pensée pour Estelle, Bérangère, Mélanie, Benjamin, Anna et tous les étudiants de l'UMR5543.

Enfin, je tiens à profiter de ces quelques lignes pour rendre un court hommage à mes Parents, je sais tout ce que je vous doit pour m'avoir toujours soutenu, parvenir jusqu'à cette thèse n'a été possible que grâce à vous et à vos encouragements... Une pensée à l'ensemble de ma famille, Marie-jeanne (ma grand-mère), Nicole (ma tata) et Adrien (mon zinou) ; Isa et Laurent ; Florence et Manu ; Nathalie et Sébastien.

Vaea, puisque la tradition me le permet et que mon cœur me l'impose, je voudrais remercier la petite tempête polynésienne qui a chamboulé ma vie bien ordonnée. Tu as su donner du goût à ma vie (sushi-addict) et une raison de ne rien regretter, que ces 6 ans de bonheur ne soient que le pâle reflet d'une incroyable aventure...ensembles.

Je remercie l'Association "Demain Debout" et sa Présidente Jeannine Genestoux pour leur soutien financier au cours de ma première année de thèse. C'est grâce à votre aide que j'ai pu entreprendre ces travaux et je vous en remercie de tout coeur. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à l'Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale" (IRME), à son Président, le Professeur Marc Tadié et au Président du Conseil Scientifique, le Professeur François Clarac, pour la confiance dont ils ont fait preuve en me finançant durant ces années doctorales. Enfin, je n'oublie pas les bénévoles et donateurs, je sais tout l'investissement personnel qui a pu être nécessaire pour me financer durant ces trois années... merci à vous tous!

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	5
SOMMAIRE DES FIGURES	7
RESUME	10
ABSTRACT	10
ABRÉVIATIONS	11
PROBLEMATIQUE ET PRESENTATION DU MEMOIRE	12
INTRODUCTION GENERALE : LA LOCOMOTION	14
I) PRINCIPES FONDAMENTAUX ET ORGANISATION GENERALE DE LA LOCOMOTION	15
A) DESCRIPTION DU CYCLE LOCOMOTEUR.....	15
B) ALLURES LOCOMOTRICES ET COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES :	15
C) ORGANISATION CENTRALE ET PERIPHERIQUE DE LA LOCOMOTION	16
1) L'étage supraspinal.....	17
2) L'étage spinal.....	18
3) L'étage périphérique : contrôle sensoriel et rôle du cervelet.....	18
D) ADAPTABILITE DE LA LOCOMOTION.....	20
1) L'adaptabilité à court terme : le système sensoriel.....	21
2) L'adaptabilité à moyen terme : la neuromodulation.....	22
3) L'adaptabilité à long terme : maturation, développement et réorganisation du système locomoteur.....	23
II) LES RESEAUX LOCOMOTEURS SPINAUX : UN SIECLE D'ETUDE	24
A) LA NAISSANCE D'UN CONCEPT : LES CPGS LOCOMOTEURS	24
B) LOCALISATION SPINALE DES CPGS.....	25
C) ORGANISATION DES CPGS : OUVRIR LA "BOITE NOIRE"	27
1) Les interneurons excitateurs :.....	27
2) Les interneurons inhibiteurs :.....	29
3) Les motoneurons :.....	31
III) COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES / INTERSEGMENTAIRES :.....	32
A) LES INVERTEBRES ET VERTEBRES INFERIEURS :.....	32
1) Théories et mécanismes:.....	33
2) Rôle des afférences sensorielles dans les coordinations intersegmentaires.....	34
B) LES VERTEBRES SUPERIEURS :.....	35
1) Les coordinations intersegmentaires spinales :.....	35
2) Rôle des afférences : périphériques et supraspinales.....	36
MATERIELS & METHODES	38
I) EXPERIENCES IN VIVO :.....	39
A) LE RAT NOUVEAU-NE :	39
B) LE RAT JUVENILE :	39
II) EXPERIENCES IN VITRO :.....	40
A) BREF HISTORIQUE DE LA PREPARATION	40
B) LES PREPARATIONS DE MOELLE EPINIÈRE ISOLEE :	41

C) MILIEUX DE SURVIE (LCRA & MILIEU SUCROSE).....	42
- le liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRA) :	42
- le milieu sucrose :	42
- le milieu bas calcium haut magnésium :	43
- barrières & sections :	43
D) L'INITIATION DE LA LOCOMOTION	43
- par la pharmacologie :	43
- par la stimulation électrique des racines dorsales (DR) :	43
- par la stimulation électrique des structures supra-spinales :	44
E) ENREGISTREMENTS EXTRA & INTRACELLULAIRES :	44
- enregistrements extracellulaires par des électrodes "en passant" :	44
- enregistrements intracellulaires (technique "patch-clamp" cellule entière):	45
F) ANALYSES STATISTIQUES :	45
- statistiques :	45
OBJECTIFS DE RECHERCHE	47
RESULTATS.....	48
CHAPITRE I :	49
COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES CHEZ LES MAMMIFERES : ROLE DES CONNEXIONS PROPRIOSPINALES	49
- RESUME :	49
- INTRODUCTION :	49
- MATERIELS ET METHODES :	50
- RESULTATS :	51
- DISCUSSION :	55
CHAPITRE II :	59
COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES CHEZ LES MAMMIFERES : IMPLICATION DES RELAIS THORACIQUES	59
- RESUME :	59
- INTRODUCTION :	59
- MATERIELS ET METHODES :	60
- RESULTATS :	61
- DISCUSSION :	63
CHAPITRE III :	65
RYTHMOGENESE LOCOMOTRICE CHEZ LE RAT NOUVEAU-NE : DES OSCILLATEURS SYMETRIQUES POUR LA FLEXION ET L'EXTENSION	65
- RESUME :	65
- INTRODUCTION :	66
- MATERIELS ET METHODES :	67
- RESULTATS :	67
- DISCUSSION :	70
CHAPITRE IV :	74
COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES CHEZ LES MAMMIFERES : IMPLICATION DES AFFERENCES SENSORIELLES PROPRIOCEPTIVES	74
- RESUME :	74
- INTRODUCTION :	75
- MATERIELS ET METHODES :	76
- RESULTATS :	76
- DISCUSSION :	82
DISCUSSION GENERALE.....	85
- LES PRINCIPAUX RESULTATS	86
- VOIES DIRECTES ET INDIRECTES : UNE REDONDANCE DES SYSTEMES MOTEURS ?	87
- LESIONS SPINALES : DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE AUX ESSAIS CLINIQUES	91
BIBLIOGRAPHIE.....	96
ANNEXE.....	115
PROPRIOSPINAL CIRCUITRY UNDERLYING INTERLIMB COORDINATION IN MAMMALIAN QUADRUPEDAL LOCOMOTION	116

LOCOMOTOR RHYTHMOGENESIS IN THE ISOLATED POSTNATAL RAT SPINAL CORD: A PHASE-COUPLED SET OF SYMMETRICAL FLEXION-EXTENSION OSCILLATORS	128
DESCENDING RESPIRATORY POLYSYNAPTIC INPUTS TO CERVICAL AND THORACIC MOTONEURONS DIMINISH DURING EARLY POSTNATAL MATURATION IN RAT SPINAL CORD	161

SOMMAIRE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

<i>Figure 1</i> : Schéma d'organisation global du système locomoteur.....	12
<i>Figure 2</i> : Le cycle locomoteur chez le chat.....	15
<i>Figure 3</i> : Quelques exemples d'allures locomotrices chez différentes espèces	16
<i>Figure 4</i> : Structures centrales et voies de connexions impliquées dans la locomotion.....	17
<i>Figure 5</i> : Les structures supraspinales impliquées dans la locomotion chez le chat	18
<i>Tableau 1</i> : Différentes voies proprioceptives et sensorielles et leurs implications dans la locomotion.	19
<i>Figure 6</i> : Réorganisation des afférences sensorielles réflexes au cours de la locomotion.....	20
<i>Tableau 2</i> : Principaux acteurs impliqués dans le contrôle des CPGs locomoteurs spinaux	22
<i>Figure 7</i> : Différents modes de locomotion de <i>xenopus laevis</i> au cours du développement.....	23
<i>Figure 8</i> : Organisation segmentaire des CPGs locomoteurs spinaux chez la lamproie.....	25
<i>Figure 9</i> : Localisation des CPGs locomoteurs spinaux des membres postérieurs chez le rat nouveau-né.	26
<i>Figure 10</i> : Les interneurons excitateurs (EphA4 et Hb9) des CPGs locomoteurs spinaux chez la souris	28
<i>Figure 11</i> : Origine et développement de certaines catégories neuronales au cours du développement de la moelle épinière chez les Vertébrés supérieurs.....	29
<i>Figure 12</i> : Mécanismes sous-tendant les coordinations entre CPGs	32
<i>Figure 13</i> : Les différents modes de locomotion chez la salamandre	34

MATERIELS ET METHODES

<i>Figure 1</i> : Locomotion réelle chez le rat nouveau-né (3 à 7 jours).....	39
<i>Figure 2</i> : Représentation schématique du dispositif expérimental	45

OBJECTIFS DE RECHERCHE

<i>Figure 1</i> : Objectifs de recherche.....	47
---	----

RESULTATS

Chapitre I

Figure 1 : Le patron locomoteur chez le rat nouveau-né	51
Figure 2 : Effet d'une section thoracique totale sur la période locomotrice moyenne des régions cervicales et lombaires	52
Figure 3 : Effet de la mise au silence des régions thoraciques (bloc sucrose) sur l'activité des CPGs cervicaux et lombaires.....	53
Figure 4 : Effet de la mise au silence des régions thoraciques (bloc sucrose) sur la période locomotrice moyenne des régions cervicales et lombaires.....	53
Figure 5 : Mise en évidence d'une influence ascendante des CPGs lombaires sur leurs homologues cervicaux	54
Figure 6 : Modification du patron moteur par les influences ascendantes.....	55
Figure 7 : Mise en évidence de l'absence d'une influence descendante propriospinale.....	56
Figure 8 : Influence ascendante et coordinations bilatérales.....	57
Figure 9 : Représentation schématique des connexions propriospinales contribuant aux coordinations interappendiculaires mises en œuvres lors d'une locomotion quadrupède.....	58

Chapitre II

Figure 1 : Rôle des régions thoraciques dans les coordinations cervico-lombaires.....	61
Figure 2 : Excitabilité des régions thoraciques et coordinations cervico-lombaires.....	62
Figure 3 : Les coordinations cervico-lombaires sont dépendantes des connexions commissurales thoraciques	63
Figure 4 : Rôles des relais thoraciques dans les coordinations interappendiculaires mises en jeu lors d'une locomotion quadrupède.....	64

Chapitre III

Figure 1 : Caractéristiques temporelles du patron locomoteur générée <i>in vitro</i> par la moelle épinière isolée de rat nouveau-né (P0-4)	67
Tableau 1 : Variation de la durée des périodes locomotrices en fonction de la concentration de NMA	69
Figure 2 : La dépendance de la durée des activités de type fléchisseur et extenseur ne dépend pas du milieu activateur utilisé.....	69
Figure 3 : Etude de la variation des durées des activités enregistrées à partir de nerfs moteurs identifiés en fonction de la période locomotrice.....	69
Figure 4 : Caractéristiques temporelles des activités locomotrices déclenchées par la stimulation électrique du tronc cérébral.....	70
Figure 5 : Locomotion réelle et fictive chez des animaux juvéniles (P10-12).....	71

<i>Figure 6</i> : Organisation symétrique des hémicPGs de type extenseur et fléchisseur.....	72
<i>Figure 7</i> : Activités locomotrices dans différentes conditions expérimentales.....	73

Chapitre IV

<i>Figure 1</i> : Réponses motrices réflexes mises en jeu lors de la stimulation unitaire des racines dorsales lombaires et cervicales	75
<i>Figure 2</i> : Réinitialisation de la locomotion fictive par la mise en jeu des afférences sensorielles lombaires.....	76
<i>Figure 3</i> : Réinitialisation de la locomotion fictive par la mise en jeu des afférences sensorielles cervicales	77
<i>Figure 4</i> : Déclenchement et entraînement locomoteur par les afférences sensorielles à bas seuil	78
<i>Figure 5</i> : La stimulation des afférences sensorielles active les CPGs locomoteurs spinaux.....	79
<i>Figure 6</i> : Relations de phases entre les activités rythmiques des racines motrices spinales dans différentes conditions d'activation des CPGs locomoteurs.....	80
<i>Figure 7</i> : Influence directe des afférences sensorielles lombaires sur les régions locomotrices cervicales.....	81
<i>Figure 8</i> : Influence indirecte des afférences sensorielles cervicales sur les régions locomotrices lombaires	82
<i>Figure 9</i> : Influence des afférences sensorielles cervicales et lombaires sur l'activité des motoneurones fléchisseurs lombaires.....	83
<i>Figure 10</i> : Représentation schématique des connexions propriospinales et proprioceptives contribuant dans les coordinations interappendiculaires d'une locomotion quadrupède.....	84

DISCUSSION GENERALE

<i>Figure 1</i> : Développement des voies de commandes respiratoires directes et indirectes au cours de la période post-natale.....	88
<i>Figure 2</i> : Implication de voies spinales directes et indirectes dans la commande motrice.....	89
<i>Figure 3</i> : Réorganisation de la voie indirecte de commande respiratoire : possible implication dans la genèse de différents patrons moteurs	90
<i>Figure 4</i> : Représentation schématique du réseau de déglutition.....	91
<i>Figure 5</i> : Réorganisation des voies spinales suite à une lésion partielle	93

RESUME

Se nourrir, se reproduire, fuir un danger, explorer son environnement, sont autant de comportements qui nécessitent le déplacement de l'animal. Ainsi, la locomotion apparaît comme un système moteur crucial et vital à la survie d'une espèce et requiert la production de mouvements hautement adaptés afin de satisfaire la réalisation de tous ces comportements. Toute atteinte de la fonction locomotrice entraînera donc une perturbation multisystémique plus ou moins prononcée. Afin de comprendre pourquoi et comment un organe ne fonctionne plus, il est nécessaire au préalable de connaître son fonctionnement dans les conditions normales. Au cours de mon travail doctoral, j'ai donc développé chez le rat nouveau-né un modèle expérimental de moelle épinière isolée *in vitro* qui, compte tenu de son accessibilité directe, nous permet d'étudier de façon précise les mécanismes intimes du fonctionnement du système nerveux par une approche combinée électrophysiologique, pharmacologique et lésionnelle. Dans le cadre des études sur la neurobiologie des réseaux, ma problématique de recherche a été plus particulièrement focalisée sur les mécanismes cellulaires et synaptiques impliqués dans les coordinations motrices produites par différents générateurs de rythmes locomoteurs. Au final et de façon plutôt inattendue, les coordinations locomotrices nécessiteraient en particulier un flux d'informations dans le sens caudo-rostral entre les différents réseaux neuronaux spinaux.

ABSTRACT

To eat, reproduce, to explore the environment and escape from danger are all behaviors that require displacement of the organism. The locomotor act is therefore critical to animal survival, necessitating the production of highly adaptive movements to satisfy these other behavioral demands. As a consequence, any locomotor deficit can have a major impact at the multiple systems level. However in order to understand the dysfunction of any biological system, it is first necessary to understand its operation under normal conditions. For my doctoral study, therefore, I used the isolated spinal cord of the neonatal rat as an *in vitro* experimental model, which by virtue of its direct accessibility allows investigation of the mechanistic basis of nervous system function through the combination of electrophysiological, pharmacological and lesional approaches. In the context of exploring the neurobiology of neuronal networks, my thesis research focused on the cellular and synaptic mechanisms that are implicated in the functional coordination between the spatially separate rhythm-generating circuitry responsible for quadrupedal locomotion. An unexpected finding is that locomotor coordination is particularly dependent upon a caudo-rostral flow of propriospinal information between the different spinal networks.

ABRÉVIATIONS

5-HT : sérotonine

CPGs : "*central pattern generator*"

DA : dopamine

EMG : électromyogrammes

ENG : électroneurogrammes

FDL : funiculi dorso-latéraux

FRBP : formation réticulée bulbaire médiane

FSCD : Le faisceau spinocérébelleux dorsal

FSCV : Le faisceau spinocérébelleux ventral

FVL : funiculi ventro-latéraux

GFP : Green Fluorescent Protein

GL : *gastocnemii lateralis*

GM : *gastocnemii medialis*

KO : Knockout

L : lombaire

LCRA : liquide céphalorachidien artificiel

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

PCPA : p-chloro-phenylalanine

RLBP : région locomotrice bulbo-pontique

RLM : région locomotrice mésencéphalique

RLS : région locomotrice subthalamique

SNr : substance noire réticulée

TA : Tibialis Antérieur

Th : thoracique

VL : vastus lateralis

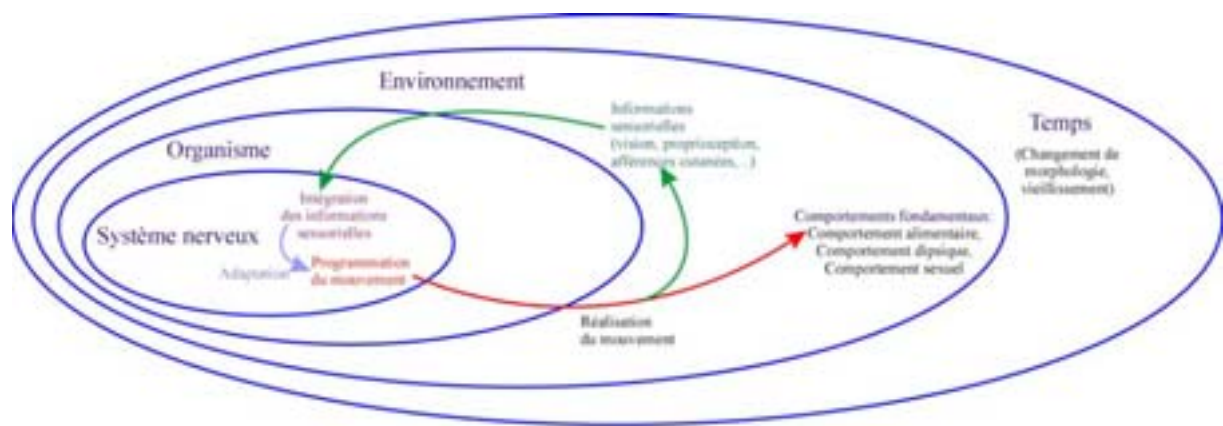


Figure 1 : Schéma d'organisation global du système locomoteur.

La survie de l'individu et de l'espèce est intimement liée à la réalisation de comportements fondamentaux nécessitant la production d'actes locomoteurs parfaitement ajustés et adaptés à l'environnement.

PROBLEMATIQUE ET PRESENTATION DU MEMOIRE

La survie d'un animal et celle de l'espèce reposent sur des comportements fondamentaux (alimentaire, dipsique, sexuel) qui impliquent nécessairement le déplacement de l'animal au sein de son environnement (figure 1). La capacité des animaux à se déplacer dépendra à la fois de leurs caractéristiques morphologiques et également des spécificités environnementales (terrestre, aérienne, aquatique) et temporelles (métamorphose, vieillissement). Dans ce cadre, la locomotion s'exprime selon divers patrons moteurs, incluant par exemple la marche, la course, le vol, la nage ou la reptation. Mais malgré cette diversité, la fonction locomotrice obéit à des constantes largement partagées au sein du règne animal. Ainsi, si le mouvement est volontaire du fait de son initiation, il est involontaire de part sa réalisation. En effet, l'initiation, le mode de locomotion et la trajectoire sont consciemment choisis par l'individu, mais la construction de l'acte moteur repose plus sur l'activité "inconsciente" de réseaux de neurones spinaux. Toutefois, en l'absence de toute information en provenance d'autres structures centrales ou de la périphérie, ces générateurs de rythmes (plus largement connus sous la terminologie anglo-saxonne "*central pattern generators*" ou CPGs) ne sont capables de produire que des activités hautement stéréotypées. L'adaptabilité des programmes moteurs est donc très largement dépendante par exemple de l'influence des afférences sensorielles musculaires, cutanées, visuelles, vestibulaires et autre sixième sens (écholocalisation, électroception). Enfin, l'acte locomoteur requiert une coordination aussi fine que vitale entre les différents membres (impliqués directement dans la propulsion) mais également entre les autres parties du corps (par exemple le cou ou le tronc). Les déplacements de certains animaux arboricoles, ou de ceux adaptés aux pentes escarpées de montagne ou simplement d'un chat le long d'une palissade ou d'un bord de fenêtre en sont des exemples évidents.

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Doctorat, ce manuscrit sera présenté en cinq grandes parties.

Succinctement, **la première** sera introductive et s'attachera à exposer les principes fondamentaux et l'organisation générale de la fonction locomotrice. Un accent particulier sera

porté sur les différents niveaux d'adaptabilité de la locomotion ainsi que sur les dernières données concernant l'organisation des réseaux locomoteurs spinaux chez les mammifères. L'avènement récent des approches combinées de génétique, de biologie moléculaire, d'électrophysiologie et d'imagerie fonctionnelle nous permettra de préciser autant que faire se peut les éléments et les mécanismes neuronaux impliqués dans la genèse des activités locomotrices et dans les coordinations intersegmentaires et interappendiculaires chez les Vertébrés supérieurs.

La seconde partie sera centrée sur les différentes méthodologies employées dans l'ensemble de mes travaux. Les préparations réduites et isolées *in vitro* étant les plus utilisées, un bref historique de ces modèles sera évoqué.

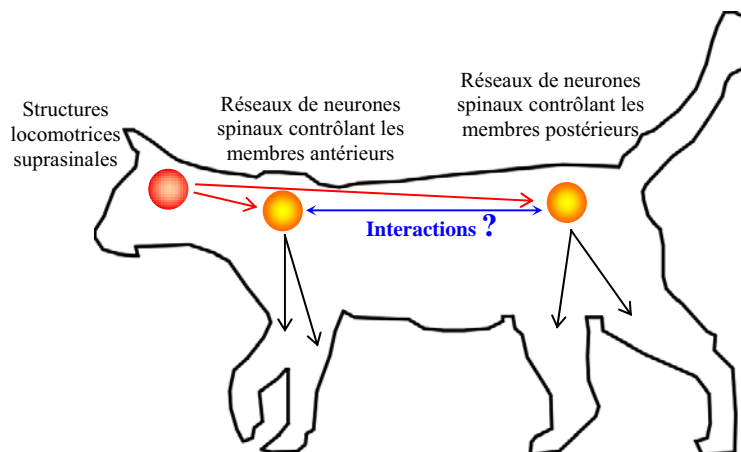
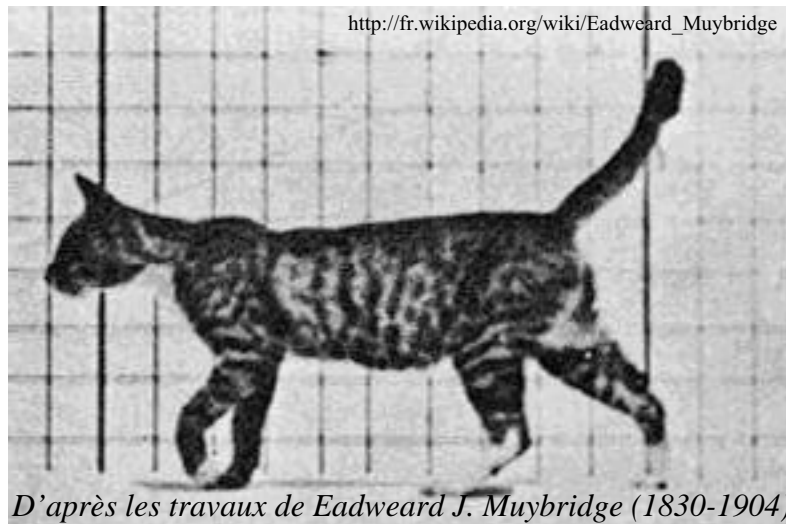
Après en avoir exposé les objectifs majeurs, **la troisième partie** de ce mémoire sera consacrée à la présentation de l'ensemble des résultats. Les données expérimentales, divisées en quatre chapitres indépendants, seront introduites et discutées tour à tour. Les rôles des connexions propriospinales, des relais spinaux thoraciques ainsi que des afférences sensorielles proprioceptives dans les coordinations interappendiculaires chez les mammifères seront présentés, suivis d'un travail sur la possible existence de générateurs symétriques impliqués dans l'élaboration des phases de flexion et d'extension au cours de la locomotion.

Une discussion générale orientée sur une analyse comparative de l'organisation de différents systèmes moteurs et sur l'aspect plus appliqué et clinique des lésions spinales constituera **la quatrième partie** de ce manuscrit.

Enfin sous forme d'annexe, une dernière et **cinquième partie** sera réservée à la présentation des articles déjà publiés ou soumis.

INTRODUCTION GENERALE : LA LOCOMOTION

(*locomovere* = *locus* [lieu] + *movere* [mouvoir])



"Si nous savions comment notre corps est fait, nous n'oserions pas faire un mouvement." *Gustave Flaubert*, Extrait du Dictionnaire des idées reçues

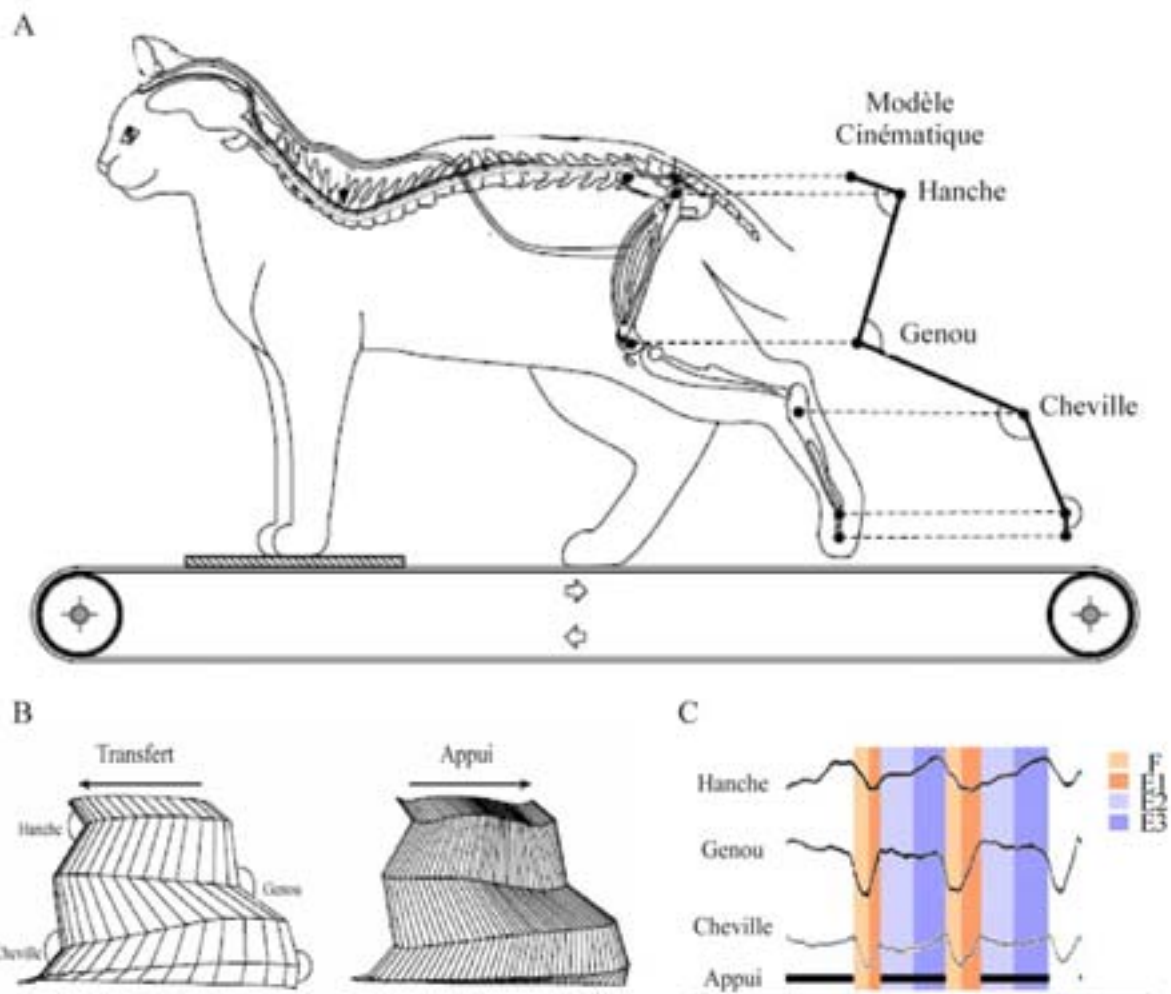


Figure 2 : Le cycle locomoteur chez le chat.

(A) Le modèle expérimental. (B) Variations des angles articulaires au cours des phases de transfert et d'appui. Les flèches noires représentent le sens de déplacement du membre. (C) Trajectoire des articulations du membre postérieur au cours de cycles successifs, les barres noires représentant le temps au cours duquel le membre est en appui sur le sol. Les différentes phases du cycle locomoteur sont indiquées par les zones de couleur. En orange la phase de transfert (F et E1) et en mauve la phase d'appui (E2 et E3)

Modifié d'après Rossignol et coll., 2004

I) PRINCIPES FONDAMENTAUX ET ORGANISATION GENERALE DE LA LOCOMOTION

A) *DESCRIPTION DU CYCLE LOCOMOTEUR*

L'étude de la locomotion chez de nombreux modèles animaux a montré que les principales caractéristiques du cycle locomoteur sont communes à l'ensemble des espèces. Une description du cycle locomoteur sera donc essentiellement présentée à partir des données obtenues chez le chat, modèle de prédilection depuis plus d'un siècle dans l'étude de la locomotion. La locomotion est caractérisée par une succession de cycles de flexion et d'extension des membres permettant une alternance entre les phases de transfert et les phases d'appui, assurant ainsi la propulsion de l'animal (figure 2) (Philippon 1905; Rossignol, et coll. 2004). **La phase de transfert**, qui correspond à la réalisation d'un pas, débute lorsque le membre quitte le sol et se termine au moment de son contact avec le sol (figure 2B, 2C). Cette phase transfert se subdivise en deux périodes successives classiquement dénommées F et E1, la première se caractérisant par une flexion de toutes les articulations, la seconde par une extension précoce du genou et de la cheville jusqu'au contact du membre avec le sol. Au cours de **la phase d'appui**, le membre repose sur le sol. Les muscles les plus sollicités au cours de cette phase sont les muscles extenseurs connus pour leur rôle antigravitaire. A l'instar de la phase de transfert, la phase d'appui comporte également deux périodes successives appelées E2 et E3. La première correspond à la durée pendant laquelle le membre supporte en partie le poids du corps et la seconde est définie comme la phase de propulsion au cours de laquelle toutes les articulations entrent en extension.

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

B) *ALLURES LOCOMOTRICES ET COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES :*

Une allure locomotrice se définit par la séquence des différents temps d'appui sur le sol de chaque membre de l'animal (figure 3) (Abourachid 2003). Par exemple, la marche est

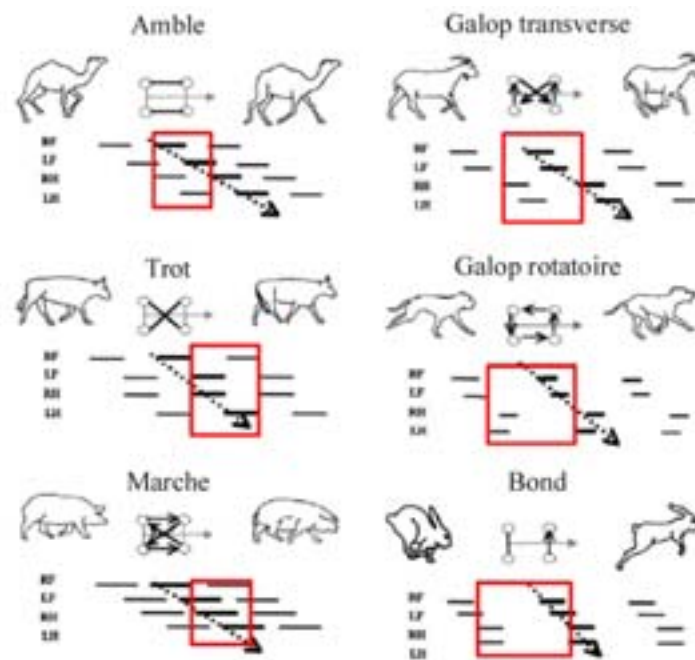


Figure 3 : Quelques exemple d'allures locomotrices chez différentes espèces.

Le temps pendant lequel chaque membre (RF, membre antérieur droit ; LF, membre antérieur gauche ; RH, membre postérieur droit ; RL, membre postérieur gauche) est en appui sur le sol est représenté par un trait noir. Les cadres rouges représentent un cycle locomoteur et permettent d'observer les coordinations interappendiculaires.

Modifié d'après Abourachid, 2003

caractérisée par une alternance stricte entre les membres d'une même ceinture et l'on observe un déphasage de 25% du cycle entre les membres d'une diagonale donnée (avant droit et arrière gauche). Au cours du trot, ce déphasage disparaît, laissant place à une synchronie. Marche et trot sont classés parmi les allures symétriques en raison d'un déphasage temporel similaire entre l'appui au sol de la paire des membres antérieurs et celui des membres postérieurs. Lors du galop, le déphasage séparant le début de l'appui au sol des membres antérieurs devient différent de celui séparant le début de l'appui au sol des membres postérieurs, caractéristique d'une allure asymétrique (Hilderbrand 1966). Il est important de noter que la vitesse de déplacement d'un animal peut varier dans une certaine gamme sans modification de l'allure en augmentant simplement la fréquence ou la longueur des pas. Cependant, certains "points de ruptures" existent. Chez le chat, la marche laisse place au trot lorsque la vitesse de déplacement dépasse 0,7 mètre par seconde. De manière similaire, lorsque cette vitesse atteint 2,7 mètres par seconde, le trot est remplacé par le galop (Goslow, et coll. 1973). D'une manière générale, les coordinations interappendiculaires sont totalement reconfigurées lors de ces changements d'allure, s'appuyant sur une modification drastique à la fois du patron de contraction des muscles fléchisseurs et extenseurs et de la dynamique des articulations.

Concernant la bipédie et en particulier chez l'homme, les allures naturelles obéissent strictement à la règle de l'alternance bilatérale (marche et course). Les variables majeures de ces allures sont similaires à celles décrites chez les quadrupèdes (durée du posé au sol et de levée de chacun des membres, décalage de temps entre le début des appuis au sol de chaque membre), la phase de double appui observée au cours de la marche disparaissant toutefois lors de la course.

C) ORGANISATION CENTRALE ET PERIPHERIQUE DE LA LOCOMOTION

L'organisation de la locomotion est particulièrement bien conservée au sein du règne animal. On peut ainsi décrire trois étages principaux : l'étage supraspinal qui initie et contrôle la locomotion, l'étage spinal qui génère le rythme et le patron locomoteur et enfin l'étage périphérique qui permet d'adapter rapidement le mouvement aux contraintes environnementales (figure 4).

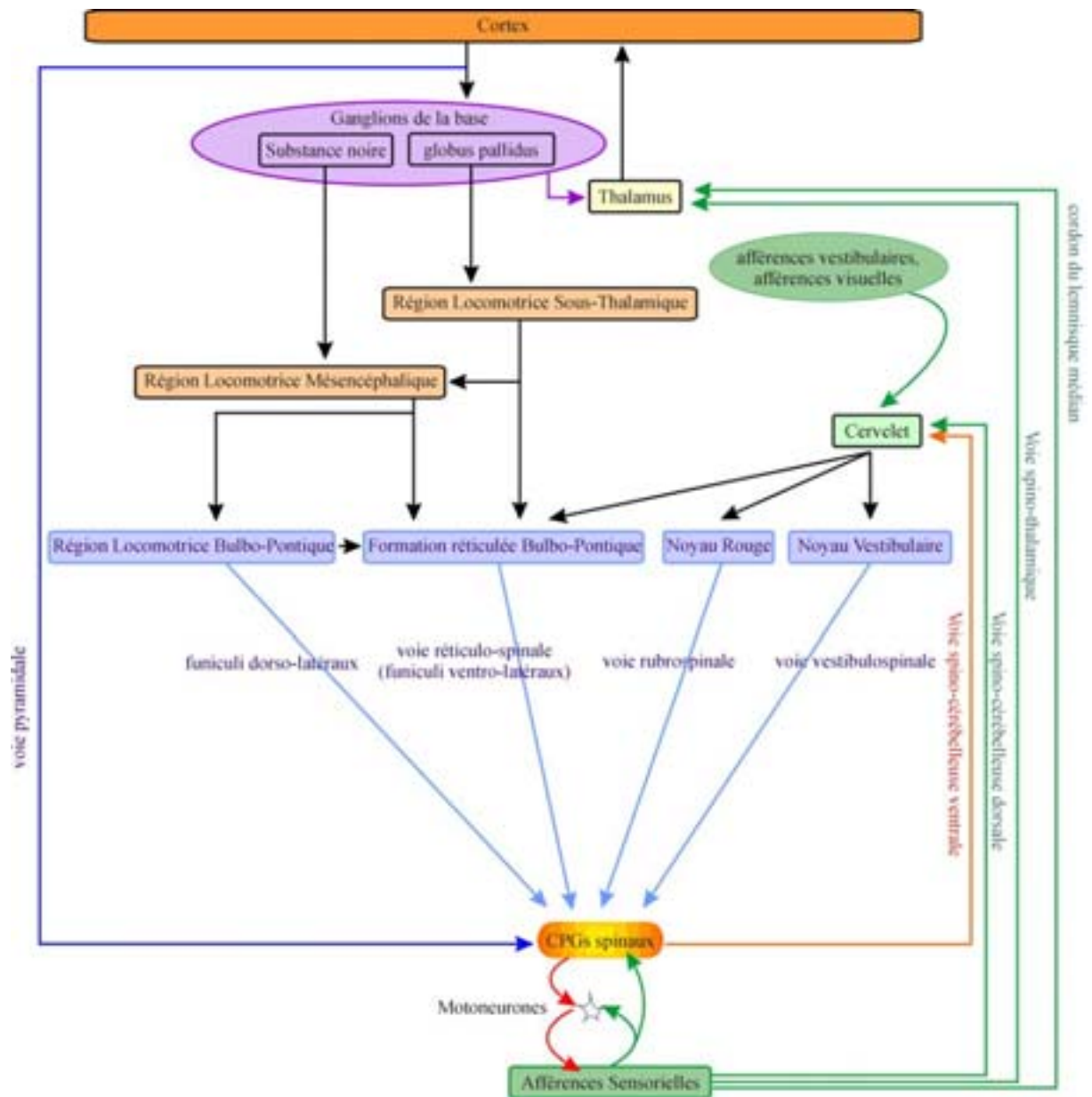


Figure 4 : Structures centrales et voies de connexions impliquées dans la locomotion.

1) L'étage supraspinal

Différentes aires corticales telles que le cortex moteur primaire, le cortex prémoteur et l'aire motrice supplémentaire participent à l'initiation et à la programmation de la locomotion. Les informations issues du cortex empruntent deux voies de projection, la voie pyramidale et la voie extrapyramidale (figure 4). La voie pyramidale se projette directement sur les neurones spinaux après avoir décussé au niveau bulbaire et contrôle les mouvements volontaires distaux fins. Une partie de ses axones forment des collatérales qui se projettent au niveau des noyaux moteurs diencephaliques et du tronc cérébral. Après un relais dans les ganglions de la base, la voie extrapyramidale ou voie indirecte se projette au niveau thalamique (**région locomotrice sous-thalamique, RLS**) et mésencéphalique (**région locomotrice mésencéphalique, RLM**). Les ganglions de la base sont fortement impliqués dans le système locomoteur puisqu'un dysfonctionnement de ces noyaux (par exemple lors de la maladie de Parkinson) induit un sévère déficit dans l'initiation et le contrôle de la locomotion. Sur le plan de la connectivité, les ganglions de la base exercent un tonus inhibiteur GABAergique (originaire de la substance noire réticulée, SNr) sur les structures de projections telles que les régions locomotrices mésencéphaliques (Garcia-Rill, et coll. 1986). Le déclenchement de la locomotion passerait alors par une levée de cette inhibition sur les structures motrices du tronc cérébral.

Des expériences de lésions menées chez le chat décortiqué ont montré toutefois que le cortex n'est pas indispensable à l'initiation de la locomotion (Miller, et coll. 1975; Bjursten, et coll. 1976; Grillner 1985; MacKay-Lyons 2002), les animaux conservant dans ce cas une locomotion adaptée à l'environnement. Si une transection est réalisée en avant des colliculi supérieurs (préparation prémammillaire, figure 5) préservant la RLS, l'animal présente alors des séquences locomotrices spontanées mais hautement stéréotypées, inadaptées aux exigences environnementales (évitement d'obstacles par exemple) (Mori, et coll. 1989; Whelan 1996). Si la transection est réalisée plus caudalement, supprimant la RLS (préparation postmammillaire), l'animal n'est plus capable de produire une locomotion spontanée. Dans ce cas, la stimulation de la RLM (structure englobant le noyau cunéiforme et le noyau pédonculopontin) permet d'initier différentes allures locomotrices (de la marche lente au galop) en fonction de l'intensité de stimulation (Shik, et coll. 1966).

Après un relais au niveau de la **formation réticulée bulbo-pontique** et de la **région locomotrice bulbo-pontique**, les informations issues des structures locomotrices sous-

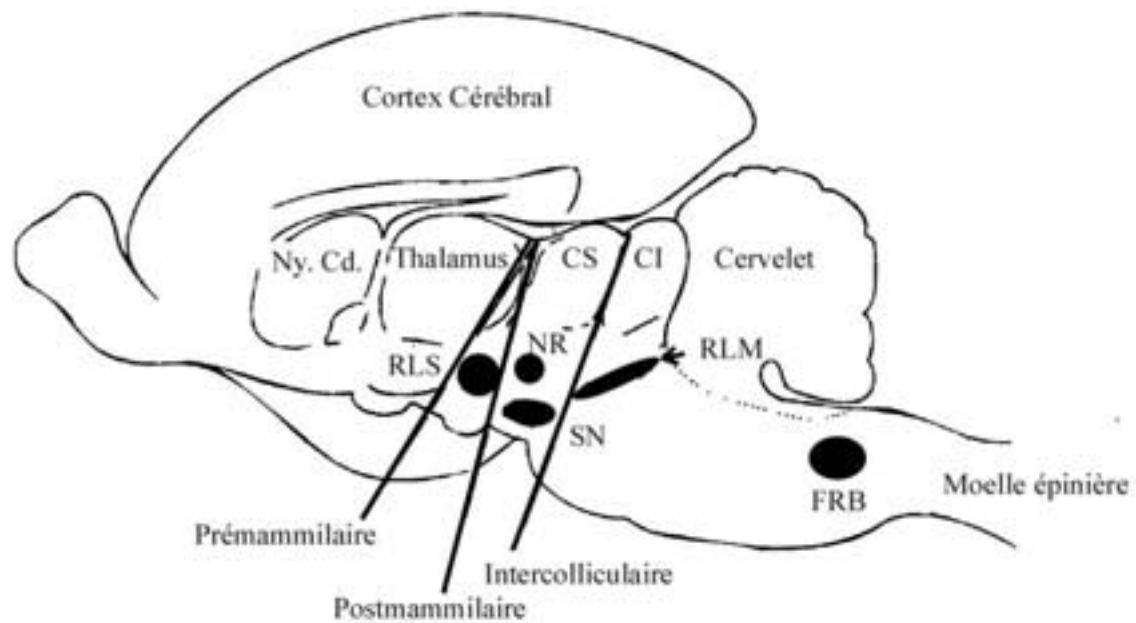


Figure 5 : Les structures supraspinales impliquées dans la locomotion chez le chat.

Les traits noirs représentent les 3 types de section. Dans la préparation *prémammilaire*, la section passe en amont des colliculi supérieurs ainsi que des corps mamillaires. Ces chats peuvent exprimer spontanément de la marche. Dans la préparation *postmammilaire*, la section passe en amont des colliculi supérieurs et en aval des corps mamillaires. Ces chats nécessitent habituellement une stimulation du tronc cérébral pour initier de la marche. Enfin la préparation *intercolliculaire*, préparation historique de chats décérébrés décrite par Sherrington (1906), présente rarement des activités locomotrices spontanées du fait du haut niveau de tonus extenseur.

(RLS) région locomotrice sous-thalamique, (NR) noyau rouge, (SN) substance noire, (RLM) région locomotrice mésencéphalique, (CS) colliculi supérieurs, (CI) colliculi inférieurs, (Ny. Cd.) noyau caudé, (FRB) formation réticulée bulbaire.

Modifié d'après Whelan 1996

thalamique et mésencéphalique sont transmises aux différentes régions spinales par les **funiculi ventro-latéraux** et **dorso-latéraux**.

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

2) L'étage spinal

Au niveau spinal, des réseaux de neurones possédant la capacité de transformer une commande tonique descendante en une activité rythmique (et ce en l'absence d'influence de la périphérie) produisent alors un patron locomoteur transmis au final aux motoneurons. Ces réseaux neuronaux spinaux (également appelés "*central pattern generators*" ou CPGs), localisés au sein des régions cervicales et lombaires chez les mammifères, seront abordés plus en détail ultérieurement (voir **II) Les réseaux locomoteurs spinaux**).

3) L'étage périphérique : contrôle sensoriel et rôle du cervelet

Lors de l'exécution d'un mouvement, les afférences sensorielles proprioceptives et cutanées informent le système nerveux sur l'exécution de la commande motrice par l'appareil biomécanique. Les récepteurs sensoriels à l'origine de ces informations sont localisés dans les muscles, les tendons, les articulations et la peau (tableau 1) (Dietz 2002). Compte tenu de la multiplicité de ces contrôles sensoriels, la locomotion peut s'adapter à tout moment et rapidement aux contraintes internes de l'organisme ainsi qu'aux exigences environnementales.

Les afférences cutanées en provenance des mécanorécepteurs (complexe de Merkel et corpuscules de Ruffini et de Meissner) codent les informations relatives au toucher

Stimulus	Récepteur sensoriel	Connexion afférente	Réflexe	Rôle supposé
Etirement du muscle (dynamique)	Fuseau neuromusculaire (sac nucléaire)	Groupe I	Monosynaptique (<i>stretch reflex</i>)	Compensation des irrégularités du sol
Etirement du muscle (statique)	Fuseau neuromusculaire (chaîne nucléaire)	Groupe II (III)	Polysynaptique	Compensation des perturbations de l'allure
Modification du centre de masse	Organe tendineux de Golgi	Groupe Ib	Polysynaptique,	Contrôle du centre de masse
Position et mouvement des articulations	Muscles entourant l'articulation, les mécanorécepteurs de la capsule articulaire	Groupe I, II	Polysynaptique	Influence le patron locomoteur et compensations
Déformation de la peau	Mécanorécepteurs de la peau	Groupe II (III)	Polysynaptique	Adaptation aux conditions du sol
Stimulus douloureux, pression	Terminaisons libres, corpuscules de Pacini	Groupe III, IV	Interneurones spinaux (CPG), réflexe de flexion	Réflexe de retrait

Tableau 1 : Différentes voies proprioceptives et sensorielles et leurs implications dans la locomotion.

D'après Dietz, 2002

discriminatif (fibres des groupes II/III). Ces afférences semblent être également impliquées dans le placement du membre au cours de la locomotion, comme le montrent des expériences chez des chats spinaux dénervés (section des nerfs cutanés) incapables de réaliser correctement une marche sur les barreaux d'une échelle (Bouyer et Rossignol 2003). De plus, ces afférences cutanées peuvent renforcer l'activité des CPGs locomoteurs spinaux. En effet, la stimulation électrique tonique de ces afférences chez des animaux décérébrés et paralysés augmente l'amplitude des bouffées de potentiels d'actions des activités rythmiques lors d'une locomotion fictive (nommée ainsi car aucun mouvement n'est effectué) induite pharmacologiquement (Viala et Buser 1969; Viala, et coll. 1978; Fleshman, et coll. 1984).

Une seconde classe d'afférences cutanées en provenance des corpuscules de Pacini et des terminaisons libres, code respectivement les dépressions phasiques de la surface cutanée et les sensations douloureuses (fibres des groupes III/IV). Dans ce dernier cas, les informations sensorielles générées sont à l'origine d'un réflexe de défense connu sous le terme de réflexe ipsilatéral de flexion (souvent associé à un réflexe d'extension croisé du membre controlatéral).

Les afférences proprioceptives sont organisées en plusieurs classes : les afférences en provenance des fuseaux neuromusculaires (fibres Ia et II), des organes tendineux de Golgi (fibres Ib) et des mécanorécepteurs de la capsule articulaire (fibres I/II). Ces afférences impliquées dans les réflexes myotatique (fibres Ia) et myotatique inverse (fibres Ib) sont essentielles dans la modulation de la locomotion, notamment en contrôlant la transition entre les phases d'appui et de transfert (organisation temporelle ou "*timing*" du programme central). Par exemple, la stimulation électrique des afférences sensorielles primaires de type Ib innervant un muscle extenseur de la cheville augmente la durée de la phase d'appui et retarde alors l'initiation de la phase de transfert grâce à des projections polysynaptiques excitatrices sur des interneurons et des motoneurons de type extenseur (figure 6) (Duyssens et Pearson 1980; Conway, et coll. 1987; Pearson, et coll. 1992; Pearson et Collins 1993; Whelan, et coll. 1995). Ce mécanisme capital évite ainsi à l'animal d'amorcer une flexion alors qu'une partie du poids du corps repose toujours sur le membre. Il apparaît cependant que les afférences en provenance des muscles extenseurs ne peuvent rendre compte à elles seules du contrôle de la transition entre phases d'appui et de transfert. On doit alors d'avantage considérer l'articulation comme une balance entre l'état d'étirement des muscles fléchisseurs et l'état de contraction des muscles extenseurs (charge supportée par le membre) (Duyssens et Pearson 1980; Pearson, et coll. 1992). L'élongation des muscles fléchisseurs (notamment au niveau de la hanche) à la fin de la phase d'appui permettrait de déclencher le transfert du membre en

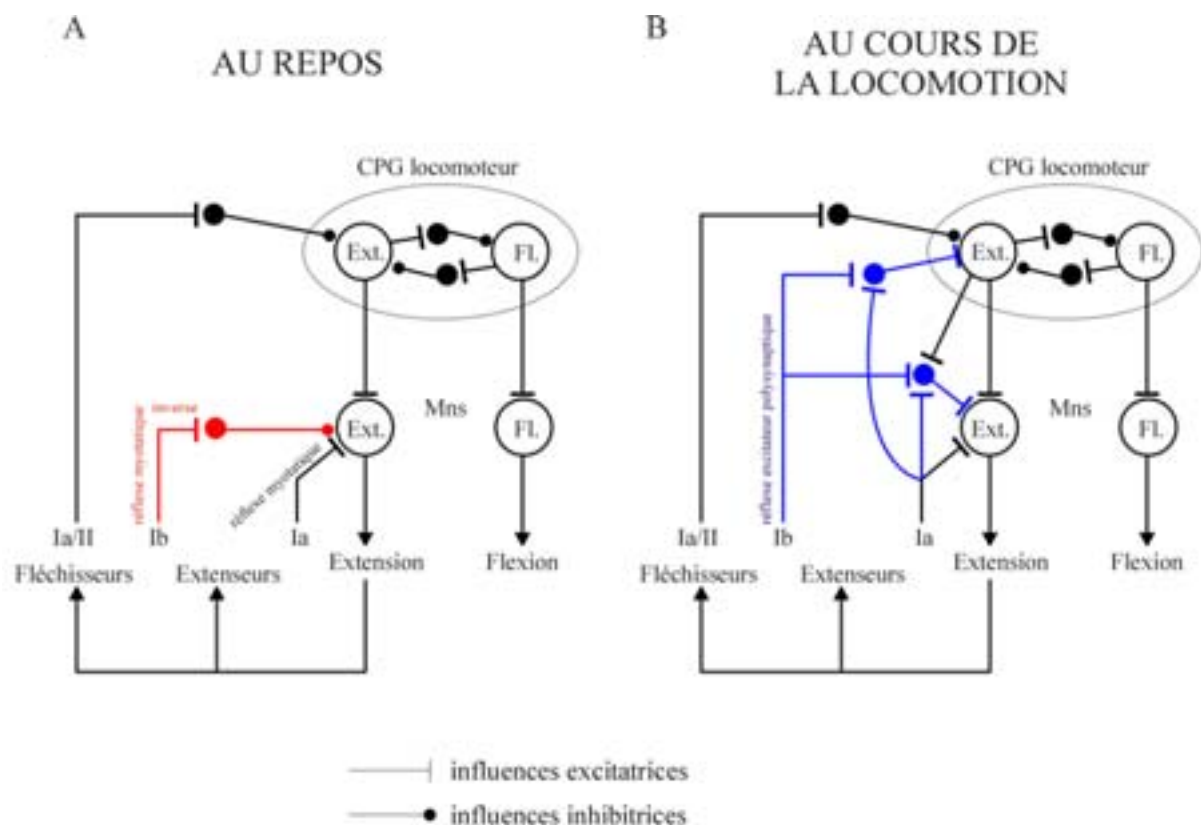


Figure 6 : Réorganisation des afférences sensorielles réflexes au cours de la locomotion.

Schémas représentant les voies réflexes proprioceptives impliquées dans la modulation de l'activité de type extenseur au repos (**A**) et durant la locomotion (**B**). Notons en particulier que les afférences proprioceptives Ib, impliqués dans l'inhibition des motoneurones extenseurs au cours du réflexe myotatique inverse (en rouge dans **A**), sont capables d'exciter ces mêmes neurones au cours de la locomotion, favorisant ainsi les phases d'extension (en bleu dans **B**).

Modifié d'après Whelan 1996

inhibant l'activité des muscles extenseurs via un réflexe de type myotatique (Lam et Pearson 2002).

Enfin, les afférences proprioceptives sont capables d'initier des séquences locomotrices en activant directement les CPGs locomoteurs spinaux. Chez le chat, la stimulation d'afférences proprioceptives par des mouvements passifs des articulations (par exemple sur un tapis roulant) déclenche ainsi une activité locomotrice (Sherrington 1910; Grillner et Rossignol 1978). Un tel entraînement locomoteur peut également être observé lors de la stimulation électrique des afférences à bas seuil sur une préparation de moelle épinière isolée de rat nouveau-né (Smith, et coll. 1988; Marchetti, et coll. 2001).

Parallèlement, des boucles de régulation plus larges mettant en jeu des voies de communication ascendantes et des structures supraspinales coexistent avec ce contrôle segmentaire de la locomotion par les afférences sensorielles. Premièrement, le **faisceau spinocérébelleux dorsal** (FSCD), véhiculant des informations sensorielles, renseigne le **cervelet** sur la réalisation effective du mouvement (Arshavsky 1972). Deuxièmement, une copie efférente produite par les CPGs locomoteurs spinaux emprunte le **faisceau spinocérébelleux ventral** (FSCV) afin d'informer le cervelet sur la commande motrice générée au niveau spinal (Lundberg 1971). En comparant ces copies afférente et efférente, le cervelet peut alors ajuster la commande motrice en contrôlant indirectement l'activité des CPGs spinaux et des motoneurons via les voies descendantes vestibulospinales, rubrospinales et réticulospinales. En l'absence de cette boucle de contrôle, les mouvements restent stéréotypés et présentent une coordination extrêmement appauvrie.

D) ADAPTABILITE DE LA LOCOMOTION

En raison des contraintes de l'organisme et des conditions environnementales, la locomotion doit être adaptée en permanence à court, moyen et long terme. Par exemple, lorsque l'animal trébuche, il doit réajuster rapidement la trajectoire du ou des membre(s) perturbé(s) de manière à contourner l'obstacle. Ceci constitue un processus d'adaptabilité à court terme. Lors de modifications de la morphologie de l'animal (croissance au cours du développement, perte naturelle ou accidentelle d'un membre) on observe un remaniement plus profond des réseaux et des patrons locomoteurs, ceci constituant une adaptabilité à plus long terme du système locomoteur. Cette palette d'adaptabilité repose sur l'action conjointe de mécanismes à la fois centraux et périphériques.

1) L'adaptabilité à court terme : le système sensoriel

La mise en jeu des afférences sensorielles déclenche des réponses réflexes motrices qui selon la situation de l'animal (au repos, durant la phase de transfert, durant la phase d'appui), activent des circuits neuronaux "reconfigurés" (pour revue voir McCrea, 2001; Hultborn, 2001 ; Lam et Pearson, 2002; Rossignol, 2006). Cette **modulation activité dépendante** permet de conserver une **adaptabilité à court terme** optimale du patron locomoteur. La figure 6 illustre un exemple de réorganisation des voies réflexes mises en jeu par les afférences proprioceptives. Alors qu'au repos les afférences primaires de type Ib inhibent de manière disynaptique les motoneurones extenseurs (réflexe myotatique inverse), lors de la locomotion, ce circuit est mis au silence et ces mêmes afférences sont alors à l'origine d'une excitation polysynaptique de ces neurones.

Cette modulation activité dépendante intéresse également les afférences d'origine cutanée. Ainsi chez le chat spinalisé, le contact de la patte avec un obstacle lors de la phase de transfert (flexion) induit l'activation d'afférences cutanées qui provoquent un réflexe de flexion "exagérée" de l'ensemble des articulations permettant alors le franchissement de l'obstacle. Lorsque cette même expérience est réalisée pendant la phase d'appui (extension), une extension accentuée est alors observée, permettant à l'animal de ne pas compromettre sa stabilité.

De plus, la mise en jeu des afférences sensorielles est également capable de moduler directement l'activité des CPGs locomoteurs. Par exemple, lors d'une locomotion fictive induite pharmacologiquement chez le chat (Conway, et coll. 1987; Schomburg, et coll. 1998) et chez le rat nouveau-né (Kiehn, et coll. 1992; Sqalli-Houssaini, et coll. 1993; Bracci, et coll. 1997; Iizuka, et coll. 1997), la stimulation électrique des racines dorsales réinitialise l'activité des CPGs spinaux en augmentant ou en diminuant la durée des phases et des périodes locomotrices (on parle de "*resetting*" selon la terminologie anglo-saxonne).

Cette adaptabilité à court terme, qui repose sur des mécanismes segmentaires, permet ainsi une exécution rapide et efficace de la correction du mouvement. Ainsi, lorsqu'un chaton spinalisé est placé sur un double tapis roulant (les côtés droit et gauche fonctionnant à des vitesses différentes), on observe une adaptation individuelle des membres (controlatéraux) à la vitesse de chacun des deux tapis (Forssberg, et coll. 1980).

NEUROTRANSMETTEURS "PRIMAIRES" (CPG)	TYPE DE RECEPTEUR	ACTION SUR LE RYTHME LOCOMOTEUR
Glutamate GABA	NMDA/Kainate GABA _{A/B}	induit un rythme rapide et coordonné ralenti le rythme et diminue l'amplitude des bouffées de potentiels d'actions
Glycine	GABA _A	coordinations bilatérale et fléchisseur/extenseur ralenti le rythme, diminue l'amplitude des bouffées de potentiels d'actions, coordinations bilatérale et fléchisseur/extenseur

NEUROMODULATEURS ACTIVATEURS	TYPE DE RECEPTEUR	POTENTIALITE DE RYTHMOGENESE	
Sérotonine	5-HT1/5-HT2	+++	rapide et coordonné
Dopamine	D1/D2	++	lent et coordonné
Noradrénaline		+	lent, non coordonné
Acétylcholine	muscarinique	+	lent, coordinations bilatérales
AVP		+	lent, coordinations bilatérales partielles
Ocytocine		+	lent, coordinations bilatérales partielles
Substance P		+	lent, coordinations partielles
Bombésine		++	lent et coordonné

NEUROMODULATEURS	TYPE DE RECEPTEUR	ACTION SUR LE RYTHME LOCOMOTEUR			
		Freq.	Ampl.	Coord.	stab.
Glutamate	Métabotrope de type I	↑			
	Métabotrope de type III	↓			
Sérotonine	5-HT1 _A /5-HT1 _{B/D}	↓			↑
	5-HT2	↑			
Noradrénaline	5-HT2 _{A/C} /5-HT7			↑	
	Apha1	↓			
	Apha2	↑			
Dopamine	Bêta				↑
	D1	↓	↑		↑
AVP		↓	↓		
Ocytocine		↓	↑		
Bombésine		↓			
Substance P		↑			↑

Tableau 2 : Principaux acteurs impliqués dans le contrôle des CPGs locomoteurs spinaux.

Freq, Fréquence ; Ampl, amplitude des bouffées de potentiels d'action ; Coord, coordinations bilatérales ; Stab, stabilité.

2) L'adaptabilité à moyen terme : la neuromodulation

Les réseaux de neurones moteurs sont en grande majorité sous l'influence de nombreux systèmes neuromodulateurs permettant de régler et de configurer de différentes manières la dynamique de ces assemblages neuronaux afin de produire au final une variété importante de réponses motrices (Marder et Thirumalai 2002). Compte tenu de leur durabilité (de quelques secondes à quelques heures), les effets de la **neuromodulation** constituent une **adaptabilité à moyen terme** des réseaux de neurones. Son action se situe d'une part au niveau de l'efficacité de la transmission synaptique (en agissant par exemple sur la libération et l'action post-synaptique des neurotransmetteurs "primaires") et d'autre part au niveau de l'expression des propriétés intrinsèques des neurones (par exemple rebonds post-inhibiteurs, plateaux calciques). Succinctement, la neuromodulation met en jeu des récepteurs de type métabotropique activant des voies de seconds messagers intracellulaires. A leur tour, ces derniers peuvent agir par exemple sur des protéines kinases possédant la capacité de modifier durablement la conformation et la fonction de protéines membranaires (telles des canaux ioniques) et cellulaires.

Dans le cadre de la locomotion, les systèmes neuromodulateurs apportent un degré de flexibilité supplémentaire au fonctionnement du système locomoteur en agissant au niveau des étages supraspinaux et spinaux. Cependant, il est parfois difficile d'appréhender la question de la neuromodulation à partir de modèles expérimentaux *in vivo*. En effet, on admet aisément que les effets d'un neuromodulateur donné puissent être la résultante de son action sur de multiples sites lorsque par exemple cette substance est appliquée par voie systémique (sanguine ou intrapéritonéale). Depuis bientôt trois décennies, le développement de préparations isolées *in vitro* chez les Vertébrés (en particulier la lamproie et les rongeurs néonataux) a permis d'accroître de manière exponentielle nos connaissances de la neuromodulation du système locomoteur. En maintenant en survie des régions entières du système nerveux central telles que la moelle épinière, il est dès lors possible de cibler plus précisément l'action et l'effet d'un neuromodulateur. Ainsi, il est maintenant largement admis que les neuromodulateurs peuvent modifier durablement les propriétés fonctionnelles des CPGs spinaux locomoteurs (en facilitant, déprimant ou même initiant les activités motrices, ou encore en modifiant les caractéristiques cellulaires et synaptiques des réseaux neuronaux cibles), accroissant leur flexibilité et permettant l'émergence de nombreux patrons moteurs adaptés.

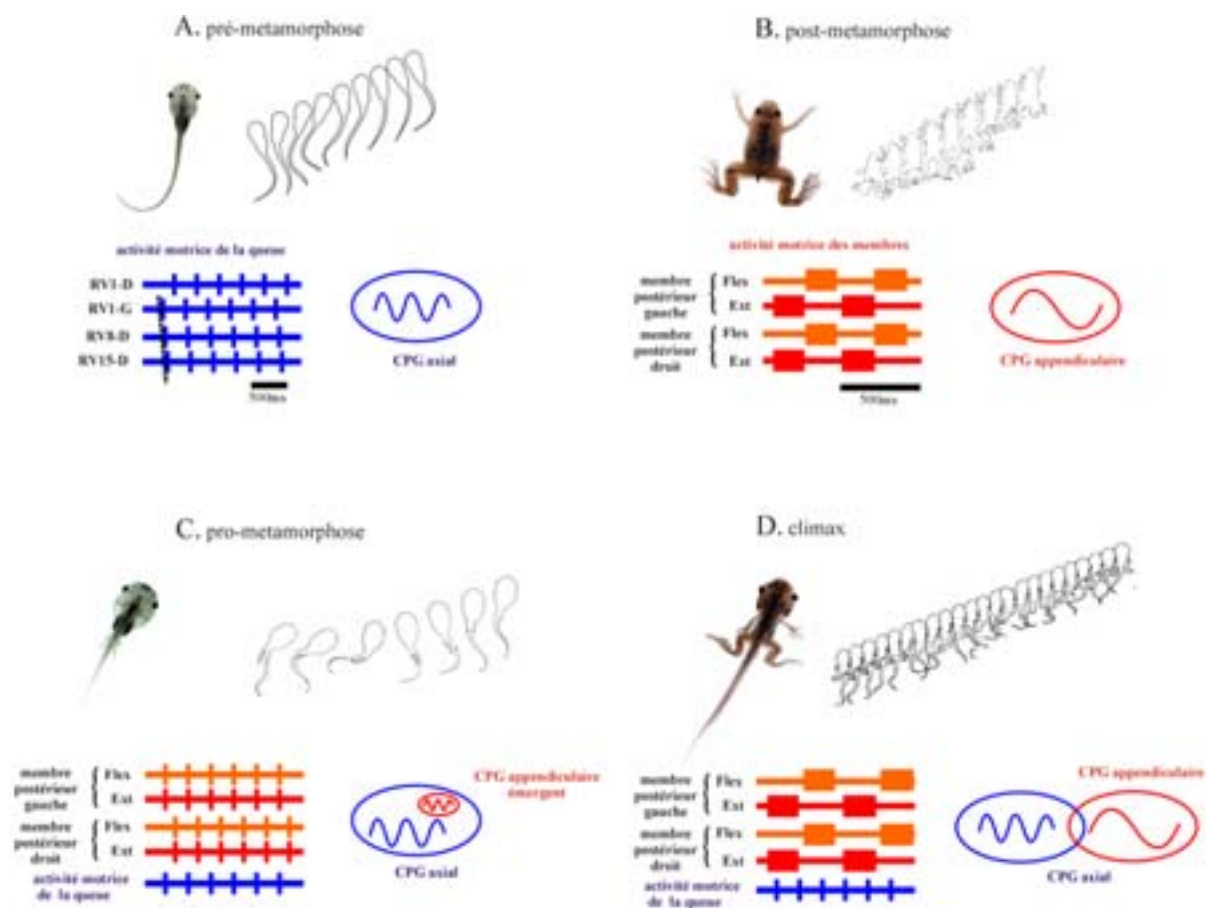


Figure 7 : Différents modes de locomotion de *xenopus laevis* au cours du développement.

L'animal débute sa vie sous la forme d'un têtard, utilisant une nage axiale identique à celle utilisée par la lamproie (A). Au cours du développement, les membres apparaissent et l'appendice caudal disparaît, transformant la nage axiale en une nage appendiculaire (B). Au cours des stades mixtes, l'animal possède à la fois un appendice caudal et des membres fonctionnels lui permettant d'utiliser les deux formes de nages. Alors qu'un seul type de patron est généré durant la pro-métamorphose (C), des activités locomotrices appendiculaires et de type nage coexistent au cours du climax (D).

Modifié d'après Combes et coll., 2004, 2006

Dans le cadre de ce manuscrit et compte tenu des innombrables données relatives à la neuromodulation du système locomoteur, il serait illusoire d'établir une revue exhaustive des différents effets produits par la mise en jeu de telle ou telle substance neuroactive. Cependant, le tableau 2 tente de présenter quelques uns des aspects de cette neurotransmission / neuromodulation.

3) *L'adaptabilité à long terme : maturation, développement et réorganisation du système locomoteur*

Au cours du développement, la majorité des animaux subit une augmentation de taille, voire l'apparition et/ou la disparition de leurs membres. Soumis à des modifications durables de la morphologie de l'animal et/ou de son environnement, le comportement locomoteur doit alors obligatoirement être remanié, cette **adaptabilité à long terme** reposant en grande partie sur des mécanismes de neurogenèse, d'apoptose et de synaptogenèse liés notamment à l'activation du génome.

Des modifications drastiques et irréversibles de la morphologie peuvent survenir au cours du développement, comme en particulier celui des amphibiens chez lesquels le système nerveux central doit nécessairement assurer une continuité dans la commande et la genèse de rythmes locomoteurs malgré la disparition de l'appendice caudal et le bourgeonnement de nouveaux membres. L'apparition de nouvelles voies motrices et sensorielles associée à la disparition fonctionnelle des voies préexistantes laissent entrevoir une reprogrammation voire une reconfiguration des réseaux spinaux locomoteurs. Chez le xénope (*Xenopus laevis*; figure 7) (Combes, et coll. 2004), le têtard utilise une nage axiale identique à celle décrite chez la lamproie. Progressivement, au fur et à mesure des changements morphologiques de l'animal, la nage axiale laisse place à une nage appendiculaire, les deux modes de locomotion coexistants même durant certains stades du développement. Alors que chez la salamandre les CPGs axiaux (nage) et les CPGs des ceintures scapulaires et pelviennes (marche) coexistent jusqu'au stade adulte (Delvolve, et coll. 1997), il semble que chez le xénope une ségrégation graduelle s'effectue entre les CPGs contrôlant la nage axiale et les CPGs contrôlant l'activité de membres.

Au cours du développement, la maturation progressive d'un patron locomoteur connaît également des modifications importantes et définitives (Clarac, et coll. 2004). Très tôt au cours des stades embryonnaires chez le rat (Nishimaru et Kudo 2000) et la souris (Branchereau, et coll. 2000), les CPGs spinaux locomoteurs sont bien capables de produire un rythme, mais cependant caractérisé par un synchronisme général (bilatéral et

fléchisseur/extenseur). Progressivement, l'alternance bilatérale apparaît, suivie peu après de l'alternance homolatérale de type flexion/extension et à la naissance, le patron locomoteur présente un caractère quasiment définitif. D'une manière générale, le caractère alterné de la locomotion est étroitement lié à la maturation des connexions inhibitrices. En effet, au cours des périodes embryonnaires les systèmes inhibiteurs agissent comme de véritables systèmes excitateurs et ce en raison d'une valeur élevée du potentiel d'équilibre électrochimique des ions chlorures. La présence au niveau membranaire de nombreux cotransporteurs (NKCC, KCC2) pourrait expliquer la concentration élevée en chlorure intracellulaire. La maturation parallèle des systèmes inhibiteurs et du patron locomoteur consisterait donc en une variation de l'expression membranaire de ces cotransporteurs (régulation possible au niveau du génome) permettant de diminuer sensiblement la valeur du potentiel d'équilibre des ions chlorure. Des travaux récents (Pearlstein, et coll. 2005; Jean-Xavier, et coll. 2006) montrant l'implication de la sérotonine dans la mise en place d'une alternance locomotrice chez le rat nouveau-né, suggèrent fortement l'implication des voies descendantes dans cette maturation.

Enfin l'adaptabilité à long terme des CPGs locomoteurs spinaux peut s'exprimer au travers de l'incroyable plasticité dont font preuve ces réseaux de neurones. Ainsi, le programme moteur peut être reconfiguré suite à une mise en jeu chronique des afférences sensorielles. En effet, des lapins nouveau-nés spinalisés expriment majoritairement une locomotion bilatérale alternée de type marche. Cependant, suite à entraînement de plusieurs jours, ces animaux sont capables d'exprimer à nouveau un comportement locomoteur de type bond (Viala 1986).

II) LES RESEAUX LOCOMOTEURS SPINAUX : UN SIECLE D'ETUDE

A) LA NAISSANCE D'UN CONCEPT : LES CPGS LOCOMOTEURS

Dès le début du XX^{ième} siècle, les travaux de Graham Brown montrent qu'un chat ayant subi une section basse de la moelle épinière (Th12) ainsi qu'une rhizotomie dorsale génère des mouvements locomoteurs rudimentaires des membres postérieurs. Il formule l'hypothèse selon laquelle, en l'absence d'influence descendante et d'afférence sensorielle, les réseaux de neurones localisés au niveau spinal peuvent générer seuls une activité rythmique à la base de la locomotion. Il les nomme alors "*central pattern generator*" (CPG) (Brown 1911). De plus, il propose un modèle dans lequel l'alternance de type fléchisseur/extenseur observée lors de la marche dépendrait de l'existence d'hémigénérateurs lombaires

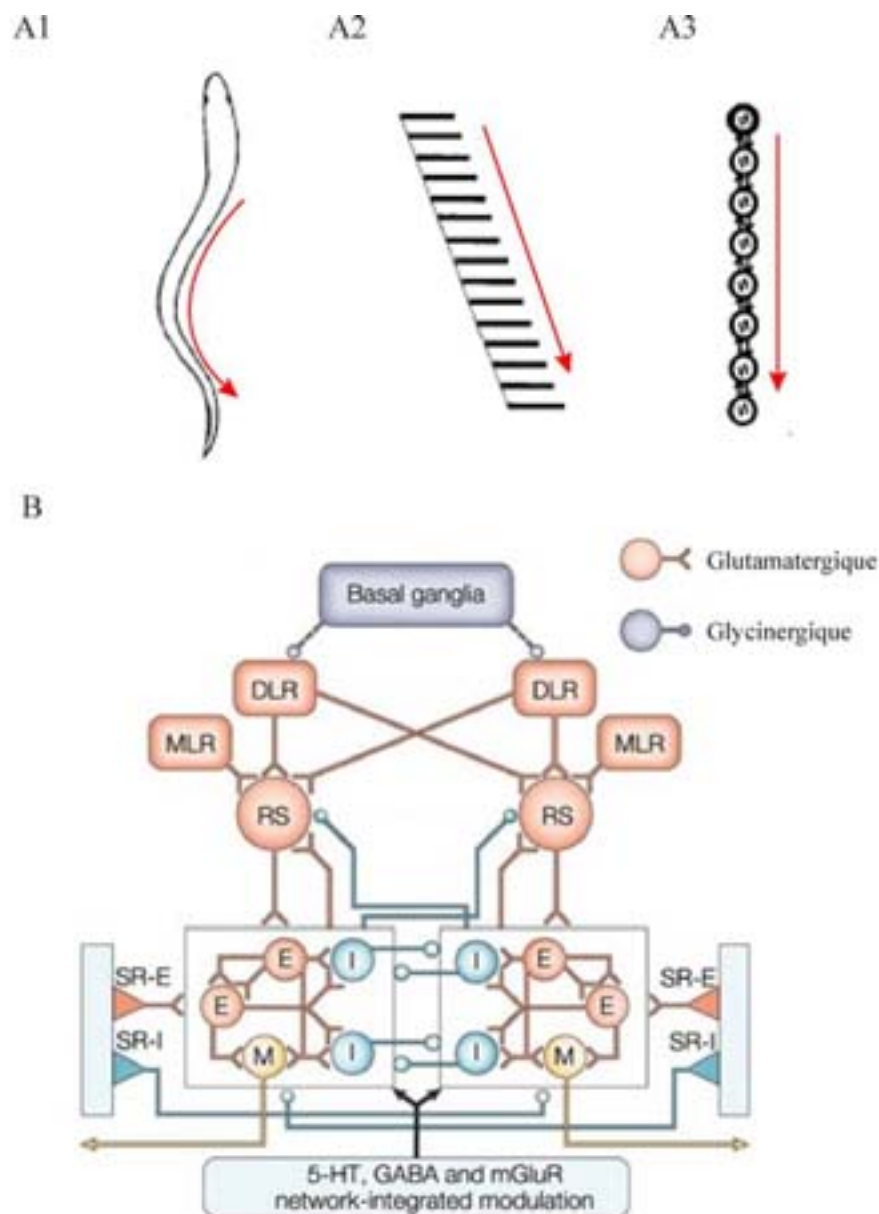


Figure 8 : Organisation segmentaire des CPGs locomoteurs spinaux chez la lamproie.

(A1) Représentation schématique d'une ondulation utilisée lors de la nage ondulatoire. (A2) Propagation segmentaire de la commande motrice lors de la nage. (A3) Organisation distribuée des CPGs locomoteurs spinaux. (B) Organisation des différents éléments neuronaux et synaptiques d'un CPG segmentaire.

(E) interneurone excitateur; (I) interneurons inhibiteurs; (M) motoneurons; (SR-E/I) récepteurs à l'étirement Excitateurs, Inhibiteurs; (RS) neurones réticulospinaux; (MLR) région locomotrice mésencéphalique; (DLR) région locomotrice diencéphalique.

(A) Modifié d'après Delvolvé, 1997; (B) Grillner, 2003

antagonistes (le "*half-center model*"). Renforçant cette idée, d'autres études ont confirmé la capacité de la moelle épinière à générer seule des activités motrices rythmiques. Chez le chien et le cochon d'inde lors de narcoses (sommeil provoqué), des mouvements rythmiques non locomoteurs (par exemple de type grattage) ont ainsi pu être mis en évidence (Brown 1912). Quelques décennies plus tard, l'hypothèse de Brown concernant l'existence de CPGs locomoteurs spinaux était confirmée par des études chez le lapin montrant qu'une activité locomotrice induite pharmacologiquement pouvait être enregistrée à partir de nerfs moteurs sur une préparation curarisée (Viala et Buser 1971). Dans ces conditions, la locomotion est qualifiée de fictive dans la mesure où compte tenu de la présence de curare (bloquant cholinergique nicotinique), aucun mouvement ne peut être généré.

Des études ultérieures ont ensuite permis de confirmer ou de modifier quelque peu le modèle présenté par Brown. Ainsi, Lundberg reprend cette théorie des hémigénérateurs en précisant le rôle potentiel des afférences sensorielles cutanées et proprioceptives dans la complexité du patron locomoteur (Engberg et Lundberg 1969). Par ailleurs, d'autres auteurs proposent un modèle simple mettant en jeu une boucle d'interneurones inhibiteurs capables de produire une activité rythmique locomotrice (Gurfinkel 1972). Plus complexe, le modèle de la mosaïque de générateurs proposé par Grillner (1981) suggère que chaque articulation posséderait un couple de générateurs produisant l'activité alternée des muscles fléchisseurs et extenseurs (Grillner 1981). Les différentes connexions entre les unités rythmiques de ces articulations permettraient la production de multiples patrons locomoteurs. Enfin, certains auteurs proposent que les réseaux spinaux locomoteurs pourraient être constitués de plusieurs niveaux d'interneurones, un premier capable de générer l'activité rythmique et un second responsable de l'organisation fine du patron locomoteur (Perret 1983). Finalement, il est plus probable que l'organisation des CPGs locomoteurs spinaux corresponde à un hybride entre ces différents modèles, intégrant à la fois différents étages interneuronaux (rythme et patron) et impliquant les afférences sensorielles dans la modulation du patron locomoteur, notamment lors des transferts de phases.

B) LOCALISATION SPINALE DES CPGS

Avant d'entreprendre l'étude fine de l'organisation des CPGs locomoteurs, il a été nécessaire de connaître précisément la localisation de ces réseaux spinaux. Ainsi, des expériences menées à la fois chez des Vertébrés inférieurs et supérieurs et utilisant des

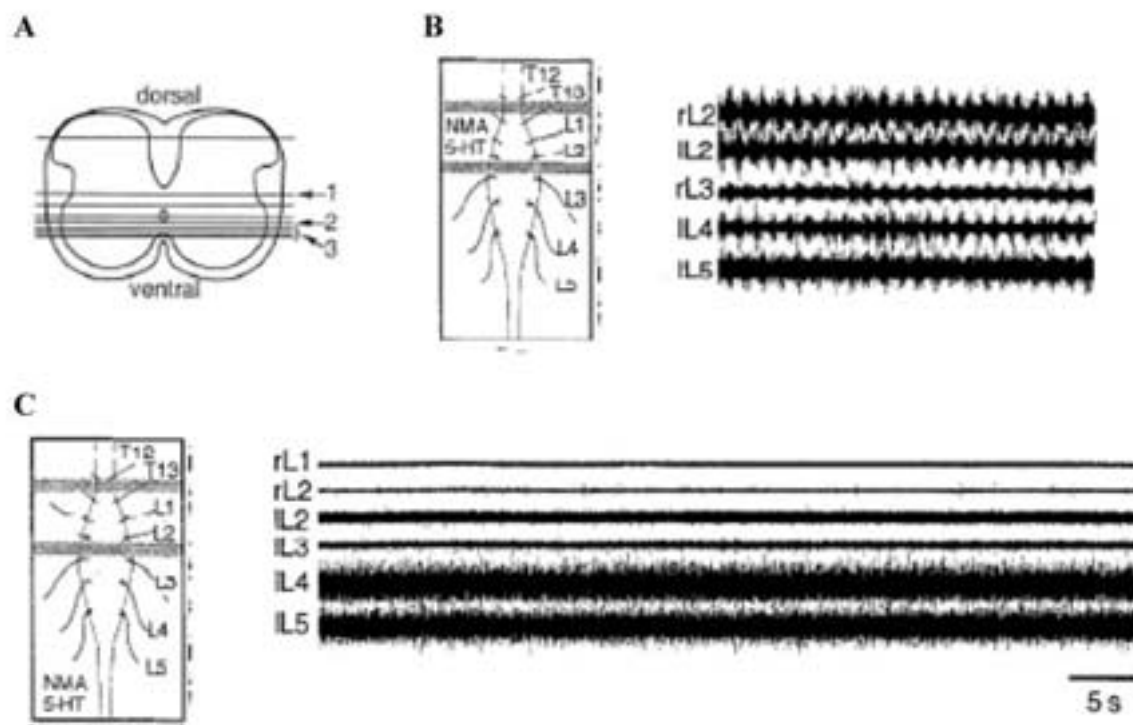


Figure 9 : Localisation des CPGs locomoteurs spinaux des membres postérieurs chez le rat nouveau-né.

(A) Représentation schématique des différents niveaux de sections horizontales réalisées. Après avoir réalisé la section 1, une locomotion fictive est toujours générée malgré une réduction dans l'amplitude des activités. A l'inverse, la section 3 entraîne la disparition de toute activité. (B) L'application sélective de NMA/5-HT sur les segments L1 et L2 déclenche une activité rythmique sur l'ensemble des segments enregistrés. (C) L'application du même milieu activateur sur les segments L3 à L5 ne déclenche qu'une activité tonique.

Modifié (A) d'après Kjaerulff et Kiehn, 1996, (B) et (C) d'après Cazalets et coll., 1996

approches lésionnelles, pharmacologiques et d'imagerie cellulaire se sont succédées depuis les tous premiers travaux de Brown et de Sherrington chez le chat.

Concernant la localisation de ces CPGs chez les Vertébrés inférieurs tels que la lamproie et le xénope (Roberts 2000), de nombreuses études ont montré la présence d'hémigénérateurs droits et gauches distribués le long de la moelle épinière (figure 8) (Grillner 2003). Cette distribution segmentaire des oscillateurs est cependant spécifique des animaux se propulsant grâce à une nage ondulatoire et ne peut rendre compte d'une locomotion appendiculaire. Toutefois, certains animaux tels que la salamandre utilisant ces deux modes locomoteurs présentent en plus des CPGs axiaux impliqués dans la nage, des CPGs localisés au niveau des ceintures pelvienne et scapulaire responsables de la marche (Delvolve, et coll. 1997).

Ces dernières données suggèrent une régionalisation des CPGs au niveau spinal chez les espèces utilisant un mode de propulsion appendiculaire. Ainsi, les travaux menés chez le chat ont notamment permis de localiser une zone rythmogène au sein de la moelle épinière lombaire (L3-L4) (Grillner et Zangger 1979; Deliagina, et coll. 1983) dont la stimulation déclenche une locomotion coordonnée (Marcoux et Rossignol 2000; Langlet, et coll. 2005; Barthelemy, et coll. 2006). Cette régionalisation des CPGs est également la règle chez le rat adulte chez lequel la lésion discrète d'une région spinale (Th13-L2) provoque de sévères déficits locomoteurs (Magnuson, et coll. 2005). Enfin chez le lapin, les CPGs contrôlant les mouvements des membres antérieurs et postérieurs sont localisés respectivement dans les régions cervicales et lombaires (Viala et Vidal 1978).

A l'instar des études sur la neuropharmacologie des centres locomoteurs, le développement des préparations réduites *in vitro* a largement facilité l'étude de la localisation des CPGs en autorisant à la fois des approches lésionnelles (sections sériees rostro-caudales et dorso-ventrales) ainsi que des compartimentations facilitant la perfusion et l'activation préférentielle de certaines régions spinales (figure 9). Les travaux ainsi réalisés ont délimité la zone minimale de tissu nécessaire pour induire une activité rythmique alternée bilatéralement au niveau des segments lombaires antérieurs L1 et L2 (Cazalets, et coll. 1995; Bracci, et coll. 1996; Kjaerulff et Kiehn 1996; Cowley et Schmidt 1997; Kremer et Lev-Tov 1997; Schmidt et Jordan 2000). Notons que l'obtention d'une activité locomotrice de type fléchisseur/extenseur nécessite une région spinale plus distribuée, s'étendant des segments Th13 à L5. De manière similaire, les régions les plus rythmogènes des CPGs antérieurs sont localisés au niveau des segments C7 à Th1, même si une zone plus large comprenant des

segments cervicaux plus antérieurs (jusqu'à C5) est nécessaire pour l'obtention d'un patron locomoteur présentant à la fois des alternances bilatérale et de type fléchisseur/extenseur (Ballion, et coll. 2001).

Dans le plan dorso-ventral, les CPGs locomoteurs se situent dans une zone ventro-médiane proche du canal central. Ainsi, la région minimale nécessaire pour l'obtention d'une activité rythmique locomotrice inclue la partie médiane de la lamina VII, la lamina VIII et la lamina X (figure 9A) (Bracci, et coll. 1996; Kjaerulff et Kiehn 1996). Cette portion ventro-médiane de moelle épinière est suffisante pour générer une activité organisée de type fléchisseur/extenseur, présentant de plus une alternance bilatérale assurée par la présence de fibres inhibitrices ventrales commissurales.

C) ORGANISATION DES CPGS : OUVRIR LA "BOITE NOIRE"

Chez les Vertébrés, l'organisation des CPGs locomoteurs la plus étudiée et la mieux connue est sans nul doute celle des Vertébrés inférieurs telle que la lamproie. Ces travaux ont permis d'énoncer les principes fondamentaux de l'architecture, de la connectivité des différents éléments constitutifs de ces réseaux ainsi que de leur rythmogenèse. Toutefois, même si ces principes sont largement transposables aux autres espèces, l'organisation même des CPGs locomoteurs des Vertébrés supérieurs reste méconnue et très souvent assimilée à une "boite noire". De plus, l'utilisation d'une locomotion appendiculaire a nécessité la mise en place de nouveaux éléments inhérents à ce mode de propulsion, permettant par exemple l'apparition des alternances de type fléchisseur/extenseur dans la locomotion bipède et quadrupède. De fait, l'analyse précise de cette "boite noire" et la dissection de ses constituants spécifiques constituent un nouveau challenge expérimental.

1) Les interneurones excitateurs :

Chez les Vertébrés inférieurs, les interneurones excitateurs jouent un rôle central dans la rythmogenèse des CPGs. Il semble donc naturel de déterminer si de tels neurones assurant la même fonction sont présents au sein des CPGs des Vertébrés supérieurs. Sur la base de leurs propriétés membranaires (rebonds post-inhibiteurs, plateaux), de leur connectivité (afférences sensorielles, efférentes) ainsi que de leur patron locomoteur (extenseur, fléchisseur ou tonique), quatre classes d'interneurones excitateurs ont été identifiées chez les mammifères (Kiehn 2006).

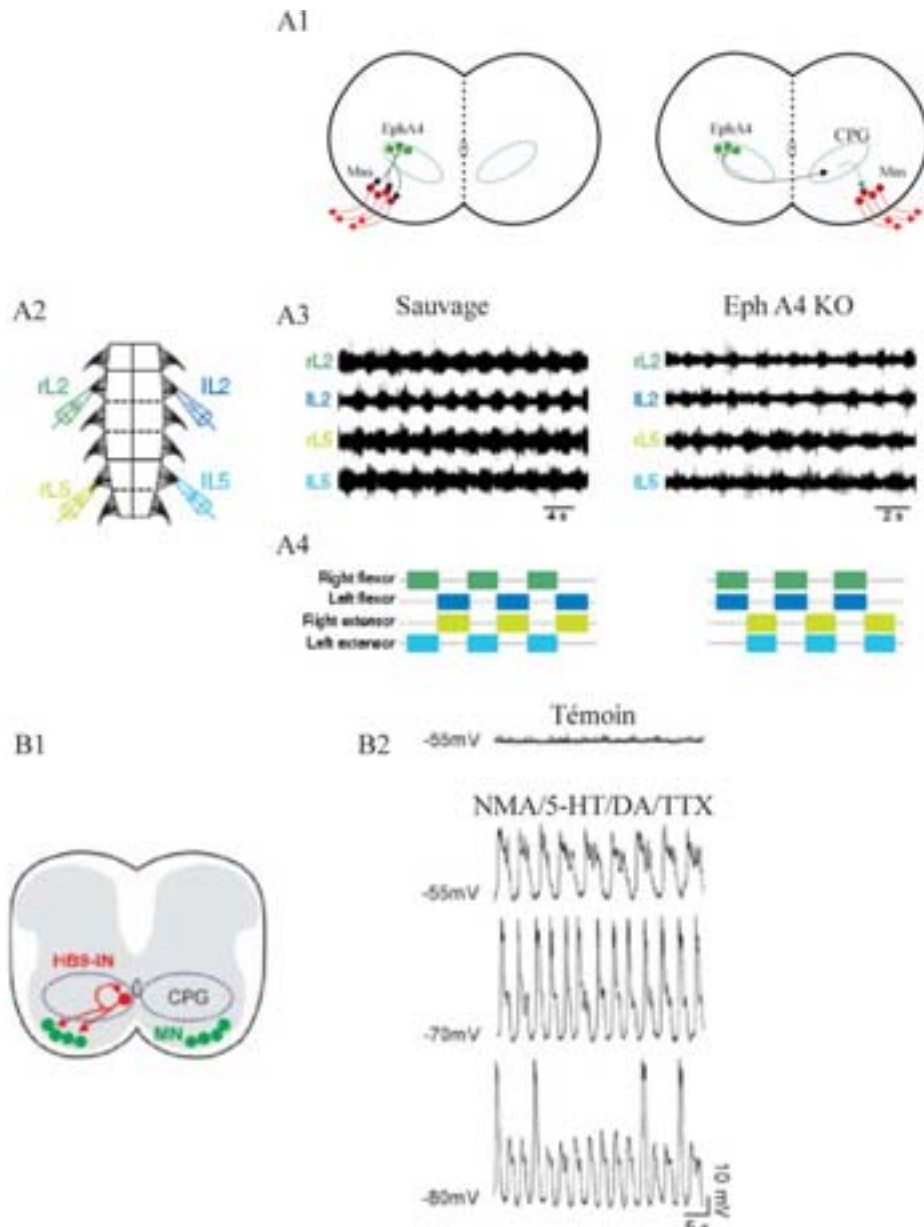


Figure 10 : Les interneurons excitateurs (EphA4 et Hb9) des CPGs locomoteurs spinaux chez la souris.

(A1) Représentation schématique de la projection axonale commissurale des interneurons EphA4 chez les souris normales (à gauche) et chez celles portant une délétion du gène EphA4 (EphA4 KO). (A2) Schéma de la moelle épinière isolée *in vitro* et des différents sites d'enregistrement (rL2, racine ventrale L2 droite; IL2, L2 gauche; rL5, L5 droite; IL5, L5 gauche). (A3) Enregistrements électrophysiologiques des racines motrices lors d'une activation pharmacologique des CPGs locomoteurs. On observe que l'alternance bilatérale est remplacée chez la souris EphA4 KO par une synchronie. En outre, l'alternance fléchisseur extenseur est conservée. (A4) Schéma de la répartition temporelle des bouffées d'activités des différentes racines motrices. (B1) Organisation des interneurons Hb9 au sein des CPGs locomoteurs spinaux des mammifères. (B2) Enregistrements intracellulaires des interneurons Hb9 lors d'une activation pharmacologique des CPGs locomoteurs spinaux (NMA/5-HT/DA/TTX). Dans ces conditions où toutes les afférences synaptiques sont bloquées, les interneurons Hb9 présentent de larges oscillations voltage-dépendante de leur potentiel de membrane.

Modifié d'après Kiehn, 2006

Chez le chat, deux populations d'interneurons déchargeant rythmiquement pendant les phases d'extension ou de flexion (Shefchyk, et coll. 1990; Angel, et coll. 2005) ont été localisées dans les régions spinales connues pour leur implication dans la rythmogénèse locomotrice (régions lombaires L3-L4 et lombosacrées). Ces interneurons, à la fois activés par la stimulation des régions locomotrices supraspinales (Shefchyk, et coll. 1990) et fortement influencés par les afférences fusoriales (primaires et secondaires) (Cavallari, et coll. 1987; Edgley et Jankowska 1987; Edgley et Jankowska 1987; Angel, et coll. 2005), se projettent directement au niveau des motoneurons. Cependant, il semble que la nature excitatrice de ces interneurons n'ait pas été formellement établie. De part la difficulté à cartographier et à identifier fonctionnellement l'ensemble des populations interneurales impliquées dans la fonction locomotrice chez le chat, d'autres modèles ont fait leur apparition et tout particulièrement le modèle souris qui autorise maintenant des approches combinées de génétique, d'électrophysiologie et d'imagerie fonctionnelle. Ainsi, il est désormais possible d'identifier différentes populations neuronales appartenant aux CPGs locomoteurs grâce aux marqueurs génétiques exprimés préférentiellement par tel ou tel groupe cellulaire.

Dans de récentes études, des souris "*knockout*" des récepteurs aux éphrines A4 (EphA4) et de leur ligand B3 (EphrinB3) ont été utilisées (Dottori, et coll. 1998; Coonan, et coll. 2001; Kullander, et coll. 2001; Kullander, et coll. 2001; Yokoyama, et coll. 2001). Les éphrines interviennent dans le guidage axonal et la délétion du gène de leur récepteur dans les neurones induit un guidage anarchique de leur axone. Ainsi, des neurones excitateurs prémoteurs (appelés EphA4) normalement ipsilatéraux chez les animaux sauvages, se projettent vers les segments controlatéraux chez ces souris "*knockout*" (figure 10 A1) (Kullander, et coll. 2003). Cette connexion excitatrice commissurale induit alors un comportement locomoteur de type bond, remplaçant l'alternance bilatérale par une synchronie. Cette modification des relations de phase entre les mouvements des membres postérieurs est également observée au niveau des membres antérieurs dans une étude très récente sur le comportement locomoteur de ces souris EphA4-*ko* (Akay, et coll. 2006). Même si une réorganisation partielle du système nerveux au cours du développement puisse être induite durant ces manipulations génétiques rendant parfois délicate l'interprétation de certains résultats, ces expériences montrent qu'au moins une partie des cellules EphA4 sont des interneurons excitateurs des motoneurons ipsilatéraux (Butt, et coll. 2005), mais n'indiquent cependant pas un rôle putatif dans la genèse du rythme locomoteur.

Une dernière population d'interneurons excitateurs a pu également être identifiée en couplant l'expression de la protéine GFP ("*green fluorescent protein*", détectée par

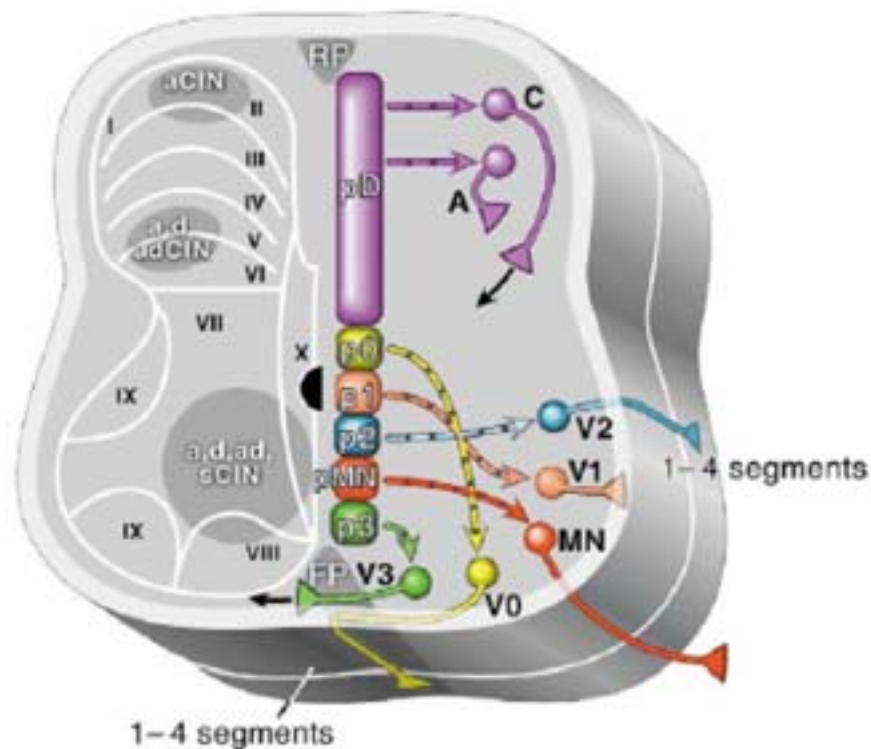


Figure 11 : Origine et développement de certaines catégories neuronales au cours du développement de la moelle épinière chez les Vertébrés supérieurs.

La moitié droite du schéma représente l'origine des populations d'interneurones et des neurones moteurs (MN). Pour information, les interneurones V0 sont marqués par *Evx1*, les V1 par *En1* (*Engrailed*), les V2 par *Chx10*, les V3 par *Sim1* et les neurones moteurs par *Hb9*.

La moitié gauche du schéma représente la localisation générale des interneurones commissuraux (CIN) au niveau des différentes couches de Rexed (I à X). On note 4 classes d'interneurones commissuraux en fonction de leur patron de projection : les interneurones commissuraux (a) ascendants, (d) descendants, (ad) ascendants et descendants, (s) segmentaires.

Modifié d'après Goulding et Pfaff, 2005

microscopie à fluorescence et permettant la visualisation des neurones en direct) au facteur de transcription HB9 (*basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9*) (figure 10 B) (Hinckley, et coll. 2005; Wilson, et coll. 2005). Si leur rôle exact dans la genèse de l'activité locomotrice reste là encore à déterminer, il apparaît néanmoins que ces interneurons HB9 présentent une organisation segmentaire le long de la moelle épinière, qu'ils sont rythmiquement actifs pendant la locomotion et que certains d'entre eux possèdent des propriétés de rythmogénèse (cellule "*pacemaker*"). En effet, isolés du reste du réseau par la mise au silence de toutes les synapses chimiques lors de l'application de tétrotoxine (bloquant des canaux sodiques voltage-dépendants), les interneurons excitateurs Hb9 présentent des oscillations endogènes de leur potentiel de membrane en réponse à la perfusion d'un mélange composé de NMA, de 5-HT et de dopamine. L'observation de ces oscillations, dont la période est voltage-dépendante, permet de classer ces interneurons parmi les éléments importants de la genèse locomotrice spinale.

2) Les interneurons inhibiteurs :

L'alternance d'un rythme suppose l'implication de connexions inhibitrices réciproques. Ainsi, les études menées chez les Vertébrés inférieurs ont montré l'importance des interneurons inhibiteurs dans le maintien de l'alternance droite/gauche. En outre, le modèle d'hémigénérateurs chez les Vertébrés supérieurs suppose que des interneurons inhibiteurs permettent également d'assurer l'alternance entre les activités de type fléchisseur et extenseur.

Grâce aux facteurs de transcription qu'elles expriment, 4 classes d'interneurons "primitifs" ont pu être identifiées (nommées V0 à V3) au cours de la formation de la moelle épinière (figure 11) (Goulding et Pfaff 2005) :

- les interneurons V0 se projetant vers les segments voisins controlatéraux (Lanuza, et coll. 2004);
- les axones des interneurons V1 restant localisés au niveau segmentaire ipsilatéral;
- les neurones V2 se projetant vers des segments ipsilatéraux voisins;
- enfin les axones des neurones V3 ayant pour cible le segment controlatéral.

Compte tenu de leur projection, ces interneurons peuvent dès lors être impliqués dans les coordinations locomotrices bilatérales et de type fléchisseur/extenseur.

L'**alternance bilatérale** chez les mammifères repose tout comme chez les Vertébrés inférieurs sur des connexions commissurales inhibitrices. En effet, les travaux de lésions horizontales de la moelle épinière isolée du rat nouveau-né révèlent que ces coordinations

sont maintenues en présence de la commissure ventrale (Kjaerulff et Kiehn 1996). Ces interneurons commissuraux ventraux sont donc à la base des coordinations entre les segments controlatéraux (Kjaerulff et Kiehn 1997; Bonnot, et coll. 1998; Cangiano et Grillner 2005) et mettent en jeu des connexions inhibitrices dans la mesure où, baignée par des antagonistes glycinergique et GABAergique, la moelle épinière isolée de rat nouveau-né génère une activité rythmique caractérisée par des activités bilatérales synchrones (Bracci, et coll. 1996; Bracci, et coll. 1996). Dans ces conditions, on peut raisonnablement supposer que ces interneurons inhibiteurs commissuraux auraient pour origine les neurones de type V0 et/ou V3. Ainsi, des souris "*knockout*" pour les neurones V0 peuvent présenter des périodes de synchronie entre les membres postérieurs (locomotion de type bond) sans altérer l'alternance de type fléchisseur/extenseur (Lanuza, et coll. 2004). Toutefois, la conservation d'une partie de l'alternance bilatérale que l'on peut observer chez ces souris transgéniques révèle que d'autres populations de neurones (probablement V3) sont également impliquées dans les coordinations bilatérales.

Comme nous l'avons précisé précédemment, il est important de noter que dans les modèles expérimentaux de lignées "*knockout*", des systèmes de compensation peuvent être spontanément exprimés contrebalançant tout ou partie les effets d'une délétion génique. Afin de s'affranchir de cet écueil, il apparaît souhaitable de pouvoir moduler l'activité de populations identifiées de neurones. Par exemple, la mise au silence temporaire d'une population neuronale permettrait notamment de préciser son rôle dans le fonctionnement des CPGs. Cette approche est désormais possible chez la souris. Le récepteur de la drosophile à l'allatostatin (AlstR) est capable d'activer une conductance potassique, induisant ainsi une diminution de la résistance d'entrée et de l'excitabilité des neurones cibles (Lechner, et coll. 2002). L'introduction dans le génome murin du gène codant pour ce récepteur permet son expression ciblée en particulier dans les interneurons V1 (Tan, et coll. 2006). L'application d'allatostatin permet alors de mettre au silence spécifiquement et réversiblement cette population neuronale sans modifier l'organisation du CPG comme cela peut être le cas chez les souris "*knockout*". Ces expériences ont ainsi permis de démontrer que les neurones inhibiteurs V1 régulent la fréquence du rythme produit par les CPGs locomoteurs (Gosgnach, et coll. 2006). Même si les effets attendus sur le patron locomoteur n'ont pas été rapportés par ces auteurs, cette approche d'inactivation inductible et réversible de populations neuronales choisies doit permettre dans un avenir proche de disséquer finement les divers éléments de ce réseau locomoteur.

L'alternance de type fléchisseur/extenseur, présente sur des préparations de moelles épinières dépourvues de connexion commissurale (Raastad, et coll. 1997; Bonnot, et coll. 2002) repose sur des connexions ipsilatérales réciproques et inhibitrices. En effet, cette alternance est supprimée par la perfusion d'antagonistes glycinergique et GABAergique sur moelle épinière isolée de rat nouveau-né (Bracci, et coll. 1996; Bracci, et coll. 1996). Parmi les interneurons inhibiteurs participant à la régulation de l'activité produite par les CPGs locomoteurs, les cellules de Renshaw (CR) et les interneurons de l'inhibition réciproque (INs-Ia) sont issus de la population de neurones primitifs V1 (Sapir, et coll. 2004; Alvarez, et coll. 2005). Les CR reçoivent une innervation excitatrice (cholinergique et glutamatergique, voir 3) les motoneurons) en provenance de collatérales d'axones des motoneurons segmentaires qu'elles innervent. En réponse à cette excitation, les CR inhibent en retour ces motoneurons (inhibition récurrente). Le rôle de ces cellules se limiterait donc à réguler le gain de la sortie motrice du système nerveux central. En revanche, certains auteurs considèrent que les interneurons de l'inhibition réciproque seraient responsables de l'alternance de type fléchisseur/extenseur. Les INs-Ia extenseurs et fléchisseurs déchargent en anti-phase respectivement avec les motoneurons extenseurs et fléchisseurs, pourraient donc être impliqués dans l'alternance fonctionnelle entre ces deux groupes motoneuronaux (McCrea, et coll. 1980; Noga, et coll. 1987; Pratt et Jordan 1987). Cependant jusqu'à présent, aucune population interneuronale *directement* responsable de ces coordinations n'a été formellement isolée et identifiée.

3) Les motoneurons :

Chez les Vertébrés, on considère généralement que le motoneurone n'est pas un élément constitutif des CPGs. Des travaux récents pourraient nous amener à reconsidérer cette question. En effet, la stimulation électrique tonique des axones des motoneurons lombaires permet le déclenchement d'une locomotion fictive alternée bilatéralement sur une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de souris nouveau-née (Mentis, et coll. 2005). Afin d'étudier ce phénomène, les auteurs ont enregistré l'activité de cellules de Renshaw connues pour recevoir une excitation monosynaptique en provenance de collatérales d'axones des motoneurons. La stimulation antidromique de ces axones déclenche dans les cellules de Renshaw des potentiels post-synaptiques excitateurs. Fait surprenant et nouveau, ces réponses bien que fortement diminuées par l'application de bloquants cholinergiques, ne disparaissent qu'après la perfusion d'antagonistes de type glutamatergiques (Mentis, et coll. 2005; Nishimaru, et coll. 2005). Ces travaux démontrent la potentialité des motoneurons à libérer

Gradient d'excitabilité

Connectivité asymétrique

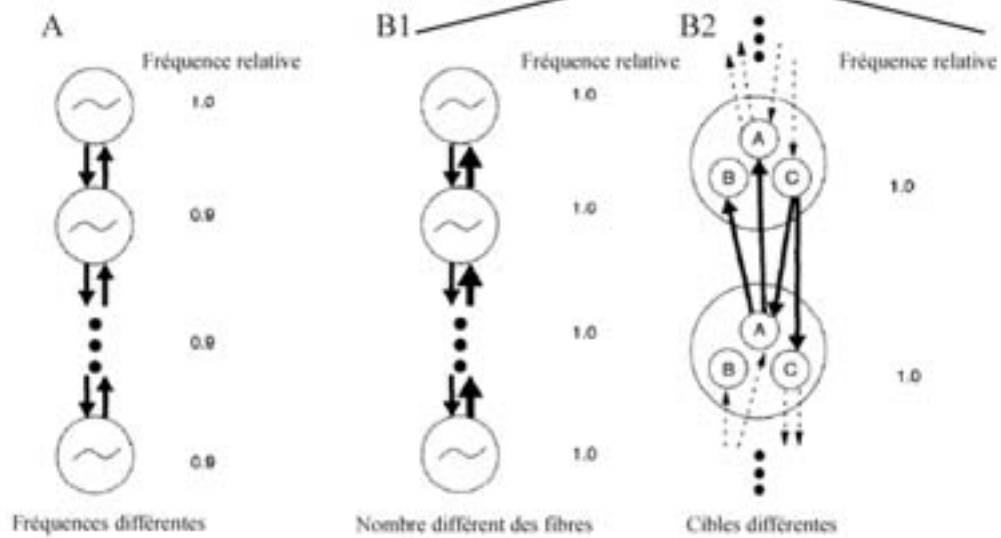


Figure 12 : Mécanismes sous-tendant les coordinations entre CPGs.

(A) Dans ce modèle, la différence entre les fréquences intrinsèques des CPGs est à l'origine du gradient d'excitabilité. Toutefois, l'asymétrie (nombre et importance fonctionnelle de fibres, **B1**; cibles différentes, **B2**) entre les connexions réciproques des CPGs est également un des mécanismes impliqués dans les coordinations intersegmentaires.

Modifié d'après Skinner et Mulloney, 1998

du glutamate sur des interneurons spinaux et pourraient expliquer par extrapolation le déclenchement d'une locomotion fictive par la stimulation de leurs axones.

Dès lors, les motoneurons, longtemps considérés uniquement comme éléments de sortie des réseaux moteurs pourraient jouer un rôle important dans la genèse même du rythme locomoteur.

III) COORDINATIONS INTERAPPENDICULAIRES / INTERSEGMENTAIRES :

Dans la locomotion appendiculaire, les caractéristiques fondamentales sont (1) une activité rythmique, (2) une alternance ipsilatérale de type fléchisseur/extenseur, (3) une alternance droite/gauche et (4) des coordinations interappendiculaires. Si nous disposons de nombreuses données concernant les trois premiers points, le dernier, à la base des changements d'allure chez l'animal (en particulier quadrupède), reste assez peu documenté. Appréhender les mécanismes responsables des coordinations interappendiculaires chez les Vertébrés supérieurs nécessite une connaissance précise des couplages existants entre les CPGs locomoteurs localisés au niveau des ceintures pelvienne et scapulaire. Dans ce sens, les travaux menés sur les coordinations intersegmentaires chez les invertébrés et les Vertébrés inférieurs nous fournissent de précieuses hypothèses de travail.

A) *LES INVERTEBRES ET VERTEBRES INFERIEURS :*

Différents modèles d'invertébrés (l'écrevisse, la sangsue) et de Vertébrés inférieurs (le xénope, la lamproie, la salamandre) se sont révélés particulièrement adaptés à l'étude des coordinations intersegmentaires et des couplages entre CPGs. Tous ces modèles possèdent en effet une chaîne d'oscillateurs segmentaires générant une commande motrice rostro-caudale assurant soit la propulsion de l'animal (xénope, sangsue, lamproie, salamandre) (Kristan 1974; Grillner, et coll. 1991), soit encore participant à la ventilation des œufs chez l'écrevisse (mouvements des palettes natatoires). Coordonner cette chaîne d'oscillateurs segmentaires requiert des mécanismes extrêmement précis capables de coupler par exemple jusqu'à 100 CPGs chez la lamproie tout en conservant un déphasage constant de 1% entre les segments adjacents et ce quel que soit la vitesse adoptée par l'animal (Wallen et Williams 1984; McClellan 1996). A la base de ces coordinations intersegmentaires, deux théories coexistent : le **gradient d'excitabilité** des CPGs d'une part et la **connectivité intersegmentaire** d'autre part (figure 12) (Skinner et Mulloney 1998).

1) *Théories et mécanismes:*

Au sein d'un réseau neuronal composé de deux CPGs couplés réciproquement par des connexions identiques (symétriques), le CPG présentant la fréquence intrinsèque la plus rapide est capable d'imposer son propre rythme à l'autre et est alors appelé CPG "*leader*". Ce mécanisme à la base de la théorie sur le **gradient d'excitabilité** (Ikeda 1964; Matsushima et Grillner 1992) s'applique également aux couplages au sein des chaînes d'oscillateurs. Sur une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de lamproie, lors de l'activation sélective des segments les plus caudaux, la fréquence d'oscillation de ces CPGs devient supérieure à celle du reste de la moelle épinière. A cet instant, les CPGs caudaux deviennent les CPGs "*leaders*" et une onde d'excitation est alors générée le long de l'axe cérébro-spinal, se propageant dans le sens caudo-rostral (Matsushima et Grillner 1992). Ce phénomène permet d'expliquer le comportement de nage en arrière chez ces animaux (Grillner 1993).

Chez la sangsue, les CPGs les plus rythmogènes sont situés au milieu de la chaîne d'oscillateurs (Hill, et coll. 2003). Dans cette situation et sur la base de cette première théorie, une double onde d'excitation serait générée et se propagerait à la fois dans le sens caudo-rostral et rostro-caudal. Cette situation permet difficilement d'expliquer la production d'une nage ondulatoire efficace et implique donc l'existence d'une autre théorie basée sur une **connectivité intersegmentaire asymétrique**. Entre deux CPGs, cette asymétrie repose sur le nombre, la nature (inhibitrice ou excitatrice) et les cibles des fibres les connectant. Notons que cette asymétrie peut refléter une combinaison partielle ou totale de ces caractéristiques. Par exemple chez la sangsue, les interneurons excitateurs se projettent vers les CPGs plus caudaux alors que les neurones inhibiteurs contactent à la fois les CPGs rostraux et caudaux (Brodfuehrer, et coll. 1995). Chez la lamproie, alors que les neurones excitateurs se projettent dans les deux directions, les neurones inhibiteurs contactent uniquement les segments plus caudaux (Buchanan 2001).

Dans une chaîne d'oscillateurs, la longueur des connexions est également un élément déterminant dans les couplages intersegmentaires. Par exemple chez la lamproie, si les connexions courtes sont plus impliquées dans le maintien du délai de propagation de la commande motrice de segments adjacents (Pearce et Friesen 1988; Sigvardt et Williams 1996), les connexions longues assurent quant à elles la stabilisation du rythme en connectant les CPGs distants (jusqu'à 40 segments) (Poon, et coll. 1978; Pearce et Friesen 1985; Brodfuehrer, et coll. 1995; McClellan et Hagevik 1999; Miller et Sigvardt 2000; Buchanan 2001; Friesen et Hocker 2001).

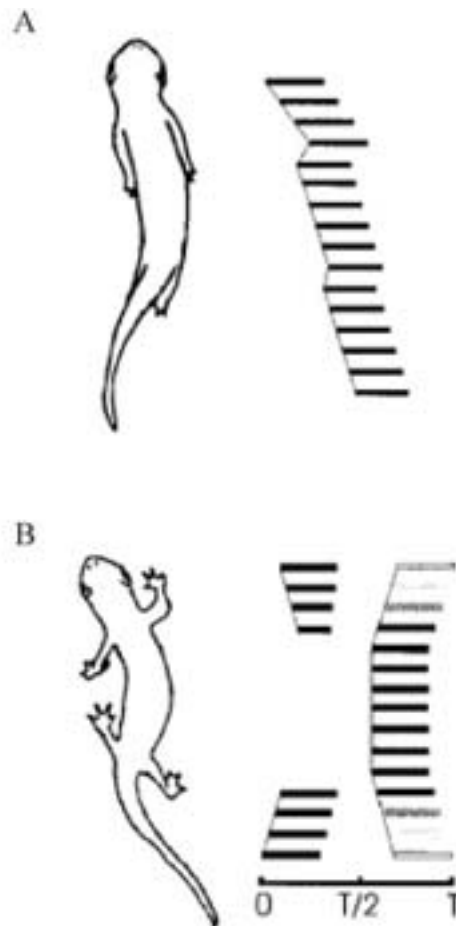


Figure 13 : Les différents modes de locomotion chez la salamandre.

Les barres noires indiquent les périodes d'activité des myomères ipsilatéraux durant la nage ondulatoire (A) et au cours de la marche (B). Lors de la nage, le déphasage quasi constant de segment à segment permettant la propagation de l'onde contractile est perturbé au niveau des ceintures scapulaire et pelvienne où sont probablement localisés les CPGs locomoteurs appendiculaires. Alors que les CPGs situés entre ces deux ceintures sont activés séquentiellement au cours de la nage, leur activité devient synchrone pendant la marche.

Modifié d'après Delvolvé et coll., 1997

Toutefois, peut-on transposer et appliquer ces théories aux coordinations interappendiculaires ? Un premier élément de réponse est donné par l'étude chez la salamandre des mécanismes responsables à la fois des couplages intersegmentaires lors de la nage axiale et des couplages interappendiculaire lors de la marche (figure 13) (Delvolve, et coll. 1997). Chez cet animal, il existe une chaîne d'oscillateurs segmentaires similaires à ceux décrits chez la lamproie et responsables de la nage ondulatoire, ainsi que des CPGs de marche localisés au niveau des ceintures scapulaire et pelvienne. Répondant à la théorie du gradient d'excitabilité, des CPGs "*leaders*" rostraux produiraient l'onde d'excitation rostro-caudale observée lors de la nage. Sur la base d'enregistrements électromyographiques, l'influence tonique des CPGs de marche sur les CPGs axiaux intermédiaires serait à l'origine des cassures observées dans la propagation de l'onde de contraction lors de la nage. Couplée au gradient d'excitabilité, la théorie basée sur l'existence de connexions asymétriques permettrait également d'expliquer les coordinations locomotrices observées lors de la marche puisque les connexions intersegmentaires entre CPGs de marche et CPGs axiaux sont remodelées de façon phase dépendante (par exemple les CPGs de nage les plus rostraux sont excités par les CPGs de marche de la ceinture scapulaire pendant la première moitié du cycle et sont inhibés pendant la seconde).

Pour conclure et en réponse à la question précédemment posée, il semblerait que l'on puisse en effet transposer ces théories à une locomotion de type appendiculaire chez les Vertébrés inférieurs. Toutefois en raison du peu de données disponibles dans la littérature, il convient de rester prudent quant à l'extrapolation de ces mécanismes aux Vertébrés supérieurs. Ce point constituera le fil conducteur des travaux présentés dans une section ultérieure (voir Résultats) Chapitre I).

2) *Rôle des afférences sensorielles dans les coordinations intersegmentaires*

Parallèlement aux mécanismes purement centraux que l'on vient de décrire, les afférences sensorielles participent également aux couplages entre les activités des réseaux de neurones moteurs. Afin d'évaluer précisément leur rôle, une première approche consiste à comparer les coordinations obtenues *in vivo* et sur des préparations isolées *in vitro* dépourvues d'afférence sensorielle. Par exemple, lorsque l'on isole la moelle épinière d'une lamproie, la propagation de la commande motrice reste toujours possible (Wallen et Williams 1984), mais néanmoins présente une modification significative du déphasage intersegmentaire (Hill, et coll. 2003). Confirmée par des modèles computationnels (Yu, et coll. 1999; Cang et Friesen

2000), cette différence peut être attribuée au fonctionnement *in vivo* des récepteurs sensoriels sensibles à l'étirement.

De manière complémentaire, une seconde approche consiste à effectuer des expériences de lésions en maintenant intactes les afférences sensorielles. Chez la sangsue, la section transversale de la chaîne d'oscillateurs perturbe le déphasage entre les CPGs, mais n'empêche pas la propagation de l'onde d'excitation au-delà du site de lésion, permettant de maintenir les coordinations intersegmentaires (Yu, et coll. 1999). Ainsi, le déphasage intersegmentaire observé sur une préparation isolée dépourvue d'afférence est insuffisant pour produire une vague complète sinusoïdale du corps de l'animal. Les retours sensoriels sont alors nécessaires pour corriger ce déphasage afin de permettre à la sangsue de produire une ondulation locomotrice adaptée.

Enfin, chez certaines espèces, le rôle des afférences sensorielles dépasse largement la correction ou le réajustement simple des coordinations intersegmentaires mais participe activement dans l'élaboration de ces couplages. En effet chez la larve de drosophile, l'ablation génétique des afférences sensorielles inverse le péristaltisme à la base de sa locomotion induisant ainsi un déplacement vers l'arrière (Suster et Bate 2002).

B) LES VERTEBRES SUPERIEURS :

Comme nous l'avions précédemment exposé, la plupart des principes fondamentaux concernant l'organisation et le fonctionnement des CPGs locomoteurs semble être conservée des Vertébrés inférieurs aux supérieurs. Bien que parcellaires, certaines données suggèrent qu'il en est de même pour les coordinations intersegmentaires à la base des couplages interappendiculaires.

1) Les coordinations intersegmentaires spinales :

Chez les Vertébrés supérieurs, les CPGs locomoteurs contrôlant les mouvements de membres antérieurs et postérieurs sont localisés respectivement au niveau cervical et lombaire (Viala et Vidal 1978; Ballion, et coll. 2001). Des expériences de lésions ont tenté de préciser les propriétés intrinsèques de chacun de ces oscillateurs. Chez le lapin adulte décortiqué et curarisé (Viala et Vidal 1978), l'injection systémique d'un mélange nialamide (inhibiteur des monoamines oxydases) /dopamine (L-dopa) permet de déclencher une locomotion fictive coordonnée sur l'ensemble des nerfs moteurs enregistrés. Après une ligature totale de la moelle épinière au niveau du segment thoracique Th13, le rythme produit par les CPGs

lombaires n'est pas (ou peu) modifié alors que les activités générées par les CPGs cervicaux ralentissent significativement, montrant une instabilité accrue de leur période locomotrice. Ces données suggèrent que les couplages entre les CPGs à l'origine des coordinations interappendiculaires seraient basés sur le principe du gradient d'excitabilité. De manière similaire, sur une préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né, une transection complète au niveau thoracique découple l'activité des CPGs antérieurs et postérieurs, révélant une fréquence intrinsèque plus rapide des générateurs lombaires (Ballion, et coll. 2001). L'ensemble de ces données suggère donc que les CPGs responsables des mouvements locomoteurs des membres postérieurs seraient les CPGs "*leaders*", des connexions propriospinales assurant la communication directe avec les générateurs cervicaux (English 1979; English 1985; English 1989).

Récemment, les données obtenues sur moelle épinière désinhibée (perfusée par des antagonistes glycinergique et GABAergique) chez le rat nouveau-né montrent que ces connexions propriospinales entre les CPGs distants reposeraient sur l'existence de connexions longues (au moins 10 segments) et de connexions plus courtes relayant au niveau des régions thoraciques (Cazalets 2005). Ces différentes fibres pourraient avoir comme origine les interneurons commissuraux ascendants et descendants (Carlin, et coll. 2006; Kiehn 2006; Zhong, et coll. 2006; Zhong, et coll. 2006) dont la distance de projections est d'au moins six segments (Eide, et coll. 1999; Birinyi, et coll. 2003).

2) *Rôle des afférences : périphériques et supraspinales*

Chez les Vertébrés inférieurs et les invertébrés, les **afférences sensorielles** jouent un rôle important dans les coordinations intersegmentaires, mais leur implication chez les Vertébrés supérieurs reste toutefois très peu documentée. En revanche, certains travaux montrent clairement que les afférences sensorielles jouent un rôle central dans les couplages entre CPGs fonctionnellement et géographiquement distincts. C'est en effet le cas lors des interactions entre les fonctions locomotrices et respiratoires (Iscoe et Polosa 1976; Kawahara, et coll. 1988; Palisses, et coll. 1988; Morin et Viala 2002; Potts, et coll. 2005). Chez le rat nouveau-né (préparation tronc cérébral-moelle épinière isolée, Morin et Viala 2002) et juvénile (préparation semi-intacte, Potts, et coll. 2005), la stimulation électrique des afférences à bas seuil (probablement proprioceptives) au niveau lombaire (L2) déclenche prématurément une bouffée d'activité respiratoire sur les nerfs commandant la contraction du diaphragme (nerfs phréniques). Lorsque la stimulation de ces afférences sensorielles devient répétitive (c'est le cas lors de la locomotion réelle), on observe l'émergence d'un couplage de

type 1:1 entre les cycles locomoteurs et respiratoires. Dès lors, on peut raisonnablement supposer que les afférences sensorielles pourraient être capables de coupler également les CPGs locomoteurs antérieurs et postérieurs. Dans le cadre de ce travail doctoral, ce point sera présenté dans une section ultérieure (voir **Résultats**) Chapitre IV).

Les travaux princeps de Shik et collaborateurs (1966) ont montré que la stimulation électrique d'une région locomotrice du tronc cérébral permet de modifier les coordinations interappendiculaires chez le chat en déclenchant des changements d'allures (de la marche au galop). Chez la salamandre, en fonction de l'intensité choisie, la stimulation électrique de la région locomotrice mésencéphalique déclenche soit de la marche, soit de la nage (Cabelguen, et coll. 2003). D'autres structures supraspinales telles que le cervelet sont connues pour jouer un rôle important dans les coordinations interappendiculaires. En effet chez le chat, suite à une cérébellectomie, ces dernières se trouvent profondément altérées. Il est donc nécessaire de prendre en compte l'implication des **voies descendantes** dans les coordinations interappendiculaires. Un travail élégant montre ainsi l'influence du système sérotoninergique sur les alternances bilatérales entre les membres postérieurs chez le rat nouveau-né. Chez les animaux traités par l'injection de p-chloro-phenylalanine (un inhibiteur de la synthèse de la 5-HT), la locomotion fictive induite par application de NMDA présente un synchronisme bilatéral anormal au niveau lombaire (Norreel, et coll. 2003; Pearlstein, et coll. 2005). Dans ces conditions, l'ajout de sérotonine exogène dans le milieu de perfusion, "mimant" la restauration des systèmes sérotoninergiques, déclenche alors une alternance bilatérale. Cependant, si de tels neuromodulateurs semblent être capables de contrôler les coordinations segmentaires, aucun d'entre eux n'a permis jusqu'alors de modifier suffisamment les programmes moteurs de manière à déclencher des changements d'allure locomotrice (par exemple de la marche au trot). De façon indirecte, ce point peut être également illustré par des expériences de lésion sélective des systèmes descendants neuromodulateurs chez le rat adulte. La perte des afférences monoaminergiques (5-HT, DA et NA) par injection chronique de toxines spécifiques (5,6 dihydroxytryptamine combinée à la 6-hydroxydopamine) réduit significativement le tonus postural de ces animaux, mais ne modifie en rien le patron locomoteur utilisé par l'animal. Si les systèmes descendants neuromodulateurs jouent un rôle important dans la mise en place des coordinations segmentaires, leur rôle dans les coordinations interappendiculaires reste indéterminé.

MATERIELS & METHODES



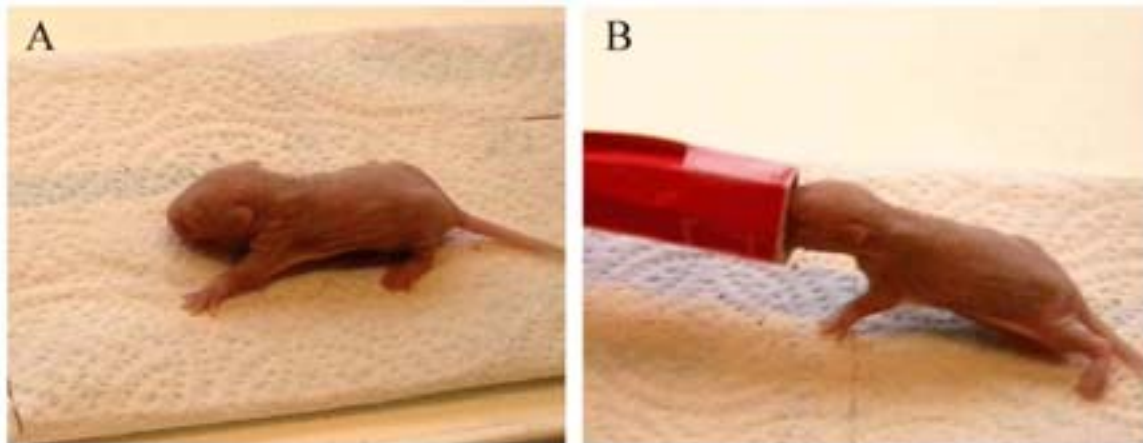


Figure 1 : Locomotion réelle chez le rat nouveau-né (3 à 7 jours).

La présentation d'un stimulus olfactif devant le museau de l'animal (voir texte) permet de déclencher des épisodes locomoteurs (**B**) au cours desquels des enregistrements EMGs sont réalisés. Notons que le support du corps et le placement des membres (ici l'arrière gauche) ne sont pas encore matures.

I) EXPERIENCES IN VIVO :

A) *Le rat nouveau-né :*

Les rats nouveau-nés (3 à 7 jours) sont anesthésiés par hypothermie jusqu'à la disparition de tout mouvement réflexe (flexion) en réponse à des pincements de la queue. Maintenus grâce à une colle biologique (collodion ; Sigma, Lyon, France), des paires d'électrodes en acier (diamètre 50 μ m) sont alors insérées dans les muscles extenseurs (triceps et gastrocnemius) des membres antérieurs et postérieurs. Une fois les électrodes positionnées, les animaux sont réchauffés en permanence sous une lampe. Des enregistrements électromyographiques (EMG) permettent alors d'évaluer les coordinations bilatérales et antéropostérieures lors de la locomotion. Pour induire une marche motivée, un cône contenant de la sciure provenant de la cage et constituant un puissant stimulus olfactif, est placé devant le museau des animaux (Jamon et Clarac 1998). L'éloignement lent et progressif du cône permet alors le déclenchement d'épisodes locomoteurs (figure 1).

B) *Le rat juvénile :*

L'anesthésie est identique à celle décrite précédemment, mais le temps d'intervention étant plus long, les animaux (âgés de 10 à 12 jours) sont maintenus en sommeil sur un tapis de glace. Dans ce cas, une très légère incision de la peau est effectuée afin de faciliter l'introduction des électrodes. Dans ces expériences, seules deux paires d'électrodes sont implantées, une dans un muscle fléchisseur (*tibialis anterior*), l'autre dans un muscle extenseur (*gastrocnemius*) de la cheville. Lors de la phase de réveil, les animaux sont placés sous une lampe et une période de repos est respectée. Les rats juvéniles sont alors déposés sur un tapis roulant bidirectionnel dont la vitesse est en permanence ajustée à la celle de déplacement spontané de l'animal.

II) EXPERIENCES IN VITRO :

A) *Bref historique de la préparation*

Cette approche méthodologique permet d'isoler *in vitro* une partie du système nerveux central (généralement la moelle épinière) que l'on maintient en survie pendant plusieurs heures en la baignant dans du liquide céphalorachidien artificiel (LCRA). Les activités motrices générées par les réseaux de neurones peuvent être enregistrées au niveau des muscles (EMG, préparations semi-intactes), au niveau des racines ventrales ou des nerfs identifiés (électroneurogrammes, préparations totalement isolées), ainsi qu'au niveau cellulaire (enregistrements électrophysiologiques intracellulaires des interneurons ou motoneurons spinaux).

Historiquement, la préparation de moelle épinière d'embryon de rat isolée *in vitro* fut d'abord développée afin d'étudier le développement des réflexes spinaux (Vaughn et Grieshaber 1973; Saito 1979). Par la suite une préparation modifiée comprenant la moelle épinière et le tronc cérébral de rat nouveau-né a permis d'étudier l'activité des CPGs bulbaires respiratoires (Suzue 1984; Smith et Feldman 1987; Hilaire, et coll. 1989). La petite taille de ce tissu, sa faible myélinisation et l'absence de barrière hémato-encéphalique permettent une diffusion aisée des métabolites (glucose, oxygène,...) ainsi que des substances neuroactives ajoutées dans le milieu de perfusion. Par la suite, cette même préparation a facilité l'étude des réseaux locomoteurs et le rôle essentiel joué par l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) dans le déclenchement des activités rythmiques alternées de type locomoteur (Kudo et Yamada 1987; Smith, et coll. 1988). C'est à cette époque que fut développée à Marseille la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* dans le but entre autres de localiser les CPGs responsables du rythme locomoteur (Cazalets, et coll. 1990). Un nombre important de travaux se focalise ensuite sur la pharmacologie des réseaux locomoteurs précisant le rôle joué par nombre de neuromédiateurs tels que la sérotonine (Cazalets, et coll. 1990; Cazalets, et coll. 1992; Cowley et Schmidt 1994; Kiehn et Kjaerulff 1996), la dopamine (Smith, et coll. 1988; Kiehn et Kjaerulff 1996), la noradrénaline (NA) (Kiehn, et coll. 1999; Sqalli-Houssaini et Cazalets 2000), l'acétylcholine (Cowley et Schmidt 1994; Cowley et Schmidt 1994; Kiehn, et coll. 1996), certains neuropeptides (Smith, et coll. 1988; Barthe et Clarac 1997), le cocktail activateur historiquement utilisé pour déclencher la locomotion fictive se composant de NMDA et de sérotonine. Même si la stimulation des régions locomotrices supra-spinales n'a

pas été systématiquement utilisée sur ce type de préparation réduite, il a cependant été décrit récemment une approche méthodologique basée sur la stimulation électrique du tronc cérébral (mise en jeu des voies descendantes activatrices) permettant d'initier une locomotion fictive (Zaporozhets, et coll. 2004) caractérisée par des alternances bilatérale, de type fléchisseur/extenseur au niveau lombaire (respectivement L2 et L5 (Kjaerulff et Kiehn 1996)), au niveau cervical (respectivement C5 et C8 (Ballion, et coll. 2001)) et enfin antéro-postérieure (Juvénal et al 2005).

Même s'il est nécessaire de garder à l'esprit qu'aux stades étudiés, les systèmes moteurs subissent toujours une maturation, l'utilisation croissante de ces préparations réduites a cependant permis d'accroître considérablement nos connaissances des réseaux de neurones moteurs et de leur pharmacologie.

B) Les préparations de moelle épinière isolée :

Deux stades de développement sont utilisés au cours de ces expériences, les rats nouveau-nés (0 à 4 jours) et les rats juvéniles (10 à 12 jours). Même si la dissection est en tout point similaire, l'utilisation d'un milieu sucré (voir partie LCRA & milieu sucré) pendant la dissection augmente la survie du tissu nerveux des animaux les plus âgés.

Les rats sont anesthésiés par hypothermie, puis décapités et éviscérés. La préparation est alors placée dans une cuve à dissection (25 ml) contenant du liquide céphalorachidien artificiel (vitesse de renouvellement 5-10 ml/min; voir partie : LCRA & milieu sucré). Maintenu initialement à faible température, le milieu de survie est progressivement chauffé au cours de la dissection (de 10°C à 25°C) et en permanence oxygéné (O₂ 95%, CO₂ 5%). Sous contrôle binoculaire, la peau et les muscles sont retirés puis une laminectomie dorsale est effectuée. Après avoir délicatement supprimé les méninges, les racines ventrales et dorsales sont sectionnées en coupant le plus proche possible des ganglions. Finalement, la préparation, généralement positionnée face ventrale vers le haut, est maintenue fixée par des minuties au fond d'une seconde cuve (recouverte de Sylgard) de volume plus petit (10 ml) permettant ainsi un renouvellement plus rapide du milieu de perfusion (5 ml/min). Afin de limiter voire de supprimer les effets indésirables liés aux procédures de dissection et d'isolement, un temps de récupération (45-60 min) est systématiquement respecté avant que tout enregistrement ne soit effectué.

Différents types de préparations ont ainsi été utilisées au cours de nos expériences : des préparations tronc cérébral-moelle épinière (les animaux sont décérébrés en avant de la cinquième paire de nerfs crâniens de manière à conserver le pont et le bulbe), des préparations moelle épinière isolée (la section est réalisée en avant de la première paire de racines cervicales) et enfin des préparations moelle épinière isolée conservant des nerfs moteurs identifiés. Dans ce dernier cas, le protocole de dissection est légèrement modifié. Une fois la laminectomie dorsale effectuée et les méninges retirées, les membres postérieurs de l'animal sont disséqués afin d'isoler les nerfs moteurs. Pour cela, la peau est entaillée et les muscles identifiés (*tibialis anterior* et *gastrocnemius*) par contrôle visuel. Les muscles sont ensuite détachés du squelette de l'animal et fixés par des minuties en prenant soin de ne pas sectionner leurs innervations. Les nerfs moteurs, repérés par leur point d'insertion au niveau des masses musculaires, sont finalement sectionnés.

C) Milieux de survie (LCRA & milieu sucrose)

- le liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRA) :

Le tissu nerveux est maintenu en survie grâce à la perfusion d'un milieu dont la composition est proche de celle du liquide céphalorachidien (en mM : 113 NaCl, 4,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 D-Glucose ; 95% O₂, 5% CO₂ ; pH=7,4; osmolarité : 300mosm.l⁻¹). L'osmolarité est ajustée grâce à l'ajout de D-mannitol dans les solutions.

- le milieu sucrose :

Isoler la moelle épinière de rats juvéniles (10-12 jours) a nécessité de nombreux essais initialement infructueux, probablement en raison d'une myélinisation avancée et de la taille plus importante de la préparation, diminuant ainsi fortement la simple diffusion des solutés. Combinant une possible carence en oxygène et des métabolites ainsi que des effets délétères liés au choc spinal lors de la dissection, aucune activité nerveuse ne pouvait être enregistrée. En utilisant une solution diminuant l'excitabilité neuronale et la production de potentiel d'action (pH=7,4 ; 339mM sucrose, 5mM HEPES ; 95% O₂, 5% CO₂), le milieu sucrose a permis d'augmenter les chances de survie des préparations puisque dans 3 cas sur 9, une activité locomotrice fictive *in vitro* a pu être initiée.

- *le milieu bas calcium haut magnésium :*

Afin de bloquer toute activité synaptique au niveau des segments spinaux, un milieu appauvri en calcium a été utilisé (en mM : 111,85 NaCl, 4,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 0,1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 D-Glucose ; 95% O₂, 5% CO₂; pH=7,4).

- *barrières & sections :*

Des barrières étanches de Vaseline sont mises en place afin de perfuser les segments spinaux ainsi compartimentés par des solutions différentes (en concentration ionique ou en substances neuroactives). Durant l'expérience, une différence de niveau entre les compartiments est réalisée afin de déceler la présence d'éventuelles fuites au niveau des barrières. De plus, à la fin de ces mêmes expériences, un colorant (bleu de méthylène) est appliqué dans l'un des compartiments afin d'en tester l'étanchéité.

Dans le but de supprimer toute connexion réciproque controlatérale, des sections sagittales de la moelle épinière ont été réalisées au niveau de certaines régions spinales (en particulier cervicale et/ou thoracique). Des sections transverses ont également été effectuées (Th7) afin de déconnecter physiquement les CPGs cervicaux des CPGs lombaires.

D) L'initiation de la locomotion

- *par la pharmacologie :*

L'application dans le bain de perfusion d'un mélange composé de N-méthyl-D,L-aspartate ($0,5-2 \times 10^{-5}M$), de sérotonine ($10^{-5}M$) et de dopamine ($10^{-4}M$) a été utilisée pour déclencher des épisodes de locomotion fictive (Barriere, et coll. 2004). Dans certaines expériences, l'ajout de bicuculline ($0,25 \times 10^{-5}M$) et de strychnine ($0,25 \times 10^{-5}M$) a permis de bloquer respectivement les synapses inhibitrices GABAergiques et glycinergiques.

- *par la stimulation électrique des racines dorsales (DR) :*

La stimulation (stimulateur Master 8 : AMPI) des racines dorsales d'une moelle épinière quiescente permet de déclencher une activité locomotrice fictive par la mise en jeu des afférences sensorielles. L'intensité minimale de stimulation (seuil) permettant le déclenchement d'une réponse à courte latence des motoneurons (réponse de type myotatique) est déterminée dans un premier temps par l'utilisation de choc unique, la stimulation devenant

ensuite soit tonique (fréquence : 1-5 Hz, intensité : 1-2 x seuil, durée des pulses : 0,3 msec) soit rythmique (période des trains de stimulations : 1-7 sec, fréquence : 1-5 Hz, durée des pulses : 0,3 msec).

- par la stimulation électrique des structures supra-spinales :

Basées sur une méthodologie récemment rapportée (Zaporozhets, et coll. 2004), des stimulations électriques toniques du tronc cérébral ont été réalisées afin d'induire dans certaines expériences une locomotion fictive. Une électrode de stimulation (pipette de verre remplie de milieu de perfusion) est apposée sur la face ventrale du tronc cérébral (ou délicatement incérée sur quelques dizaines de μm) et une seconde électrode (conducteur métallique) est placée directement au contact de la face dorsale (Zaporozhets, et coll. 2004). Chaque expérience débute par la détermination des paramètres optimaux (site de stimulation, intensité, fréquence (1-2 Hz), durée des pulses (18 msec)) nécessaires pour déclencher une locomotion fictive. Dans ces conditions expérimentales où la stimulation électrique met en jeu certaines voies descendantes, nous considérons que les CPGs spinaux sont probablement activés par la libération de neurotransmetteurs endogènes.

E) Enregistrements extra & intracellulaires :

Les activités motrices générées par les CPGs spinaux sont soit enregistrées au niveau des racines ventrales ou des nerfs (enregistrements extracellulaires), soit au niveau d'un motoneurone (enregistrements intracellulaires).

- enregistrements extracellulaires par des électrodes "en passant" :

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

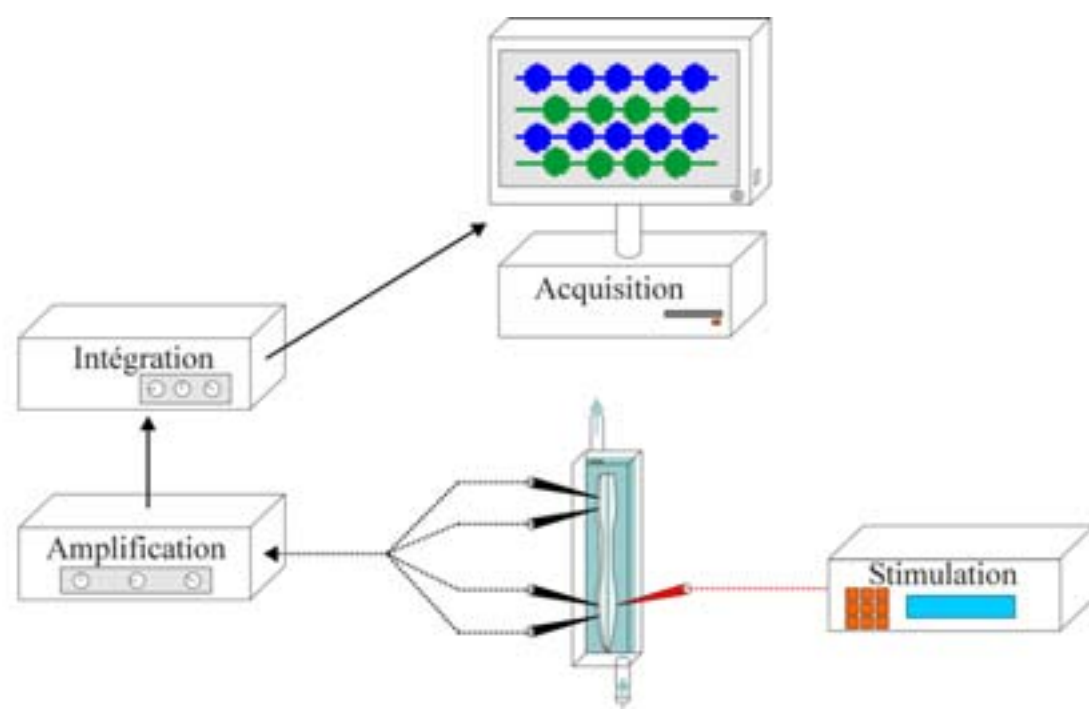


Figure 2 : Représentation schématique du dispositif expérimental

La moelle épinière est isolée et maintenue en survie pendant plusieurs heures dans du liquide céphalorachidien artificiel oxygéné. Les activités produites par les CPGs locomoteurs sont enregistrées par des électrodes de succion placées au niveau des racines ventrales. Le signal est amplifié, intégré et redirigé vers un ordinateur afin d'être visualisé et analysé. Un stimulateur électrique permet d'activer les afférences sensorielles par la stimulation des racines dorsales (électrode rouge).

- *enregistrements extracellulaires par des électrodes de succion :*

Les racines les plus courtes (cervicales et thoraciques) sont aspirées dans des électrodes de succion en verre (borosilicate, Clark electromedical instruments, Pangbourne, England) remplies de milieu de perfusion. Le positionnement de ces électrodes à proximité des racines d'intérêt est assuré grâce à des micromanipulateurs (Narishige). De façon similaire à la technique d'enregistrement précédemment évoquée, la différence de potentiel est mesurée entre cette électrode de succion et une seconde électrode de référence (en acier) placée dans le bain.

L'activité électrophysiologique extracellulaire est alors amplifiée 10 000 fois (P. Cirret, Arcachon), filtrée (100Hz-1kHz), intégrée (constante de temps = 20 à 100 ms), numérisée (CED 1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge) et visualisée sur ordinateur grâce au logiciel d'acquisition Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge). Les fichiers sont finalement sauvegardés sur disque dur pour permettre des analyses ultérieures (figure 2).

- *enregistrements intracellulaires (technique "patch-clamp" cellule entière):*

Les électrodes de borosilicate (10-15M Ω) sont remplies d'une solution intracellulaire (en mM : 130 K Gluconate, 5 NaCl, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 2 ATP Mg²⁺, 10 EGTA; pH ajusté à 7,4) dont l'osmolarité est fixée aux environs de 300mosm.l⁻¹. Afin de ne pas dégrader l'ATP, la solution est refroidie en permanence dans de la glace.

Les enregistrements intracellulaires, effectués au niveau des segments lombaires (L2), sont réalisés avec un amplificateur de type Axopatch-1D (Axon Instruments), numérisés (Digidata 1322A, Axon Instruments), visualisés et stockés sur ordinateur (Spike 2 et Clampex 9.0, Axon Instruments). Les analyses sont réalisées grâce au programme Clampfit 9.0 (Axon Instruments).

F) Analyses Statistiques :

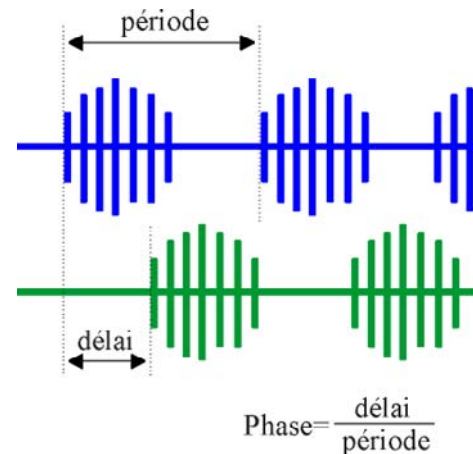
- *statistiques :*

Les résultats sont présentés sous la forme valeur moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre *n* représente la quantité de préparations (animaux) utilisées. Les différences entre les moyennes sont évaluées en utilisant le test de Student (comparaison de 2 groupes), l'ANOVA (comparaison de plus de 2 groupes) combinée avec un test de Tukey, le

test de Pearson (pour les corrélogrammes) et celui de Rayleigh (pour les analyses de phase). Les valeurs moyennes sont considérées statistiquement significatives lorsque les valeurs de p sont inférieures à 0,05.

- *calcul des relations de phases :*

Comme l'illustre le schéma ci-contre, les relations de phases entre les activités de deux racines motrices sont obtenues en calculant le rapport du délai sur la période locomotrice (au moins 20 cycles sont pris aléatoirement dans les enregistrements). Une représentation circulaire des relations de phase est alors utilisée (Zar 1974), des valeurs moyennes proches de 0 ou 1 indiquant un synchronisme, des valeurs proches de 0,5 illustrant une alternance. Dans cette représentation, l'amplitude du vecteur représente la distribution des valeurs individuelles et est obtenu grâce à l'utilisation du test de Rayleigh.



- *cross-corrélogrammes :*

De manière plus systématique, le couplage entre deux activités rythmiques est évalué par cross-corrélation (au minimum 120 secondes d'enregistrement en continu sont utilisées). Avant de réaliser un cross-corrélogramme entre les activités de deux racines ventrales distinctes, on vérifie que chacune d'entre elles est effectivement rythmique en réalisant des autocorrélations des tracés intégrés. Les corrélogrammes obtenus sont représentés avec des intervalles de confiance fixés à 95 % ($\pm 2 \times$ la SEM). Lorsque la valeur du coefficient de corrélation est proche de 1, les activités sont considérées en phase, lorsque le coefficient est proche de -1, elles sont en opposition de phase. Enfin, lorsque le cross-corrélogramme est plat, les deux activités sont estimées indépendantes.

- *régressions linéaires :*

La relation entre deux séries de valeurs (par exemple entre la durée des bouffées d'activités d'un muscle et la période du cycle locomoteur) est évaluée grâce au test de Pearson et présenté sous la forme d'une régression linéaire (Prism 4, GraphPad Software, Inc.).

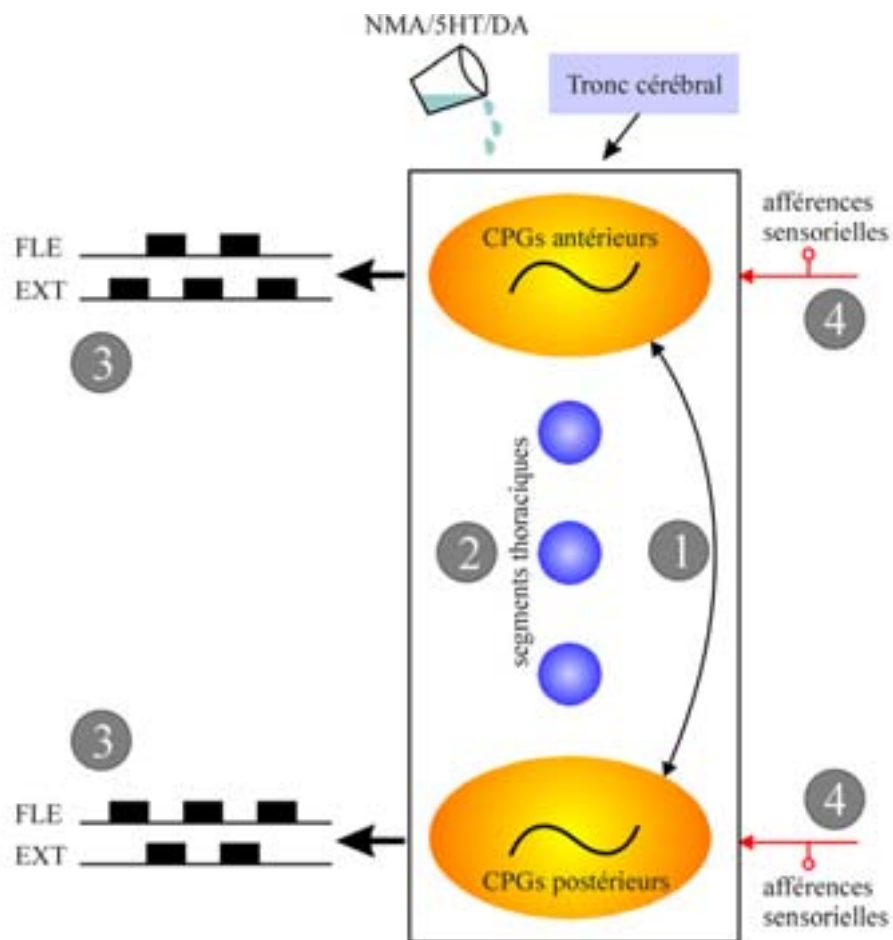


Figure 1 : Objectifs de recherche

Les différents points 1 à 4 sont présentés dans le texte.
 FLE, fléchisseur; EXT, extenseur.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les objectifs de ce travail doctoral sont centrés sur l'exploration des mécanismes centraux et périphériques impliqués dans les coordinations interappendiculaires au cours de la locomotion. Comme le résume la représentation schématique ci-contre, ces objectifs s'articulent autour des quatre points suivants:

❶ l'activité locomotrice de type quadrupède met en jeu des générateurs de rythmes antérieurs et postérieurs localisés chez les Vertébrés supérieurs respectivement au niveau cervical et lombaire. Existe-t-il dans ces conditions un CPG "*leader*" imposant à la fois son propre rythme ainsi que le patron locomoteur à l'ensemble des générateurs spinaux ? Quel(s) rôle(s) jouent les connexions propriospinales dans ces couplages moteurs ?

❷ le passage d'une locomotion de type nage ondulatoire (par exemple chez la lamproie) à une locomotion de type appendiculaire est accompagné d'une régionalisation des CPGs locomoteurs spinaux, et dans ce schéma évolutif, les segments thoraciques ne semblent plus être impliqués directement dans la propulsion de l'animal. Conservent-ils néanmoins un rôle dans les coordinations antéro-postérieures ?

❸ le patron locomoteur est caractérisé entre autres par une alternance homolatérale de type fléchisseur/extenseur. De plus, il est largement admis que les variations de la vitesse locomotrice découlent principalement des modifications de la durée de la phase d'appui du membre, précisément celle au cours de laquelle les muscles extenseurs antigravitaires sont mis en jeu. L'asymétrie fonctionnelle entre la durée des activités de types fléchisseur et extenseur reflète-t-elle une asymétrie intrinsèque du fonctionnement des oscillateurs spinaux ou peut-elle être une caractéristique émergente liée à la mise en jeu d'autres éléments du système moteur tels que les afférences sensorielles ?

❹ enfin, l'adaptabilité à court terme des mouvements locomoteurs est assurée en grande partie par les afférences sensorielles qui chez les Vertébrés supérieurs, permettent un ajustement segmentaire rapide de la commande centrale. Au cours d'une locomotion appendiculaire de type quadrupède, ces afférences sensorielles peuvent-elles influencer le fonctionnement des CPGs distants et dans ces conditions, jouent-elles un rôle dans les coordinations intersegmentaires ?

RESULTATS

CHAPITRE I :

Coordinations interappendiculaires chez les mammifères : rôle des connexions propriospinales

- RESUME :

Très tôt après la naissance, le rat présente une locomotion coordonnée se traduisant par une alternance à la fois bilatérale et de type fléchisseur/extenseur, ainsi qu'une alternance homolatérale entre les membres antérieur et postérieur. Afin d'étudier les mécanismes centraux à la base de ces coordinations, nous avons utilisé une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né particulièrement adaptée à une triple approche pharmacologique, électrophysiologique et lésionnelle. La perfusion de la moelle épinière par un mélange composé de NMA, de sérotonine et de dopamine déclenche une locomotion fictive dont les coordinations (alternances entre les activités homologues antéropostérieures d'une part, et entre les activités controlatérales segmentaires d'autre part) correspondent à un patron de type marche similaire à celui enregistré chez l'animal libre de ses mouvements. Découplés chimiquement par un bloc sucrose au niveau des segments thoraciques (utilisation de compartiments étanches), les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires présentent des fréquences intrinsèques similaires. Activés sélectivement, les CPGs lombaires sont capables d'entraîner à leur rythme leurs homologues cervicaux, suggérant l'existence d'une influence ascendante excitatrice. En l'absence de connexions bilatérales au niveau des segments rostraux (C1 à Th7), cette commande caudo-rostrale assure également l'alternance droite/gauche des régions spinales antérieures par l'intermédiaire de connexions principalement excitatrices. En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que les coordinations locomotrices antéropostérieures chez le rat nouveau-né reposent d'avantage sur des connexions asymétriques entre les CPGs locomoteurs spinaux antérieurs et postérieurs que sur une différence entre leurs capacités intrinsèques à produire une activité rythmique.

- INTRODUCTION :

La locomotion repose sur le fonctionnement au sein de la moelle épinière de réseaux de neurones également appelés "*central pattern generators*" (CPGs). Concernant les mammifères, les théories actuelles considèrent que chaque membre de l'animal est contrôlé par un CPG en charge de l'activité rythmique et alternée des muscles extenseurs et

fléchisseurs. La réalisation du comportement locomoteur demande d'une part des couplages stricts entre ces réseaux de neurones afin de produire une locomotion efficace, et d'autre part une capacité à adapter ces coordinations notamment lors des modifications d'allure (marche, trot, galop). Les travaux menés chez les mammifères ont ainsi permis de localiser les CPGs contrôlant les membres antérieurs au niveau des segments cervicaux (Viala et Vidal 1978; Ballion, et coll. 2001), ainsi que les CPGs contrôlant les membres postérieurs au niveau des segments lombaires (Cazalets, et coll. 1992; Cazalets, et coll. 1995; Kjaerulff et Kiehn 1996; Rossignol, et coll. 1996; Kremer et Lev-Tov 1997). Si nous disposons en outre de nombreuses données sur les mécanismes neuronaux à la base des coordinations bilatérales chez les mammifères (Kjaerulff et Kiehn 1996; Rossignol, et coll. 1996; Kremer et Lev-Tov 1997; Cazalets et Bertrand 2000; Butt, et coll. 2002; Kiehn 2006), les mécanismes propriospinaux à l'origine des coordinations entre les CPGs contrôlant les membres antérieurs et postérieurs sont eux peu documentés. La compréhension des mécanismes cellulaires centraux à la base des couplages entre les membres de l'animal nécessite de déterminer les potentialités intrinsèques de ces CPGs (théorie du gradient d'excitabilité) ainsi que leurs interconnexions (théorie de la connectivité intersegmentaire asymétrique).

La réalisation d'une telle étude chez les mammifères serait facilitée par l'utilisation d'une préparation réduite dans laquelle les réseaux de neurones spinaux sont largement décrits et localisés. La moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né semble donc bien adaptée pour répondre à cette étude. Au cours de nos expériences, nous avons comparé le patron locomoteur fictif produit par la moelle épinière isolée et activée pharmacologiquement au patron locomoteur réel exprimé par ces animaux libres de leurs mouvements. Par des approches lésionnelles et d'activation préférentielle, nos résultats principaux montrent qu'*in vitro* les propriétés de rythmogenèse des CPGs lombaires et cervicaux sont similaires, et donc qu'aucun des générateurs locomoteurs spinaux ne jouerait le rôle de CPG "*leader*". Enfin, les CPGs lombaires ayant la capacité d'entraîner à distance l'activité de leurs homologues cervicaux, les coordinations interappendiculaires seraient basées sur la théorie des connexions intersegmentaires asymétriques.

- MATÉRIELS ET MÉTHODES :

Les matériels et méthodes font l'objet dans ce manuscrit d'une section individualisée. Je répreciserai succinctement dans chaque chapitre de résultats les particularités méthodologiques employées dans chacune de ces études.

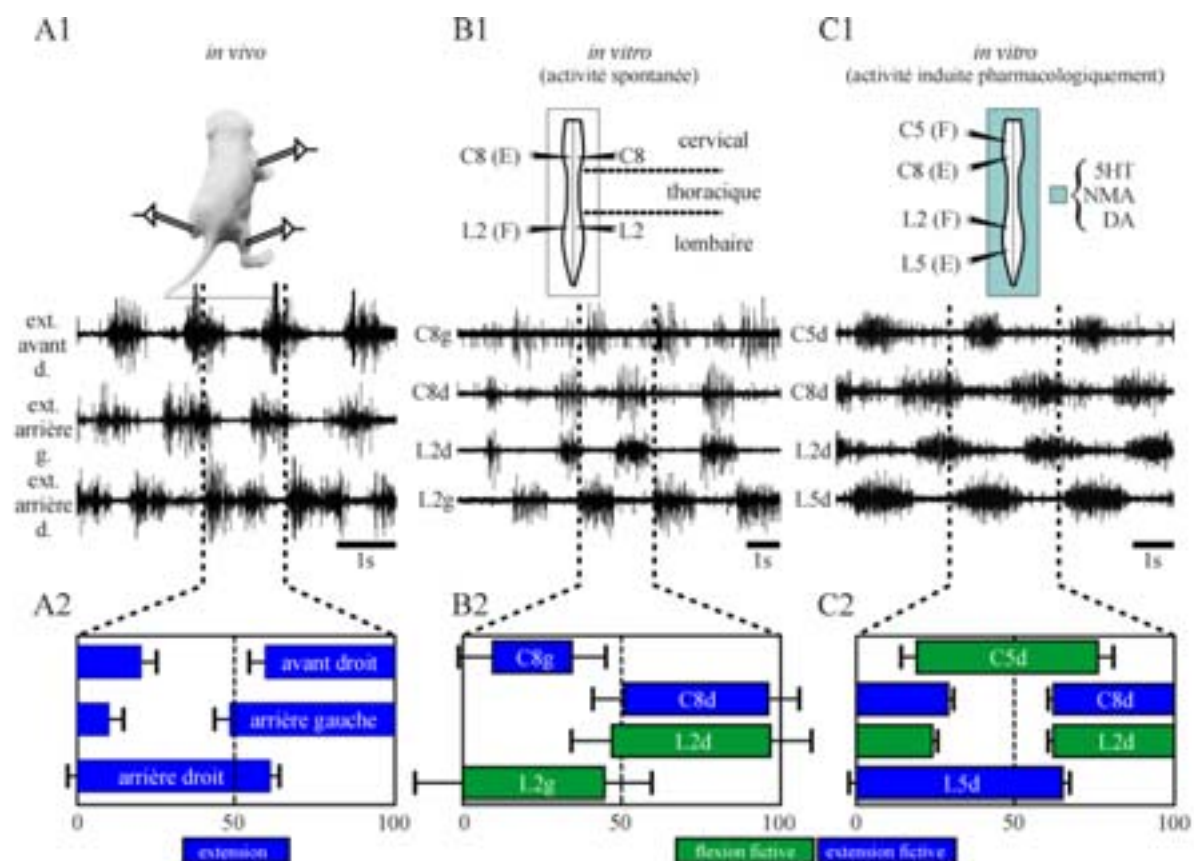


Figure 1 : Le patron locomoteur chez le rat nouveau-né.

(A1) Enregistrements électromyographiques des muscles extenseurs des membres antérieurs (droit) et postérieurs (droit et gauche) au cours d'une locomotion réelle de rats nouveau-nés (3 à 7 jours). (A2) Cycle locomoteur normalisé présentant les activités des muscles extenseurs des membres (5 animaux). (B, C) La préparation de moelle épinière isolée *in vitro* est utilisée afin d'étudier les coordinations entre les CPGs locomoteurs pendant des périodes de locomotion fictive spontanée (B1) et induite pharmacologiquement (C1). Pour cela des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires des racines ventrales cervicales (C) et lombaires (L) ont été effectués. En (C1) le mélange utilisé pour déclencher la locomotion fictive est composé de NMA (10^{-5} M), de 5-HT (10^{-5} M) et de dopamine (10^{-4} M). (B2, C2) Cycles locomoteurs normalisés présentant le patron locomoteur fictif lors des épisodes de locomotion fictive spontanée (B2) (1 préparation) et induite pharmacologiquement (C2) (18 préparations).

E, Extenseur ; F, Fléchisseur ; d, droite ; g, gauche.

Au cours de ce travail, une série d'expériences *in vivo* couplant une approche comportementale à des enregistrements électromyographiques (voir Matériels & Méthodes, page 37) a d'abord été réalisée afin de caractériser les coordinations interappendiculaires d'une locomotion réelle chez le rat nouveau-né. Une seconde série expérimentale, centrée sur l'utilisation de la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* (voir Matériels & Méthodes, page 38) a été effectuée afin d'étudier les mécanismes neuronaux spinaux contrôlant les coordinations entre les CPGs cervicaux et lombaires. Des sections du tissu spinal ont été réalisées dans le plan transverse au niveau thoracique (Th7) afin de découpler physiquement les CPGs cervicaux et lombaires, et dans le plan longitudinal (sagittal) afin de séparer fonctionnellement les CPGs segmentaires controlatéraux. Des compartimentations du tissu spinal ont également été utilisées afin de perfuser et d'activer (par un mélange composé de NMA, 5-HT et Dopamine) séparément les CPGs cervicaux et lombaires (voir Matériels & Méthodes, page 41). Dans certaines expériences, des inhibiteurs des récepteurs à la glycine (strychnine) et au GABA (bicuculline) ont été ajoutés au milieu de perfusion afin de bloquer les synapses chimiques inhibitrices (voir Matériels & Méthodes, page 41). Enfin, le degré de coordination entre les activités rythmiques est évalué en réalisant des cross-corrélogrammes. Dans ces représentations, plus la valeur du coefficient est positive, plus les activités sont synchrones. Inversement, plus elle est négative, plus les activités sont alternées.

- *RESULTATS* :

- *le patron locomoteur* :

Le patron locomoteur utilisé par le rat nouveau-né (3 à 7 jours) libre de ses mouvements a été déterminé grâce à des enregistrements électromyographiques des muscles extenseurs des membres antérieurs (triceps) et postérieurs (gastrocnemius). Durant cette période post-natale, ces animaux expriment rarement une locomotion spontanée du fait de l'immaturation de leur tonus postural. Afin de déclencher des séquences locomotrices, les animaux étaient entraînés à suivre un stimulus odorant attractif (Fady, et coll. 1998). La locomotion ainsi évoquée est caractérisée par une alternance entre les activités de type extenseur droites et gauches au niveau d'une même ceinture ainsi que par une alternance entre les activités de type extenseur antérieures et postérieures homolatérales (phases moyennes respectives : $0,48 \pm 0,02$ et $0,59 \pm 0,04$; période locomotrice moyenne : $1,22 \pm 0,03$ s). Malgré le faible tonus postural de ces animaux, les coordinations interappendiculaires présentées sont relativement proches d'une allure de type marche (figure 1A).

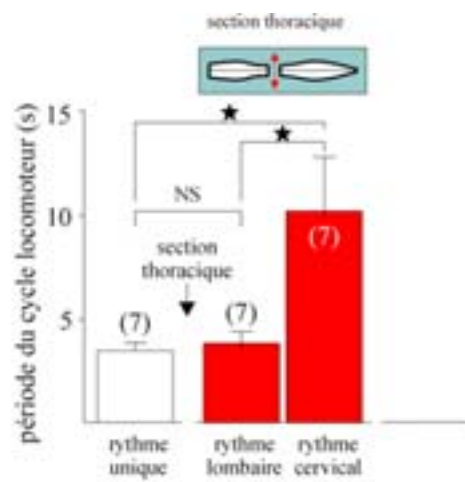


Figure 2 : Effet d'une section thoracique totale sur la période locomotrice moyenne des régions cervicales et lombaires.

Le nombre de préparations utilisées est indiqué entre parenthèses. * $p < 0.05$. NS, non significatif.

Des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires au niveau des racines ventrales (C5=fléchisseur et C8=extenseur des membres antérieurs; L2=fléchisseur et L5=extenseur des membres postérieurs; (Kiehn et Kjaerulff 1996; Ballion, et coll. 2001)) d'une préparation réduite de moelle épinière ont ensuite permis de comparer le patron locomoteur précédemment décrit au patron locomoteur fictif généré *in vitro*. Dans de très rares cas (2/30 préparations), les CPGs locomoteurs spinaux présentent une activité spontanée. Les coordinations présentées lors de ces épisodes de locomotion fictive peuvent être considérées comme hautement représentatives du fonctionnement intrinsèque des CPGs locomoteurs spinaux du fait de l'absence de substance neuroactive exogène. Dans ce cas, les coordinations sont caractérisées par une alternance entre les activités segmentaires bilatérales et par une synchronie entre les activités hétérologues homolatérales antéro-postérieures (période locomotrice fictive moyenne : $2,04 \pm 0,13s$) (figure 1B). Cependant dans une large majorité des cas où la préparation est spontanément quiescente (28/30 préparations), il est nécessaire de perfuser la moelle épinière avec un mélange neuroactif composé de NMA, 5-HT et dopamine afin d'activer les CPGs locomoteurs spinaux (Barriere, et coll. 2004). Dans ces conditions expérimentales, le patron locomoteur fictif enregistré est très similaire à celui obtenu *in vivo* et *in vitro* spontanément (période moyenne : $3,00 \pm 0,12s$). Enfin, la moelle épinière isolée *in vitro* et activée pharmacologiquement semble donc capable de générer une locomotion fictive dont le patron est proche d'une allure de type marche (figure 1C).

- les propriétés intrinsèques des CPGs antérieurs et postérieurs :

Les rythmes produits par les CPGs locomoteurs spinaux antérieurs et postérieurs apparaissent hautement coordonnés *in vitro*. On peut raisonnablement supposer qu'il existe au sein de la moelle épinière des connexions propriospinales en charge de ces coordinations. Les études menées chez des modèles "simples" montrent que les couplages entre différents CPGs reposent à la fois sur leurs propriétés intrinsèques (fréquence propre d'oscillation) ainsi que sur leurs connexions réciproques (Skinner et Mulloney 1998). Dans un schéma d'organisation où ces connexions sont symétriques, le CPG dont la fréquence est la plus rapide est considéré comme le CPG "*leader*". Cependant, dans un schéma d'organisation où les connexions réciproques sont asymétriques, l'ensemble des paramètres fréquence intrinsèque et connectivité entre les générateurs rend alors compte des couplages entre ces CPGs. Dans cette optique, lorsque la séparation fonctionnelle des CPGs antérieurs et postérieurs est réalisée par une transection complète au niveau thoracique, la période du rythme produit par les régions lombaires n'est pas modifiée ($3,83 \pm 0,56s$) alors que celle du rythme cervical augmente de

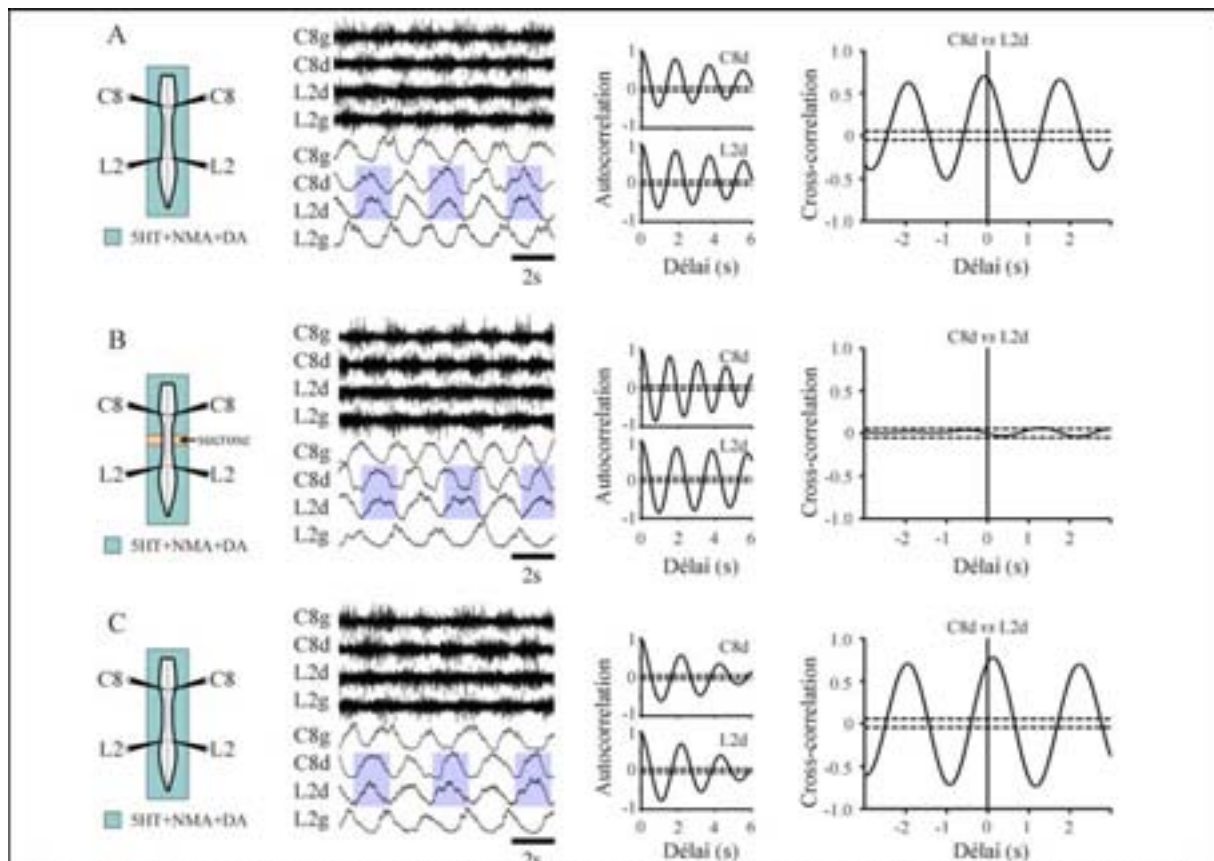


Figure 3 : Effet de la mise au silence des régions thoraciques (bloc sucrose) sur l'activité des CPGs cervicaux et lombaires.

(A) *de gauche à droite:* Dispositif expérimental; tracés bruts et intégrés des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires des racines ventrales cervicales et lombaires durant un épisode de locomotion fictive induite pharmacologiquement (NMA/5-HT/Dopamine); auto-corrélogrammes des tracés intégrés des racines C8 et L2; cross-corrélogramme entre les tracés intégrés des racines homolatérales C8 et L2. Les corrélogrammes ont été réalisés pour des périodes d'activités comprises entre 120s et 190s et sont représentés avec leurs intervalles de confiance à 95% (± 2 SEM) (lignes en pointillé). (B) Perte des coordinations cervico-lombaires durant le bloc sucrose au niveau des segments thoraciques. Malgré le découplage des activités cervicales et lombaires (cross-corrélogramme plat), les régions cervicales et lombaires présentent toujours des activités rythmiques (voir les auto-corrélogrammes). (C) Rinçage du sucrose au niveau des segments thoraciques et retour rapide des coordinations cervico-lombaires.

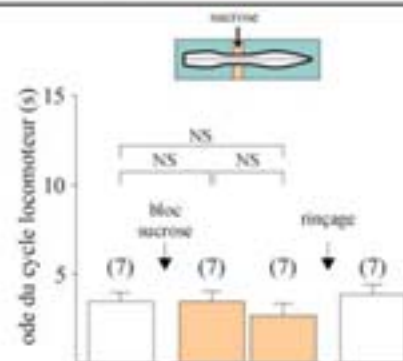


Figure 4 : Effet de la mise au silence des régions thoraciques (bloc sucrose) sur la période locomotrice moyenne des régions cervicales et lombaires.

Le nombre de préparations utilisées est indiqué entre parenthèses. NS, Non Significatif.

manière significative ($10,23 \pm 2,65s$, $p < 0,05$, figure 2). Toutefois dans cette situation expérimentale, l'activité rythmique enregistrée au niveau cervical est caractérisée par des bouffées de potentiels d'actions de longues durées ne présentant pas systématiquement d'alternance bilatérale. Ces caractéristiques incompatibles avec une activité de type locomoteur ne permettent donc pas de conclure sur la présence ou l'absence de CPGs "leaders" au niveau spinal.

Une approche conceptuellement identique consiste à découpler les CPGs antérieurs et postérieurs en perfusant les segments thoraciques avec un milieu bloquant la conduction axonale (milieu sucré). Dans ce cas, des activités locomotrices fictives, maintenues à la fois au niveau cervical et au niveau lombaire (autocorrélogrammes, figure 3B), deviennent indépendantes (cross-corrélogramme plat, figure 3B) sans pour autant modifier significativement leurs périodes respectives (L2 : $3,49 \pm 0,57s$ et C8 : $2,68 \pm 0,69s$; figure 4A). En réactivant les segments thoraciques, les coordinations initiales sont restaurées (figure 3C). Ces résultats suggèrent que les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires partagent les mêmes propriétés intrinsèques de rythmogenèse et qu'en conséquence aucun CPG "leader" n'est présent au niveau spinal.

- la connectivité entre les CPGs antérieurs et postérieurs :

Afin de déterminer l'influence réciproque des CPGs locomoteurs spinaux antérieurs et postérieurs, des expériences de compartimentation de la moelle épinière ont été réalisées. Une barrière de vaseline, placée au niveau thoracique, permet de perfuser de manière indépendante les CPGs cervicaux et lombaires. L'activation pharmacologique (mélange composé de NMA, 5-HT et dopamine) de l'un ou de l'autre permet alors de déterminer leur influence réciproque. Lorsque seuls les segments lombaires sont perfusés par ce mélange, une activité rythmique bilatérale est générée au niveau de ces régions (figure 5B). Dans ces conditions et en l'absence d'agent neuroactif au niveau cervical, un rythme présentant une alternance bilatérale est également observé au niveau des segments antérieurs. Fait important, ces rythmes présentent alors des coordinations cervico-lombaires similaires à celles observées lorsque l'ensemble des régions spinales est activé (figure 5A). Ce résultat suggère que les CPGs lombaires sont capables d'entraîner leurs homologues cervicaux. Cette conclusion, supposant une libération endogène de neurotransmetteurs de fibres ascendantes lombo-cervicales, est renforcée par l'observation d'une absence d'activité tonique au niveau cervical associée à des bouffées de potentiels d'actions de faible amplitude (comparer les enregistrements au niveau cervical entre les figures 5A et B).

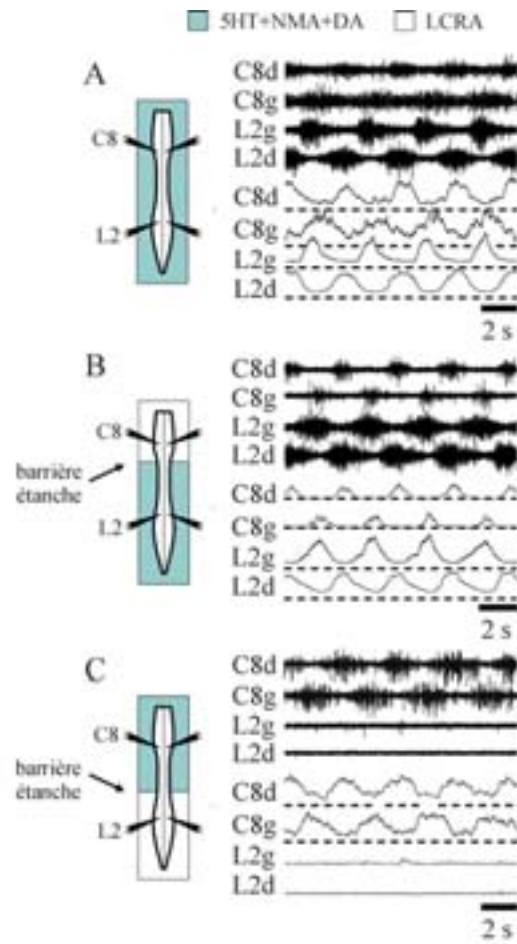


Figure 5 : Mise en évidence d'une influence ascendante des CPGs lombaires sur leurs homologues cervicaux.

(A) Locomotion fictive antéro-postérieure obtenue par l'application globale de NMA/5-HT/dopamine. (B) Application sélective du même mélange activateur sur les régions lombaires. Notons dans ce cas le déclenchement d'une activité locomotrice au niveau lombaire mais également au niveau cervical dont les régions sont perfusées par un milieu normal (LCRA). (C) Perfusion sélective du milieu activateur sur les régions cervicales. Notons l'absence de toute activité au niveau lombaire.

Une expérience corollaire a ensuite été réalisée au cours de laquelle seuls les segments cervicaux ont été activés pharmacologiquement. Dans ces conditions, l'activité rythmique locomotrice n'est présente qu'au niveau antérieur et contrairement aux effets observés dans l'expérience précédente, les CPGs cervicaux sont incapables d'entraîner leurs homologues lombaires (figure 5C).

Des connexions propriospinales asymétriques majoritairement ascendantes semblent être impliquées dans l'établissement des coordinations intersegmentaires entre les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires. Dans ces conditions, un changement du patron moteur au niveau lombaire devrait être répercuté au niveau cervical par le biais de cette influence ascendante. Cette modification du patron moteur peut être obtenue par l'ajout de bicuculline (antagoniste GABAergique) et de strychnine (antagoniste glycinergique) uniquement dans le milieu de perfusion baignant les régions lombaires lors d'une locomotion fictive induite pharmacologiquement. Le blocage des synapses chimiques inhibitrices induit alors un rythme lombaire bilatéral synchronisé (figure 6B1). Dans ces conditions, alors que les segments cervicaux ne sont pas exposés aux bloqueurs des synapses inhibitrices, une activité bilatérale synchronisée apparaît et ce de manière coordonnée avec les rythmes lombaires (figure 6B2). Ce résultat confirme l'existence d'une influence ascendante des générateurs postérieurs sur les générateurs antérieurs, les premiers étant capables d'imposer leur propre rythme aux seconds. Finalement, lorsque cette influence caudo-rostrale est "chimiquement interrompue" par la perfusion de sucrose au niveau thoracique, les CPGs cervicaux échappent au contrôle des CPGs lombaires et expriment à nouveau une activité bilatérale alternée (figure 6C2).

Lors de l'expérience corollaire, le changement moteur (c'est-à-dire la synchronisation des activités bilatérales) engendré pharmacologiquement au niveau cervical n'est pas répercuté au niveau lombaire, le rythme postérieur conservant les mêmes caractéristiques que dans les conditions témoins (figure 7B). Ces résultats démontrent que les générateurs cervicaux sont incapables d'imposer leur propre rythme à leurs homologues lombaires.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'alternance bilatérale de l'activité locomotrice cervicale pourrait être imposée, du moins en partie, par les connexions ascendantes lombo-cervicales. Afin de tester cette hypothèse, toutes les régions spinales sont activées pharmacologiquement alors que les connexions commissurales au niveau cervico-thoracique (C1-Th7) sont supprimées par une section longitudinale. Dans ces conditions, l'ensemble des coordinations (bilatérales et antéro-postérieures) est maintenu (figure 8B). Afin de déterminer

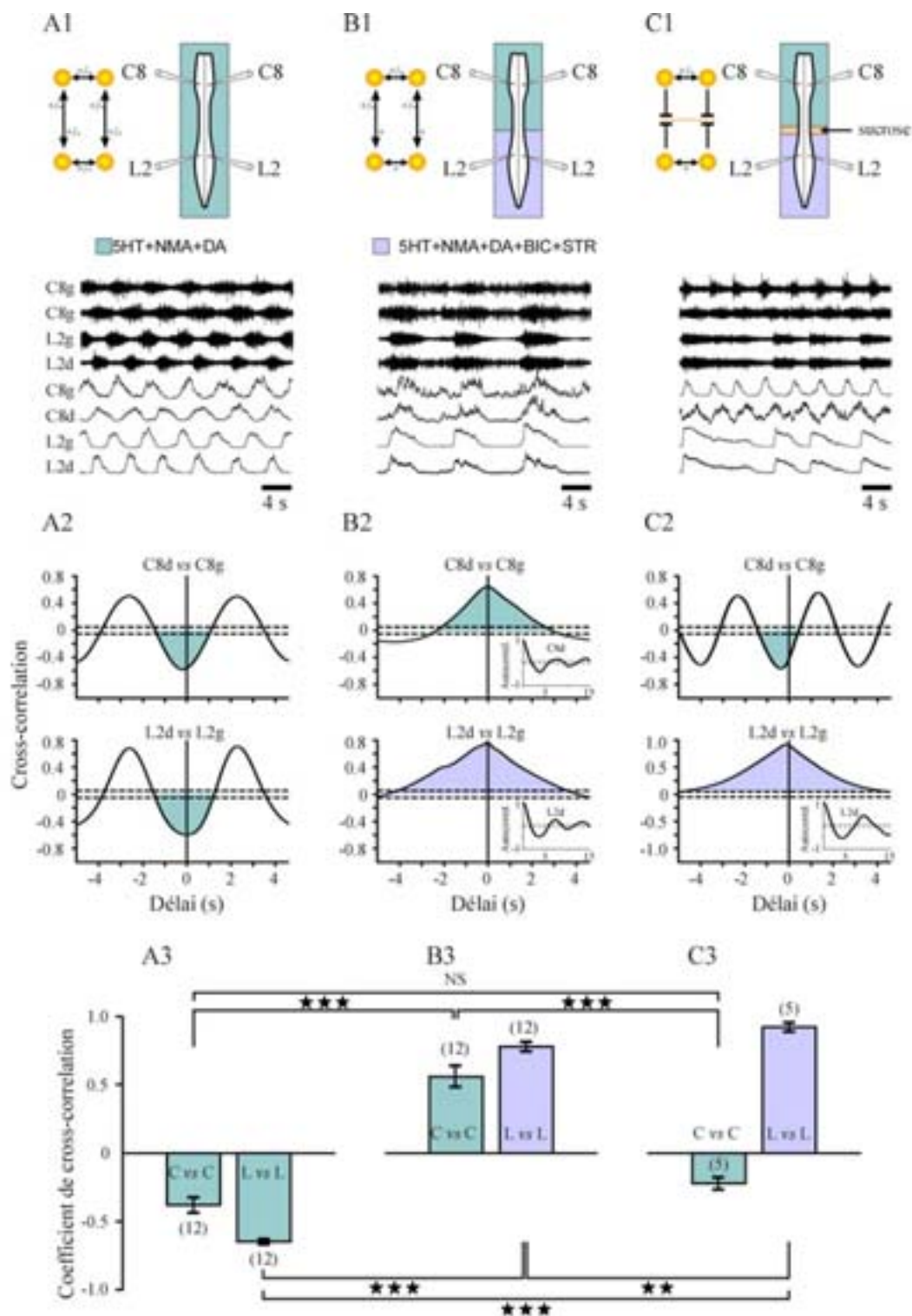


Figure 6: Modification du patron moteur par les influences ascendantes.

(A1, B1, C1) Activité des racines ventrales durant la perfusion d'un mélange composé de NMA/5-HT/dopamine sur la moelle épinière entière (A1), lors de l'application supplémentaire de bicuculline (BIC) et de strychnine (STR) au niveau des segments postérieurs à Th7 (B1), et enfin après mise au silence des niveaux thoraciques (milieu sucrose, C1). (A2, B2, C2) Cross-corrélogrammes entre les activités bilatérales cervicales et lombaires en condition témoin (A2), lors de la perfusion de BIC et de STR (B2) et lors de l'application de sucrose au niveau thoracique (C2). (A3, B3, C3) Coefficients de cross-corrélation moyens des activités bilatérales cervicales (C) et lombaires (L) dans les trois conditions expérimentales. Le nombre de préparations utilisées est indiqué entre parenthèses. ** p<0.01. *** p<0.001. NS, Non Significatif.

la nature des connexions ascendantes mises en jeu, les synapses chimiques inhibitrices cervicales sont bloquées par la perfusion d'antagonistes GABAergiques et glycinergiques. Malgré une diminution significative du coefficient de cross-corrélation entre les activités des racines cervicales controlatérales (traduisant une réduction des coordinations), l'alternance bilatérale cervicale ainsi que l'alternance homolatérale antéro-postérieure sont maintenues (figure 8C).

- *DISCUSSION* :

Ces données montrent que des connexions ascendantes, majoritairement excitatrices, participent étroitement aux couplages entre les CPGs antérieurs et postérieurs ainsi qu'à l'établissement des alternances bilatérales cervicales (figure 9).

- *les coordinations interappendiculaires : in vitro veritas*

Les travaux réalisés dans cette étude montrent clairement que les coordinations locomotrices enregistrées *in vitro* sont très proches de celles observées *in vivo* et correspondent à une allure de type marche (Fady, et coll. 1998) ou encore une locomotion de type nage (McEwen, et coll. 1997). On observe dans tous les cas un patron locomoteur caractérisé par une alternance bilatérale, une alternance entre les activités de types fléchisseurs et extenseurs d'un même membre, et enfin par une alternance antéropostérieure homolatérale. Par conséquent, la préparation réduite de moelle épinière isolée peut être considérée comme un modèle de choix pour l'étude des mécanismes propriospinaux impliqués dans les coordinations interappendiculaires. En effet les afférences sensorielles ainsi que les structures locomotrices supraspinales étant absentes, les coordinations observées entre les segments cervicaux et lombaires ne reposent donc que sur des connexions propriospinales (English, 1989).

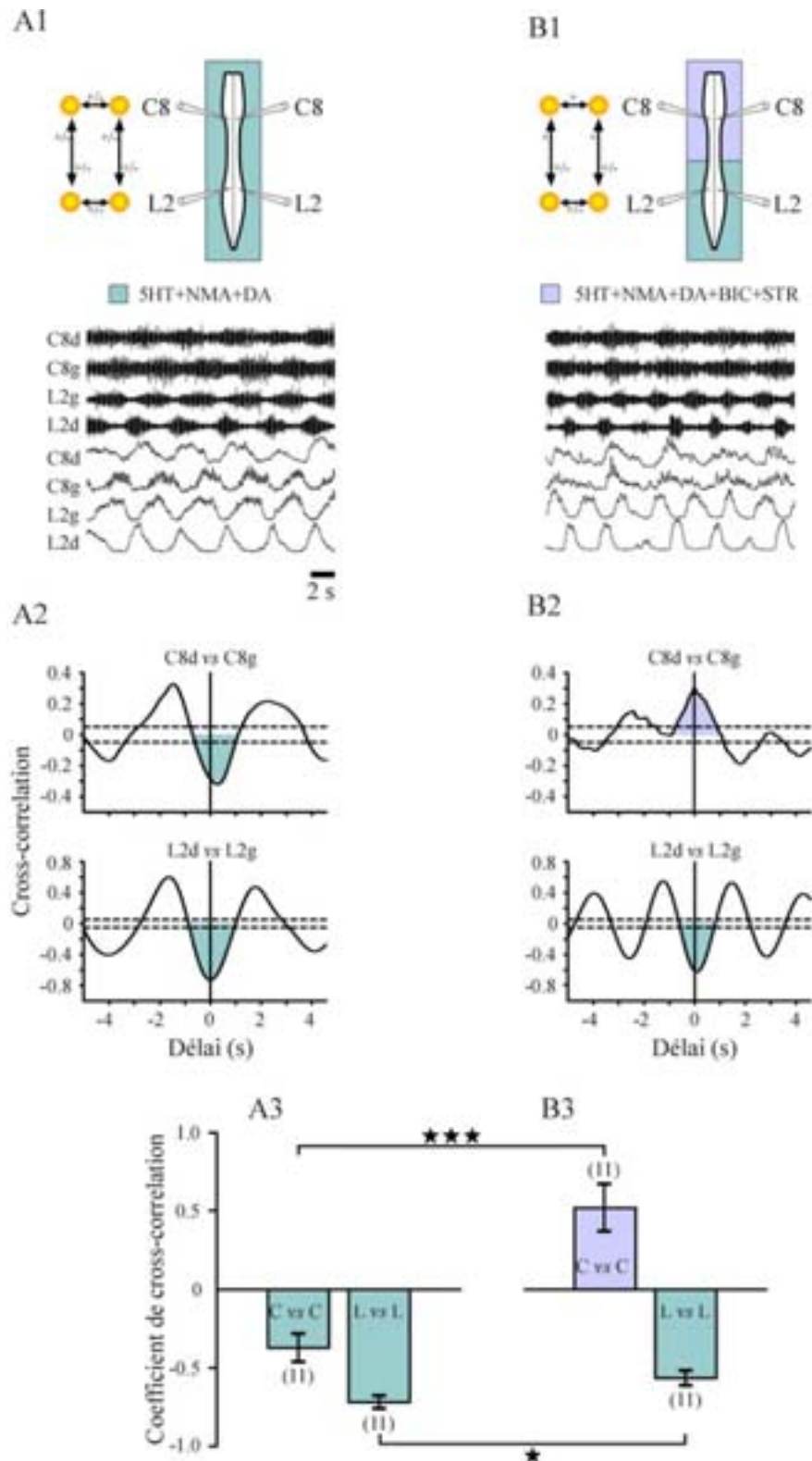


Figure 7: Mise en évidence de l'absence d'une influence descendante propriospinale.

(A1, B1) Activité des racines ventrales durant la perfusion d'un mélange composé de NMA/5-HT/dopamine sur la moelle épinière entière (A1), et lorsque de la bicuculline (BIC) et de la strychnine (STR) sont ajoutées au mélange initial au niveau des segments antérieurs à Th7 (B1). (A2, B2) Cross-corrélogrammes représentant les activités bilatérales cervicales et lombaires en condition témoin (A2) et lors de l'ajout de BIC et de STR (B2). (A3, B3) Coefficients moyens de cross-corrélation des activités bilatérales cervicales (C) et lombaires (L) dans les deux conditions expérimentales. Le nombre de préparations utilisées est indiqué entre parenthèses. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

- des CPGs locomoteurs spinaux homologues :

Sachant que les coordinations entre générateurs de rythme reposent sur des théories soit de gradient d'excitabilité, soit de connectivité asymétrique, soit encore d'une combinaison de ces deux mécanismes, une première approche consistait à découpler "physiquement" les CPGs cervicaux (responsables des mouvements des membres antérieurs) des CPGs lombaires (contrôlant les membres postérieurs). Lorsqu'une transection spinale est réalisée au niveau thoracique, le rythme produit par les CPGs lombaires ne présente pas de modification significative de la période locomotrice alors que les activités rythmiques générées par les régions cervicales sont caractérisées par une période significativement augmentée (figure 2). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment sur une préparation similaire chez laquelle le tronc cérébral était conservé (Ballion, et coll. 2001) et auraient permis de conclure à l'existence d'un gradient d'excitabilité caudo-rostral, les CPGs lombaires jouant le rôle de "*leaders*". Cependant, en l'absence de coordination bilatérale alternée au niveau des régions cervicales et du fait de la période anormalement élevée du rythme, nous ne pouvons pas exclure que le choc spinal lié à la transection affecte d'avantage les régions cervicales que les segments lombaires, soit par une décharge anarchique des fibres ascendantes, soit par une atteinte plus directe des CPGs cervicaux et ce malgré le niveau de la section (Th7).

La perfusion sélective de quelques segments thoraciques par un milieu composé de sucrose permet alors de s'affranchir des effets secondaires et néfastes liés à la transection spinale. Dans ces conditions, il est important de noter qu'une fois isolés, les CPGs cervicaux et lombaires sont capables de générer seuls leurs propres rythmes locomoteurs (présence d'une alternance bilatérale). Le cross-corrélogramme plat témoigne alors d'un découplage total entre les deux CPGs et l'absence de différence significative entre leur période moyenne respective permet de conclure à l'absence de CPG spinal "*leader*" chez le rat nouveau-né (figures 3, 4).

- les coordinations interappendiculaires chez le rat : "*une machine*" à propulsion³

Les expériences d'activation sélective des CPGs postérieurs ou antérieurs révèlent une asymétrie dans les couplages entre ces générateurs. En effet, les segments lombaires, une fois

³ La théorie de l'animal-machine est un postulat éthologique issu du mouvement mécaniste soulevé par René Descartes. Elle suggérait que les animaux étaient des machines au sens premier du terme, c'est-à-dire qu'on ne leur accordait ni conscience ni la moindre pensée. Leurs cris et gémissements ne pouvaient être que le reflet de dysfonctionnements dans les "rouages".

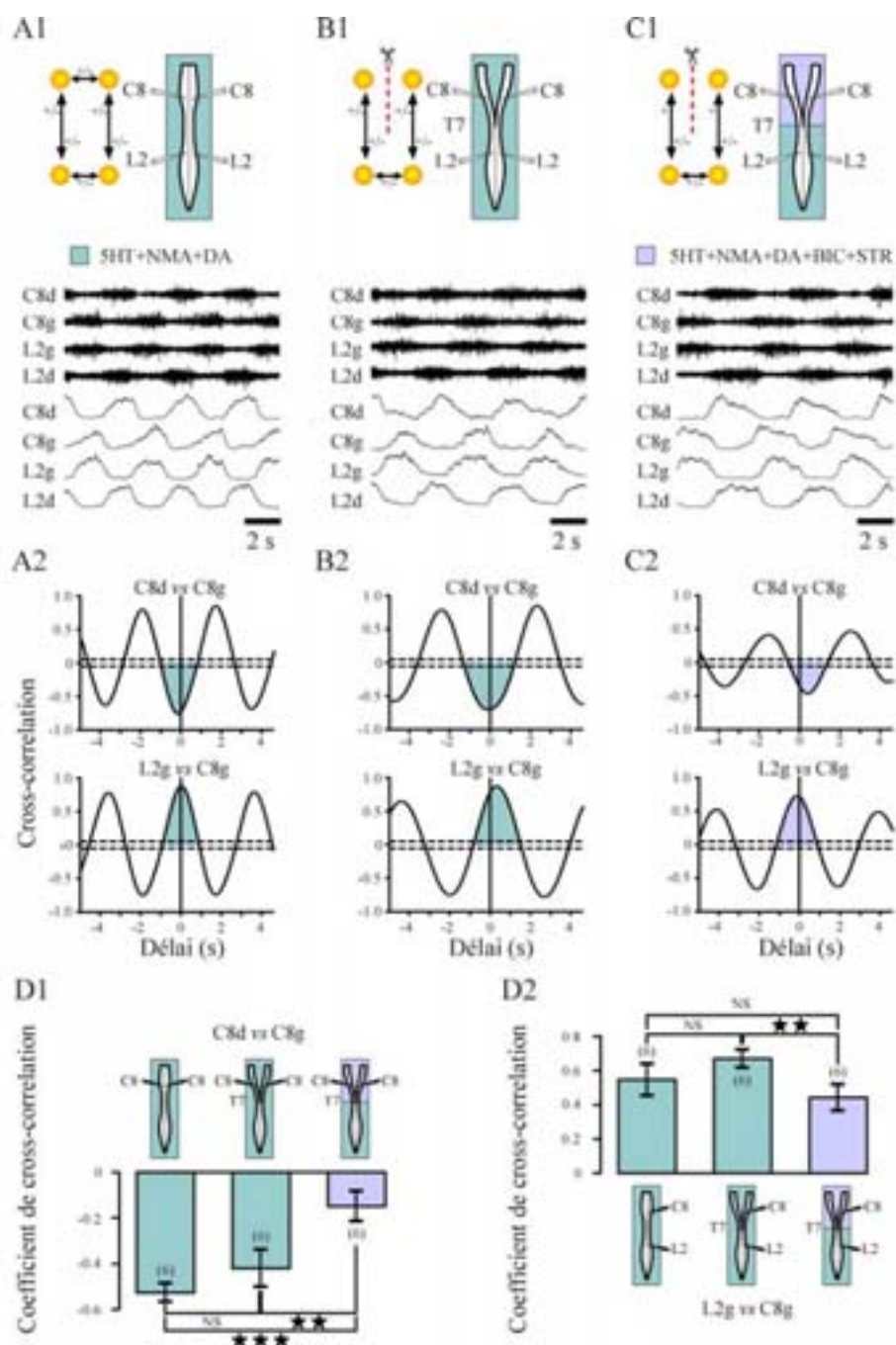


Figure 8 : Influence ascendante et coordinations bilatérales.

(A1, B1, C1) Activité des racines ventrales durant la perfusion d'un mélange composé de NMA/5-HT/dopamine sur la moelle épinière entière (A1), après une section longitudinale médiane (C1 à Th7) (B1) et lorsque de la bicuculline (BIC) et de la strychnine (STR) sont ajoutées au mélange initial au niveau des segments antérieurs à Th7 (C1). (A2, B2, C2) Cross-corrélogrammes entre les activités bilatérales cervicales et homolatérales cervicales et lombaires. (D) Coefficients moyens de cross-corrélation (\pm SEM) des activités cervicales bilatérales (D1) et des activités cervico-lombaires homolatérales (D2) dans les trois conditions expérimentales (A1, B1, C1). Le nombre de préparations est indiqué entre parenthèse. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. NS, non significatif

activés, sont capables d'entraîner à leur propre rythme les segments cervicaux. Cette influence ascendante ne trouve pas d'équivalence dans le sens rostro-caudal (figure 5). Il semble donc qu'une asymétrie dans la connectivité entre ces CPGs soit à la base des coordinations interappendiculaires. Dans ce contexte, les régions lombaires peuvent imposer aux segments cervicaux leur propre patron, même lorsque ce dernier adopte des coordinations inhabituelles. Ainsi, le synchronisme bilatéral des activités motrices lombaires induit par le blocage des synapses inhibitrices (Bracci, et coll. 1996), s'impose au niveau des segments cervicaux (figure 6B). Là encore, ce contrôle caudo-rostral semble bien être à "sens unique" dans la mesure où l'expérience corollaire montre que les CPGs cervicaux sont incapables d'imposer leur patron à leurs homologues lombaires (figure 7B).

Enfin, cette capacité des segments lombaires à contrôler leurs homologues cervicaux s'exprime également dans des expériences de lésion au cours desquelles les alternances bilatérales cervicales sont maintenues malgré la suppression des connexions commissurales antérieures (figure 8B). De plus l'approche pharmacologique a permis de montrer que ces connexions ascendantes reposent majoritairement sur des connexions excitatrices (figure 8C).

Des travaux antérieurs chez le lapin ont montré qu'après une section transverse totale de la moelle épinière thoracique, les CPGs antérieurs produisent des activités rythmiques lentes dont la période instable présente des variations anormales (Viala et Vidal 1978). Sur la base de ces effets, ces auteurs suggèrent que les CPGs lombaires joueraient le rôle de CPGs "leaders" compte tenu de la stabilité et de la fréquence de leur rythme, compatible avec une influence caudo-rostrale sous-tendant les coordinations antéro-postérieures. Chez la salamandre, une étude lésionnelle de la moelle épinière semble conforter cette hypothèse. Suite à une section thoracique, les auteurs concluent entre autres que les régions caudales influencent fortement certains paramètres de l'activité locomotrice générée plus rostralement (Chevallier, et coll. 2004). Enfin, une étude toute récente menée chez le rat nouveau-né en condition expérimentale *in vivo* et sur moelle épinière isolée *in vitro* confirme l'existence de cette influence ascendante en montrant la présence d'une propagation métachronale caudo-rostrale des activités rythmiques de type locomoteur au niveau des régions spinales thoraciques (Falgairolle 2006).

Le corrélat anatomique de ces voies de projections ascendantes entre segments spinaux chez les Vertébrés supérieurs est encore peu documenté. Toutefois, des travaux chez le chat ont permis d'identifier des connexions ascendantes propriospinales pouvant être à la base des coordinations interappendiculaires (English, et coll. 1985). Chez le rat, il existe également des projections ascendantes en provenance d'interneurones lombaires

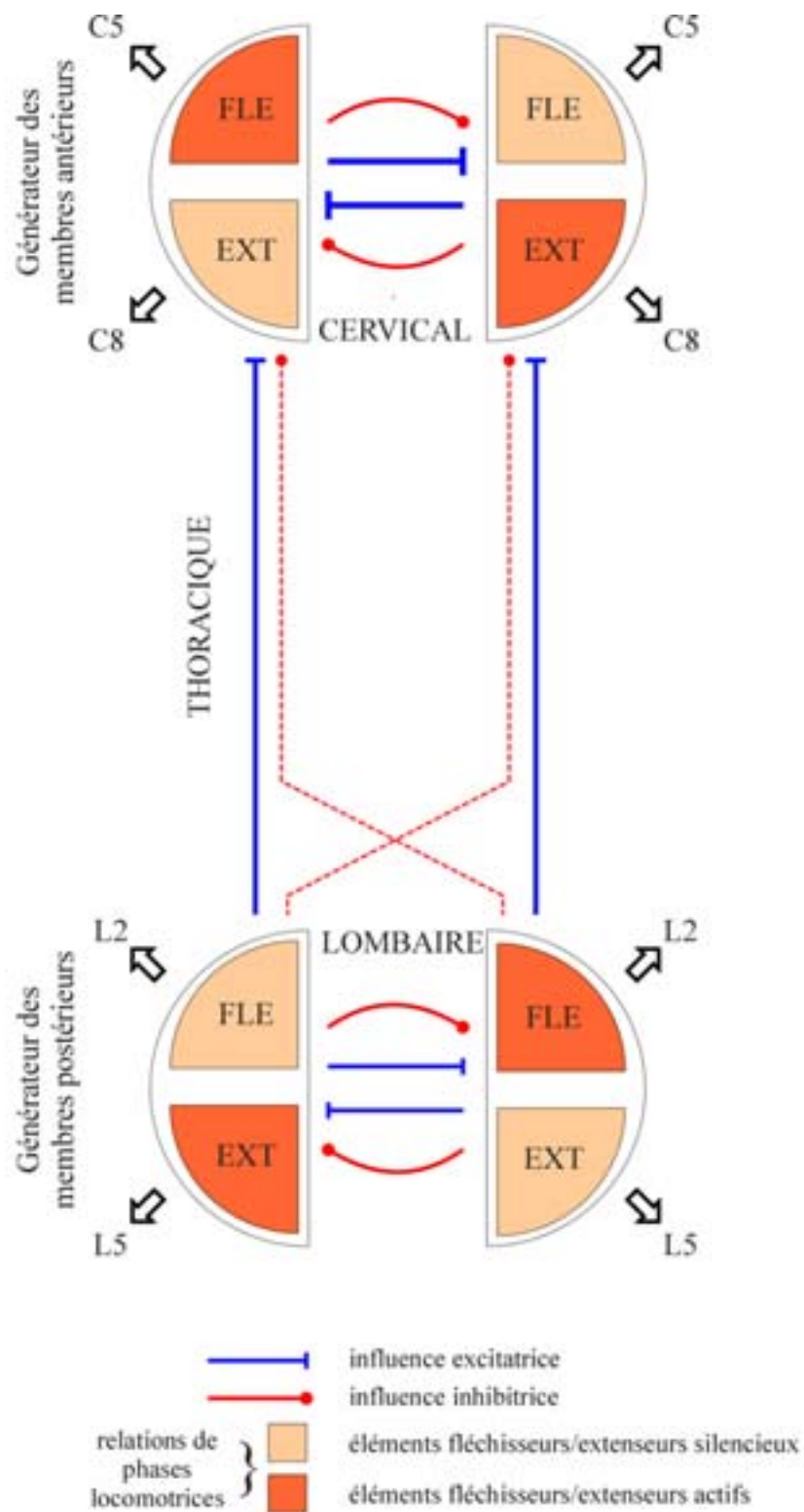


Figure 9 : Représentation schématique des connexions propriospinales contribuant aux coordinations interappendiculaires mises en œuvre lors d'une locomotion quadrupède. EXT, Extenseur. FLE, Fléchisseur.

commissuraux dont les axones se projettent rostralement sur plusieurs segments vers les régions thoraciques (Eide, et coll. 1999; Stokke, et coll. 2002; Birinyi, et coll. 2003; Butt et Kiehn 2003). Toutefois, l'étendue de ces projections ne semble pas excéder six segments. Un travail très récent basé sur le marquage rétrograde des neurones propriospinaux chez le rat adulte confirme l'existence de voies de projections directes et réciproques (ascendantes et descendantes) entre les renflements lombaires et cervicaux, les axones de ces interneurones empruntant majoritairement les funiculi ventro-latéraux (Reed, et coll. 2006).

Pour conclure, les coordinations interappendiculaires chez le rat reposent essentiellement sur une connectivité asymétrique caudo-rostrale entre des CPGs homologues antérieurs et postérieurs. Les mécanismes sous-tendant les coordinations intersegmentaires semblent être conservés au cours de l'évolution, mais utilisés selon des combinaisons différentes en fonction des espèces. Au final, "*rats have rear-wheel drive it seems*"⁴.

⁴ Ce commentaire, d'une tonalité plutôt humoristique, est issu de "*This Week in The Journal of Neuroscience*". Je me permets donc de reprendre cette phrase de conclusion qui illustre parfaitement à mon sens le résultat principal de ce travail.

CHAPITRE II :

Coordinations interappendiculaires chez les mammifères : implication des relais thoraciques

- RESUME :

Dans le cadre des coordinations interappendiculaires, les données précédentes ont mis en évidence l'existence d'une influence ascendante des régions locomotrices lombaires sur les segments cervicaux. On sait par ailleurs que l'organisation des couplages intersegmentaires chez les Vertébrés inférieurs repose sur la coexistence de fibres longues et de relais le long des chaînes spinales d'oscillateurs. L'utilisation d'une locomotion appendiculaire chez les Vertébrés supérieurs a cependant nécessité une régionalisation des générateurs de rythmes, plaçant les segments thoraciques (l'équivalent des segments intermédiaires chez la lamproie) dans une situation d'éléments secondaires en terme de rythmogenèse locomotrice. Dans cette étude, l'utilisation de la préparation réduite de moelle épinière isolée de rat nouveau-né a permis de préciser le rôle joué par ces segments thoraciques dans les coordinations interappendiculaires. Lorsque la moelle épinière est compartimentée (murs de vaseline) à différents niveaux thoraciques et qu'un milieu activateur de perfusion (NMA/5-HT/dopamine) est appliqué au niveau des régions caudales à cette barrière, la capacité des CPGs lombaires à entraîner leurs homologues cervicaux augmente proportionnellement avec le nombre de segments thoraciques exposés aux agents neuroactifs. Inversement, au cours d'un épisode de locomotion fictive induit pharmacologiquement, les couplages cervico-lombaires sont significativement réduits lorsque les régions thoraciques seules sont baignées par un milieu neutre ou par un milieu appauvri en calcium. L'ensemble de ces résultats suggère que les coordinations interappendiculaires reposent à la fois sur des connexions directes entre les CPGs antérieurs et postérieurs, ainsi que sur des connexions indirectes relayant au niveau des segments thoraciques.

- INTRODUCTION :

Lors d'une locomotion réelle, les coordinations interappendiculaires sont essentielles dans l'expression et dans la réalisation de différentes allures telles que la marche, le trot et le galop. Toutefois, dans un schéma global d'organisation de l'activité locomotrice, d'autres parties du corps telles que le tronc participent parfois activement à la propulsion de l'animal

(par exemple, succession de flexions dorsales et ventrales du tronc au cours du galop chez le guépard) (Hildebrand 1961). De plus, la musculature thoracique présente des contractions rythmiques lors de la locomotion chez le rat (Gramsbergen, et coll. 1999), chez le chat (Koehler, et coll. 1984; Zomlefer, et coll. 1984) et également chez l'homme (Thorstensson, et coll. 1982). Cette rythmicité des régions thoraciques peut avoir comme origine chez le rat nouveau-né les CPGs cervicaux et/ou lombaires dans la mesure où, au cours d'expériences de transections spinales sur préparation réduite de moelle épinière *in vitro*, les segments thoraciques présentent un rythme identique à celui généré par les CPGs auxquels ils restent rattachés (Ballion, et coll. 2001). En effet, totalement isolés, ces réseaux de neurones thoraciques semblent être incapables de générer seuls une activité rythmique sous l'action d'un mélange composé de NMDA et de 5-HT en faible concentration (5 μ M) (Ballion, et coll. 2001). Lorsque les concentrations sont augmentées (15 à 20 μ M), ces mêmes régions thoraciques génèrent alors un rythme alterné bilatéralement (Falgairolle et Cazalets 2006). Toutefois, le rôle joué par ces segments spinaux dans les coordinations interappendiculaires chez les Vertébrés supérieurs n'est pas connu.

Dans cette étude, l'utilisation du modèle de moelle épinière isolée de rat nouveau-né a permis de montrer qu'à la fois (1) l'entraînement des régions cervicales par l'activation des CPGs lombaires et que (2) les coordinations antéro-postérieures sont d'autant plus facilitées que les régions thoraciques sont elles mêmes activées pharmacologiquement.

- *MATERIELS ET METHODES* :

Ces expériences ont été réalisées chez des rats nouveau-nés (âgés de 0 à 4 jours) dont la moelle épinière a été isolée et maintenue en survie *in vitro* (voir **Matériels & Méthodes, page 38**). Des compartimentations ont été réalisées afin de perfuser séparément différentes régions spinales et des sections longitudinales (sagittales) de la moelle épinière (de Th3 à Th10) ont été effectuées (voir **Matériels & Méthodes, page 41**) afin d'évaluer l'implication des régions thoraciques dans les coordinations interappendiculaires. Au cours de l'ensemble de ces expériences, un mélange activateur composé de NMA, 5-HT et dopamine a été utilisé afin de déclencher des périodes de locomotion fictive. Un milieu appauvri en calcium et enrichi en magnésium a également été perfusé au niveau des segments thoraciques afin de bloquer la transmission synaptique.

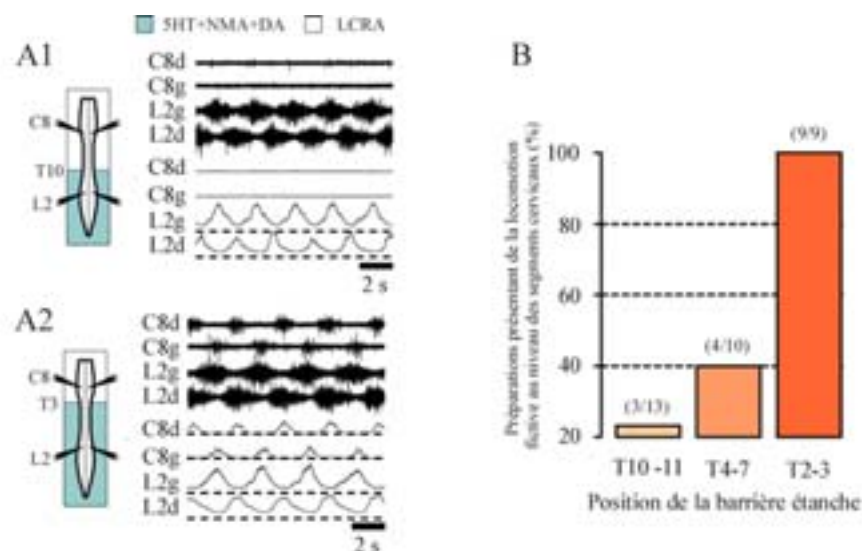


Figure 1 : Rôle des régions thoraciques dans les coordinations cervico-lombaires.

Enregistrements des racines lombaires et cervicales pendant une séquence de locomotion fictive induite par la perfusion de NMA/5-HT/dopamine sur les régions caudales au segment thoracique Th10 (**A1**) et sur les régions caudales au segment thoracique Th3 (**A2**). Les lignes en pointillés sur les tracés intégrés représentent le niveau zéro d'activité. (**B**) Histogrammes illustrant la relation entre le taux de préparations présentant une activité rythmique au niveau cervical (entre parenthèses) et le niveau de la barrière thoracique lors de l'activation pharmacologique des segments caudaux (**A1**, **A2**).

- *RESULTATS* :

Les travaux présentés précédemment (voir Chapitre I des résultats) ont montré que, par l'intermédiaire de connexions ascendantes, les régions lombaires activées pharmacologiquement (NMA/5-HT/dopamine) pouvaient entraîner à leur propre rythme des régions cervicales initialement quiescentes (figure 1A2). L'apparition de cette activité au niveau cervical est probablement la résultante de l'action de neurotransmetteurs endogènes libérés à partir de connexions ascendantes longues (lombo-cervicales) et/ou plus courtes mises en jeu par des relais thoraciques. Afin de tester cette hypothèse, le nombre de segments thoraciques activés pharmacologiquement a été progressivement augmenté en plaçant une barrière étanche à différents niveaux spinaux. Ainsi, lorsque la barrière est placée à un niveau thoracique caudal (Th10-11, n=13), la perfusion des segments caudaux à cette barrière par le mélange activateur ne déclenche que dans 23% des préparations une activité locomotrice fictive au niveau cervical (figure 1A1, 1B). Lorsque la barrière est déplacée à un niveau thoracique intermédiaire (Th4-7, n=10), ce pourcentage de préparation présentant un rythme locomoteur antérieur passe à 40% (figure 1B) et finalement atteint 100% lorsque la barrière, placée à un niveau thoracique rostral (Th2-3, n=9), permet l'activation de la quasi totalité des régions thoraco-lombaires (figure 1A2, 1B). Ces résultats montrent que l'activation pharmacologique des segments thoraciques facilite l'entraînement des CPGs antérieurs par leurs homologues lombaires.

Compte tenu de la position anatomique (intermédiaire) des régions thoraciques entre les CPGs antéro-postérieurs spinaux, ce rôle facilitateur pourrait également satisfaire à l'établissement des coordinations interappendiculaires lors de la locomotion. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de compartimentation des régions thoraciques (Th3 à Th10) sont menées pour permettre soit d'activer, soit de mettre au silence ces segments spinaux. En condition témoin, lorsque l'ensemble de la moelle épinière est activé pharmacologiquement (NMA/5-HT/dopamine), une activité locomotrice fictive est "classiquement" générée sur toutes les sorties motrices enregistrées. On observe alors une alternance bilatérale au niveau de chaque ceinture (par exemple, L5 gauche et L5 droite) ainsi qu'une alternance antéropostérieure (par exemple, L5 et C8 droites) caractérisée par un coefficient de cross-corrélation moyen de $-0,49 \pm 0,07$ (n=7, figure 2C1). Par ailleurs, une activité rythmique est également enregistrée au niveau thoracique (Th7 droit), générée en synchronie avec la racine

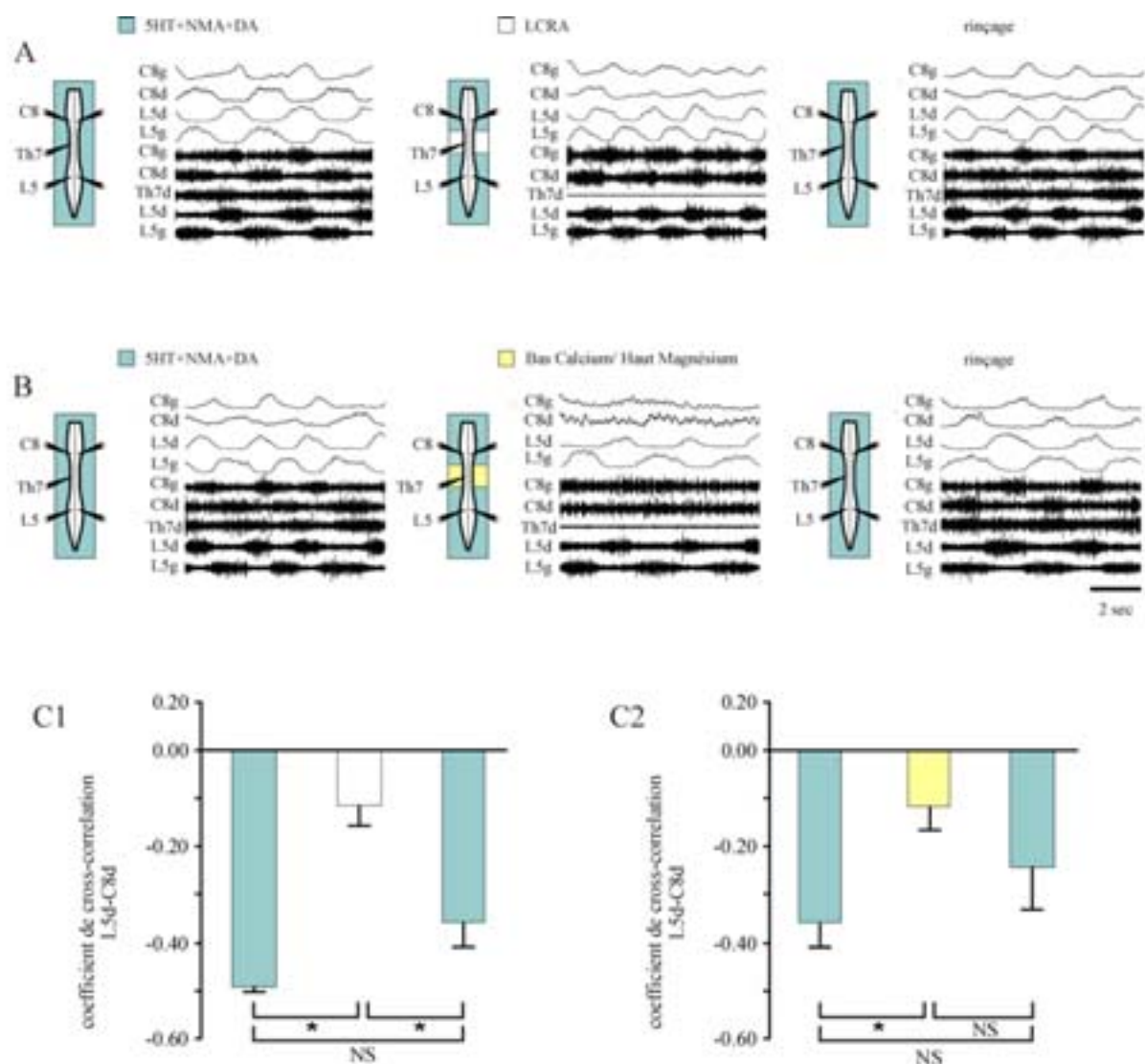


Figure 2 : Excitabilité des régions thoraciques et coordinations cervico-lombaires.

(A) Enregistrements au niveau cervical, thoracique et lombaire lors de l'application de NMA/5-HT/dopamine sur la moelle épinière entière (gauche), uniquement sur les régions cervicales et lombaires (milieu) et à nouveau sur l'ensemble du tissu spinal (droite). (B) Expérience identique à celle décrite en A, le LCRA étant remplacé par un milieu appauvri en calcium et enrichi en magnésium. (C) Histogrammes présentant la valeur moyenne (\pm SEM) du coefficient de cross-corrélation entre les activités homolatérales cervicales et lombaires dans les conditions expérimentales exposées en A (C1) et en B (C2) (7 préparations). * $p < 0,05$. NS, non significatif.

lombaire L5 homolatérale (figure 2A). Dans ces conditions, lorsque les régions thoraciques (Th3-Th10) sont perfusées sélectivement par un milieu neutre (LCRA), elles sont alors mises au silence, se traduisant par une disparition de l'activité motrice au niveau de ces segments. De manière concomitante, les coordinations intersegmentaires cervico-lombaires diminuent de manière statistiquement significative (coefficient de cross-corrélation moyen : $-0,11 \pm 0,04$, $p < 0,05$) (figure 2C1). Une fois les segments thoraciques réactivés pharmacologiquement, les caractéristiques initiales rythmiques et relatives aux coordinations intersegmentaires sont restaurées (figure 2A, 2C1).

Dans une série d'expériences similaires, le degré de coordination des activités cervico-lombaires est également évalué lorsque la transmission synaptique au niveau thoracique est fortement réduite (voire bloquée). La perfusion de ces segments par un milieu appauvri en calcium et enrichi en magnésium induit ainsi d'une part la disparition des activités rythmiques thoraciques (figure 2B) et d'autre part une réduction significative du coefficient de corrélation moyen entre les activités lombaires et cervicales homolatérales ($-0,12 \pm 0,04$, $p < 0,05$) (figure 2C2). Notons de plus que ce coefficient est identique à celui obtenu lors de la perfusion d'un milieu neutre sur les régions thoraciques (comparer figures 2C1 et 2C2). Enfin, un retour partiel des paramètres locomoteurs étudiés est observé lors de la restauration des conditions initiales (figure 2B, 2C2).

Le schéma d'organisation de l'interconnectivité spinale des réseaux locomoteurs proposé dans l'étude précédente (voir Chapitre I, figure 9), montrait la coexistence d'influences ascendantes homolatérales excitatrices et croisées inhibitrices impliquées dans les coordinations et les couplages antéro-postérieurs. Afin de tester cette hypothèse, des sections longitudinales ont été réalisées au niveau thoracique (Th3 à Th10) permettant la suppression des connexions croisées. En condition témoin, lors d'une activation pharmacologique globale, les segments spinaux génèrent des activités bilatérales cervicales et lombaires alternées (figure 3A1, B1, B2). De plus, l'alternance homolatérale antéro-postérieure est caractérisée par un fort coefficient moyen de cross-corrélation ($-0,81 \pm 0,01$; $n=7$; figure 3B3). Après une section longitudinale thoracique (figure 3A2), bien que les coordinations bilatérales ne présentent pas de variation significative (figure 3B1, B2), l'analyse statistique du coefficient de cross-corrélation révèle que les coordinations cervico-lombaires sont significativement réduites ($-0,62 \pm 0,07$; $p < 0,05$; figure 3B3).

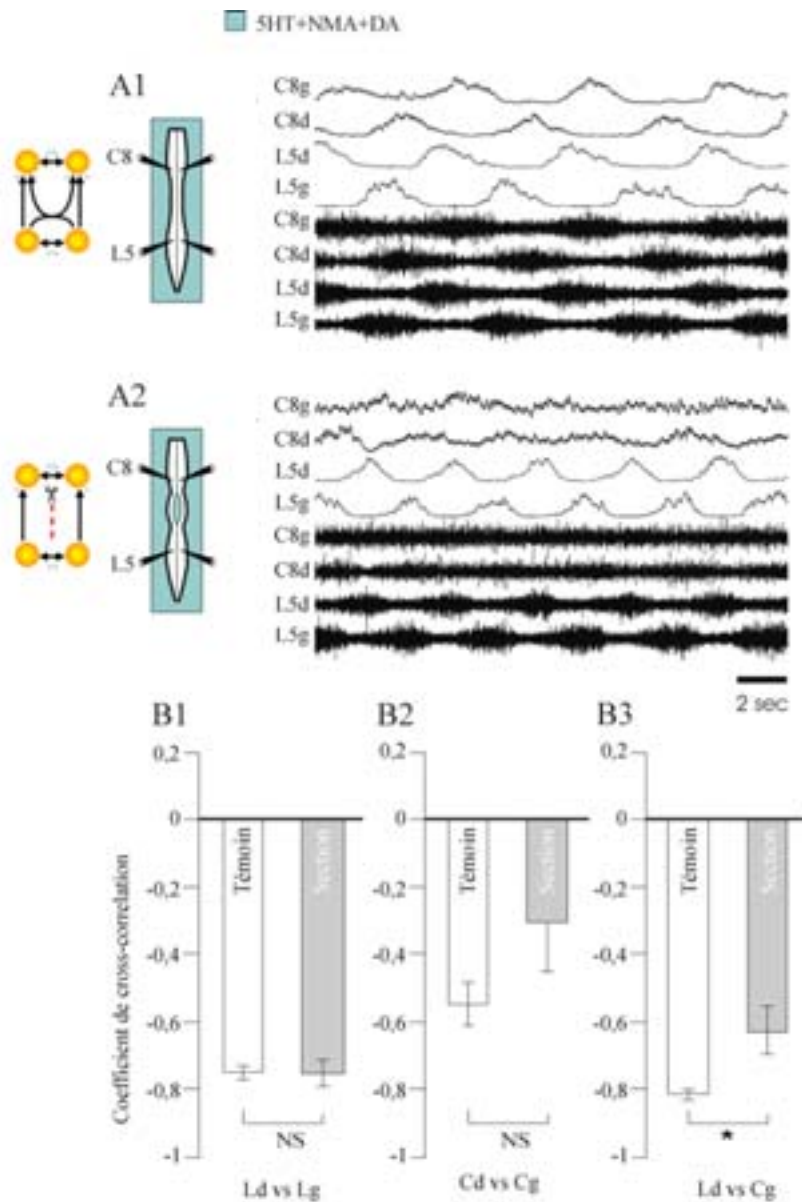


Figure 3 : Les coordinations cervico-lombaires sont dépendantes des connexions commissurales thoraciques.

Activités locomotrices fictives pharmacologiquement induites dans les conditions témoins (**A1**) et après section longitudinale des segments thoraciques (Th3 à Th10, flèche rouge, **A2**). Histogrammes présentant la valeur moyenne (\pm SEM) du coefficient de cross-corrélation entre les activités controlatérales lombaires (**B1**), cervicales (**B2**), et antéro-postérieures (**B3**) avant (en blanc) et après la section thoracique (en gris) (pour 7 préparations). *, $p < 0,05$; NS, non significatif ; d, droite ; g, gauche.

- *DISCUSSION* :

Comme le résume la figure 4, l'ensemble de ces données montre l'implication des régions thoraciques à la fois dans l'influence ascendante des CPGs lombaires sur les CPGs cervicaux, ainsi que dans les coordinations interappendiculaires.

En l'absence d'activation pharmacologique exogène, les CPGs cervicaux peuvent produire une activité rythmique locomotrice sous l'influence ascendante des CPGs lombaires. De manière importante, les résultats présentés dans ce chapitre montrent que, avec l'utilisation d'une compartimentalisation spinale (positionnement variable d'une barrière étanche), les régions cervicales sont d'autant plus actives que le nombre de segments thoraciques perfusés par les substances neuroactives augmente (figure 1). Ce premier point suggère que ces segments spinaux n'apparaissent plus seulement comme des éléments suiveurs tels qu'ils ont pu être décrits précédemment (Ballion, et coll. 2001), mais comme des structures relayant activement les informations à la base des couplages interappendiculaires. Ainsi, l'influence ascendante des CPGs lombaires naîtrait de la coopération entre des connexions longues caudo-rostrales et de l'activation des relais thoraciques.

Une telle contribution active des segments spinaux a également été observée dans la transmission de la commande motrice en provenance des structures supraspinales vers les régions locomotrices lombaires (Zaporozhets, et coll. 2006). Sur des préparations similaires à celles utilisées dans notre étude, la stimulation électrique du tronc cérébral déclenche une activité locomotrice fictive au niveau lombaire. Fait important et en accord avec nos hypothèses, l'efficacité de la commande descendante est directement dépendante du niveau d'excitabilité des segments cervico-thoraciques et de l'intégrité de la transmission synaptique (expérience de perfusion d'un milieu appauvri en calcium). Ces résultats montrent que la transmission de la commande locomotrice issue du tronc cérébral vers l'ensemble des régions spinales repose là encore sur la mise en jeu combinée de voies directes et de voies indirectes relayant entre autres au niveau thoracique. De plus, l'étude des connexions au niveau spinal a récemment été rapportée sur une préparation de moelle épinière isolée et désinhibée (application d'antagonistes GABAergiques et glycinergiques) (Cazalets 2005). Parallèlement à l'implication de connexions directes entre segments distants (jusqu'à dix segments), les couplages intersegmentaires sont également assurés par des connexions indirectes (existence de relais spinaux) dans la mesure où le temps de propagation de la commande motrice est en accord avec l'hypothèse d'une conduction segmentaire déjà révélée dans des études centrées

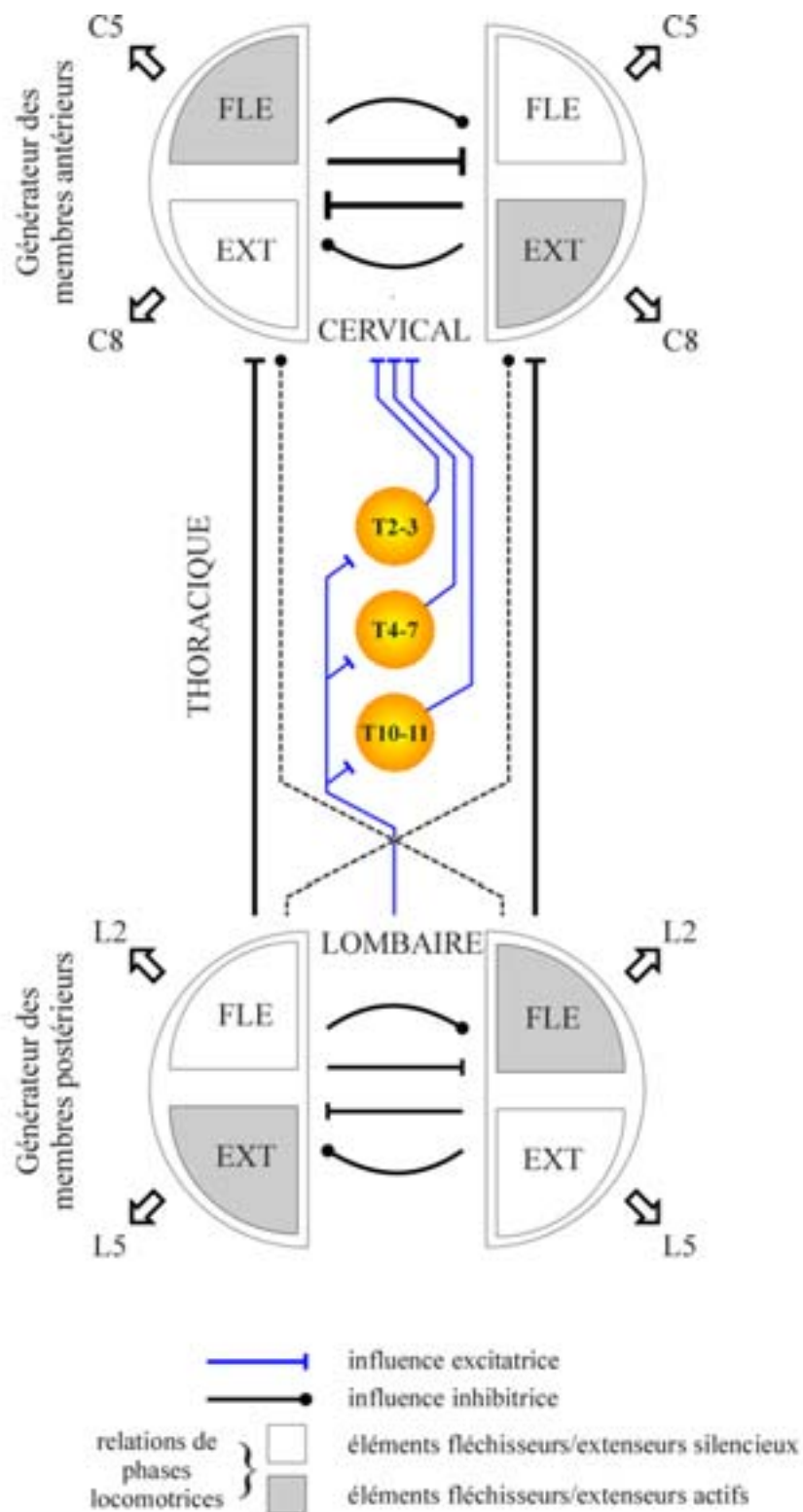


Figure 4: Rôles des relais thoraciques dans les coordinations interappendiculaires mises en jeu lors d'une locomotion quadrupède.
EXT, Extenseur, FLE, Fléchisseur.

sur le rôle des interneurones commissuraux descendants et ascendants se projetant sur plusieurs segments thoraciques (Eide, et coll. 1999; Stokke, et coll. 2002; Birinyi, et coll. 2003; Butt et Kiehn 2003).

Dans cette étude, le second point important est l'implication des régions thoraciques dans les coordinations interappendiculaires au cours de la locomotion comme le montrent les expériences de compartimentation sélective (figure 2) et de section (figure 3) au niveau de ces régions. A notre connaissance chez les Vertébrés supérieurs, ce rôle des segments thoraciques dans la coordination des activités locomotrices antéro-postérieures n'est pas documenté. Cependant il est intéressant d'observer qu'il existe au niveau lombo-sacré chez le rat nouveau-né une organisation synaptique très similaire à celle que l'on propose au niveau des régions rostrales. En effet, des sections longitudinales permettant de séparer les régions spinales lombo-sacrées bilatérales révèlent que des connexions croisées inhibitrices descendantes participent d'une part au patron d'alternance bilatéral et d'autre part au déphasage intersegmentaire (Falgairolle et Cazalets 2006).

Enfin, le rôle joué par les régions thoraciques chez les Vertébrés supérieurs n'est pas sans nous rappeler celui joué par les segments intermédiaires distribués le long de l'axe cérébrospinal chez des modèles animaux plus "simples" et dans lesquels les coordinations intersegmentaires entre oscillateurs reposent également sur la combinaison de voies directes et indirectes (Poon, et coll. 1978; Pearce et Friesen 1985; Brodfuehrer, et coll. 1995; McClellan et Hagevik 1999; Miller et Sigvardt 2000; Buchanan 2001; Friesen et Hocker 2001). L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'implication active des régions thoraciques dans la propagation de la commande locomotrice et des coordinations intersegmentaires semble être conservée au cours de l'évolution des Vertébrés inférieurs aux Vertébrés supérieurs.

CHAPITRE III :

Rythmogenèse locomotrice chez le rat nouveau-né : des oscillateurs symétriques pour la flexion et l'extension

- RESUME :

Au cours d'une locomotion réelle chez le rat adulte, la vitesse de déplacement est directement liée à la durée de la phase d'appui au sol des membres de l'animal. En d'autres termes, les variations de la période locomotrice sont directement dépendantes de la durée des phases d'extension. Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés aux propriétés temporelles des activités locomotrices fictives générées par une activation pharmacologique de la moelle épinière isolée (NMA (10^{-5} M), 5-HT (10^{-5} M) et dopamine (10^{-4} M)) ou par la stimulation électrique du tronc cérébral. Chez le rat âgé de 0 à 4 jours, des alternances homolatérales de type fléchisseur/extenseur sont enregistrées soit au niveau des sorties motrices cervicales (C5=fléchisseur; C8=extenseur) et lombaires (L2=fléchisseur; L5=extenseur) soit au niveau des nerfs moteurs (TA, tibial antérieur=fléchisseur de la cheville; G, gastrocnémien=extenseur de la cheville) et montrent des relations de phases constantes caractéristiques d'une allure locomotrice fictive de type marche. En modifiant la concentration de NMA (de 5 à 20 μ M) dans le mélange activateur ou les paramètres de stimulation électrique des régions du tronc cérébral, la période du cycle locomoteur varie de manière significative autorisant alors une étude de la durée des activités en fonction de la période du cycle locomoteur. Contrairement aux variations observées chez l'animal adulte, la durée des activités de type extenseur et de type fléchisseur est étroitement corrélée à la période locomotrice. De plus, malgré la variation significative de la durée du cycle locomoteur, le patron généré correspond toujours à une allure fictive de type marche. Chez des animaux juvéniles (âgés de 10 à 12 jours), un double enregistrement électromyographique des muscles TA et G est réalisé au cours d'épisodes de locomotion réelle sur tapis roulant. A ce stade de développement, les caractéristiques d'une locomotion adulte sont observées. Toutefois, après avoir isolé la moelle épinière *in vitro* de ces animaux juvéniles, la durée des activités de type fléchisseur est à nouveau dépendante de la période locomotrice. Ces résultats suggèrent que les générateurs responsables des phases de flexion et d'extension génèrent des activités dont le décours temporel évolue de manière symétrique.

- INTRODUCTION :

La locomotion des mammifères est générée par des circuits de neurones spinaux (de l'anglais "*central pattern generators*": CPGs) capables de produire les mouvements coordonnés des différents membres et régions du corps. Les CPGs locomoteurs des mammifères consisteraient en deux hémigénérateurs antagonistes responsables de l'alternance flexion/extension observée lors de la locomotion (Grillner, et coll. 1981). Pendant la locomotion des mammifères adultes tels que le chat (Goslow, et coll. 1973; Andersson, et coll. 1981; Halbertsma 1983), le rat (Navarrete, et coll. 2002) et l'homme (Grillner et Zangger 1979), les variations de la vitesse du pas découlent d'une modification de la durée de la phase d'extension du membre (appui), alors que la durée de la phase de flexion (transfert) reste relativement constante (Arshavsky, et coll. 1997). Malgré le fait que cette caractéristique soit largement admise, les mécanismes à la base de cette asymétrie fonctionnelle ne sont pas totalement établis et restent controversés. Ce fonctionnement asymétrique pourrait en effet s'expliquer selon trois théories. Premièrement, les hémigénérateurs produiraient des activités de type fléchisseur et extenseur de même durée, l'asymétrie provenant alors de l'influence différentielle des afférences sensorielles au cours de la locomotion (Lundberg 1969). Deuxièmement, les voies descendantes en provenance du tronc cérébral contrôleraient de manière asymétrique l'activité d'hémigénérateurs spinaux fléchisseurs et extenseurs possédant des caractéristiques fonctionnelles similaires (Shik, et coll. 1966; Jordan 1979). Enfin, cette asymétrie pourrait être liée au fonctionnement même des CPGs locomoteurs spinaux (Grillner et Dubuc 1988).

Depuis une décennie, l'utilisation de la préparation de moelle épinière isolée de rat nouveau-né *in vitro* a permis d'accroître considérablement notre compréhension de l'organisation des CPGs locomoteur chez les mammifères (Kiehn et Butt 2003). Cette préparation peut produire une activité rythmique sur les racines motrices spinales (Smith, et coll. 1988; Cazalets, et coll. 1992; Cowley et Schmidt 1994; Kiehn et Kjaerulff 1996), caractérisée par une alternance entre les activités homologues (fléchisseur ou extenseur) controlatérales, ainsi que par une alternance entre les activités de types fléchisseur et extenseur d'un même membre. Toutefois, même si les durées des activités de type extenseur sont fortement corrélées à la durée du cycle locomoteur (comme cela peut être observé chez l'adulte *in vivo*), la relation entre la durée des activités de type fléchisseur et la période du cycle locomoteur est moins évidente. Des études antérieures ont cependant rapporté qu'elle pourrait dépendre de la combinaison de différents neuromodulateurs utilisés dans le

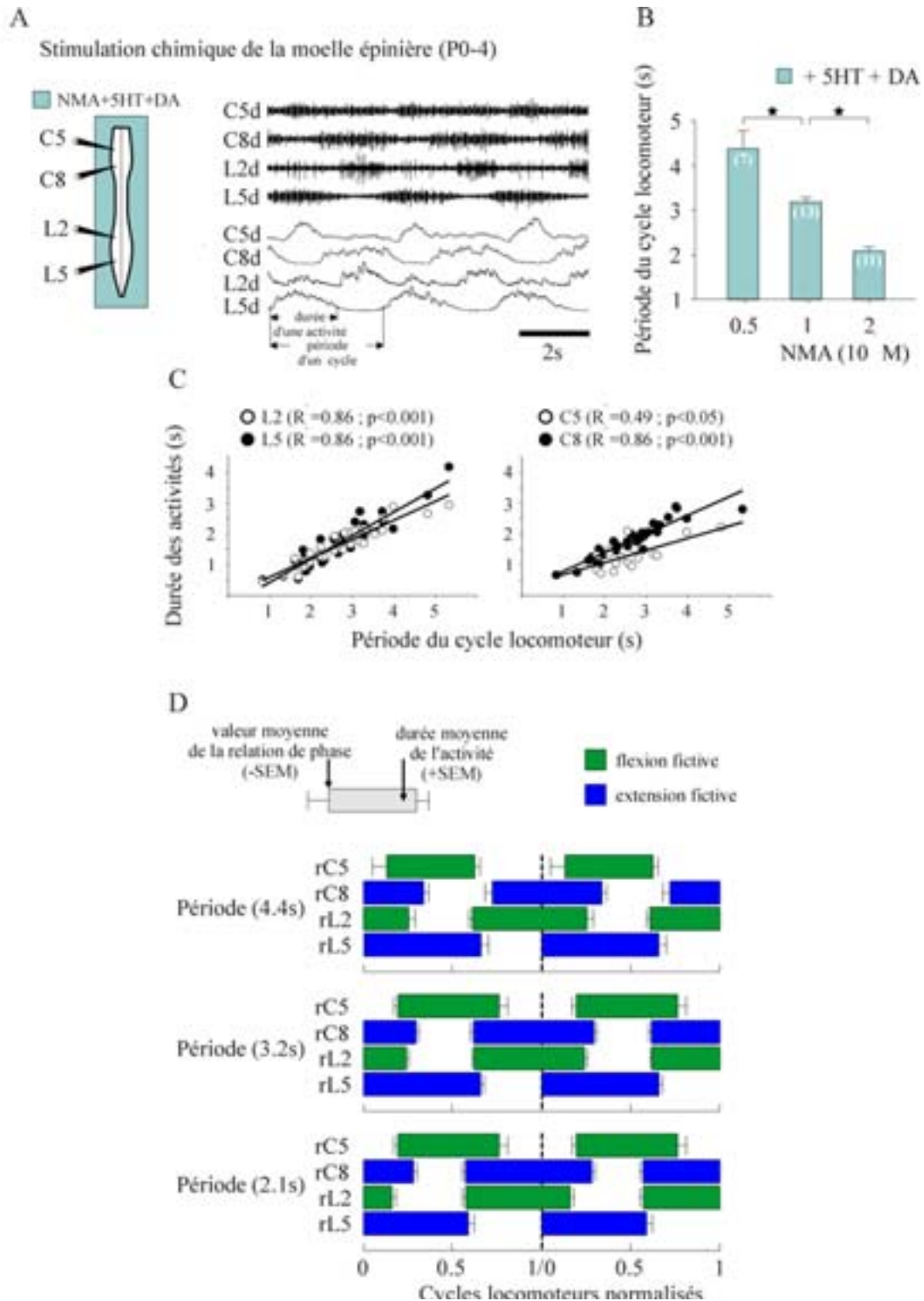


Figure 1 : Caractéristiques temporelles du patron locomoteur générée *in vitro* par la moelle épinière isolée de rat nouveau-né (P0-4).

(A) Enregistrements extracellulaires des racines homolatérales cervicales (C5 et C8) et lombaires (L2 et L5) pendant la perfusion d'un mélange composé de NMA/5-HT/dopamine. (B) Histogrammes montrant les variations de la période locomotrice en fonction de la concentration de NMA utilisée (0,5 à 2×10⁻⁵M) en combinaison avec la 5-HT et la dopamine. (C) Relation entre la durée des activités homolatérales cervicales (droite) et lombaires (gauche) et la période du cycle locomoteur. (D) Cycles locomoteurs normalisés durant des épisodes de locomotion fictive induite avec différentes concentrations de NMA (haut, 0,5×10⁻⁵M ; milieu, 10⁻⁵M ; bas 2×10⁻⁵M). d, droite ; g, gauche ; R², coefficient de corrélation. Le nombre de préparations utilisées est indiqué entre parenthèses et les barres verticales indiquent la SEM; *, p<0,05 ; NS, non significatif.

déclenchement des activités locomotrices fictives (Kiehn et Kjaerulff 1996; Barthe et Clarac 1997).

Le but de ce travail est de déterminer si l'origine de cette asymétrie est une propriété intrinsèque des oscillateurs spinaux ou une caractéristique émergente mettant en jeu des éléments différents tels que les afférences sensorielles. Succinctement, à partir de l'étude des caractéristiques temporelles des activités locomotrices fictives (préparations réduites de moelle épinière) et réelles (marche sur tapis roulant), nos résultats suggèrent que l'asymétrie fonctionnelle entre les phases d'extension et de flexion résulterait de l'influence d'afférences sensorielles et/ou supraspinales plutôt que d'une différence dans le fonctionnement intrinsèque des hémigénérateurs spinaux.

- *MATERIELS ET METHODES :*

Ces expériences ont été réalisées chez des rats nouveau-nés (âgés de 0 à 4 jours) et juvéniles (âgés de 10 à 12 jours) dont la moelle épinière a été isolée et maintenue en survie *in vitro* (voir : **Matériels & Méthodes, page 38**). La locomotion fictive, enregistrée soit au niveau de racines ventrales soit au niveau de nerfs moteurs, a été déclenchée par des stimulations électriques au niveau du tronc cérébral ou par la perfusion d'un mélange composé de N-méthyl-D,L-aspartate (NMA; $0,5-2 \times 10^{-5}M$) de sérotonine (5-HT; $10^{-5}M$) et de dopamine ($10^{-4}M$), (voir partie : **Matériels & Méthodes, page 41**). Différentes concentrations de NMA ont été utilisées de manière à faire varier la période du cycle locomoteur fictif. Enfin, des enregistrements électromyographiques des muscles fléchisseur (tibialis anterior) et extenseur (gastrocnemius) de la cheville ont été réalisés chez les rats juvéniles au cours de périodes de locomotion sur tapis roulant (voir partie : **Matériels & Méthodes, page 37**).

- *RESULTATS :*

Chez le rat nouveau-né, la moelle épinière isolée *in vitro* génère une locomotion fictive pharmacologiquement induite (NMA $10^{-5}M$; 5-HT $10^{-5}M$; dopamine $10^{-4}M$) caractérisée par une alternance entre les bouffées d'activités des motoneurones homologues controlatéraux au niveau cervical et lombaire ainsi qu'une alternance entre les racines ventrales homolatérales de type fléchisseur (C5, L2) et extenseur (C8, L5) (figure 1A). Dans ces conditions d'activation pharmacologique, la période locomotrice moyenne est de $3,2 \pm 0,1s$ ($n=13$; tableau 1, figure 1B). L'étude des relations temporelles existant entre les activités motrices et le cycle locomoteur a donc nécessité l'utilisation de différentes concentrations de

NMA ($0,5 - 2 \times 10^{-5}M$; (Morin et Viala 2002)) afin de modifier significativement la durée du cycle locomoteur (tableau 1, figure 1B). Dans ces conditions expérimentales, la variation de la durée des activités de type extenseur et de type fléchisseur est positivement corrélée à la période du cycle locomoteur fictif (figure 1C). Ainsi, on observe pour les sorties motrices L2, L5 ainsi que pour C8 un fort coefficient de corrélation ($R^2=0,86$; $p<0,001$). Malgré une valeur inférieure pour les sorties motrices C5 ($R^2=0,49$), ce coefficient reste toutefois significatif ($p<0,05$).

Tableau 1 : Variation de la durée des périodes locomotrices et des bouffées d'activités en fonction de la concentration de NMA dans le mélange activateur. N: nombre de préparations; §: $p<0,001$; £: $p<0,01$; NS: non significatif.

NMA ($\times 10^{-5}M$)	N	Période locomotrice (s)	Durée des bouffées d'activité (s)			
			C5	C8	L2	L5
0,5	7	4,4 \pm 0,3	2,1 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2	2,7 \pm 0,4
1	13	3,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1
2	11	2,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1

Durant la locomotion réelle, les modifications de coordinations entre les membres antérieurs et postérieurs à la base des différentes allures locomotrices sont hautement corrélées à la vitesse de déplacement de l'animal. L'analyse statistique montre que, quelle que soit la période locomotrice fictive obtenue (rapide (2,1s), moyenne (3,2s), lente (4,4s) respectivement pour les concentrations de NMA de $2 \times 10^{-5}M$, $10^{-5}M$ et $0,5 \times 10^{-5}M$), les relations de phases entre les activités cervico-lombaires homolatérales et leurs durées relatives dans le cycle locomoteur ("*duty cycle*") restent inchangés (figure 1D). L'ensemble de ces résultats suggère d'une part que les hémigénérateurs fléchisseurs et extenseurs aux niveaux cervico-lombaires fonctionnent de manière symétrique et d'autre part que la moelle épinière isolée est capable de produire un seul patron locomoteur fictif dont les caractéristiques sont proches d'une allure de type marche.

La forte corrélation entre la durée des activités de type fléchisseur et la période locomotrice révélée dans cette étude apparaît inattendue et surprenante. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'un tel résultat soit lié (1) à l'utilisation d'un mélange activateur spécifique, (2) à la présence d'axones de nature différente (fléchisseur ou extenseur) au sein

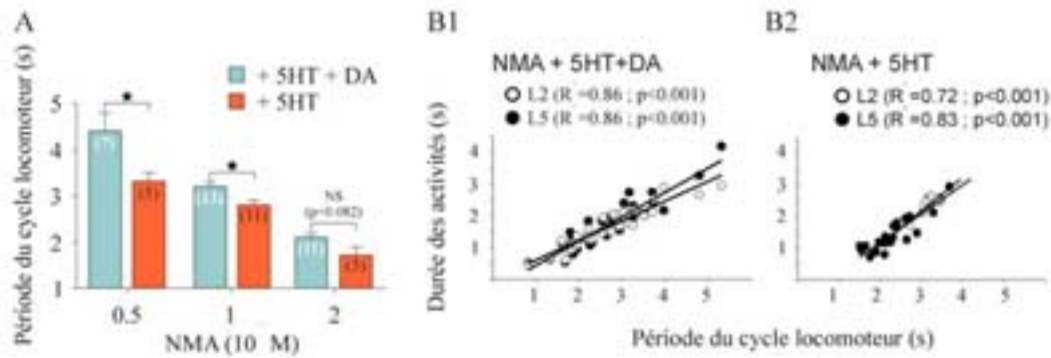


Figure 2 : La dépendance de la durée des activités de type fléchisseur et extenseur ne dépend pas du milieu activateur utilisé.

(A) Histogrammes montrant les variations de la période du cycle locomoteur en fonction de la concentration de NMA utilisée (0,5 à 2×10^{-5} M) en condition NMA/5-HT et NMA/5-HT/dopamine. (B) Relation entre la durée des activités homolatérales lombaires et la période du cycle locomoteur en condition NMA/5-HT/dopamine (B1) ou NMA/5-HT (B2). Le nombre de préparations utilisées est indiqué entre parenthèses et les barres verticales indiquent la SEM. d, droite ; g, gauche ; *, $p < 0,05$; NS, non significatif.

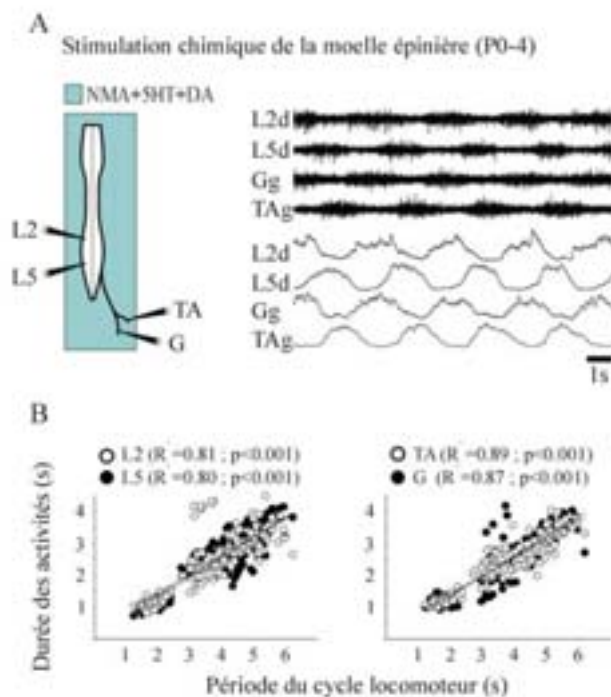


Figure 3 : Etude de la variation des durées des activités enregistrées à partir de nerfs moteurs identifiés en fonction de la période locomotrice.

(A) Activités locomotrice enregistrées au niveau des racines ventrales lombaires (L2 et L5) et des nerfs moteurs des muscles tibialis anterior (TA) et gastrocnemius (G). (B) Graphiques montrant la relation entre la durée des activités et la période du cycle locomoteur fictif. d, droite ; g, gauche ; R², coefficient de corrélation ; s, secondes.

d'une même racine motrice (Cowley et Schmidt 1994), (3) au mode de déclenchement de la locomotion fictive ou finalement (4) à l'immaturation du système locomoteur. Une série d'expériences a permis de tester ces quatre points particuliers.

Dans la littérature, le mélange activateur le plus classiquement utilisé est composé de NMA et de 5-HT (Cazalets, et coll. 1992). Dans nos expériences, la dopamine a été rajoutée à ce cocktail afin de stabiliser le rythme et d'étendre significativement la gamme des périodes locomotrices exprimées par la moelle épinière isolée (figure 2A) (Barriere, et coll. 2004). Cependant, quelque soit le mélange activateur utilisé, la durée des activités de type fléchisseur et extenseur est positivement corrélée à la période du cycle locomoteur (figure 2B1, B2). Il semble donc que cette caractéristique ne soit pas liée à l'utilisation d'un mélange activateur spécifique.

D'autre part, des études neuroanatomiques ont montré que les corps cellulaires de motoneurons fonctionnellement différents peuvent présenter une co-localisation segmentaire lombaires (Nicolopoulos-Stournaras et Iles 1983). De plus dans certains cas, les axones innervant les muscles fléchisseurs et extenseurs se projettent dans les mêmes racines motrices (Cowley et Schmidt 1994; Yakovenko, et coll. 2002). Par conséquent, l'enregistrement extracellulaire d'une racine ventrale donnée peut être constitué d'un chevauchement des décharges de différentes populations motoneuronales. Afin de s'affranchir de ce possible biais expérimental, des enregistrements de l'activité de nerfs moteurs de muscles fléchisseur (*tibialis anterior*, TA) et extenseur (*gastrocnemius*, G) de la cheville combinés à ceux des racines lombaires L2 et L5 controlatérales ont été réalisés (figure 3A). Là encore, une forte corrélation entre la durée des bouffées d'activités de type fléchisseur (TA, L2) et extenseur (G, L5) et la période du cycle locomoteur fictif est observée (figure 3B).

Le mode de déclenchement pharmacologique d'une activité locomotrice fictive nécessite l'application exogène de différentes substances neuroactives sur la moelle épinière entière. Ces neuromédiateurs agissent de manière simultanée et aspécifique sur de nombreuses populations de neurones, cette activation pouvant alors être responsable des effets inattendus observés. Un autre mode de déclenchement d'épisodes locomoteurs fictifs a donc été utilisé, consistant en la stimulation électrique d'intensités variables du tronc cérébral (Zaporozhets, et coll. 2004). Cette stimulation induit une activation des CPGs locomoteurs spinaux (figure 4A) consécutive à la libération endogène de neuromédiateurs en provenance des voies descendantes. Dans ces nouvelles conditions expérimentales, la modification des paramètres de stimulation permet de moduler la période locomotrice fictive. On observe alors que la durée des activités homolatérales de types extenseur et fléchisseur est toujours

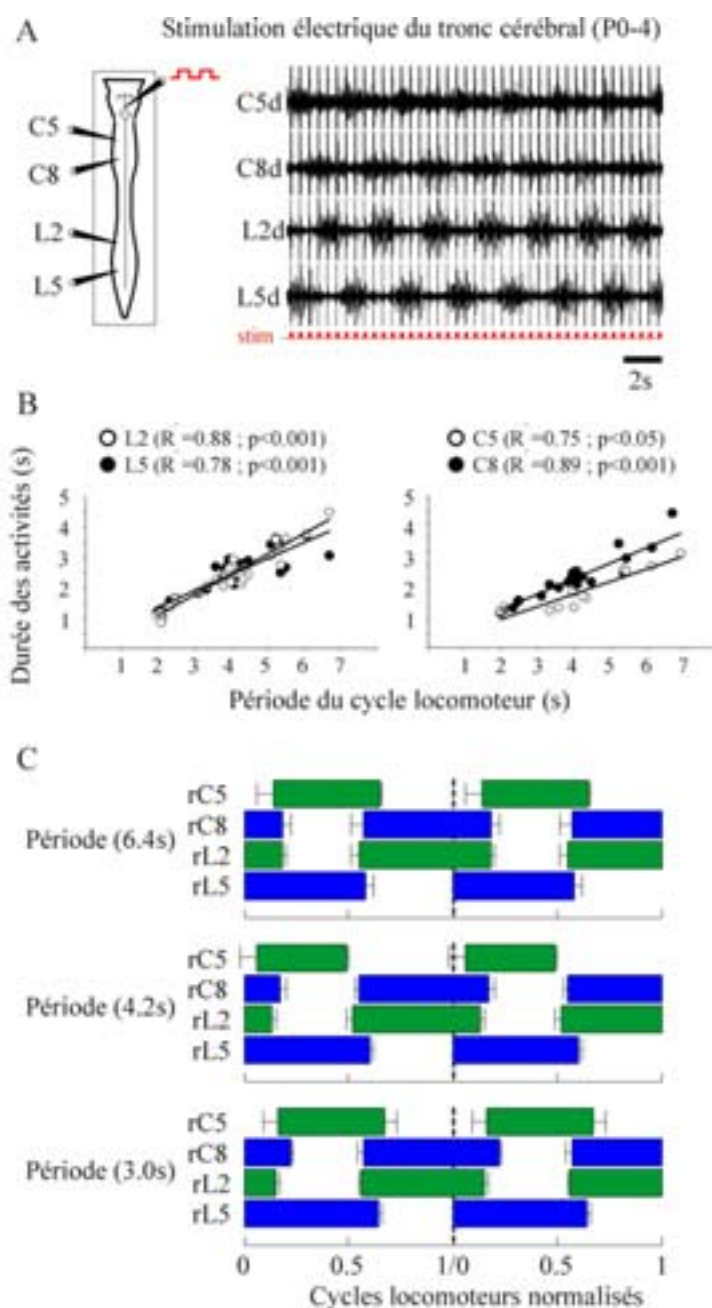


Figure 4 : Caractéristiques temporelles des activités locomotrices déclenchées par la stimulation électrique du tronc cérébral.

(A) Enregistrements extracellulaires des racines homolatérales cervicales (C5 et C8) et lombaires (L2 et L5) pendant la stimulation électrique (stim) du tronc cérébral. (B) Relation entre la durée des activités homolatérales cervicales (droite) et lombaires (gauche) et la période du cycle locomoteur. (C) Cycles locomoteurs normalisés durant des épisodes de locomotion fictive induits par la stimulation électrique du tronc cérébral. d, droite ; g, gauche ; R^2 , coefficient de corrélation ; s, secondes

dépendante de la période du cycle locomoteur fictif (figure 4B). De plus, l'analyse des relations de phases montre que le patron généré lors de la stimulation du tronc cérébral est similaire à celui obtenu après activation pharmacologique (comparer les figures 1D et 4C) et correspond à une allure fictive de type marche.

L'ensemble des données précédentes suggère qu'*in vitro*, les hémigénérateurs spinaux responsables de la flexion et de l'extension opèrent de manière symétrique durant les variations de la période locomotrice. Afin de déterminer si l'immaturation des réseaux de neurones spinaux chez le rat nouveau-né pouvait être responsable des résultats obtenus *in vitro*, une série d'expériences a été menée chez des animaux juvéniles (âgés de 10 à 12 jours) chez lesquels la locomotion présente des caractéristiques proches de celles décrites chez l'adulte (Westerga et Gramsbergen 1990). En effet, l'enregistrement électromyographique de l'activité des muscles fléchisseur (TA) et extenseur (G) de la cheville au cours de séquences de locomotion sur tapis roulant (figure 5A1) révèle une très faible variabilité de la durée des activités de type fléchisseur alors que la durée des extenseurs reste étroitement dépendante de la période du cycle locomoteur (n=5; figure 5A2). Lorsque les moelles épinières d'animaux juvéniles sont isolées *in vitro*, la perfusion du mélange activateur induit dans 3 préparations sur 9 des épisodes de locomotion fictive cervico-lombaire, présentant alors l'ensemble des alternances (bilatérale, antéro-postérieure et fléchisseur/extenseur; figure 5B1) caractéristiques d'une locomotion de type marche. Enfin, de manière similaire à ce qui avait été observé précédemment *in vitro* chez les animaux plus jeunes, la durée des activités de types fléchisseur et extenseur est positivement corrélée à la période locomotrice fictive (figure 5B2).

L'ensemble de ces résultats montre qu'en l'absence d'afférences supraspinales et périphériques, les hémigénérateurs locomoteurs spinaux contrôlent de manière symétrique la durée des phases d'extension et de flexion lors d'une locomotion quadrupède (figure 6).

- DISCUSSION :

Pendant la locomotion, il est classiquement admis que la vitesse de déplacement est positivement corrélée à la durée des phases d'appui (extension), la durée des phases de transfert (flexion) demeurant peu variable. Chez des chats décortiqués et déafférentés (Grillner et Zangger 1984), paralysés (Grillner et Dubuc 1988) ou spinalisés (Pearson et Rossignol 1991), ces caractéristiques sont conservées suggérant que les afférences sensorielles et supraspinales ne seraient pas responsables de l'asymétrie observée entre les durées des activités de types fléchisseur et extenseur au cours de la locomotion. Il a donc été

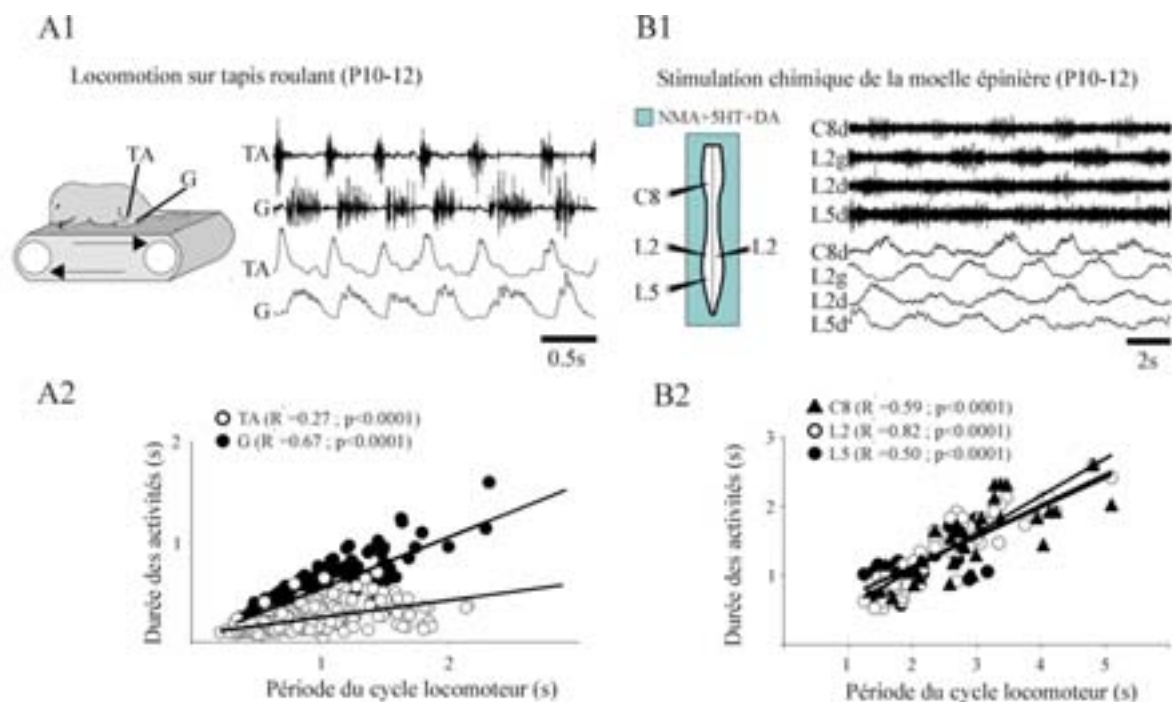


Figure 5 : Locomotion réelle et fictive chez des animaux juvéniles (P10-12).

(A1, B1) Représentations schématiques d'un rat juvénile (P10-12) sur un tapis roulants (A1) et d'une moelle épinière isolée au même stade de développement (B1). Enregistrements électromyographiques des muscles *tibialis anterior* (TA) et *gastrocnemius* (G) pendant une séquence de marche sur un tapis roulant (A1) et séquence de locomotion fictive enregistrée à partir des racines homolatérales cervicales (C5 et C8) et lombaires (L2 et L5) pendant la perfusion d'un mélange composé de NMA/5-HT/dopamine (B1). (A2, B2) Graphiques présentant la relation entre la durée des activités fléchisseurs et extenseur et la période du cycle locomoteur réel (A2) ou fictif (B2). R^2 , coefficient de corrélation.

suggéré que la modulation préférentielle de la durée des activités extenseur au cours de variations de la période locomotrice dépendrait d'une asymétrie dans la circuiterie et le fonctionnement intrinsèque des CPGs locomoteurs (Grillner et Dubuc 1988).

Cependant, un certain nombre de données tend à montrer que le rôle joué par ces afférences pourrait être beaucoup plus important que ne laissent supposer les travaux précédemment cités. Chez le chat spinalisé et curarisé, la locomotion fictive induite par l'injection de L-dopa ne montre aucune différence dans la variation des durées des activités de types fléchisseur et extenseur (Baker, et coll. 1984). De plus, lors de stimulations électriques au niveau du tronc cérébral chez des chats paralysés, les variations spontanées de la période locomotrice fictive reposent soit sur une adaptation de la durée de la phase d'extension ("*extensor dominant*"), soit dans la majorité des cas sur une adaptation de la phase de flexion ("*flexor dominant*") (Yakovenko, et coll. 2005). L'utilisation de modèles mathématiques montre que l'excitation différentielle perçue par les hémigénérateurs fléchisseurs et extenseurs lors de la locomotion serait responsable de ces dominances de phases ("*flexor vs extensor dominant*"). En ajustant la transition entre les temps d'appui et de transfert, les afférences périphériques et/ou supraspinales pourraient également déterminer la durée même de ces phases (McCrea 2001; Lam et Pearson 2002; Rossignol, et coll. 2006). Finalement, il semblerait que l'architecture intrinsèque des hémigénérateurs fléchisseurs et extenseurs ne soit pas à l'origine de l'asymétrie fonctionnelle observée *in vivo*, suggérant un mode de fonctionnement symétrique de ces réseaux de neurones.

En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent qu'une fois déconnectés des influences supraspinales et périphériques, les hémigénérateurs fléchisseurs et extenseurs produisent alors des activités dont la durée évolue de manière symétrique en fonction de la période locomotrice. Dans ces conditions de déafférentation et soumis à une excitation équivalente (par exemple pharmacologique), ces hémigénérateurs produisent des activités locomotrices dont les caractéristiques temporelles sont identiques (durées d'environ 60% du cycle quelque soit le mode d'activation et l'âge de la préparation). De plus, au cours d'une marche sur tapis roulant, le rat adulte présente une différence temporelle entre durée de l'extension (62% de la durée totale du cycle) et durée de flexion (19%) (Antri, et coll. 2002). Cependant, suite à une lésion médullaire thoracique (Th8-9) et après une période de récupération de 15 jours, les durées des phase d'extension et des phases de flexion deviennent sensiblement similaires (environ un tiers de la durée totale du cycle locomoteur). Ces résultats suggèrent donc que les afférences supraspinales pourraient participer à l'asymétrie observée dans la durée des activités locomotrices.

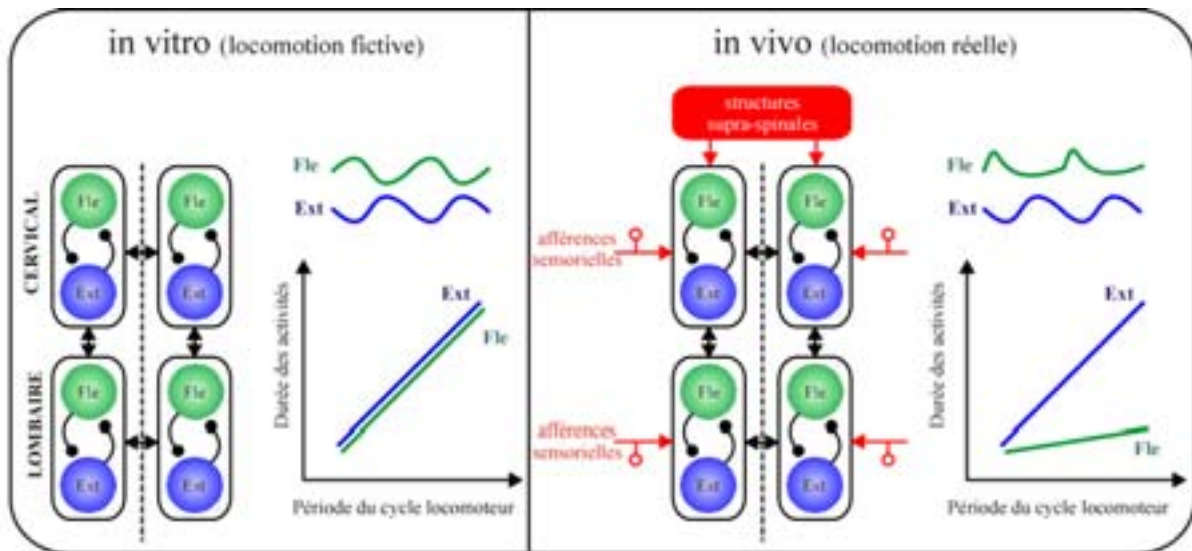


Figure 6 : Organisation symétrique des hémicPGs de type extenseur et fléchisseur.

Les variations temporelles des bouffées d'activités locomotrices pourraient avoir comme origine l'influence des voies descendantes et des retours sensoriels au cours d'une locomotion réelle.

Enfin, la figure 7 illustre les activités locomotrices réelles et fictives produites *in vivo* et *in vitro* chez la souris (Gordon et Whelan 2006). L'asymétrie dans la durée des phases d'extension et de flexion observée chez l'animal libre de ses mouvements (figure 7A2) est réduite lorsque les afférences supraspinales sont supprimées et que seule une partie des afférences sensorielles est maintenue (en particulier forte réduction des informations relatives à la charge supportée par les membres; figure 7B2). En revanche, lorsque la moelle épinière est isolée *in vitro* et totalement déafférentée, alors l'asymétrie est complètement supprimée (figure 7C2). Ces données montrent que les afférences périphériques participent également au maintien de l'asymétrie fonctionnelle observée *in vivo* entre la durée des activités de types fléchisseur et extenseur.

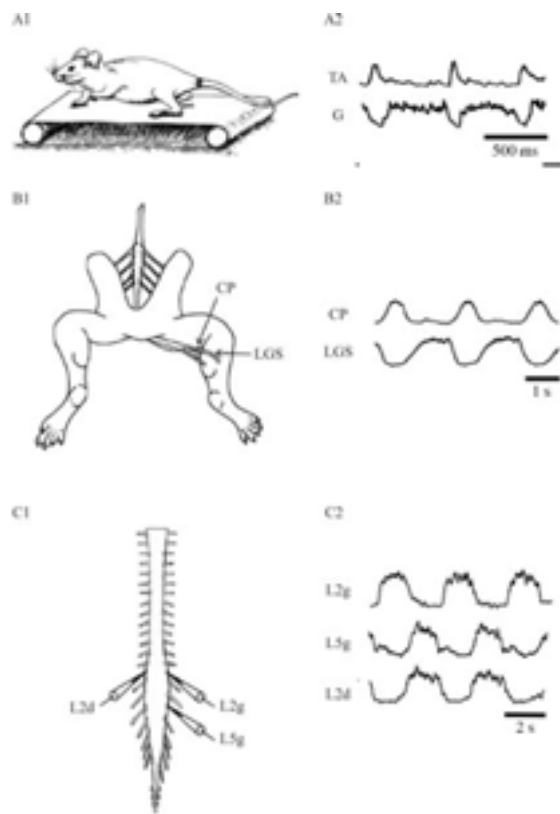


Figure 7 : Activités locomotrices dans différentes conditions expérimentales.

(A1) Représentation schématique d'une souris marchant sur un tapis roulant. (A2) Enregistrements électromyographiques des muscles fléchisseur (*tibialis anterior*, TA) et extenseur (*gastrocnemius*, G) de la cheville d'une souris adulte marchant sur un tapis roulant. (B1) Représentation schématique d'une préparation semi-intacte de souris et (B2) électroneurogrammes de nerfs moteurs de type extenseur (*gastrocnemius lateralis*, LGS) et de type fléchisseur (*common peroneal*, CP) lors d'une locomotion pharmacologiquement induite. (C1) Représentation schématique d'une préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de souris et (C2) enregistrements électrophysiologiques des activités des racines lombaires ventrales de type fléchisseur (L2) et de type extenseur (L5) lors d'une locomotion fictive pharmacologiquement induite. Concernant les préparations semi-intacte et totalement isolée, l'activité rythmique est induite par la perfusion d'un mélange composé

de NMA/5-HT/dopamine.

Modifié d'après Gordon et Whelan 2006.

En conclusion, nos données semblent être en accord avec l'hypothèse originale émise par Engberg et Lundberg (1969) dans laquelle l'asymétrie entre les activités de types

extenseur et fléchisseur serait plus la résultante de l'influence des afférences sensorielles et/ou supraspinales que d'une asymétrie fonctionnelle intrinsèque de ces réseaux.

CHAPITRE IV :

Coordinations interappendiculaires chez les mammifères : implication des afférences sensorielles proprioceptives

- RESUME :

Les informations issues des afférences musculaires appendiculaires (fuseau neuromusculaire, organe tendineux de Golgi) sont essentielles dans l'ajustement du rythme locomoteur ou dans le renforcement d'une contraction musculaire. D'une manière générale, leur rôle est primordial pour qu'un acte locomoteur reste fonctionnel lorsque les conditions environnementales changent. Il est donc important d'évaluer l'implication des afférences en provenance des membres antérieurs et postérieurs dans les coordinations interappendiculaires. Sur des préparations de moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né, la stimulation électrique des racines dorsales lombaires ou cervicales, mettant en jeu les afférences à bas seuil (proprioceptives), peut induire une réinitialisation des rythmes locomoteurs (pharmacologiquement induits) à la fois aux niveaux antérieur et postérieur. Sur des préparations quiescentes, la stimulation rythmique de ces mêmes afférences entraîne sur une large gamme de période une locomotion fictive coordonnée sur l'ensemble des segments spinaux. Dans ces conditions d'activation, certaines coordinations intersegmentaires (relations de phases) sont modifiées, présentant un passage de l'alternance au synchronisme. Afin de préciser les voies de projections spinales activées par la stimulation des afférences sensorielles, des expériences de compartimentation de la moelle épinière ont été réalisées. Ainsi, le déclenchement d'une activité locomotrice induit par la stimulation rythmique des afférences lombaires se maintient au niveau cervical lorsque la transmission synaptique est bloquée au niveau des régions thoraco-lombaires. A l'inverse, la stimulation des afférences cervicales est incapable de déclencher une activité locomotrice lombaire lorsque la transmission synaptique des régions cervico-thoraciques est interrompue. Enfin, des données préliminaires montrent que l'activation des afférences cervicales à bas seuil est capable de déclencher des potentiels post-synaptiques excitateurs au niveau de certains motoneurons lombaires. L'ensemble de ces résultats montre que la mise en jeu des afférences périphériques à bas seuil lombaires et cervicales peut déclencher des séquences de locomotion fictive sur

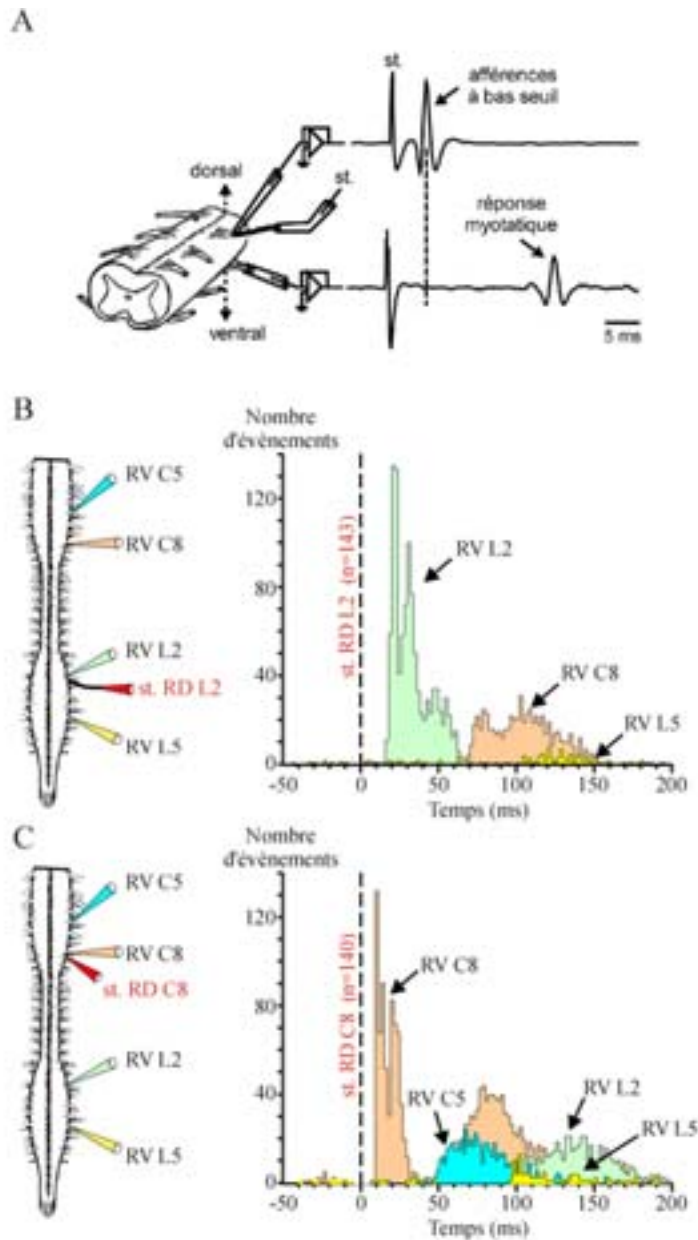


Figure 1 : Réponses motrices réflexes mises en jeu lors de la stimulation unitaire des racines dorsales lombaires et cervicales.

(A) Identification des afférences sensorielles activées par la stimulation électrique des racines dorsales. (B) PSTH ("peri-stimulus time histogram") illustrant le nombre d'événements moteurs déclenchés aux niveaux lombaire (L2, L5) et cervical (C8, C5) suite à la stimulation électrique de la racine dorsale L2. (C) Même représentation qu'en B suite à la stimulation électrique de la racine dorsale C8. RV, racine ventrale; RD, racine dorsale.

l'ensemble de la moelle épinière, l'influence ascendante et descendante de ces afférences sensorielles sur les CPGs locomoteurs reposant sur une asymétrie fonctionnelle.

- *INTRODUCTION* :

Les études menées depuis près d'un siècle chez les mammifères ont montré que le patron rythmique de la locomotion dépendait de l'activité de réseaux de neurones spinaux (CPGs) distants contrôlant respectivement les membres antérieurs et postérieurs (Brown 1911; Viala et Vidal 1978; Ballion, et coll. 2001). La réalisation d'un acte moteur adapté repose en outre sur des réajustements immédiats lors de l'exécution du mouvement. Cette adaptabilité à court terme dépend de boucles réflexes locales en provenance des afférences sensorielles musculaires et cutanées permettant au membre de corriger l'amplitude et la trajectoire du mouvement. Parallèlement, ces afférences sensorielles présentent une forte capacité d'activation des CPGs lombaires et peuvent ainsi déclencher des périodes d'activités locomotrices (pour revue voir Rossignol, et coll. 2006). Toutefois, compte tenu de la complexité des modèles expérimentaux classiquement utilisés chez les Vertébrés supérieurs (chat, rat adulte), peu de données concernant les mécanismes cellulaires et synaptiques sous-tendant l'influence de ces afférences sensorielles sur l'ensemble des CPGs spinaux sont disponibles dans la littérature.

Le développement de modèles exprimant une locomotion fictive (animaux paralysés, déafférentés, préparations réduites *in vitro* de tissu nerveux) tend cependant à faciliter ce type d'étude (Conway, et coll. 1987; Gossard, et coll. 1994; Guertin, et coll. 1995; Perreault, et coll. 1995; Pearson, et coll. 1998; Stecina, et coll. 2005). En particulier, la préparation de moelle épinière isolée *in vitro* de rat nouveau-né a permis de démontrer que les afférences sensorielles lombaires mises en jeu à bas seuil pouvaient activer et entraîner les CPGs locomoteurs postérieurs dès les premiers jours suivants la naissance (Kiehn, et coll. 1992; Sqalli-Houssaini, et coll. 1993; Iizuka, et coll. 1997; Marchetti, et coll. 2001). Là encore, aucune donnée n'est rapportée sur le rôle potentiel de ces afférences dans l'activation et les coordinations des CPGs locomoteurs antérieurs et postérieurs.

Dans ce travail, l'impact des afférences sensorielles à bas seuil lombaires et cervicales sur les interactions entre les générateurs de rythmes locomoteurs spinaux a été étudié en combinant des approches électrophysiologiques et pharmacologiques, associées à la compartimentation de la moelle épinière isolée *in vitro*. Nos principaux résultats montrent que la stimulation électrique des racines dorsales cervicales ou lombaires peut réinitialiser l'ensemble des rythmes locomoteurs spinaux pharmacologiquement induits et déclencher des

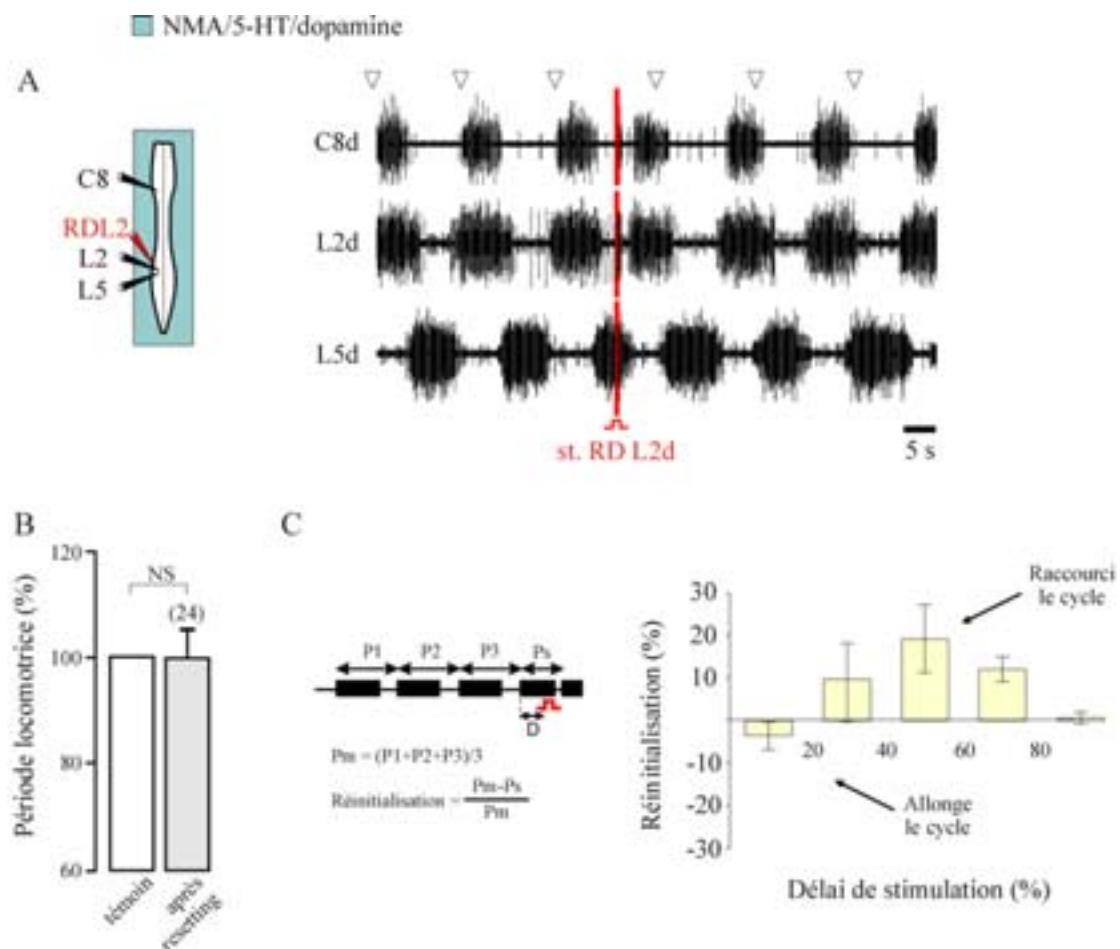


Figure 2 : Réinitialisation de la locomotion fictive par la mise en jeu des afférences sensorielles lombaires.

(A) Activités électrophysiologiques des racines ventrales lombaires et cervicales homolatérales pendant une séquence de locomotion fictive induite pharmacologiquement (NMA/5-HT/dopamine). La stimulation électrique (créneau rouge) est appliquée au niveau de la racine dorsale L2 (st. RDL2) (fréquence 20Hz ; durée 0,3ms ; 1-2 x seuil). Les triangles blancs représentent le début théorique des activités L2 droite en l'absence de stimulation. (B) Histogrammes montrant l'évolution de la période locomotrice avant et après la réinitialisation. (C) Graphique illustrant le pourcentage de réinitialisation en fonction du délai de la stimulation (7 préparations). NS, non significatif.

activités locomotrices fictives antéropostérieures coordonnées. L'influence des afférences en provenance des membres antérieurs et postérieurs dans les coordinations interappendiculaires est de plus basée sur des voies de projections ascendantes et descendantes fonctionnellement asymétriques.

- *MATERIELS ET METHODES* :

Ces expériences ont été réalisées chez des rats nouveau-nés (âgés de 0 à 4 jours) dont la moelle épinière a été isolée et maintenue en survie *in vitro* (voir: *Matériels & Méthodes*, page 38). Les afférences sensorielles à bas seuil sont mises en jeu par la stimulation électrique (tonique ou rythmique; voir: *Matériels & Méthodes*, page 41) des racines dorsales sur des préparations quiescentes ou activées pharmacologiquement (NMA, 5-HT et Dopamine). Des compartimentations du tissu spinal ont permis la perfusion différentielle des segments lombaires et cervicaux par un milieu appauvri en calcium et enrichi en magnésium afin de bloquer la transmission synaptique (voir: *Matériels & Méthodes*, page 41). Enfin, des enregistrements intracellulaires utilisant la technique de "patch-clamp" ont été réalisés sur une population de motoneurons lombaires de type fléchisseur (voir: *Matériels & Méthodes*, page 43).

- *RESULTATS* :

Dans ce travail, seuls les résultats relatifs aux stimulations des racines dorsales C8 et L2 ont été présentés. Ce choix est principalement dicté par le fait que ces entrées sensorielles sont situées dans des régions spinales au niveau desquelles sont précisément localisés les CPGs locomoteurs antérieurs (C7 à Th1) et postérieurs (L1-L2). De plus, les données concernant la mise en jeu des afférences sensorielles C5 et L5 ne sont encore que très parcellaires.

Sur des préparations isolées *in vitro* de moelle épinière de rat nouveau-né, la stimulation électrique des racines dorsales permet de mettre en jeu différents groupes d'afférences périphériques, fermant ainsi virtuellement la boucle sensori-motrice. Afin d'identifier la nature des afférences sensorielles ainsi recrutées, la volée afférente est enregistrée au niveau de la racine dorsale stimulée, et les réponses motrices évoquées sont recueillies à partir des racines motrices ventrales correspondantes (figure 1A). Les stimulations sont effectuées au niveau des segments lombaire L2 et cervical C8, régions

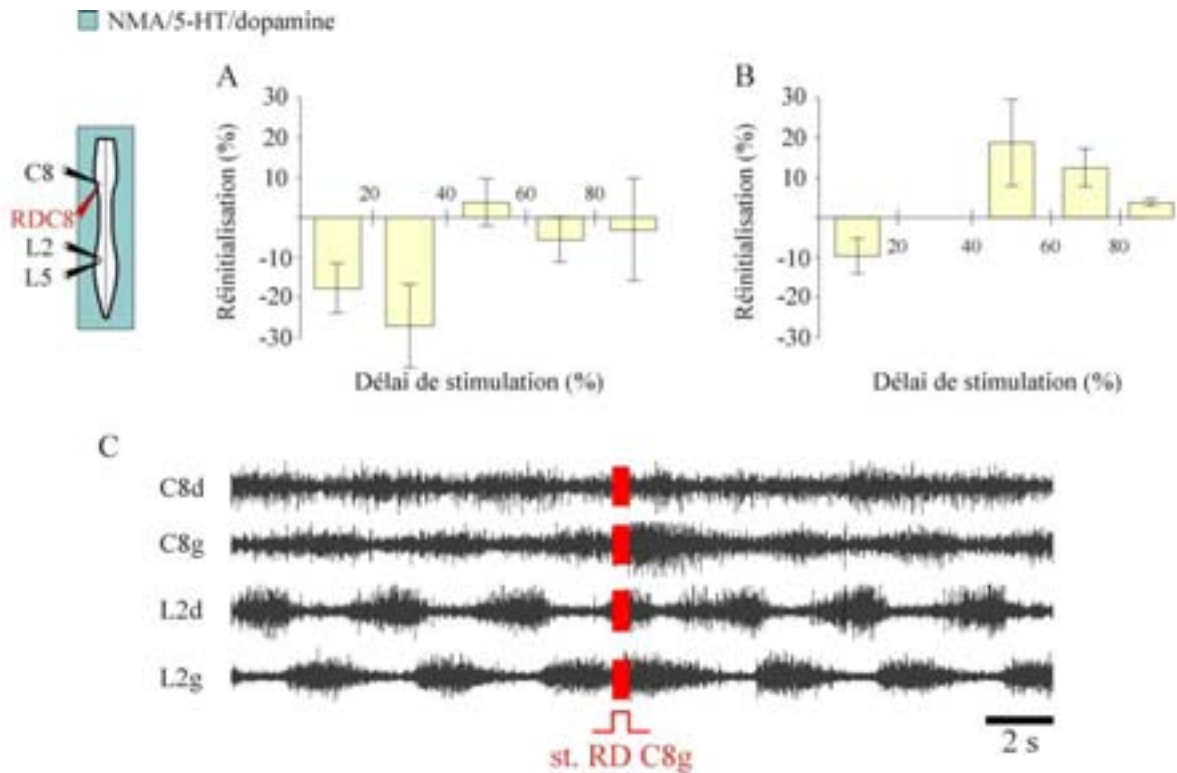


Figure 3 : Réinitialisation de la locomotion fictive par la mise en jeu des afférences sensorielles cervicales.

(A) Histogrammes montrant le pourcentage de réinitialisation en fonction du délai de la stimulation électrique de la racine dorsale C8 (RDC8) (fréquence 20Hz ; durée 0,3ms ; 1-2 x seuil) (7 préparations). (B) Dans 2 cas sur les 7 présentés en A, la stimulation électrique est suivie d'un raccourcissement de la période locomotrice, comme en témoignent les enregistrements en C.

spinales connues pour leur implication majeure dans la genèse du rythme locomoteur postérieur et antérieur chez le rat (Cazalets, et coll. 1995; Ballion, et coll. 2001). Dans ces conditions expérimentales, l'amplitude de la stimulation est considérée comme valeur seuil dès lors qu'une réponse motrice apparaît. Ainsi, une stimulation électrique (choc unique, amplitude moyenne $0,49 \pm 0,03$ V, $n=26$) déclenche dans un premier temps sur la racine dorsale une réponse à courte latence ($3,75 \pm 0,31$ ms, $n=6$) reflétant l'activation des afférences à bas seuil (figure 1A, tracé du haut). Consécutivement, une réponse réflexe est enregistrée au niveau de la racine ventrale correspondante avec une latence moyenne (par rapport à la volée afférente) de $16,49 \pm 1,40$ ms ($n=6$) (figure 1A, tracé du bas). Cette réponse motrice persiste en présence d'un milieu de survie enrichi en Ca^{2+} et en Mg^{2+} connu pour bloquer de manière réversible les voies poly-synaptiques ($n=5$; non illustré). Ainsi, les afférences sensorielles lombaires mises en jeu dans ces conditions expérimentales sont d'origine musculaire, probablement proprioceptive primaire, car elles évoquent une réponse motrice mono-synaptique de type myotatique.

Avant d'évaluer l'implication des afférences proprioceptives lombaires et cervicales dans les coordinations inter-segmentaires, des stimulations électriques répétitives en choc unique (compris entre 1 et 1,5x le seuil) sont réalisées dans un premier temps au niveau d'une racine dorsale L2, des multi-enregistrements nous permettant alors de rechercher les réponses motrices à partir des sorties cervicales C5 et C8, et lombaires L2 et L5 homolatérales (figure 1B, schéma). La représentation graphique du *peri-stimulus time histogram* (PSTH) révèle que la mise en jeu de ces retours sensoriels lombaires (L2) déclenche au niveau de la racine motrice correspondante une réponse complexe constituée d'une composante précoce (latence moyenne : $11,5 \pm 1,7$ ms, $n=4$) et d'une composante tardive ($22,0 \pm 2,3$ ms, $n=3$), généralement assimilées respectivement aux réponses réflexes mono- et poly-synaptique (figure 1B, PSTH). Parallèlement, alors que cette même série de stimulations ne semble déclencher qu'une très faible activité lombaire extenseur (L5, latence 114 ms, 1 cas observé), une composante motrice d'une latence moyenne de $51,0 \pm 7,2$ ms ($n=4$) est systématiquement observée au niveau segmentaire C8. L'expérience corollaire au cours de laquelle la stimulation est réalisée au niveau d'une racine dorsale cervicale (C8) montre des réponses motrices à la fois au niveau segmentaire (C8 et C5) mais également au niveau lombaire, essentiellement sur L2 (figure 1C, PSTH).

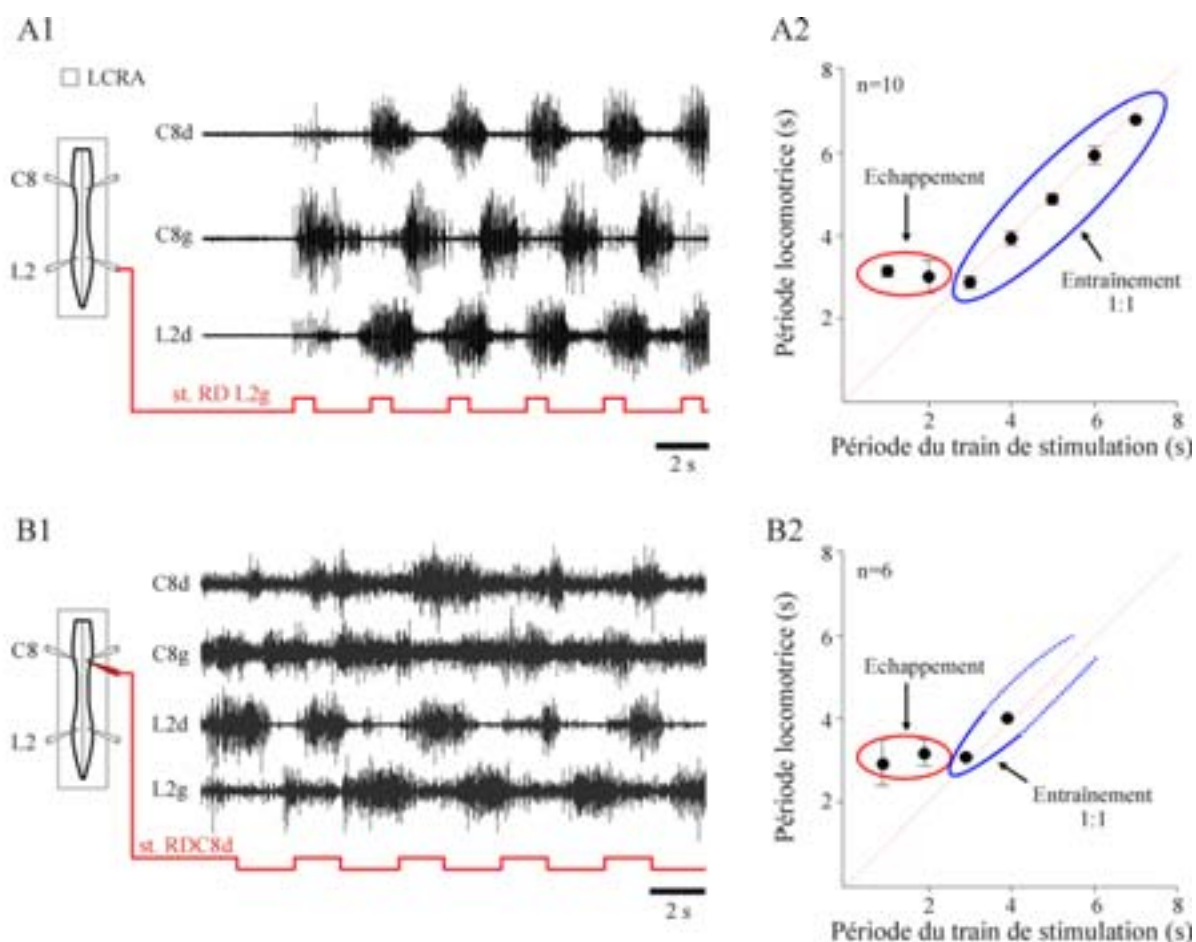


Figure 4 : Déclenchement et entraînement locomoteur par les afférences sensorielles à bas seuil.

Représentation schématique du dispositif expérimental (gauche) et enregistrements des racines lombaires et cervicales pendant une séquence de locomotion fictive induite par la stimulation électrique rythmique de la racine dorsale L2 gauche (st. RDL2g) (A1) ou C8 droite (st. RDC8d) (B1). Les créneaux en rouges (trace du bas) représentent les trains de stimulations électriques (période des trains de stimulations : 1-7 sec, fréquence : 1-5 Hz, durée des pulses : 0,3 msec). Représentations graphiques illustrant la période locomotrice fictive en fonction de la période des trains de stimulations utilisée lors de l'activation des afférences sensorielles lombaires (A2) ou cervicales (B2).

L'ensemble de ces résultats montre clairement que les afférences lombaires et cervicales proprioceptives sont capables de déclencher une réponse au niveau des sorties motrices segmentaires mais également distantes.

- réinitialisation des rythmes locomoteurs:

Si les afférences proprioceptives lombaires sont connues pour leur capacité à "réinitialiser" *in vitro* le rythme locomoteur postérieur (Kiehn, et coll. 1992; Sqalli-Houssaini, et coll. 1993; Iizuka, et coll. 1997), leur action sur les générateurs cervicaux reste totalement inconnue. Dans ce cadre, un train de stimulation (1 à 2x le seuil, chocs de 0,3 ms ; 5-20 Hz ; train de 0,5-1 s ; n=7 préparations) est appliqué au niveau d'une racine dorsale L2 au cours d'un épisode de locomotion fictive cervico-lombaire déclenchée pharmacologiquement (NMA/5HT/dopamine). L'activation des afférences lombaires à bas seuil engendre dans ces conditions une réinitialisation généralisée des rythmes locomoteurs, à la fois postérieurs et antérieurs (figure 2A). Notons en particulier que la stimulation, effectuée pendant la phase d'activation de la racine L5 homolatérale (extenseur), déclenche la fin prématurée de cette activité et une nouvelle bouffée de potentiels d'actions débute alors sur les racines L2 et C8. Ce phénomène de réinitialisation est validé par l'absence de changement significatif de la période locomotrice après réinitialisation complète du rythme (figure 2B) et étroitement lié au délai de stimulation des afférences proprioceptives au cours du cycle locomoteur (figure 2C). En effet, la mise en jeu de ces retours sensoriels évoque une réduction significative de la période locomotrice ($19,3 \pm 7,9\%$) si la stimulation intervient entre 40 et 60 % du cycle locomoteur.

De façon similaire, la stimulation des afférences cervicales (C8, extenseur) peut également réinitialiser le rythme généré par l'ensemble des CPGs locomoteurs spinaux. Ainsi, lorsqu'elle est réalisée pendant la phase d'activation de C8, la durée des activités enregistrées au niveau C8 et L2 est allongée, retardant d'autant le début de l'activité en L5 (non illustré). Si l'analyse statistique montre que la période locomotrice est allongée lorsque la stimulation est réalisée entre le début et 40% du cycle locomoteur, aucune modification du cycle n'apparaît lorsque la stimulation est appliquée plus tardivement (entre 40% et la fin du cycle) (figure 3A). Cependant, dans deux préparations sur les sept utilisées, le profil de réinitialisation des rythmes est similaire à celui obtenu lors de la mise en jeu des afférences sensorielles L2 (comparer figures 2C et 3B). Enfin, la stimulation des racines dorsales lombaires L5 (extenseur) ou cervicales C5 (fléchisseurs) semble incapable de réinitialiser le rythme locomoteur fictif.

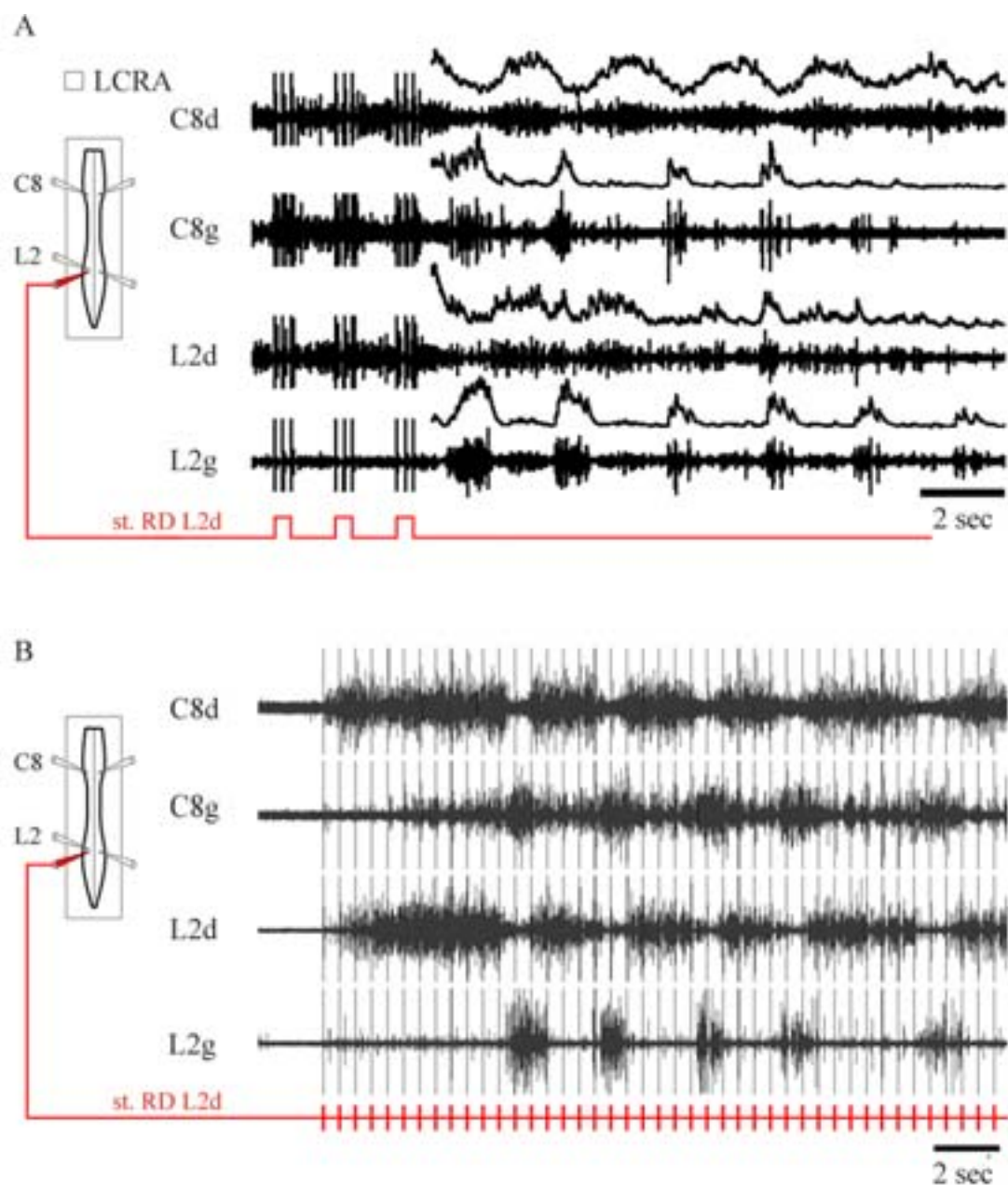


Figure 5 : La stimulation des afférences sensorielles active les CPGs locomoteurs spinaux.

Les séquences de locomotion fictive peuvent être déclenchées par la stimulation rythmique (A) ou tonique (B) des afférences sensorielles lombaires. Notons qu'une fois la stimulation rythmique terminée, il peut persister sur quelques cycles une activité de type locomoteur.

L'ensemble de ces données montre que les informations sensorielles lombaires d'origine musculaire sont capables de réinitialiser à la fois les rythmes locomoteurs lombaires et cervicaux tout en conservant les relations de phase existant entre les différentes activités motrices.

- *entraînement des CPGs locomoteurs par les afférences sensorielles :*

Au cours de la locomotion, les afférences lombaires proprioceptives sont naturellement et rythmiquement activées. *In vitro*, la stimulation périodique de ces afférences peut entraîner à son propre rythme une locomotion pharmacologiquement induite dans une gamme de fréquences toutefois limitée (Kiehn, et coll. 1992). Ce phénomène peut s'expliquer par une "incompatibilité" entre la fréquence intrinsèque des générateurs et celle imposée par la stimulation des afférences sensorielles. Dans ces conditions, nous avons choisi de stimuler rythmiquement (période des trains de stimulations : 1-7s, fréquence : 1-5Hz, durée des pulses : 0,3ms) les afférences cervicales ou lombaires à bas seuil sur des préparations initialement silencieuses. La stimulation d'une racine dorsale lombaire (L2) déclenche et entraîne des activités robustes de locomotion fictive sur les sorties motrices segmentaires (L2 et L5) mais également au niveau des régions cervicales distantes (C8 droite et gauche), caractérisées par une alternance bilatérale et antéropostérieure (figure 4A1). Dans cette situation, un couplage étroit de type 1:1 apparaît entre la période de stimulation et le cycle locomoteur et se maintient sur une large gamme de périodes imposées (entre 3 et 7s, figure 4A2). Pour des périodes de stimulation inférieures à 3 secondes, un phénomène d'échappement des CPGs locomoteurs est observé (figure 4A2). Notons qu'après l'arrêt de la stimulation rythmique des afférences sensorielles, il est possible d'observer la persistance de quelques cycles locomoteurs (figure 5A) et qu'enfin la stimulation tonique des ces mêmes afférences est capable de générer des séquences soutenues de locomotion fictive (figure 5B).

De manière similaire sur des préparation initialement silencieuses, la stimulation électrique périodique des afférences cervicales (C8) à bas seuil déclenche et entraîne une activité rythmique à la fois au niveau des segments antérieurs mais également au niveau des régions postérieures (figure 4B1). Bien qu'efficace, la mise en jeu de ces afférences cervicales produit une activité locomotrice dont le patron semble être moins organisé que celui déclenché par la stimulation des afférences lombaires. Enfin, les variations dans la période du train de stimulation ne permettent un entraînement de type 1:1 du rythme locomoteur que pour des valeurs supérieures ou égales à trois secondes (figure 4B2).

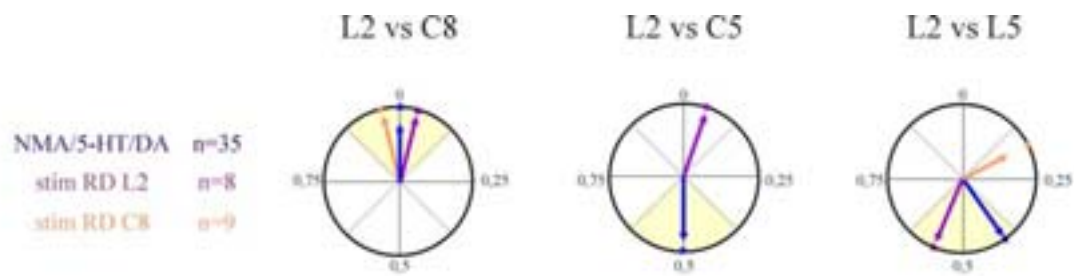


Figure 6 : Relations de phases entre les activités rythmiques des racines motrices spinales dans différentes conditions d'activation des CPGs locomoteurs.

Représentations circulaires des relations de phases entre les activités enregistrées sur les racines ventrales L2/C8 (gauche), L2/C5 (milieu) et L2/L5 (droite) pendant des séquences de locomotion fictive induite pharmacologiquement (NMA/5-HT/dopamine) ou par la stimulation électrique de la racine dorsale L2 (stim.RDL2) ou C8 (stim.RDC8).

Afin de tester l'influence des afférences sensorielles sur les coordinations interappendiculaires (L2 vs C8 et L2 vs C5) et intra-appendiculaires (L2 vs L5), une étude des relations de phases a été réalisée autorisant la comparaison des coordinations obtenues durant des épisodes de locomotion fictive induites soit pharmacologiquement, soit par la stimulation électrique rythmique des racines dorsales lombaires (L2) ou cervicales (C8). Quelque soit le mode d'activation utilisé, le synchronisme observé entre les activités des racines motrices homolatérales L2 et C8 reste inchangé (figure 6, représentation circulaire à gauche). Cependant, lorsque les entrées sensorielles issues des muscles fléchisseurs au niveau lombaire (L2) sont mises en jeu, l'alternance antéropostérieure entre les racines motrices homologues (L2 vs C5) est remplacée par une synchronie (phase=0,05 ; représentation circulaire au milieu). Enfin, la stimulation des afférences sensorielles de type extenseur au niveau cervical (C8) est capable de modifier significativement l'alternance de type fléchisseur/extenseur au niveau lombaire (L2 vs L5; phase=0,17 ; représentation circulaire à droite). Ces résultats préliminaires suggèrent que dans certaines circonstances les afférences sensorielles peuvent modifier drastiquement les relations de phases existant entre les sorties motrices inter- et intra-appendiculaires.

- voies de projections spinales mises en jeu par les afférences sensorielles :

Les résultats précédents mettent en évidence la forte capacité des afférences proprioceptives lombaires ou cervicales à évoquer un rythme locomoteur sur l'ensemble des segments spinaux.

Dans un premier temps, l'activation locomotrice déclenchée au niveau des régions cervicales par les afférences lombaires peut soit être relayée par les générateurs postérieurs de la locomotion (ces derniers activant à leur tour les générateurs cervicaux), soit dépendre d'un accès direct des informations sensorielles lombaires sur les oscillateurs antérieurs (figure 7A, schéma de droite). Afin de tester ces hypothèses, une étude pharmacologique visant à bloquer le fonctionnement des structures centrales lombaires est réalisée. Dans les conditions témoin de perfusion (milieu de survie normal, LCRA), la stimulation électrique périodique d'une racine dorsale L2 (1,5T, 0,3ms, 5Hz, toutes les 3s) active les afférences proprioceptives et déclenche ainsi des activités locomotrices fictives cervico-lombaires (figure 7A). Pour bloquer de manière réversible toute transmission synaptique chimique, un milieu de perfusion extracellulaire appauvri en Ca^{2+} et enrichi en Mg^{2+} est appliqué uniquement aux régions lombaires. Alors que la stimulation rythmique des afférences lombaires à bas seuil reste à

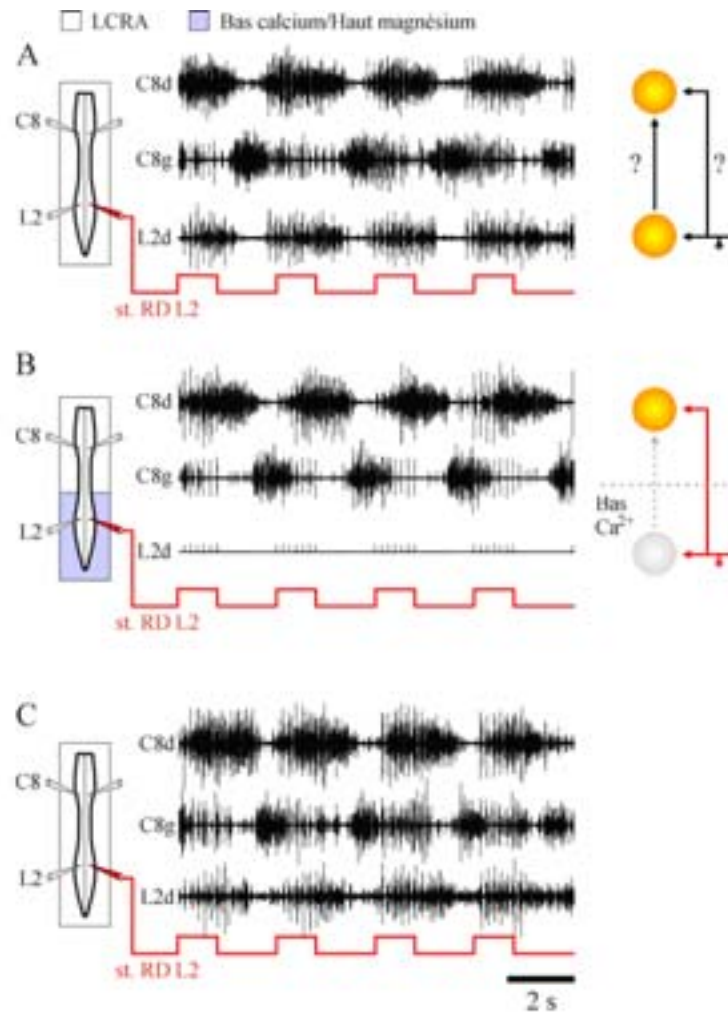


Figure 7 : Influence directe des afférences sensorielles lombaires sur les régions locomotrices cervicales.

Tracés bruts (haut) et intégrés (bas) des racines lombaires et cervicales pendant une séquence de locomotion fictive induite par la stimulation électrique rythmique (période des trains de stimulations : 3sec ; fréquence 5Hz ; 1,5 x seuil ; durée des pulses 0,3msec) de la racine dorsale L2 gauche (st. RDL2) en condition témoin (A), lors de la perfusion d'un milieu appauvri en calcium et enrichi en magnésium au niveau des segments lombaires (B) et enfin après restauration des conditions initiales (C).

présent sans effet sur le générateur postérieur de la locomotion, elle continue d'entraîner un rythme locomoteur alterné au niveau cervical (figure 7B), cet effet disparaissant lorsque les conditions initiales sont restaurées (figure 7C). Ces données montrent clairement que les informations proprioceptives lombaires ont un accès aux générateurs cervicaux de la locomotion sans relais lombaire (figure 7B, schéma de droite).

Dans un second temps, l'expérience corollaire est réalisée en stimulant les afférences sensorielles cervicales de type extenseur (C8). Sur des préparations initialement quiescentes, cette stimulation rythmique déclenche une locomotion fictive cervico-lombaire (figure 8A), cette activation à distance des régions lombaires pouvant être relayée par les générateurs antérieurs de la locomotion ou dépendre d'une voie directe des entrées sensorielles cervicales sur les générateurs lombaires (figure 8A, schéma de droite). Lorsque la transmission synaptique est bloquée au niveau des régions cervicales, la stimulation rythmique de la racine dorsale C8 ne déclenche plus aucune activité (figure 8B), alors que les générateurs lombaires restent toujours capables de produire des séquences locomotrices fictives (activation des CPGs postérieurs par les afférences lombaires; figure 8C). La restauration des conditions initiales de perfusion permet de rétablir des périodes de locomotion fictive antéropostérieures induites par la stimulation des afférences cervicales (figure 8D). Ces résultats suggèrent donc que les informations sensorielles cervicales relaient probablement au niveau segmentaire avant d'activer les CPGs locomoteurs lombaires (figure 8D, schéma de droite).

Afin de déterminer si les afférences sensorielles peuvent également influencer l'étage de sortie, des enregistrements unitaires ("patch-clamp") ont été réalisés au niveau des motoneurones locomoteurs. Cette étude, initiée récemment et centrée sur la population de motoneurones lombaires (n=10) de type fléchisseur (L2), a permis de déterminer en particulier l'impact d'afférences distantes que sont les entrées sensorielles cervicales (C8). Dans un premier temps, ces motoneurones sont identifiés par l'activation antidromique de leurs axones en stimulant électriquement par choc unique les racines ventrales d'intérêt (figure 9A). Un test complémentaire est ensuite effectué au cours duquel une activation orthodromique des neurones est réalisée. Lorsqu'un courant dépolarisant supraliminaire est injecté dans le soma du motoneurone, des potentiels d'actions sont générés et enregistrés de manière synchrone à la fois au niveau du corps cellulaire motoneuronal et au niveau des racines ventrales (axone) (figure 9B). Enfin, l'identification fonctionnelle de ces motoneurones est réalisée au cours de l'application d'un mélange activateur (NMA/5HT/DA) déclenchant une locomotion fictive. Dans ce cas, on observe une oscillation maintenue du

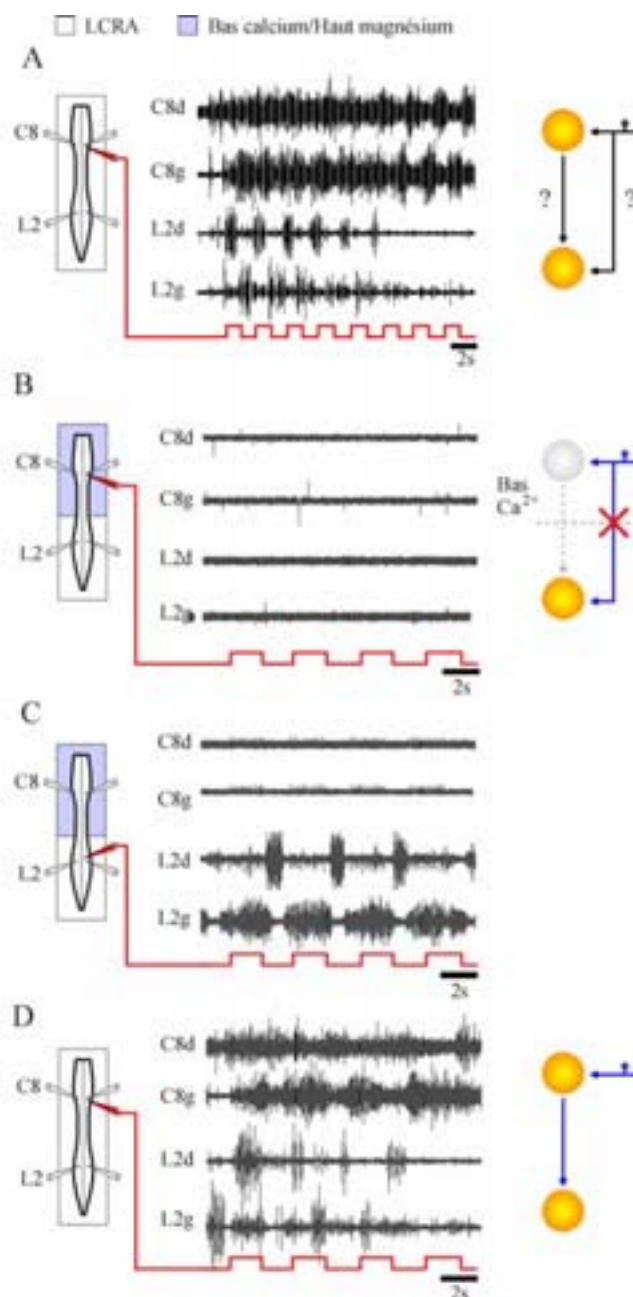


Figure 8 : Influence indirecte des afférences sensorielles cervicales sur les régions locomotrices lombaires.

Tracés bruts des racines lombaires et cervicales pendant une séquence de locomotion fictive induite par la stimulation électrique rythmique (période des trains de stimulations : 2-4sec ; fréquence 5Hz ; 1,5 x seuil ; durée des pulses 0,3msec) de la racine dorsale C8 gauche dans les conditions témoins (**A**), lors de la perfusion d'un milieu appauvri en calcium et enrichi en magnésium au niveau des segments cervicaux (**B**) et enfin après restauration des conditions initiales (**D**). Notons que l'absence de rythme locomoteur au niveau lombaire durant la mise au silence des régions cervicales n'est pas liée à un dysfonctionnement des CPGs lombaires puisque la stimulation électrique rythmique des afférences sensorielles L2 est capable d'initier une locomotion fictive (**C**).

potentiel de membrane des motoneurones fléchisseurs L2 générant des bouffées de potentiels d'actions en anti-phase avec l'activité de type extenseur enregistrée au niveau des sorties antagonistes L5 (figure 9C).

Une fois les neurones identifiés, l'influence synaptique des afférences sensorielles homolatérales cervicales et lombaires sur les motoneurones est testée lors de l'application d'un train de stimulation électrique sur les racines dorsales correspondantes. Ainsi, comme cela est classiquement rapporté dans la littérature, la mise en jeu des afférences lombaires à bas seuil L2 et L5 déclenche respectivement des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE, pouvant générer un potentiel d'action; figure 9D2) et inhibiteurs (PPSI; figure 9D3). La faible latence de ces PPSE est compatible avec la mise en jeu d'afférences proprioceptives de type Ia, les PPSI pouvant résulter de l'activation d'interneurones impliqués dans l'inhibition réciproque (interneurones inhibiteurs de type Ia). Enfin, la stimulation des afférences cervicales C8 déclenche à courte latence une série d'évènements synaptiques caractérisée principalement par la présence de PPSE (figure 9D1), suggérant une influence excitatrice directe sur les motoneurones.

- *DISCUSSION* :

La coordination et l'adaptabilité à court terme des systèmes moteurs ne passent pas exclusivement par des interactions directes entre les générateurs spinaux de rythme. Outre certaines structures telles que le cortex moteur ou le cervelet connues pour être largement impliquées dans le contrôle supra-spinal des coordinations motrices entre les différents membres (pour revue voir Orlovsky, et coll. 1999), les informations sensorielles jouent un rôle majeur dans l'ajustement immédiat des actes moteurs, et donc dans les interactions entre différents CPGs. Nos données expérimentales, bien que préliminaires pour certaines, mettent clairement en évidence la capacité des afférences sensorielles à bas seuil à activer les CPGs locomoteurs spinaux distants. En outre, en réinitialisant l'ensemble des rythmes locomoteurs spinaux lorsque les préparations sont pharmacologiquement activées ou en déclenchant des épisodes de locomotion fictive cervico-lombaire lorsque ces mêmes préparations sont initialement quiescentes, les projections descendantes et ascendantes mises en jeu respectivement par les afférences sensorielles cervicales et lombaires semblent être basées sur des organisations asymétriques (figure 10).

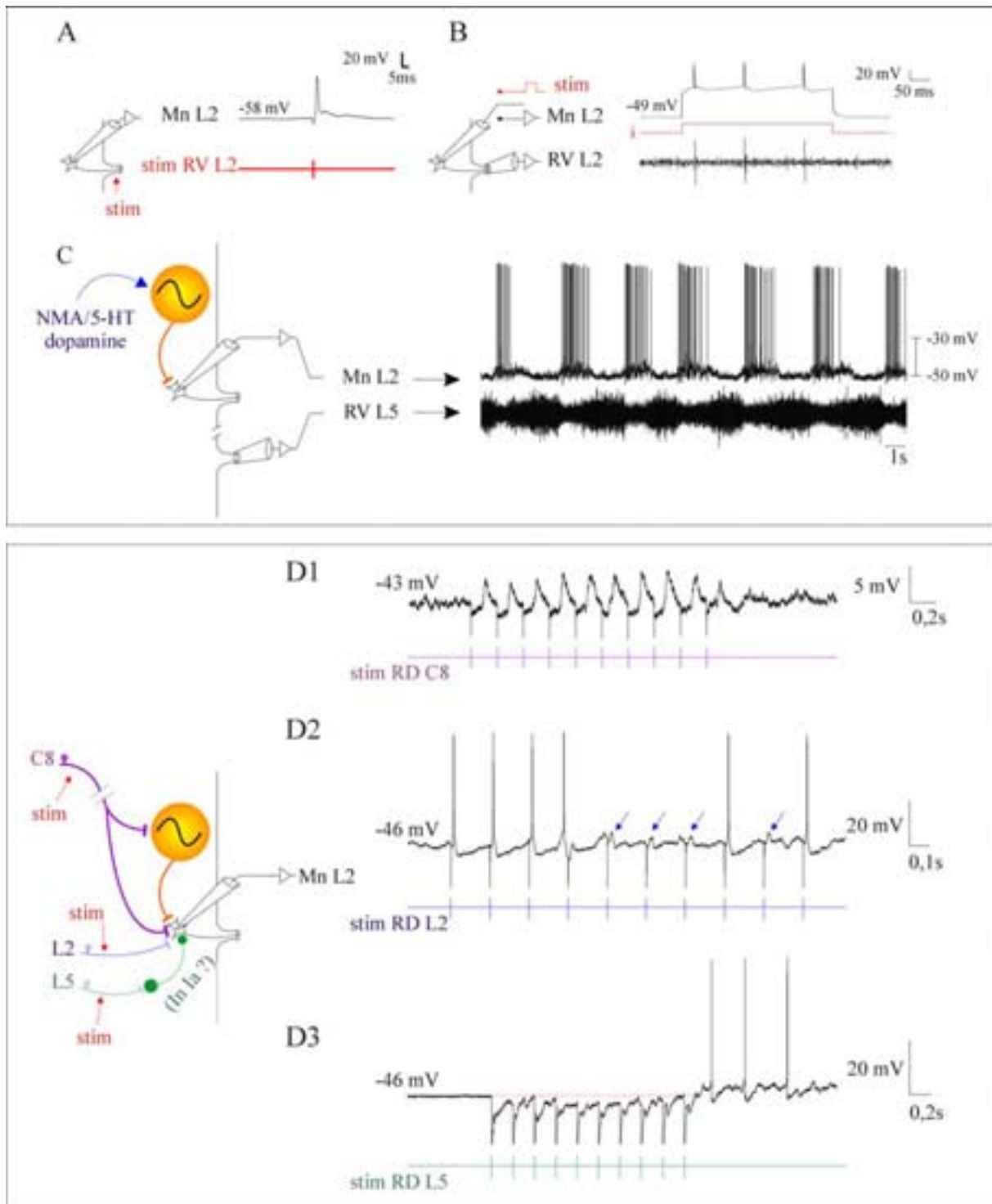


Figure 9 : Influence des afférences sensorielles cervicales et lombaires sur l'activité des motoneurones fléchisseurs lombaires.

(A) Identification du motoneurone par stimulation antidromique de la racine ventrale L2 et (B) par une stimulation orthodromique du corps cellulaire. (C) Identification fonctionnelle des motoneurones au cours d'une séquence de locomotion fictive induite pharmacologiquement (NMA/5-HT-dopamine). (D) Potentiels post-synaptiques évoqués au niveau motoneuronal lors de la stimulation électrique d'une racine dorsale (RD) C8 (D1), L2 (D2) ou L5 (D3). stim, stimulation; les flèches bleues indiquent la présence de potentiels post-synaptiques excitateurs.

- stimulation électrique des afférences sensorielles: réponses réflexes ou mise en jeu des CPGs?

La stimulation électrique des entrées sensorielles évoque des réponses motrices dont l'origine pourrait n'être que purement réflexe. L'échappement de la période locomotrice observée pour des périodes de trains de stimulation inférieurs à trois secondes (figure 4A2, B2) permet d'infirmer cette hypothèse. En effet, si les mécanismes impliqués mettaient en jeu uniquement des voies réflexes, alors le couplage 1:1 se maintiendrait très probablement quelle que soit la période de stimulation utilisée. D'autre part, il est possible d'observer le maintien d'une locomotion fictive pendant quelques cycles dès l'arrêt des stimulations rythmiques (figure 5A). Cette activité "résiduelle" reflète vraisemblablement la mise au silence progressive de CPGs spinaux. Là encore, il est très peu probable que l'activation de voies purement réflexes puisse perdurer dès l'arrêt des stimulations sensorielles. Finalement, la stimulation tonique de ces afférences déclenche une locomotion fictive coordonnée (figure 5B) (Marchetti, et coll. 2001), cette capacité à transformer une activité tonique en un patron rythmique organisé étant caractéristique de l'implication de CPGs (Hurwitz, et coll. 2005).

- voies de projections des afférences sensorielles cervicales et lombaires :

Au cours d'expériences de compartimentation, nous avons pu montrer l'existence probable de projections directes des afférences sensorielles lombaires sur les segments cervicaux. En effet, la perfusion d'un milieu bloquant la transmission synaptique sur les segments lombaires n'empêche pas l'expression d'une activité rythmique au niveau cervical par la stimulation des afférences sensorielles lombaires (figure 7B). En revanche, il est possible que les afférences sensorielles cervicales relaient sur des interneurons segmentaires, ces derniers se projetant vers les segments plus caudaux. La stimulation des afférences cervicales reste sans effet (absence de rythme lombaire) lorsque la transmission synaptique des régions spinales antérieures est bloquée (figure 8B). Il existe donc une asymétrie de connectivité entre les voies de projections empruntées par les afférences cervicales et celles utilisées par les informations sensorielles lombaires (figure 10).

Sur le plan purement anatomique, les connexions descendantes entre les régions cervicales et lombaires reposent sur des circuits propriospinaux. Ainsi, les afférences sensorielles cervicales pourraient relayer sur les neurones propriospinaux descendants empruntant les funiculi ventrolatéraux (Reed, et coll. 2006). En effet ces neurones, dont le corps cellulaire est localisé au niveau des régions cervicales (C1-C8) et les terminaisons

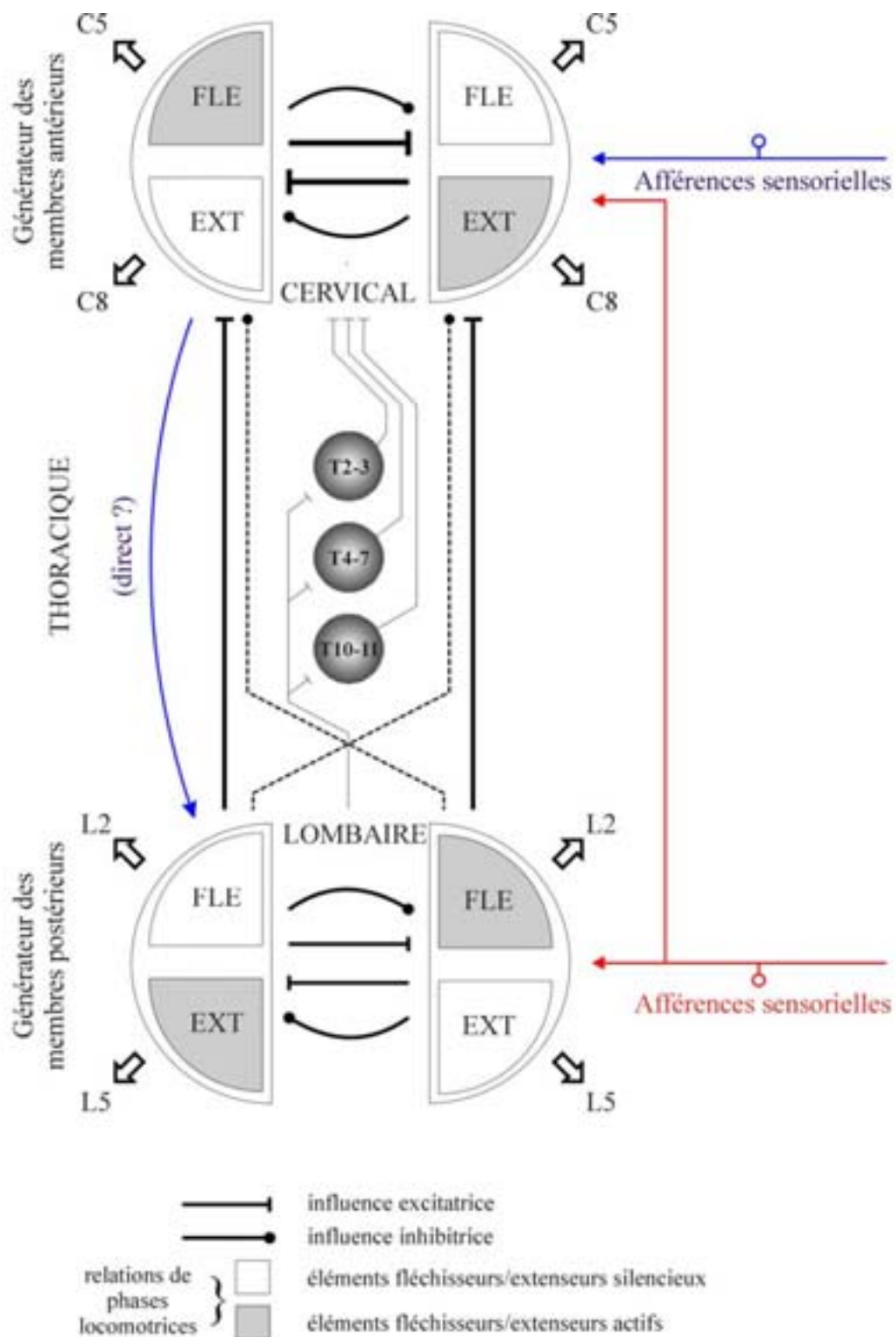


Figure 10 : Représentation schématique des connexions propriospinales et proprioceptives contribuant dans les coordinations interappendiculaires d'une locomotion quadrupède. EXT, Extenseur ; FLE, Fléchisseur.

synaptiques au niveau des segments lombaires (L2), peuvent être raisonnablement considérés comme des candidats potentiels. Concernant les voies de projection ascendantes, les informations sensorielles lombaires pourraient transiter via le faisceau spinocérébelleux dorsal (proprioception inconsciente) ou la voie spinothalamique (sensations liées à la douleur, la température et le toucher non discriminatif) ou encore la voie du lemnisque médian dorsal (les sensations liées à la proprioception consciente et le toucher discriminatif) et émettre des collatérales au niveau des régions cervicales. De plus, des connexions indirectes pourraient relayer sur des interneurons propriospinaux ascendants, capables de connecter directement les régions lombaires (L1-L6) et cervicales (C5-C8) en empruntant les funiculi ventrolatéraux (Reed, et coll. 2006). Enfin, les informations en provenance des afférences cervicales semblent être capables de se projeter sur les sorties motrices des régions lombaires comme en atteste la présence de potentiels post-synaptiques excitateurs sur les motoneurons de type fléchisseur (L2; figure 9D1). Si le rôle exact de ces événements synaptiques sur le fonctionnement des motoneurons lombaires reste une question ouverte, une telle action à distance des systèmes sensoriels a toutefois déjà été rapportée entre les afférences proprioceptives lombaires et les motoneurons phréniques respiratoires localisés dans les régions cervicales (Morin et Viala 2002).

Pour conclure, l'organisation asymétrique révélée dans cette étude n'est pas sans nous rappeler celle proposée précédemment (voir Chapitre I) concernant les influences propriospinales entre CPGs locomoteurs spinaux antérieurs et postérieurs. Compte tenu de l'existence de projections directes des afférences sensorielles lombaires sur les générateurs locomoteurs antérieurs, nous pouvons suggérer qu'une fois encore, les régions lombaires joueraient le rôle de "chef d'orchestre" dans le schéma d'organisation global de la locomotion quadrupède. Cette dominance pourrait ainsi refléter le rôle purement propulsif des membres postérieurs chez le rat alors que les membres antérieurs présentent une plus grande polyvalence (locomotion, préhension, toilettage).

DISCUSSION GENERALE

Dans ce manuscrit, nos données expérimentales ont été systématiquement discutées dans les différents chapitres de résultats. Au cours de cette Discussion Générale, les résultats principaux issus de ces études seront donc brièvement résumés et replacés dans un contexte plus large sur l'organisation des systèmes moteurs chez les Vertébrés supérieurs. Une attention particulière sera portée sur la présence de voies de connexion directes et indirectes et leur(s) rôle(s) potentiel(s) au sein de différents systèmes moteurs. Enfin, nous tenterons de lier ces données issues de l'expérimentation animale à une problématique plus appliquée centrée sur la rééducation post-traumatique suite à une lésion médullaire.

- LES PRINCIPAUX RESULTATS

Les résultats majeurs issus des quatre chapitres de résultats précédemment présentés sont résumés dans les quatre paragraphes suivants.

L'utilisation de la préparation réduite de moelle épinière de rat nouveau-né (âgé de 0 à 4 jours) isolée *in vitro* a montré que les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires pouvaient générer, lors d'une activation pharmacologique ou durant la stimulation électrique du tronc cérébral, une ***locomotion fictive dont le patron, semblable à de la marche***, est comparable à celui observé chez des animaux libres de leurs mouvements (âgés de 3 à 7 jours). Ce modèle semble donc bien adapté à l'étude des mécanismes cellulaires et synaptiques en charge de la mise en place des coordinations interappendiculaires chez les mammifères au cours de la locomotion. Ainsi, des expériences d'activation pharmacologique préférentielle de certaines régions spinales génératrices de rythmes montrent entre autres que les CPGs locomoteurs lombaires influencent l'activité de leurs homologues cervicaux grâce à l'existence de ***connexions asymétriques*** entre ces segments médullaires.

De plus, l'activation pharmacologique ou la modification de l'excitabilité des segments thoraciques montre l'implication de ***connexions ascendantes*** reposant à la fois sur la mise en jeu de ***fibres longues*** (plurisegmentaires) ***directes*** ainsi que de ***fibres plus courtes*** relayant au niveau de ces segments. Fonctionnellement, ces voies neuronales de communications assureraient le long des segments spinaux une ***propagation segmentaire*** de la commande motrice participant ainsi activement aux ***coordinations intersegmentaires et interappendiculaires*** lors de la locomotion fictive.

L'organisation temporelle de cette locomotion a été étudiée de la naissance à la seconde semaine post-natale en combinant des approches utilisant des préparations réduites *in vitro* et des enregistrements électromyographiques *in vivo* durant des épisodes de locomotion sur tapis roulant. Alors qu'au cours de la marche réelle, la vitesse locomotrice est modulée préférentiellement par une variation de la durée de la phase d'appui, durant la locomotion fictive, les variations de périodes sont étroitement corrélées à la fois à la durée des activités de types extenseur et fléchisseur. Ces données suggèrent un fonctionnement symétrique des hémigénérateurs spinaux de type extenseur ou fléchisseur.

Enfin, la mise en jeu des *afférences sensorielles* à bas seuil a été réalisée afin de déterminer l'influence de ces informations sur les coordinations intersegmentaires produites lors de séquences de locomotion fictive. Sur des préparations quiescentes, l'ensemble des afférences cervicales et lombaires module l'activité des CPGs locomoteurs spinaux antérieurs et postérieurs. Il existe donc une *organisation fonctionnelle asymétrique* entre les *voies* de projections *ascendantes* et *descendantes* activées par les afférences sensorielles (probablement proprioceptives), l'influence caudo-rostrale reposant sur des fibres directes et indirectes, l'influence rostro-caudale étant assurée par des voies indirectes relayant au niveau cervical.

- VOIES DIRECTES ET INDIRECTES : UNE REDONDANCE DES SYSTEMES MOTEURS ?

Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent la coexistence de voies directes (fibres longues) et indirectes (relais segmentaires) entre les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires (Juvénat, et coll. 2005). Le rôle joué par l'ensemble de ces voies de connexion est d'assurer les coordinations interappendiculaires lors des séquences locomotrices. De plus, de telles voies ont récemment été décrites sur le plan anatomique (Reed, et coll. 2006) et seraient également impliquées dans la propagation de la commande locomotrice (Cazalets 2005; Zaporozhets, et coll. 2006). La présence de ces différentes voies de communication au sein d'un même système moteur (rythmique) ne semble pas être une particularité de la fonction locomotrice. En effet, au cours de ces années doctorales, j'ai eu l'opportunité de travailler sur un autre système moteur, le système respiratoire, les données de cette étude n'ayant pas été présentées jusqu'alors dans ce manuscrit par souci d'homogénéité (les chapitres de Résultats étant centrés sur l'étude de la locomotion). Succinctement, le rythme respiratoire est généré chez les Vertébrés supérieurs par des CPGs localisés au niveau bulbo-pontique (noyau du "preBötzing" et complexe noyau rétrotrapézoïde/noyau parafacial) (pour revue voir

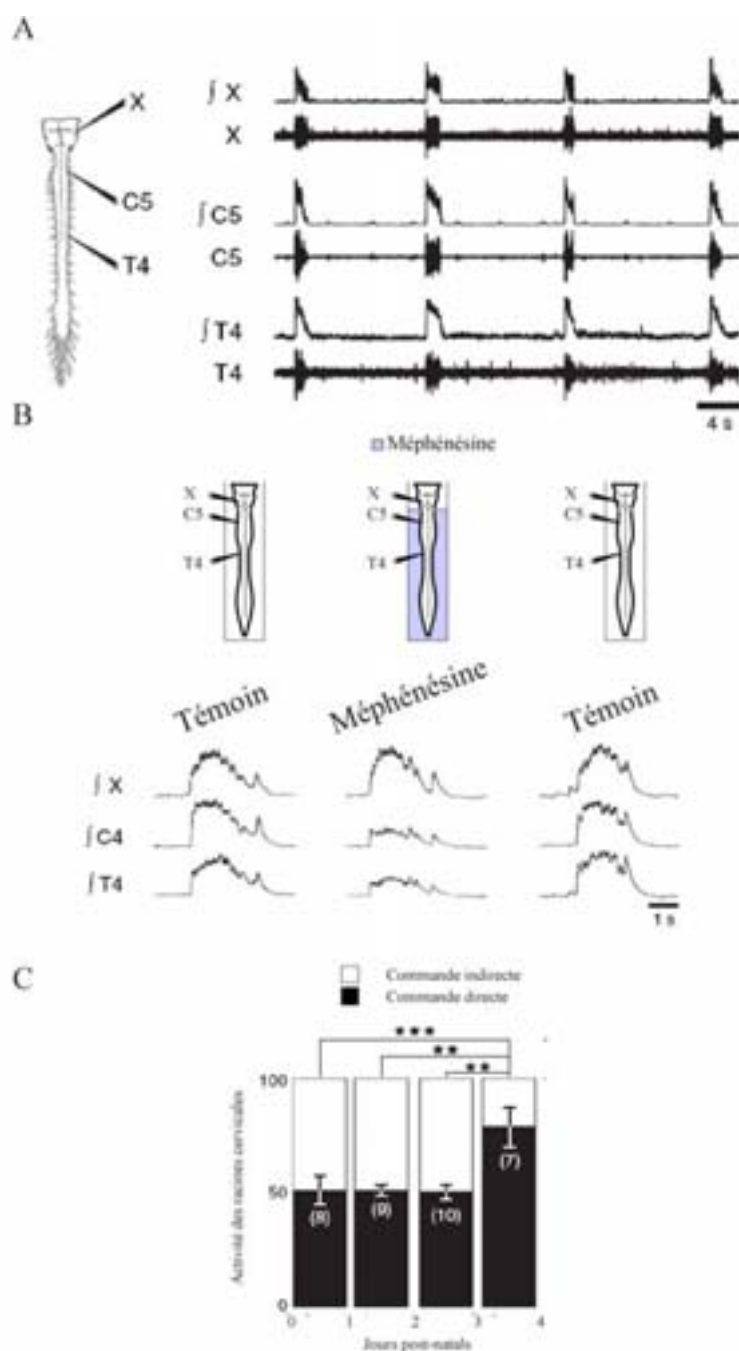


Figure 1 : Développement des voies de commandes respiratoires directes et indirectes au cours de la période post-natale.

(A) Enregistrements électrophysiologiques au niveau des racines motrices crâniennes (X), cervicales (C5) et thoraciques (T4) des activités respiratoires fictives générées par une préparation réduite de tronc cérébral – moelle épinière. (B) Schémas représentant la préparation utilisée (haut) et tracés intégrés des activités enregistrées sur les racines motrices crâniennes et spinales dans les conditions témoins (gauche et droite) et lors de la perfusion au niveau spinal d'un milieu bloquant la transmission polysynaptique (milieu, méphénésine). (C) Histogrammes représentant l'évolution relative de la commande polysynaptique (en noir) et monosynaptique (en blanc) descendantes en fonction de l'âge de l'animal.

Modifié d'après Juvin et Morin 2005.

(Feldman et Del Negro 2006), ces réseaux de neurones étant constitués de cellules présentant des propriétés d'oscillation endogène (cellule de type "pacemaker"). Chez l'animal adulte, des voies de projections monosynaptiques "directes" entre les neurones des CPGs et les motoneurons respiratoires spinaux ont été caractérisées à la fois anatomiquement (par des marquages antérogrades et rétrogrades) (Ellenberger et Feldman 1988; Yamada, et coll. 1988; Ellenberger, et coll. 1990) et fonctionnellement (en réalisant des analyses de cross-corrélation) (Duffin et van Alphen 1995). De plus, des collatérales d'axone de certains neurones bulbospinaux réalisent des contacts synaptiques au niveau des segments cervicaux les plus rostraux (Lipski, et coll. 1994), des interneurons propriospinaux se projetant alors à leur tour vers les motoneurons phréniques (Tian et Duffin 1996). Ainsi, parallèlement à la présence d'une voie directe bulbospinale, il existerait également une voie indirecte composée de relais spinaux impliqués dans la transmission de la commande respiratoire entre les CPGs bulbaire et les motoneurons spinaux. Dans un contexte de développement des systèmes moteurs, l'objectif principal de notre travail était de déterminer si une telle commande indirecte relayant au niveau spinal pouvait être caractérisée fonctionnellement *in vitro* durant la période post-natale chez le rat. Sur des préparations isolées de tronc cérébral-moelle épinière, des activités respiratoires générées spontanément sont enregistrées aux niveaux crânien et spinal (figure 1A). L'amplitude des activités respiratoires fictives cervicales (phréniques) et thoraciques (intercostales) est alors réduite lorsque la transmission polysynaptique est bloquée au niveau de ces segments (figure 1B), montrant qu'à ce stade de développement, les voies directes et indirectes entre les CPGs respiratoires et ces motoneurons coexistent. Il apparaît donc que les systèmes moteurs tels que ceux impliqués dans les fonctions respiratoire et locomotrice partagent une organisation similaire des voies de commandes descendantes composées de fibres directes et de relais segmentaires (figure 2) (Juvin et Morin 2005).

Cependant, le rôle exact de cette organisation en "double commande" n'est pas encore clairement établi. Dans la fonction respiratoire, ces voies directes et indirectes pourraient représenter un système de sécurité permettant de compenser un dysfonctionnement de l'un de ces deux éléments notamment au cours du développement. En effet, au cours de la période post-natale, les systèmes moteurs sont encore largement immatures, une défaillance pouvant avoir sur leur fonctionnement des conséquences dramatiques (arrêt respiratoire au cours du sommeil dans le cadre des pathologies de la mort subite du nourrisson). Cette immaturité, liée par exemple à la faible myélinisation des axones en provenance des centres respiratoires bulbaire, pourrait alors être compensée par la synergie fonctionnelle des voies directes et

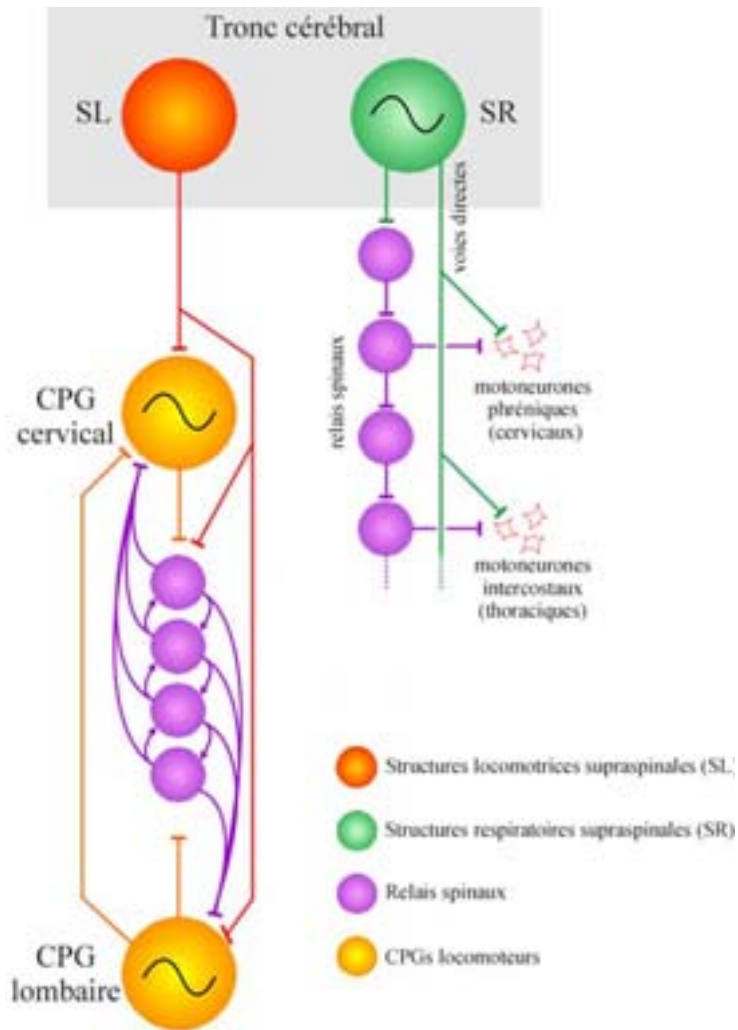


Figure 2 : Implication de voies spinales directes et indirectes dans la commande motrice.

Représentations schématiques de la commande descendante locomotrice (gauche) et respiratoire (droite) mettant en jeu à la fois des fibres longues directes et des relais spinaux.

Modifié d'après Juvin et coll. 2005 (gauche) et Juvin et Morin 2005 (droite).

indirectes. Ainsi, nos résultats montrent qu'au cours de la période post-natale, les voies mono- et polysynaptiques contribuent de manière égale à la transmission de la commande respiratoire (période de 0 à 3 jours, figure 1C). La maturation progressant, la voie directe semble alors jouer un rôle prédominant, sans pour autant que la commande polysynaptique ne disparaisse (période de 3 à 4 jours, figure 1C), puisque elle est même conservée chez l'animal adulte (Dobbins et Feldman 1994).

Bien que l'existence d'une double commande respiratoire mono- et polysynaptique sur un motoneurone donné ne soit pas encore démontrée, la présence de ces deux composantes au niveau de l'étage de sortie pourrait accroître la flexibilité fonctionnelle de ces neurones moteurs en jouant par exemple sur leur état d'excitabilité. En conséquence, ceci pourrait permettre l'expression de nombreux patrons moteurs associés à la respiration (par exemple toux et soupir). Dans certains cas, cette flexibilité fonctionnelle pourrait même entraîner la reconfiguration de l'activité motrice de groupes motoneuronaux particuliers. Prenons encore l'exemple des motoneurones respiratoires phréniques (innervant le diaphragme) et abdominaux (innervant les muscles de la ceinture abdominale) qui dans les conditions normales sont actifs en opposition de phase, respectivement durant l'inspiration et l'expiration (figure 3, eupnée). Au cours du vomissement, un rétropéristaltisme intestinal est déclenché grâce en particulier à la co-contraction du diaphragme et des muscles abdominaux. Ce passage d'une alternance à une synchronie d'activités motrices pourrait avoir comme origine à la fois une reconfiguration au niveau supra-spinal (commande centrale) mais également au niveau spinal en favorisant l'émergence fonctionnelle de voies ou de relais synaptiques normalement silencieux (figure 3, vomissement) (Grélot 1997). Ainsi, les relais thoraciques impliqués dans la propagation de la commande locomotrice et dans les coordinations interappendiculaires pourraient également participer au contrôle des différentes formes de couplages observés entre les membres antérieurs et postérieurs durant diverses allures locomotrices (marche, bond). De plus, ce phénomène de reconfiguration décrit pendant le vomissement n'est pas sans nous rappeler également la réorganisation des voies réflexes (mécanisme de "*reversal*") observée lors de la locomotion. Alors qu'au repos la mise en jeu des afférences primaires de type Ib issues d'un muscle extenseur entraîne sa mise au silence par inhibition disynaptique et favorise ainsi la flexion du membre, au cours de la locomotion, l'activation de ces mêmes afférences renforce l'extension du membre assurant alors la stabilité de l'animal (voir Introduction, figure 8).

Pour terminer, à l'instar des mécanismes cellulaires et synaptiques sous-tendant les programmes moteurs de la déglutition chez les mammifères, nous pouvons émettre

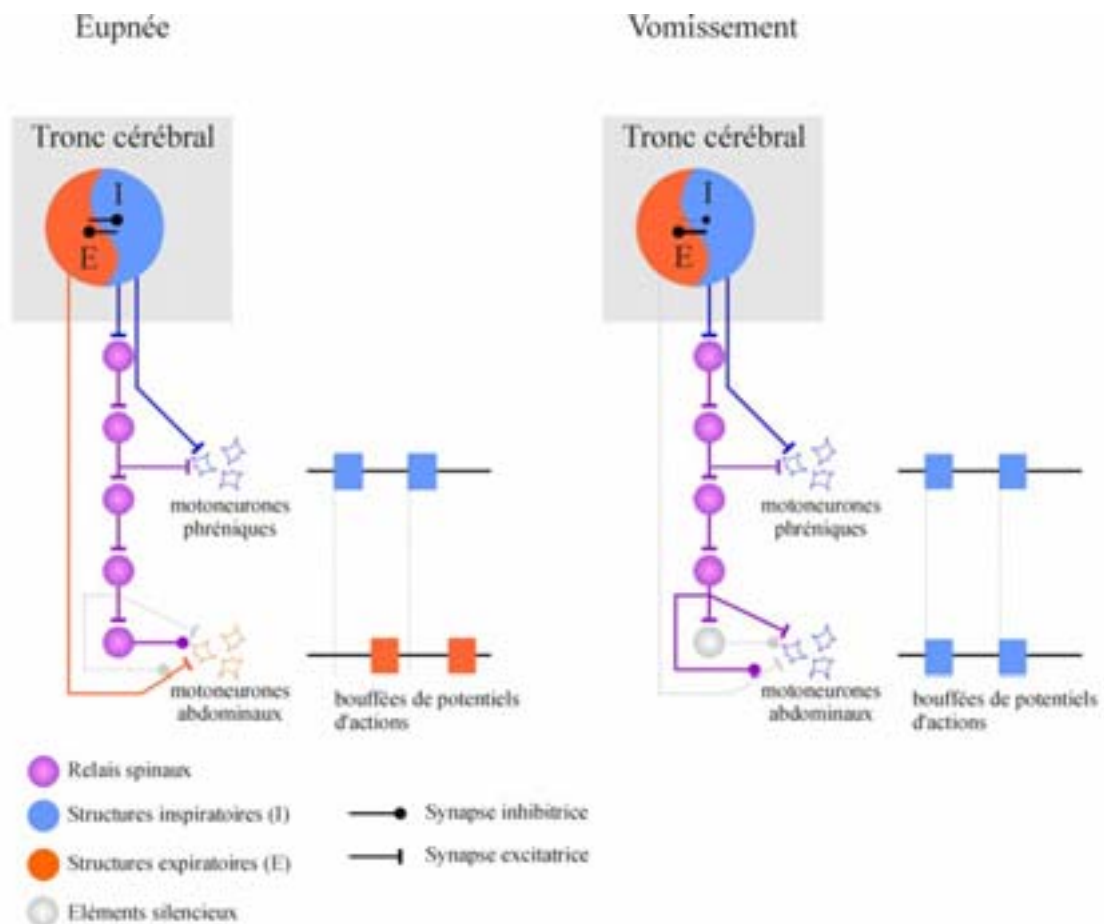


Figure 3 : Réorganisation de la voie indirecte de commande respiratoire : possible implication dans la genèse de différents patrons moteurs.

à gauche: Représentation schématique de la commande respiratoire caractérisée au cours de l'eupnée par une alternance entre les activités des motoneurones inspiratoires (phréniques) et expiratoires (abdominaux). *à droite:* La réorganisation des relais spinaux pourrait permettre de synchroniser les activités phréniques et abdominales afin d'exprimer un nouveau patron moteur (par exemple au cours du vomissement).

l'hypothèse selon laquelle les voies de commande indirecte favoriseraient la propagation segmentaire et séquentielle de la commande locomotrice. En effet, la déglutition est une activité motrice séquentielle permettant au bol alimentaire de transiter de la cavité buccale à l'estomac. Les différents muscles impliqués dans le stade buccopharyngé sont activés successivement suivit du stade oesophagien au cours duquel une contraction péristaltique orale-aborale de l'œsophage est observée (Jean 2001). Au niveau central, la déglutition est déclenchée soit de manière réflexe par la mise en jeu des afférences périphériques, soit de manière volontaire. Dans tous les cas, les CPGs déglutiteurs, localisés au niveau bulbaire (noyau du tractus solitaire et région bulbaire ventrolatérale), activent de manière séquentielle (et parfois même rythmique) différents noyaux moteurs impliqués dans la contraction de plus d'une vingtaine de muscles (figure 4). De façon similaire, une propagation métachronale caudo-rostrale de la commande locomotrice est observée *in vitro* (Falgairolle et Cazalets 2006), le délai de propagation de cette séquence pouvant alors être assuré par les connexions courtes présentes au sein des relais thoraciques. Dans ces conditions, doit-on considérer les relais thoraciques comme de simples éléments de connectique au sein du réseau ou comme des lieux d'intégration permettant une propagation adaptée de la commande motrice? Si à ce stade la réponse ne peut être que très hypothétique, nous pouvons cependant suggérer que cette activation en série des relais thoraciques permettrait plus facilement de réorganiser ou de reconfigurer localement la propagation de la commande motrice sans pour autant devoir agir sur l'ensemble du réseau locomoteur.

En conclusion, même si des convergences d'organisation et fonctionnelles existent entre ces systèmes moteurs (locomoteur, respiratoire, déglutiteur), il est difficile de les considérer comme des systèmes complètement identiques. En effet, si les CPGs respiratoires et déglutiteurs mettent en jeu des neurones possédant des propriétés de type "*pacemaker*", l'organisation des CPGs locomoteurs semble être basée sur des propriétés de connexions entre les différents éléments de ce réseau. De plus, contrairement à la fonction respiratoire, les rythmes locomoteurs ainsi que les activités de déglutition ne sont pas initiés spontanément mais mettent en jeu des générateurs qualifiés de "CPGs conditionnels" (activés par des informations descendantes ou réflexes). Enfin, alors que des activités motrices alternées sont la règle au cours de la respiration (inspiration *versus* expiration) et de la locomotion (flexion *versus* extension), la déglutition est essentiellement basée sur l'activation séquentielle non alternée de la musculature bucco-pharyngo-oesophagienne.

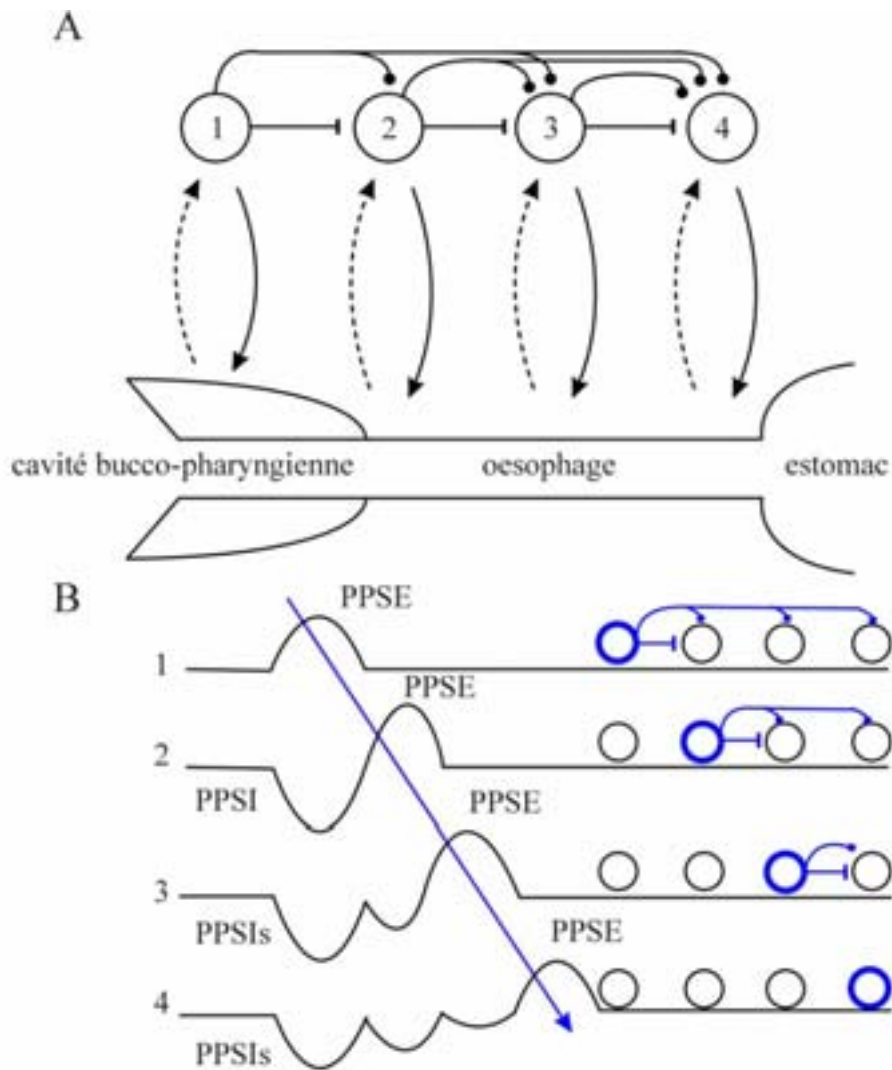


Figure 4 : Représentation schématique du réseau de déglutition.

(A) Ce réseau de neurones est constitué de neurones bulbaires (ici 1 à 4) contrôlant les différents étages bucco-pharyngo-oesophagiens. (B) Activés soit par les afférences périphériques soit volontairement, les neurones situés au début de la chaîne (1) inhibent les cellules plus caudales (2-4) et excitent les cellules adjacentes (2). Cette balance synaptique associée à l'activation de conductances particulières (par exemple courant IA) permet une activation séquentielle (flèches bleues) des différents groupes de neurones, assurant ainsi la genèse du péristaltisme.

Modifié d'après Jean 2001.

- LESIONS SPINALES : DE L'EXPERIMENTATION ANIMALE AUX ESSAIS CLINIQUES

Il y a 4500 ans, les médecins Egyptiens qui possédaient déjà une certaine connaissance des traumatismes spinaux causés par des accidents ou lors de combats en faisaient la description suivante : *"si vous examinez un homme avec une luxation d'une vertèbre de son cou, que vous le trouvez incapable de bouger ses bras et ses jambes et que de l'urine coule de son pénis involontairement, alors vous devez dire : une maladie incurable."*

De nos jours, *"en France, on dénombre plus de 50 000 tétra ou paraplégiques. Chaque année, plus de 2000 personnes perdent l'usage de leurs membres et 60 % des victimes d'une lésion de la moelle épinière ont moins de 30 ans"*⁵. Dans la majorité des situations, bien que la lésion soit partielle, elle est suivie d'une diminution des fonctions motrices et de la sensibilité caudales à la lésion spinale. Dans le cas où celle-ci est située dans les régions cervicales, on observe une réduction voire une disparition de la mobilité des membres inférieurs et supérieurs (tétraplégie), l'autonomie respiratoire pouvant également être plus ou moins affectée. Dans le cas de lésions thoraciques, seuls les membres supérieurs conservent leur mobilité (paraplégie), mais il est important de noter qu'un traumatisme médullaire affecte également un ensemble important de fonctions telles que la respiration (et les réflexes qui lui sont associés), la miction, les fonctions génitales et entraîne souvent des atteintes moins visibles mais tout aussi handicapantes liées au domaine de la psychologie.

Le développement de modèles animaux d'une pathologie est une étape indispensable dans la mise en place de thérapies. Suite à un traumatisme de la moelle épinière, une partie plus ou moins importante des axones ascendants et descendants est sectionnée. Ces neurones, ne parvenant pas à franchir le site lésionnel, ne peuvent donc pas rétablir leurs connexions synaptiques. De nombreux mécanismes sont impliqués dans cette inhibition de la régénération axonale au sein de la moelle épinière et afin de pouvoir un jour restaurer la locomotion, il apparaît donc nécessaire de combiner la régénération des fibres axonales au sein du système nerveux lésé avec le rétablissement de l'excitabilité des régions spinales sous-lésionnelles. Enfin, il semble également important de "profiter" de la plasticité innée des réseaux de neurones de la moelle épinière afin reconnecter les différents étages spinaux (Blight 2004).

Dans le cadre des recherches visant à promouvoir la régénération axonale suite à un traumatisme médullaire, l'approche expérimentale est confrontée à la présence d'une barrière cicatricielle se formant au niveau de la lésion et bloquant physiquement toute repousse

⁵ source : <http://alarme.asso.fr>

axonale. Le développement de cette barrière semble néanmoins pouvoir être retardée par l'injection d'un chélateur du fer (qui inhibe la synthèse de collagène) (Klapka, et coll. 2005), ce délai permettant alors aux fibres cortico-spinales de régénérer au-delà du site de la lésion et de restaurer une locomotion chez les animaux traités. Cependant, dans le système nerveux mature, de nombreuses molécules bloquent la régénération axonale au niveau du site de lésion en inhibant la formation du cône de croissance. Une approche complémentaire à la précédente consiste donc à lever l'inhibition exercée par certaines de ces molécules telles que les chondroïtine-sulfate protéoglycanes ou encore Nogo, molécule synthétisée par la myéline du système nerveux central (Chen, et coll. 2000; Dergham, et coll. 2002; Fournier, et coll. 2003; Schwab 2004). L'une des principales limites dans la régénération axonale est donc liée à la nature même du système nerveux adulte, substrat favorisant peu, voire inhibant fortement toute forme de régénération. Cet état de fait peut cependant être partiellement inversé par l'injection de facteurs neurotrophiques (par exemple "neurotrophin-3"), ces molécules favorisant non seulement la croissance axonale durant le développement, mais facilitant également le franchissement du site lésionnel (Schnell, et coll. 1994). Enfin, la greffe de cellules apparaît également à l'heure actuelle comme l'une des techniques les plus prometteuses dans la restauration de la fonction locomotrice. En effet, la greffe de cellules de Schwann ou de cellules engainantes olfactives permet là encore une régénération nerveuse au-delà de la lésion ainsi qu'une restauration de la motricité des animaux (Li, et coll. 1997; Fouad, et coll. 2005).

Si la régénération est fortement réduite dans le système nerveux adulte, elle est au contraire exacerbée au cours du développement (notamment aux stades embryonnaires). Des greffes de cellules souches embryonnaires au niveau du site de lésion permettent donc chez des rats lésés de restaurer un milieu permissif à la régénération et favorisent la récupération de la fonction locomotrice (McDonald, et coll. 1999; McDonald, et coll. 2004). En effet, ces cellules se différencient en neurones et cellules gliales au niveau du site lésionnel, permettant d'une part de compenser en partie la perte de tissu liée au traumatisme et d'autre part de créer une zone favorable à la régénération axonale. Cependant, si les voies descendantes ne peuvent pas être totalement restaurées, une méthode complémentaire visant à augmenter l'excitabilité des CPGs favorisera non seulement la récupération d'une posture de l'animal, mais permettra également d'augmenter la sensibilité de ces réseaux de neurones à la commande descendante. Dans ce sens, la greffe de cellules embryonnaires en provenance des noyaux raphé (cellules sérotoninergiques) à proximité des CPGs locomoteurs lombaires (caudalement au site de la

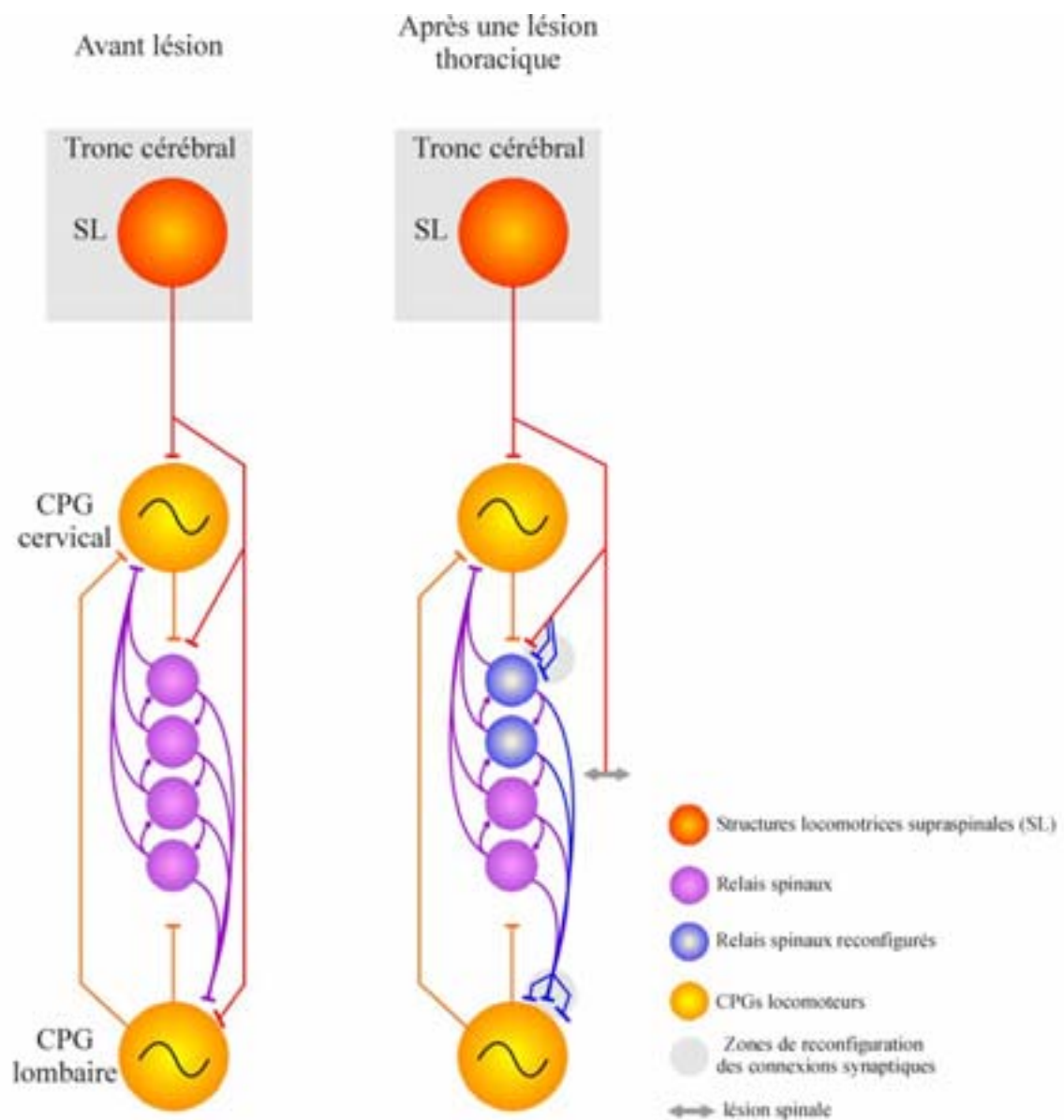


Figure 5 : Réorganisation des voies spinales suite à une lésion partielle.

Représentations schématiques de la commande locomotrice lorsque la moelle épinière est intacte (gauche) et suite à une lésion spinale thoracique (droite).

Modifié d'après Jurvin et coll. 2005 (gauche) et Blight 2004 (droite).

lésion) a permis en quelques mois la restauration d'une capacité locomotrice chez des rats paraplégiques (Yakovleff, et coll. 1995).

Agir sur l'excitabilité des CPGs peut également s'envisager par la mise en jeu des afférences sensorielles. Ainsi, diverses études combinent l'entraînement des animaux sur tapis roulant à des traitements pharmacologiques au long cours (notamment des agonistes sérotoninergiques pour le rat et noradrénergiques pour le chat) (Rossignol, et coll. 2001; Orsal, et coll. 2002; Antri, et coll. 2005; Li, et coll. 2006). Ce type d'approche est particulièrement intéressant lors de lésions spinales partielles laissant intactes une partie des fibres nerveuses descendantes. En effet, nos résultats ont montré que la mise en jeu des afférences sensorielles en provenance des membres antérieurs pouvait activer et entraîner à la fois les CPGs locomoteurs cervicaux et lombaires (Résultats, chapitre IV). Dans le cas de lésions spinales partielles pour lesquelles les voies impliquées dans les interactions entre les CPGs antérieurs et postérieurs seraient épargnées, on peut alors supposer que la mise en jeu régulière des afférences de l'ensemble des membres puisse participer à restaurer une excitabilité sous-lésionnelle. Ainsi, peut-être serait-il intéressant d'étudier l'effet de l'entraînement des membres antérieurs seuls ou en combinaison avec celui des membres postérieurs sur la restauration de la fonction locomotrice.

Enfin, une lésion spinale n'est pas sans conséquence sur l'organisation synaptique des réseaux neuronaux sous-lésionnels et une reconfiguration spontanée des connexions interneuronales est rapportée. Lorsqu'une voie motrice est interrompue (par exemple une voie directe telle que la voie cortico-spinale), des voies parallèles polysynaptiques seront utilisées. En favorisant la pousse de collatérales d'axone ("*collateral sprouting*") de neurones propriospinaux, le rôle de ces voies parallèles est alors d'amplifier la commande locomotrice descendante vers les régions lombaires (figure 5) (Bareyre, et coll. 2004). Certaines molécules connues pour inhiber la régénération axonale (par exemple Nogo) semblent également fortement diminuer la plasticité naturelle de la moelle épinière à reconfigurer ses réseaux de neurones (Blight 2004). Bloquer ces inhibiteurs de croissance semble donc être capital pour favoriser à la fois la repousse axonale et la reconfiguration des neurones propriospinaux, compte tenu du rôle potentiel que joueraient ces neurones dans les couplages interpendiculaires lors de la locomotion (voir Résultats, chapitre II).

Les recherches fondamentales ont déjà permis des transferts de stratégies de réhabilitation vers les patients atteints de lésions partielles de la moelle épinière. Par exemple, des mouvements rythmiques alternés de flexion et d'extension des membres peuvent être

déclenchés par la stimulation électrique tonique épidurale de la moelle épinière lombaire chez des patients tétraplégiques, suggérant une activation de CPGs locomoteurs au niveau de ces régions (Dimitrijevic, et coll. 1998; Minassian, et coll. 2004). Des approches et des résultats tout à fait similaires ont été obtenus chez le rat paraplégique (Ichiyama, et coll. 2005). D'autre part, l'entraînement sur tapis roulant (avec compensation partielle de charge) favorise la mise en jeu des afférences sensorielles des membres inférieurs et permet une réactivation partielle des structures locomotrices sous lésionnelles chez les patients spino-lésés (Wernig et Muller 1992). Cette stratégie thérapeutique est directement issue des études menées chez le chat spino-lésé entraîné à marcher sur tapis roulant (Lovely, et coll. 1986; Barbeau et Rossignol 1987).

A l'heure actuelle, même s'il est peu vraisemblable qu'une régénération totale des fibres cortico-spinales soit possible chez l'homme, des régénérations partielles couplées à une réorganisation des voies de commande peut cependant permettre de réactiver un CPG quiescent. Cela suggère la prise en compte de toutes les voies de communications (ou de couplages) entre les différents étages spinaux puisqu'il semble que des voies directes et indirectes (relais thoraciques) soient impliquées dans l'organisation globale des activités locomotrices. Même si l'implication de tels relais spinaux n'a pas été démontrée chez l'homme, on observe tout comme chez le rat et le chat une activité rythmique de la musculature du tronc au cours de la marche, coordonnée avec les activités des membres (Thorstensson, et coll. 1982). De plus, il a été montré chez des patients para ou tétraplégiques que la "qualité" de l'activité locomotrice présentée lors d'une marche assistée (support de poids partiel) sur tapis roulant est dépendante du niveau de la lésion spinale. Plus cette dernière est caudale (segments thoraciques bas), plus l'amplitude des électromyogrammes est réduite et plus le patron locomoteur est désorganisé (Dietz, et coll. 1999). Les auteurs suggèrent alors que la genèse d'une activité locomotrice bipède nécessiterait la participation de nombreux étages spinaux distribués le long de la moelle épinière, hypothèse renforcée par nos résultats et ceux rapportés récemment (Cazalets 2005; Falgairolle et Cazalets 2006) sur le rôle joué dans la locomotion par les différents segments spinaux et en particulier par les régions thoraciques.

Issue des données expérimentales sur les greffes de cellules, une autre approche thérapeutique plus invasive consiste à injecter dans la moelle épinière des patients lésés des cellules engainantes olfactives prélevées chez le patient (autogreffe). Cette technique présente l'immense avantage de supprimer toute forme de rejet. Quelques équipes tentent grâce à ces approches de restaurer en partie la sensibilité et la motricité de patients spino-lésés (MacKay-Sim, Université de Riffith, Brisbane, Australie). Cependant, la majorité des études cliniques

étant toujours en phase 1 (pré-clinique), les résultats de ce type d'approche ne sont donc pour l'instant pas connus.

Enfin, il est également possible d'assister la locomotion du patient par l'utilisation d'automate (le "Lokomat") contrôlant plus finement les mouvements effectués par l'individu (Dietz, et coll. 2002; Wirz, et coll. 2005). De plus, la combinaison d'un entraînement sur tapis roulant et d'un traitement pharmacologique révèle que le patient présente durant la séance de marche assistée une locomotion plus rapide (Norman, et coll. 1998; Barbeau et Norman 2003), ce type d'approches combinées et non-invasives offrant l'avantage de réduire au minimum toute intervention chirurgicale ou manipulation directe de la moelle épinière.

BIBLIOGRAPHIE

- Abourachid, A. (2003). "A new way of analysing symmetrical and asymmetrical gaits in quadrupeds." *C R Biol* 326: 625-30.
- Akay, T., Acharya, H. J., Fouad, K. et Pearson, K. G. (2006). "Behavioral and electromyographic characterization of mice lacking EphA4 receptors." *J Neurophysiol* 96: 642-51.
- Alvarez, F. J., Jonas, P. C., Sapir, T., Hartley, R., Berrocal, M. C., Geiman, E. J., Todd, A. J. et Goulding, M. (2005). "Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons." *J Comp Neurol* 493: 177-92.
- Andersson, O., Forssberg, H., Grillner, S. et Wallen, P. (1981). "Peripheral feedback mechanisms acting on the central pattern generators for locomotion in fish and cat." *Can J Physiol Pharmacol* 59: 713-26.
- Angel, M. J., Jankowska, E. et McCrea, D. A. (2005). "Candidate interneurons mediating group I disynaptic EPSPs in extensor motoneurons during fictive locomotion in the cat." *J Physiol* 47: 597-610.
- Antri, M., Barthe, J. Y., Mouffle, C. et Orsal, D. (2005). "Long-lasting recovery of locomotor function in chronic spinal rat following chronic combined pharmacological stimulation of serotonergic receptors with 8-OHDPAT and quipazine." *Neurosci Lett* 94: 162-7.
- Antri, M., Orsal, D. et Barthe, J. Y. (2002). "Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT₂ agonist." *Eur J Neurosci* 16: 467-76.
- Arshavsky, Y., Berkinblit, MB. (1972). "Activity of the neurones of the dorsal spinocerebellar tract during locomotion." *Biophysics* 17: 506-514.
- Arshavsky, Y. I., Deliagina, T. G. et Orlovsky, G. N. (1997). "Pattern generation." *Curr Opin Neurobiol* 7: 781-9.
- Baker, L. L., Chandler, S. H. et Goldberg, L. J. (1984). "L-dopa-induced locomotor-like activity in ankle flexor and extensor nerves of chronic and acute spinal cats." *Exp Neurol* 86: 515-26.
- Ballion, B., Morin, D. et Viala, D. (2001). "Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat." *Eur J Neurosci* 14: 1727-38.
- Barbeau, H. et Norman, K. E. (2003). "The effect of noradrenergic drugs on the recovery of walking after spinal cord injury." *Spinal Cord* 41: 137-43.
- Barbeau, H. et Rossignol, S. (1987). "Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat." *Brain Res* 412: 84-95.
- Bareyre, F. M., Kerschensteiner, M., Raineteau, O., Mettenleiter, T. C., Weinmann, O. et Schwab, M. E. (2004). "The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats." *Nat Neurosci* 7: 269-77.

- Barriere, G., Mellen, N. et Cazalets, J. R. (2004). "Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat." *Eur J Neurosci* 19: 1325-35.
- Barthe, J. Y. et Clarac, F. (1997). "Modulation of the spinal network for locomotion by substance P in the neonatal rat." *Exp Brain Res* 115: 485-92.
- Barthelemy, D., Leblond, H., Provencher, J. et Rossignol, S. (2006). "Non-locomotor and locomotor hindlimb responses evoked by electrical microstimulation of the lumbar cord in spinalized cats." *J Neurophysiol*.
- Birinyi, A., Viszokay, K., Weber, I., Kiehn, O. et Antal, M. (2003). "Synaptic targets of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats." *J Comp Neurol* 461: 429-40.
- Bjursten, L. M., NorrSELL, K. et NorrSELL, U. (1976). "Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy." *Exp Brain Res* 25: 115-30.
- Blight, A. R. (2004). "Just one word: plasticity." *Nat Neurosci* 7: 206-8.
- Bonnot, A., Corio, M., Bouc, A. M. et Viala, D. (1998). "Hemisegmental localisation of rhythmic networks in the lumbosacral spinal cord of neonate mouse." *J Physiol Paris* 793: 136-48.
- Bonnot, A., Whelan, P. J., Mentis, G. Z. et O'Donovan, M. J. (2002). "Locomotor-like activity generated by the neonatal mouse spinal cord." *Brain Res Brain Res Rev* 40: 141-51.
- Bouyer, L. J. et Rossignol, S. (2003). "Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion. I. Intact cats." *J Neurophysiol* 90: 3625-39.
- Bracci, E., Ballerini, L. et Nistri, A. (1996). "Localization of rhythmogenic networks responsible for spontaneous bursts induced by strychnine and bicuculline in the rat isolated spinal cord." *J Neurosci* 16: 7063-76.
- Bracci, E., Ballerini, L. et Nistri, A. (1996). "Spontaneous rhythmic bursts induced by pharmacological block of inhibition in lumbar motoneurons of the neonatal rat spinal cord." *J Neurophysiol* 75: 640-7.
- Bracci, E., Beato, M. et Nistri, A. (1997). "Afferent inputs modulate the activity of a rhythmic burst generator in the rat disinhibited spinal cord in vitro." *J Neurophysiol* 77: 3157-67.
- Branchereau, P., Morin, D., Bonnot, A., Ballion, B., Chapron, J. et Viala, D. (2000). "Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse." *Brain Res Bull* 53: 711-8.
- Broduehrer, P. D., Debski, E. A., O'Gara, B. A. et Friesen, W. O. (1995). "Neuronal control of leech swimming." *J Neurobiol* 27: 403-18.

- Brown, T. (1911). "The intrinsic factors in the act of progression in the mammal." *Proc R Soc Lond Ser B* 84: 308-319.
- Brown, T. (1912). "The factors in rhythmic activity of the nervous systems." *Proc R Soc Lond Ser B* 85: 278-289.
- Buchanan, J. T. (2001). "Contributions of identifiable neurons and neuron classes to lamprey vertebrate neurobiology." *Prog Neurobiol* 63(4): 441-66.
- Butt, S. J. et Kiehn, O. (2003). "Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals." *Neuron* 38: 953-63.
- Butt, S. J., Leuret, J. M. et Kiehn, O. (2002). "Organization of left-right coordination in the mammalian locomotor network." *Brain Res Brain Res Rev* 40: 107-17.
- Butt, S. J., Lundfald, L. et Kiehn, O. (2005). "EphA4 defines a class of excitatory locomotor-related interneurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14098-103.
- Cabelguen, J. M., Bourcier-Lucas, C. et Dubuc, R. (2003). "Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the salamander *Notophthalmus viridescens*." *J Neurosci* 23: 2434-9.
- Cang, J. et Friesen, W. O. (2000). "Sensory modification of leech swimming: rhythmic activity of ventral stretch receptors can change intersegmental phase relationships." *J Neurosci* 20: 7822-9.
- Cangiano, L. et Grillner, S. (2005). "Mechanisms of rhythm generation in a spinal locomotor network deprived of crossed connections: the lamprey hemicord." *J Neurosci* 25: 923-35.
- Carlin, K. P., Dai, Y. et Jordan, L. M. (2006). "Cholinergic and serotonergic excitation of ascending commissural neurons in the thoraco-lumbar spinal cord of the neonatal mouse." *J Neurophysiol* 95(2): 1278-84.
- Cavallari, P., Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987). "Post-synaptic actions of midlumbar interneurons on motoneurons of hind-limb muscles in the cat." *J Physiol* 389: 675-89.
- Cazalets, J. R. (2005). "Metachronal propagation of motoneurone burst activation in isolated spinal cord of newborn rat." *J Physiol* 568: 583-97.
- Cazalets, J. R. et Bertrand, S. (2000). "Ubiquity of motor networks in the spinal cord of vertebrates." *Brain Res Bull* 53: 627-34.
- Cazalets, J. R., Borde, M. et Clarac, F. (1995). "Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat." *J Neurosci* 15: 4943-51.

- Cazalets, J. R., Grillner, P., Menard, I., Cremieux, J. et Clarac, F. (1990). "Two types of motor rhythm induced by NMDA and amines in an in vitro spinal cord preparation of neonatal rat." *Neurosci Lett* 111: 116-21.
- Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y. et Clarac, F. (1992). "Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat." *J Physiol* 455: 187-204.
- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F. et Schwab, M. E. (2000). "Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1." *Nature* 403: 434-9.
- Chevallier, S., Landry, M., Nagy, F. et Cabelguen, J. M. (2004). "Recovery of bimodal locomotion in the spinal-transected salamander, *Pleurodeles waltlii*." *Eur J Neurosci* 20: 1995-2007.
- Clarac, F., Brocard, F. et Vinay, L. (2004). "The maturation of locomotor networks." *Prog Brain Res* 143: 57-66.
- Combes, D., Merrywest, S. D., Simmers, J. et Sillar, K. T. (2004). "Developmental segregation of spinal networks driving axial- and hindlimb-based locomotion in metamorphosing *Xenopus laevis*." *J Physiol* 559: 17-24.
- Conway, B. A., Hultborn, H. et Kiehn, O. (1987). "Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat." *Exp Brain Res* 68: 643-56.
- Coonan, J. R., Greferath, U., Messenger, J., Hartley, L., Murphy, M., Boyd, A. W., Dottori, M., Galea, M. P. et Bartlett, P. F. (2001). "Development and reorganization of corticospinal projections in EphA4 deficient mice." *J Comp Neurol* 436: 248-62.
- Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (1994). "A comparison of motor patterns induced by N-methyl-D-aspartate, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord." *Neurosci Lett* 171: 147-50.
- Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (1994). "Some limitations of ventral root recordings for monitoring locomotion in the in vitro neonatal rat spinal cord preparation." *Neurosci Lett* 171: 142-6.
- Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (1997). "Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord." *J Neurophysiol* 77: 247-59.
- Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N. et Pavlova, G. A. (1983). "The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat." *Exp Brain Res* 53: 81-90.
- Delvolve, I., Bem, T. et Cabelguen, J. M. (1997). "Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*." *J Neurophysiol* 78: 638-50.

- Dergham, P., Ellezam, B., Essagian, C., Avedissian, H., Lubell, W. D. et McKerracher, L. (2002). "Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair." *J Neurosci* 22: 6570-7.
- Dietz, V. (2002). "Proprioception and locomotor disorders." *Nat Rev Neurosci* 3: 781-90.
- Dietz, V., Muller, R. et Colombo, G. (2002). "Locomotor activity in spinal man: significance of afferent input from joint and load receptors." *Brain* 125: 2626-34.
- Dietz, V., Nakazawa, K., Wirz, M. et Erni, T. (1999). "Level of spinal cord lesion determines locomotor activity in spinal man." *Exp Brain Res* 128: 405-9.
- Dimitrijevic, M. R., Gerasimenko, Y. et Pinter, M. M. (1998). "Evidence for a spinal central pattern generator in humans." *Ann N Y Acad Sci* 860: 360-76.
- Dobbins, E. G. et Feldman, J. L. (1994). "Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat." *J Comp Neurol* 347: 64-86.
- Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P. F., Murphy, M., Kontgen, F. et Boyd, A. W. (1998). "EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13248-53.
- Duffin, J. et van Alphen, J. (1995). "Bilateral connections from ventral group inspiratory neurons to phrenic motoneurons in the rat determined by cross-correlation." *Brain Res* 694: 55-60.
- Duysens, J. et Pearson, K. G. (1980). "Inhibition of flexor burst generation by loading ankle extensor muscles in walking cats." *Brain Res* 187: 321-32.
- Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987). "Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord." *J Physiol* 385: 393-413.
- Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987). "An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord." *J Physiol* 389: 647-74.
- Eide, A. L., Glover, J., Kjaerulff, O. et Kiehn, O. (1999). "Characterization of commissural interneurons in the lumbar region of the neonatal rat spinal cord." *J Comp Neurol* 403: 332-45.
- Ellenberger, H. H. et Feldman, J. L. (1988). "Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats." *J Comp Neurol* 269: 47-57.
- Ellenberger, H. H., Feldman, J. L. et Goshgarian, H. G. (1990). "Ventral respiratory group projections to phrenic motoneurons: electron microscopic evidence for monosynaptic connections." *J Comp Neurol* 302: 707-14.

- Engberg, I. et Lundberg, A. (1969). "An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion." *Acta Physiol Scand* 75: 614-30.
- English, A. (1979). "Interlimb coordination during stepping in the cat: an electromyographic analysis." *J Neurophysiol* 42: 638-650.
- English, A. (1989). "Interlimb coordination during locomotion." *Am Zool*(29): 255-266.
- English, A., Tigges, J., et Lennard, P.R. (1985). "Anatomical organization of long ascending propriospinal neurons in the cat spinal cord." *J Comp Neurol* 240: 349 -358.
- Fady, J. C., Jamon, M. et Clarac, F. (1998). "Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat." *Brain Res Dev Brain Res* 108(1-2): 111-23.
- Falgairolle, M. e. C., J.R. (2006). "Metachronal coupling between spinal neuronal networks during locomotor activity in the newborn rat." *J Physiol sous-presse*.
- Feldman, J. L. et Del Negro, C. A. (2006). "Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm." *Nat Rev Neurosci* 7: 232-42.
- Fleshman, J. W., Lev-Tov, A. et Burke, R. E. (1984). "Peripheral and central control of flexor digitorum longus and flexor hallucis longus motoneurons: the synaptic basis of functional diversity." *Exp Brain Res* 54: 133-49.
- Forsberg, H., Grillner, S., Halbertsma, J. et Rossignol, S. (1980). "The locomotion of the low spinal cat. II. Interlimb coordination." *Acta Physiol Scand* 108: 283-95.
- Fouad, K., Schnell, L., Bunge, M. B., Schwab, M. E., Liebscher, T. et Pearse, D. D. (2005). "Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord." *J Neurosci* 20: 1169-78.
- Fournier, A. E., Takizawa, B. T. et Strittmatter, S. M. (2003). "Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS." *J Neurosci* 23: 1416-23.
- Friesen, W. O. et Hocker, C. G. (2001). "Functional analyses of the leech swim oscillator." *J Neurophysiol* 86: 824-35.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R. D., Conrad, C., Mosley, D. et Campbell, C. (1986). "Projections of the mesencephalic locomotor region in the rat." *Brain Res Bull* 17: 33-40.
- Gordon, I. T. et Whelan, P. J. (2006). "Monoaminergic control of cauda equina evoked locomotion in the neonatal mouse spinal cord." *J Neurophysiol*.
- Gosgnach, S., Lanuza, G. M., Butt, S. J., Saueressig, H., Zhang, Y., Velasquez, T., Riethmacher, D., Callaway, E. M., Kiehn, O. et Goulding, M. (2006). "V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs." *Nature* 440: 215-9.

- Goslow, G. E., Jr., Reinking, R. M. et Stuart, D. G. (1973). "The cat step cycle: hind limb joint angles and muscle lengths during unrestrained locomotion." *J Morphol* 141: 1-41.
- Gossard, J. P., Brownstone, R. M., Barajon, I. et Hultborn, H. (1994). "Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat." *Exp Brain Res* 98: 213-28.
- Goulding, M. et Pfaff, S. L. (2005). "Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates." *Curr Opin Neurobiol* 15: 14-20.
- Gramsbergen, A., Geisler, H. C., Taekema, H. et van Eykern, L. A. (1999). "The activation of back muscles during locomotion in the developing rat." *Brain Res Dev Brain Res* 112: 217-28.
- Grélot, L. (1997). "Physiopathologie du réflexe émétique." Habilitation à Diriger des Recherches Université d'Aix-Marseille 3.
- Grillner, S. (1981). "Control of locomotion in bipeds, tetrapods and fish." *Handbook of Physiology. The nervous system II* New York: 515-536.
- Grillner, S. (1985). "Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates." *Science* 228: 143-9.
- Grillner, S. (2003). "The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks." *Nat Rev Neurosci* 4: 573-86.
- Grillner, S. et Dubuc, R. (1988). "Control of locomotion in vertebrates: spinal and supraspinal mechanisms." *Adv Neurol* 47: 425-53.
- Grillner, S., Matshushima, T., Wadden, T., Tegner, J., El Manira, A., et Wallen, P. (1993). "The neurophysiological bases of undulatory locomotion in vertebrates." *Semin. Neurosci* 5: 17-27.
- Grillner, S., McClellan, A., Sigvardt, K., Wallen, P. et Wilen, M. (1981). "Activation of NMDA-receptors elicits "fictive locomotion" in lamprey spinal cord in vitro." *Acta Physiol Scand* 113: 549-51.
- Grillner, S. et Rossignol, S. (1978). "On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats." *Brain Res* 146: 269-77.
- Grillner, S., Wallen, P., Brodin, L. et Lansner, A. (1991). "Neuronal network generating locomotor behavior in lamprey: circuitry, transmitters, membrane properties, and simulation." *Annu Rev Neurosci* 14: 169-99.
- Grillner, S. et Zangger, P. (1979). "On the central generation of locomotion in the low spinal cat." *Exp Brain Res* 34: 241-61.

- Grillner, S. et Zangger, P. (1984). "The effect of dorsal root transection on the efferent motor pattern in the cat's hindlimb during locomotion." *Acta Physiol Scand* 120: 393-405.
- Guertin, P., Angel, M. J., Perreault, M. C. et McCrea, D. A. (1995). "Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat." *J Physiol* 487 (Pt 1): 197-209.
- Gurfinkel, V. S. e. S., M.L. (1972). "The control of posture and locomotion." *Motor control* New York: 217-234.
- Halbertsma, J. M. (1983). "The stride cycle of the cat: the modelling of locomotion by computerized analysis of automatic recordings." *Acta Physiol Scand Suppl* 521: 1-75.
- Hilaire, G., Monteau, R. et Errchidi, S. (1989). "Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat." *Brain Res* 485: 325-32.
- Hildebrand, M. (1961). "Further studies on the locomotion of the cheetah." *J Mammal* 42: 84-89.
- Hill, A. A., Masino, M. A. et Calabrese, R. L. (2003). "Intersegmental coordination of rhythmic motor patterns." *J Neurophysiol* 90: 531-8.
- Hinckley, C. A., Hartley, R., Wu, L., Todd, A. et Ziskind-Conhaim, L. (2005). "Locomotor-like rhythms in a genetically distinct cluster of interneurons in the mammalian spinal cord." *J Neurophysiol* 93: 1439-49.
- Hurwitz, I., Susswein, A. J. et Weiss, K. R. (2005). "Transforming tonic firing into a rhythmic output in the *Aplysia* feeding system: presynaptic inhibition of a command-like neuron by a CpG element." *J Neurophysiol* 93: 829-42.
- Ichiyama, R. M., Gerasimenko, Y. P., Zhong, H., Roy, R. R. et Edgerton, V. R. (2005). "Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation." *Neurosci Lett* 383: 339-44.
- Iizuka, M., Kiehn, O. et Kudo, N. (1997). "Development in neonatal rats of the sensory resetting of the locomotor rhythm induced by NMDA and 5-HT." *Exp Brain Res* 114: 193-204.
- Ikeda, K., et Wiersma, CAG. (1964). "Autogenic rhythmicity in the abdominal ganglion of the crayfish: the control of swimmeret movements." *Comp Biochem Physiol C* 12: 107-115.
- Iscoe, S. et Polosa, C. (1976). "Synchronization of respiratory frequency by somatic afferent stimulation." *J Appl Physiol* 40: 138-48.
- Jamon, M. et Clarac, F. (1998). "Early walking in the neonatal rat: a kinematic study." *Behav Neurosci* 112: 1218-28.

- Jean, A. (2001). "Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms." *Physiol Rev* 81: 929-69.
- Jean-Xavier, C., Pflieger, J. F., Liabeuf, S. et Vinay, L. (2006). "Inhibitory postsynaptic potentials in lumbar motoneurons remain depolarizing after neonatal spinal cord transection in the rat." *J Neurophysiol* 96: 2274-81.
- Jordan, L., Pratt, C.A., et Menzies, J.E. (1979). "Locomotion evoked by brainstem stimulation: Occurrence without phasic segmental afferent input." *Brain Res* 177: 204-207.
- Juvin, L. et Morin, D. (2005). "Descending respiratory polysynaptic inputs to cervical and thoracic motoneurons diminish during early postnatal maturation in rat spinal cord." *Eur J Neurosci* 21: 808-813.
- Juvin, L., Simmers, J. et Morin, D. (2005). "Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion." *J Neurosci* 25: 6025-35.
- Kawahara, K., Kumagai, S., Nakazono, Y. et Miyamoto, Y. (1988). "Analysis of entrainment of respiratory rhythm by somatic afferent stimulation in cats using phase response curves." *Biol Cybern* 58: 235-42.
- Kiehn, O. (2006). "Locomotor circuits in the Mammalian spinal cord." *Annu Rev Neurosci* 29: 279-306.
- Kiehn, O. et Butt, S. J. (2003). "Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord." *Prog Neurobiol* 70: 347-61.
- Kiehn, O., Iizuka, M. et Kudo, N. (1992). "Resetting from low threshold afferents of N-methyl-D-aspartate-induced locomotor rhythm in the isolated spinal cord-hindlimb preparation from newborn rats." *Neurosci Lett* 148: 43-6.
- Kiehn, O., Johnson, B. R. et Raastad, M. (1996). "Plateau properties in mammalian spinal interneurons during transmitter-induced locomotor activity." *Neuroscience* 75: 263-73.
- Kiehn, O. et Kjaerulff, O. (1996). "Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat." *J Neurophysiol* 75: 1472-82.
- Kiehn, O., Sillar, K. T., Kjaerulff, O. et McDearmid, J. R. (1999). "Effects of noradrenaline on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord." *J Neurophysiol* 82: 741-6.
- Kjaerulff, O. et Kiehn, O. (1996). "Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study." *J Neurosci* 16: 5777-94.

- Kjaerulff, O. et Kiehn, O. (1997). "Crossed rhythmic synaptic input to motoneurons during selective activation of the contralateral spinal locomotor network." *J Neurosci* 17: 9433-47.
- Klapka, N., Hermanns, S., Straten, G., Masanneck, C., Duis, S., Hamers, F. P., Muller, D., Zuschratter, W. et Muller, H. W. (2005). "Suppression of fibrous scarring in spinal cord injury of rat promotes long-distance regeneration of corticospinal tract axons, rescue of primary motoneurons in somatosensory cortex and significant functional recovery." *Eur J Neurosci* 22: 3047-58.
- Koehler, W. J., Schomburg, E. D. et Steffens, H. (1984). "Phasic modulation of trunk muscle efferents during fictive spinal locomotion in cats." *J Physiol* 353: 187-97.
- Kremer, E. et Lev-Tov, A. (1997). "Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system." *J Neurophysiol* 77: 1155-70.
- Kristan, W., Stent, G.S., et Brodin, L. (1974). "Neuronal network generating locomotor behavior in lamprey." *Annu Rev Neurosci* 14: 169-199.
- Kudo, N. et Yamada, T. (1987). "N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro." *Neurosci Lett* 75: 43-8.
- Kullander, K., Butt, S. J., Le Bret, J. M., Lundfald, L., Restrepo, C. E., Rydstrom, A., Klein, R. et Kiehn, O. (2003). "Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking." *Science* 299: 1889-92.
- Kullander, K., Croll, S. D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T. M., Klein, R., Yancopoulos, G. D. et Gale, N. W. (2001). "Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control." *Genes Dev* 15: 877-88.
- Kullander, K., Mather, N. K., Diella, F., Dottori, M., Boyd, A. W. et Klein, R. (2001). "Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo." *Neuron* 29: 73-84.
- Lai, Y. Y. et Siegel, J. M. (1990). "Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation." *J Neurosci* 10: 2727-34.
- Lam, T. et Pearson, K. G. (2002). "The role of proprioceptive feedback in the regulation and adaptation of locomotor activity." *Adv Exp Med Biol* 508: 343-55.
- Langlet, C., Leblond, H. et Rossignol, S. (2005). "The mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats." *J Neurophysiol*.
- Lanuza, G. M., Gosgnach, S., Pierani, A., Jessell, T. M. et Goulding, M. (2004). "Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements." *Neuron* 42: 375-86.

- Lechner, H. A., Lein, E. S. et Callaway, E. M. (2002). "A genetic method for selective and quickly reversible silencing of Mammalian neurons." *J Neurosci* 22: 5287-90.
- Li, J., Imitola, J., Snyder, E. Y. et Sidman, R. L. (2006). "Neural stem cells rescue nervous purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets." *J Neurosci* 26: 7839-48.
- Li, Y., Field, P. M. et Raisman, G. (1997). "Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells." *Science* 277: 2000-2.
- Lipski, J., Zhang, X., Kruszewska, B. et Kanjhan, R. (1994). "Morphological study of long axonal projections of ventral medullary inspiratory neurons in the rat." *Brain Res* 640: 171-84.
- Lovely, R. G., Gregor, R. J., Roy, R. R. et Edgerton, V. R. (1986). "Effects of training on the recovery of full-weight-bearing stepping in the adult spinal cat." *Exp Neurol* 92: 421-35.
- Lundberg, A. (1969). "Convergence of excitatory and inhibitory action on interneurons in the spinal cord." *UCLA Forum Med Sci* 11: 231-65.
- Lundberg, A. (1971). "Function of the ventral spinocerebellar tract. A new hypothesis." *Exp Brain Res* 12: 317-30.
- MacKay-Lyons, M. (2002). "Central pattern generation of locomotion: a review of the evidence." *Phys Ther* 82: 69-83.
- Magnuson, D. S., Lovett, R., Coffee, C., Gray, R., Han, Y., Zhang, Y. P. et Burke, D. A. (2005). "Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat." *J Neurotrauma* 93: 529-43.
- Marchetti, C., Beato, M. et Nistri, A. (2001). "Alternating rhythmic activity induced by dorsal root stimulation in the neonatal rat spinal cord in vitro." *J Physiol* 530: 105-12.
- Marcoux, J. et Rossignol, S. (2000). "Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments." *J Neurosci* 20: 8577-85.
- Marder, E. et Thirumalai, V. (2002). "Cellular, synaptic and network effects of neuromodulation." *Neural Netw* 15: 479-93.
- Matsushima, T. et Grillner, S. (1992). "Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord." *J Neurophysiol* 67: 373-88.
- McClellan, A. (1996). "Organization of spinal locomotor networks: contributions from model systems." *Comm Theor Biol* 4: 63-91.

- McClellan, A. D. et Hagevik, A. (1999). "Coordination of spinal locomotor activity in the lamprey: long-distance coupling of spinal oscillators." *Exp Brain Res* 126: 93-108.
- McCrea, D. A. (2001). "Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion." *J Physiol* 533: 41-50.
- McCrea, D. A., Pratt, C. A. et Jordan, L. M. (1980). "Renshaw cell activity and recurrent effects on motoneurons during fictive locomotion." *J Neurophysiol* 44: 475-88.
- McDonald, J. W., Becker, D., Holekamp, T. F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., Lu, J., Platik, M. M., Qu, Y., Stewart, T. et Vadivelu, S. (2004). "Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation." *J Neurotrauma* 21: 383-93.
- McDonald, J. W., Liu, X. Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S. K., Turetsky, D., Gottlieb, D. I. et Choi, D. W. (1999). "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord." *Nat Med* 5: 1410-2.
- McEwen, M. L., Van Hartesveldt, C. et Stehouwer, D. J. (1997). "A kinematic comparison of L-DOPA-induced air-stepping and swimming in developing rats." *Dev Psychobiol* 30: 313-27.
- Mentis, G. Z., Alvarez, F. J., Bonnot, A., Richards, D. S., Gonzalez-Forero, D., Zerda, R. et O'Donovan, M. J. (2005). "Noncholinergic excitatory actions of motoneurons in the neonatal mammalian spinal cord." *Proc Natl Acad Sci U S A* 37: 7344-9.
- Miller, S., Van Der Burg, J. et Van Der Meche, F. (1975). "Locomotion in the cat: basic programmes of movement." *Brain Res* 91: 239-53.
- Miller, W. L. et Sigvardt, K. A. (2000). "Extent and role of multisegmental coupling in the Lamprey spinal locomotor pattern generator." *J Neurophysiol* 83(1): 465-76.
- Minassian, K., Jilge, B., Rattay, F., Pinter, M. M., Binder, H., Gerstenbrand, F. et Dimitrijevic, M. R. (2004). "Stepping-like movements in humans with complete spinal cord injury induced by epidural stimulation of the lumbar cord: electromyographic study of compound muscle action potentials." *Spinal Cord* 42: 401-16.
- Mori, S., Sakamoto, T., Ohta, Y., Takakusaki, K. et Matsuyama, K. (1989). "Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem." *Brain Res* 505: 66-74.
- Morin, D. et Viala, D. (2002). "Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs." *J Neurosci* 22: 4756-65.
- Navarrete, R., Slawinska, U. et Vrbova, G. (2002). "Electromyographic activity patterns of ankle flexor and extensor muscles during spontaneous and L-DOPA-induced locomotion in freely moving neonatal rats." *Exp Neurol* 173: 256-65.

- Nicolopoulos-Stournaras, S. et Iles, J. F. (1983). "Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat." *J Comp Neurol* 217: 75-85.
- Nishimaru, H. et Kudo, N. (2000). "Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse." *Brain Res Bull* 53: 661-9.
- Nishimaru, H., Restrepo, C. E., Ryge, J., Yanagawa, Y. et Kiehn, O. (2005). "Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14): 5245-9.
- Noga, B. R., Shefchyk, S. J., Jamal, J. et Jordan, L. M. (1987). "The role of Renshaw cells in locomotion: antagonism of their excitation from motor axon collaterals with intravenous mecamylamine." *Exp Brain Res* 66: 99-105.
- Norman, K. E., Pepin, A. et Barbeau, H. (1998). "Effects of drugs on walking after spinal cord injury." *Spinal Cord* 36: 699-715.
- Norreel, J. C., Pflieger, J. F., Pearlstein, E., Simeoni-Alias, J., Clarac, F. et Vinay, L. (2003). "Reversible disorganization of the locomotor pattern after neonatal spinal cord transection in the rat." *J Neurosci* 23: 1924-32.
- Orlovsky, G. N. (1972). "The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion." *Brain Res* 40: 359-71.
- Orsal, D., Barthe, J. Y., Antri, M., Feraboli-Lohnherr, D., Yakovleff, A., Gimenez y Ribotta, M., Privat, A., Provencher, J. et Rossignol, S. (2002). "Locomotor recovery in chronic spinal rat: long-term pharmacological treatment or transplantation of embryonic neurons?" *Prog Brain Res* 137: 213-30.
- Palisses, R., Persegol, L., Viala, D. et Viala, G. (1988). "Reflex modulation of phrenic activity through hindlimb passive motion in decorticate and spinal rabbit preparation." *Neuroscience* 24: 719-28.
- Pearce, R. A. et Friesen, W. O. (1985). "Intersegmental coordination of the leech swimming rhythm. II. Comparison of long and short chains of ganglia." *J Neurophysiol* 54: 1460-72.
- Pearce, R. A. et Friesen, W. O. (1988). "A model for intersegmental coordination in the leech nerve cord." *Biol Cybern* 58: 301-11.
- Pearlstein, E., Mabrouk, F. B., Pflieger, J. F. et Vinay, L. (2005). "Serotonin refines the locomotor-related alternations in the in vitro neonatal rat spinal cord." *Eur J Neurosci* 21: 1338-46.
- Pearson, K. G. et Collins, D. F. (1993). "Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity." *J Neurophysiol* 70: 1009-17.
- Pearson, K. G., Misiaszek, J. E. et Fouad, K. (1998). "Enhancement and resetting of locomotor activity by muscle afferents." *Ann N Y Acad Sci* 860: 203-15.

- Pearson, K. G., Ramirez, J. M. et 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.
- Pearson, K. G. et Rossignol, S. (1991). "Fictive motor patterns in chronic spinal cats." *J Neurophysiol* 66: 1874-87.
- Perreault, M. C., Angel, M. J., Guertin, P. et McCrea, D. A. (1995). "Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat." *J Physiol* 487 (Pt 1): 211-20.
- Perret, C. (1983). "Centrally generated pattern of motoneuron activity during locomotion in the cat." *Symp Soc Exp Biol* 37: 405-22.
- Philippson, M. (1905). "L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux." *Trav Lab Physiol Inst Solvay* 7: 1-208.
- Poon, M., Friesen, W. O. et Stent, G. S. (1978). "Neuronal control of swimming in the medicinal leech. V. Connexions between the oscillatory interneurons and the motor neurones." *J Exp Biol* 75: 45-63.
- Potts, J. T., Rybak, I. A. et Paton, J. F. (2005). "Respiratory rhythm entrainment by somatic afferent stimulation." *J Neurosci* 25: 1965-78.
- Pratt, C. A. et Jordan, L. M. (1987). "Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells as contributors to the spinal mechanisms of fictive locomotion." *J Neurophysiol* 57: 56-71.
- Raastad, M., Johnson, B. R. et Kiehn, O. (1997). "Analysis of EPSCs and IPSCs carrying rhythmic, locomotor-related information in the isolated spinal cord of the neonatal rat." *J Neurophysiol* 78: 1851-9.
- Reed, W. R., Shum-Siu, A., Onifer, S. M. et Magnuson, D. S. (2006). "Inter-enlargement pathways in the ventrolateral funiculus of the adult rat spinal cord." *Neuroscience*.
- Roberts, A. (2000). "Early functional organization of spinal neurons in developing lower vertebrates." *Brain Res Bull* 53: 585-93.
- Rossignol, S., Bouyer, L., Langlet, C., Barthelemy, D., Chau, C., Giroux, N., Brustein, E., Marcoux, J., Leblond, H. et Reader, T. A. (2004). "Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat." *Prog Brain Res* 143: 163-72.
- Rossignol, S., Chau, C., Brustein, E., Belanger, M., Barbeau, H. et Drew, T. (1996). "Locomotor capacities after complete and partial lesions of the spinal cord." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56: 449-63.
- Rossignol, S., Dubuc, R. et Gossard, J. P. (2006). "Dynamic sensorimotor interactions in locomotion." *Physiol Rev* 86: 89-154.

- Rossignol, S., Giroux, N., Chau, C., Marcoux, J., Brustein, E. et Reader, T. A. (2001). "Pharmacological aids to locomotor training after spinal injury in the cat." *J Physiol* 533: 65-74.
- Saito, K. (1979). "Development of spinal reflexes in the rat fetus studied in vitro." *J Physiol* 294: 581-94.
- Sapir, T., Geiman, E. J., Wang, Z., Velasquez, T., Mitsui, S., Yoshihara, Y., Frank, E., Alvarez, F. J. et Goulding, M. (2004). "Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of renshaw cell development." *J Neurosci* 24: 1255-64.
- Schmidt, B. J. et Jordan, L. M. (2000). "The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord." *Brain Res Bull* 53: 689-710.
- Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y. A. et Schwab, M. E. (1994). "Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion." *Nature* 367: 170-3.
- Schomburg, E. D., Petersen, N., Barajon, I. et Hultborn, H. (1998). "Flexor reflex afferents reset the step cycle during fictive locomotion in the cat." *Exp Brain Res* 122: 339-50.
- Schwab, M. E. (2004). "Nogo and axon regeneration." *Curr Opin Neurobiol* 14: 118-24.
- Shefchyk, S., McCrea, D., Kriellaars, D., Fortier, P. et Jordan, L. (1990). "Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion." *Exp Brain Res* 80: 290-5.
- Sherrington, C. (1906). "The integrative action of the nervous system." Yale University Press: New Haven.
- Sherrington, C. (1910). "Remarks on the reflex mechanism of the step." *Brain* 33: 1-25.
- Shik, M. L., Severin, F. V. et Orlovskii, G. N. (1966). "Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain." *Biofizika* 11: 659-66.
- Sigvardt, K. A. et Williams, T. L. (1996). "Effects of local oscillator frequency on intersegmental coordination in the lamprey locomotor CPG: theory and experiment." *J Neurophysiol* 76(6): 4094-103.
- Skinner, F. K. et Mulloney, B. (1998). "Intersegmental coordination in invertebrates and vertebrates." *Curr Opin Neurobiol* 8: 725-32.
- Skinner, F. K. et Mulloney, B. (1998). "Intersegmental coordination of limb movements during locomotion: mathematical models predict circuits that drive swimmeret beating." *J Neurosci* 18: 3831-42.

- Smith, J. C. et Feldman, J. L. (1987). "In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion." *J Neurosci Methods* 21: 321-33.
- Smith, J. C., Feldman, J. L. et Schmidt, B. J. (1988). "Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro." *Faseb J* 2: 2283-8.
- Sqalli-Houssaini, Y. et Cazalets, J. R. (2000). "Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat." *Brain Res* 852: 100-9.
- Sqalli-Houssaini, Y., Cazalets, J. R. et Clarac, F. (1993). "Oscillatory properties of the central pattern generator for locomotion in neonatal rats." *J Neurophysiol* 70: 803-13.
- Stecina, K., Quevedo, J. et McCrea, D. A. (2005). "Parallel reflex pathways from flexor muscle afferents evoking resetting and flexion enhancement during fictive locomotion and scratch in the cat." *J Physiol* 569(Pt 1): 275-90.
- Stokke, M. F., Nissen, U. V., Glover, J. C. et Kiehn, O. (2002). "Projection patterns of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of the neonatal rat." *J Comp Neurol* 446: 349-59.
- Suster, M. L. et Bate, M. (2002). "Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input." *Nature* 416: 174-8.
- Suzue, T. (1984). "Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat." *J Physiol* 354: 173-83.
- Tan, E. M., Yamaguchi, Y., Horwitz, G. D., Gosgnach, S., Lein, E. S., Goulding, M., Albright, T. D. et Callaway, E. M. (2006). "Selective and quickly reversible inactivation of mammalian neurons in vivo using the *Drosophila* allatostatin receptor." *Neuron* 51: 157-70.
- Thorstensson, A., Carlson, H., Zomlefer, M. R. et Nilsson, J. (1982). "Lumbar back muscle activity in relation to trunk movements during locomotion in man." *Acta Physiol Scand* 116: 13-20.
- Tian, G. F. et Duffin, J. (1996). "Connections from upper cervical inspiratory neurons to phrenic and intercostal motoneurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat." *Exp Brain Res* 110: 196-204.
- Vaughn, J. E. et Grieshaber, J. A. (1973). "A morphological investigation of an early reflex pathway in developing rat spinal cord." *J Comp Neurol* 148: 177-209.
- Viala, D. et Buser, P. (1971). "Methods of obtaining locomotor rhythms in the spinal rabbit by pharmacological treatments (DOPA, 5-HTP, D-amphetamine)." *Brain Res* 35: 151-65.

- Viala, D., Viala, G., et Fayein, N. (1986). "Plasticity of locomotor organization in infant rabbits spinalized shortly after birth." *Development and Plasticity of the Mammalian Spinal Cord Padova*: 301-310.
- Viala, D. et Vidal, C. (1978). "Evidence for distinct spinal locomotion generators supplying respectively fore- and hindlimbs in the rabbit." *Brain Res* 155: 182-6.
- Viala, G. et Buser, P. (1969). "Stereotyped rhythmic motor activities in the rabbit. A study of their general characteristics." *Exp Brain Res* 8: 346-63.
- Viala, G., Orsal, D. et Buser, P. (1978). "Cutaneous fiber groups involved in the inhibition of fictive locomotion in the rabbit." *Exp Brain Res* 33: 257-67.
- Wallen, P. et Williams, T. L. (1984). "Fictive locomotion in the lamprey spinal cord in vitro compared with swimming in the intact and spinal animal." *J Physiol* 347: 225-39.
- Wernig, A. et Muller, S. (1992). "Laufband locomotion with body weight support improved walking in persons with severe spinal cord injuries." *Paraplegia* 30: 229-38.
- Westerga, J. et Gramsbergen, A. (1990). "The development of locomotion in the rat." *Brain Res Dev Brain Res* 57: 163-74.
- Whelan, P. J. (1996). "Control of locomotion in the decerebrate cat." *Prog Neurobiol* 49: 481-515.
- Whelan, P. J., Hiebert, G. W. et Pearson, K. G. (1995). "Stimulation of the group I extensor afferents prolongs the stance phase in walking cats." *Exp Brain Res* 103: 20-30.
- Wilson, J. M., Hartley, R., Maxwell, D. J., Todd, A. J., Lieberam, I., Kaltschmidt, J. A., Yoshida, Y., Jessell, T. M. et Brownstone, R. M. (2005). "Conditional rhythmicity of ventral spinal interneurons defined by expression of the Hb9 homeodomain protein." *J Neurosci* 25: 5710-9.
- Wirz, M., Zemon, D. H., Rupp, R., Scheel, A., Colombo, G., Dietz, V. et Hornby, T. G. (2005). "Effectiveness of automated locomotor training in patients with chronic incomplete spinal cord injury: a multicenter trial." *Arch Phys Med Rehabil* 86: 672-80.
- Yakovenko, S., McCrea, D. A., Stecina, K. et Prochazka, A. (2005). "Control of locomotor cycle durations." *J Neurophysiol* 94(2): 1057-65.
- Yakovenko, S., Mushahwar, V., VanderHorst, V., Holstege, G. et Prochazka, A. (2002). "Spatiotemporal activation of lumbosacral motoneurons in the locomotor step cycle." *J Neurophysiol* 87: 1542-53.
- Yakovleff, A., Cabelguen, J. M., Orsal, D., Gimenez y Ribotta, M., Rajaofetra, N., Drian, M. J., Bussel, B. et Privat, A. (1995). "Fictive motor activities in adult chronic spinal rats transplanted with embryonic brainstem neurons." *Exp Brain Res* 106: 69-78.

- Yamada, H., Ezure, K. et Manabe, M. (1988). "Efferent projections of inspiratory neurons of the ventral respiratory group. A dual labeling study in the rat." *Brain Res* 455: 283-94.
- Yokoyama, N., Romero, M. I., Cowan, C. A., Galvan, P., Helmbacher, F., Charnay, P., Parada, L. F. et Henkemeyer, M. (2001). "Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline." *Neuron* 29: 85-97.
- Yu, X., Nguyen, B. et Friesen, W. O. (1999). "Sensory feedback can coordinate the swimming activity of the leech." *J Neurosci* 19: 4634-43.
- Zaporozhets, E., Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (2004). "A reliable technique for the induction of locomotor-like activity in the in vitro neonatal rat spinal cord using brainstem electrical stimulation." *J Neurosci Methods* 139: 33-41.
- Zaporozhets, E., Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (2006). "Propriospinal neurons contribute to bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord." *J Physiol* 572: 443-58.
- Zar, J. H. (1974). "Circular distribution." *Biostatistical analysis*: 310-327.
- Zhong, G., Diaz-Rios, M. et Harris-Warrick, R. M. (2006). "Intrinsic and functional differences among commissural interneurons during fictive locomotion and serotonergic modulation in the neonatal mouse." *J Neurosci* 26: 6509-17.
- Zhong, G., Diaz-Rios, M. et Harris-Warrick, R. M. (2006). "Serotonin modulates the properties of ascending commissural interneurons in the neonatal mouse spinal cord." *J Neurophysiol* 95: 1545-55.
- Zomlefer, M. R., Provencher, J., Blanchette, G. et Rossignol, S. (1984). "Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats." *Brain Res* 290: 249-60.

ANNEXE

ARTICLE ORIGINAL

PROPRIOSPINAL CIRCUITRY UNDERLYING INTERLIMB COORDINATION IN MAMMALIAN
QUADRUPEDAL LOCOMOTION

Laurent JUVIN, John SIMMERS et Didier MORIN

The Journal of Neuroscience (2005) 25:6025– 6035

Propriospinal Circuitry Underlying Interlimb Coordination in Mammalian Quadrupedal Locomotion

Laurent Juvin, John Simmers, and Didier Morin

Laboratoire de Physiologie et Physiopathologie de la Signalisation Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5543, Equipe Neurophysiologie Adaptative des Systèmes Moteurs, 33076 Bordeaux, France

Soon after birth, freely moving quadrupeds can express locomotor activity with coordinated forelimb and hindlimb movements. To investigate the neural mechanisms underlying this coordination, we used an isolated spinal cord preparation from neonatal rats. Under bath-applied 5-HT, *N*-methyl-D,L-aspartate (NMA), and dopamine (DA), the isolated cord generates fictive locomotion in which homolateral cervicolumbar extensor motor bursts occur in phase opposition, as does bursting in homologous (left–right) extensor motoneurons. This coordination corresponded to a walking gait monitored with EMG recordings in the freely behaving animal. Functional decoupling of the cervical and lumbar generators *in vitro* by sucrose blockade at the thoracic cord level revealed independent rhythmogenic capabilities with similar cycle frequencies in the two locomotor regions. When the cord was partitioned at different thoracic levels and 5-HT/NMA/DA was applied to the more caudal compartment, the ability of the lumbar generators to drive their cervical counterparts increased with the proportion of chemically exposed thoracic segments. Blockade of synaptic inhibition at the lumbar level caused synchronous bilateral lumbar rhythmicity that, surprisingly, also was able to impose bilaterally synchronous bursting at the unblocked cervical level. Furthermore, after a midsagittal section from spinal segments C1 to T7, and during additional blockade of cervical synaptic inhibition, the cord exposed to 5-HT/NMA/DA continued to produce a coordinated fictive walking pattern similar to that observed in control. Thus, in the newborn rat, a caudorostral propriospinal excitability gradient appears to mediate interlimb coordination, which relies more on asymmetric axial connectivity (both excitatory and inhibitory) between the lumbar and cervical generators than on differences in their inherent rhythmogenic capacities.

Key words: locomotion; neuronal network interactions; newborn rat; spinal cord; forelimb; hindlimb; *in vitro*

Introduction

The production of most rhythmic behaviors relies on the autoactivity of localized networks of neurons or central pattern generators (CPGs) within an animal's nervous system (Marder and Calabrese, 1996; Stein et al., 1997). The CPGs responsible for quadrupedal locomotion in vertebrates, for example, reside as half-center modules in the cervical and lumbar regions of the spinal cord, each generating basic motor output patterns responsible for rhythmic contractions of antagonistic flexor–extensor groups of muscles in the corresponding forelimb or hindlimb (Grillner, 1981).

The orchestration of effective locomotor behavior not only demands a strict temporal relationship between the spinal CPG circuits controlling the different limbs and other body regions but also the capacity for rapid alterations in network coupling

that allow changes in interlimb coordination appropriate for activities such as walking, running, and swimming. A precise understanding of the neural basis of multilimb behaviors such as tetrapod locomotion therefore requires knowledge of the mechanisms and cellular pathways by which the various underlying central neuronal circuits interact through both transverse and longitudinal neuronal coupling systems.

Although considerable data are now available on the neural substrates of bilateral limb coordination, particularly of lumbar spinal circuits controlling the hindlimbs of quadruped mammals (Kjaerulff and Kiehn, 1996; Rossignol, 1996; Kremer and Lev-Tov, 1997; Cazalets and Bertrand, 2000; Butt et al., 2002), relatively little is known of the propriospinal processes that couple the forelimbs and hindlimbs (Viala and Vidal, 1978; English, 1979, 1989), which allow the switch between different modes of rostrocaudal coordination. Major problems in this respect include the identification of different neuronal pathways involved in coordinating and establishing their specific roles as well as deciphering the relationship between modes of coupling and the balance between processes of synaptic excitation and inhibition.

The *in vitro* neonatal rat spinal cord preparation has become established as an excellent model for studying the neuronal correlates of mammalian locomotion (Kiehn and Butt, 2003). For more than one decade, this reduced preparation has been widely used to investigate the origin and mechanisms principally of lum-

Received Feb. 21, 2005; revised May 9, 2005; accepted May 10, 2005.

This work was supported by grants from the Conseil Régional d'Aquitaine/Fonds Européens de Développement Régional and the Fondation pour la Recherche Médicale. L.J. was supported by the Demain Debout and the Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale. We thank Tiffany Aubert for assistance with our *in vivo* experiments and Dr. J.-R. Cazalets for helpful discussions and comments on this manuscript.

Correspondence should be addressed to Dr. Didier Morin, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5543, Laboratoire Physiologie et Physiopathologie de la Signalisation Cellulaire, bâtiment 2A, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. E-mail: didier.morin@umr5543.u-bordeaux2.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0696-05.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/256025-11\$15.00/0

bar network activity responsible for rhythmic hindlimb movements (Cazalets et al., 1992, 1995; Kjaerulff and Kiehn, 1996). Moreover, with this preparation, the spinal localization of the forelimb locomotor generators has been reported, along with initial data on the functional relationship between cervical and lumbar networks (Ballion et al., 2001). Here, locomotor-related burst patterns recorded from the motor roots of rhythmically active isolated cords were compared with patterns of interlimb coordination in the freely behaving animal. Split-bath experiments in combination with pharmacological manipulation and cord lesions were then used to determine the nature of propriospinal interactions between the cervical and lumbar locomotor CPGs. Our results demonstrate that coordination is mediated by a powerful ascending phasic influence that accrues caudorostrally through activation of intervening thoracic cord segments to couple cervical rhythmogenesis to that of the lumbar region. Moreover, this coupling drive is mediated by the concerted actions of ascending excitation and inhibition. Some of this work has appeared previously in abstract form (Juvin et al., 2003).

Materials and Methods

In vivo experiments. Newborn rats (Wistar; 3–7 d of age) from different litters were obtained from timed pregnant female rats raised in our laboratory breeding center. Animals were anesthetized by hypothermia until the loss of reflex responsiveness to tail pinching. Pairs of 50 μ m silver wires for electromyography (EMG) were then inserted into extensor limb muscles (triceps and gastrocnemius of the forelimb and hindlimb, respectively) and maintained by means of tissue glue (collodion; Sigma, Lyon, France). To limit the discomfort of the animals and to facilitate locomotor movements, a maximum of three pairs of recording electrodes was used to examine both left–right and anteroposterior coordination. Animals were then warmed, and the temperature of the recording set up was maintained at $\sim 37^\circ\text{C}$ by means of spotlights.

To induce overground locomotion, a hollow cone filled with bedding material from the neonate's nest was positioned in front of the animal's muzzle. This device, which exudes a powerful olfactory stimulus (Jamon and Clarac, 1998), was then pulled slowly over a distance of 50 cm to elicit EMG-recorded episodes of locomotion. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive.

In vitro spinal cord preparations. *In vitro* experiments were performed on isolated preparations of the spinal cords of 0- to 4-d-old rats. After anesthesia by hypothermia, animals were decapitated and eviscerated. The skin and muscles were rapidly removed and then preparations were placed in a 25 ml chamber containing artificial CSF (aCSF; see composition below) maintained at 10°C throughout the dissection (flow rate, 5–10 ml/min). The dissection was continued under binocular microscopy to isolate gently the entire spinal cord with its ventral roots still attached. The preparation was then placed in a 10 ml recording chamber and pinned down with its ventral surface upwards. Preparations were superfused continuously (flow rate, 3–5 ml/min) with aCSF equilibrated with 95% O_2 /5% CO_2 , pH 7.4, containing the following (in mM): 113 NaCl, 4.5 KCl, 1 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 25 NaHCO_3 , and 11 D-glucose. The temperature of this aCSF was progressively raised to 22–25 $^\circ\text{C}$ before recording procedures began.

In most preparations, the recording chamber was partitioned into two (or three, in the case of sucrose block experiments; see below) bath chambers with independent perfusion systems. Narrow petroleum jelly bridges allowed the cord to remain functionally intact between the different compartments, and water tightness was checked at the end of each experiment by adding dye (Fast Green; Sigma) to the bathing medium on either side of a given bridge. Spinal ventral root activity was recorded using glass suction electrodes or Vaseline (Prolabo, Fontenay Sous-Bois, France)-insulated, stainless-steel pin electrodes. Signals were amplified (10,000 \times) by homemade AC amplifiers, bandpass-filtered (0.1–3 kHz), full-wave rectified, integrated (sample rate, 3 kHz; $\tau = 100$ ms), digitized, and stored on a computer hard disk (Spike2 software; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) for off-line analysis.

Drug application. Pharmacological substances were bath-applied at least 30 min after the end of dissection by means of gravity supply. A mixture of *N*-methyl-D,L-aspartate (NMA; $0.5\text{--}2 \times 10^{-5}$ M), serotonin (5-HT; 10^{-5} M), and dopamine (DA; 10^{-4} M) was used to elicit prolonged and robust episodes of fictive locomotion (Barrière et al., 2004). A combination of the GABAergic antagonist bicuculline (BIC; 0.25×10^{-5} M) and the glycinergic antagonist strychnine (STR; 0.25×10^{-5} M) was used to block inhibitory synapses. In an additional series of experiments, the lumbar spinal cord was isolated reversibly from the cervical region using a sucrose block of axonal conduction in the thoracic spinal segments. For this, the recording chamber was partitioned into three baths, and the intermediate thoracic cord compartment (containing at least four contiguous spinal segments) was perfused with an isotonic sucrose solution (339 mM in distilled water) buffered with HEPES (5 mM) and adjusted to pH 7.4 using NaOH solution. All drugs used in these *in vitro* experiments were purchased from Sigma.

Lesion experiments. In some experiments, the spinal cord was transected at the thoracic level to separate physically cervical and lumbar spinal cord regions. In other experiments, sagittal splitting was performed to separate the two sides of the cord. In all cases, lesions were performed with a razor blade fragment, and a control period of 45 min was respected before data were collected.

Data analysis. Spontaneous and induced rhythmic motor bursts were characterized in terms of their mean duration over ≥ 20 integrated cycles that were selected randomly from a recorded sequence. The integrated transform was then used to evaluate real or fictive locomotor cycle period and the phase relationship between ipsilateral and contralateral motor nerves or muscle discharges. Duty cycles (burst duration/cycle period) of cervical and lumbar rhythmic activities were then evaluated and normalized as a percentage. Statistical values were expressed as means \pm SEM. Differences between means were analyzed using a statistical software package (SigmaStat for Windows; SPSS, Chicago, IL) and assessed either by Student's *t* test or one-way ANOVA with a Tukey posttest. Unless otherwise specified, changes in mean values for each parameter were taken to be significant at $p < 0.05$.

In several experimental series, the expression of stable rhythmicity in ventral motor root discharge was assessed by autocorrelation analysis taken at 120–190 s of activity. Similarly, the coordination between the activities of different ventral roots was examined by means of cross-correlation analysis of ≥ 120 s of activity. The resultant correlograms were plotted with 95% (means ± 2 SEM) confidence intervals that were calculated using Statistica 6 software (Statsoft, Tulsa, OK). Cross-correlations coefficients between two locomotor outputs allowed estimation of coupling strength whereby values approaching 1 indicated synchrony, whereas values toward -1 reflected burst alternation. A flat cross-correlogram at ~ 0 indicated independent rhythms.

Results

Overground locomotion

Initially, electromyographic recordings of forelimb elbow (triceps) and hindlimb ankle (gastrocnemius) extensor muscles were performed in freely moving neonates ($n = 5$) (Fig. 1A1) to allow comparison of interlimb coordination during actual locomotion with fictive locomotor patterns subsequently observed in the main *in vitro* part of our study. During the first postnatal week (3–7 d), spontaneous locomotor episodes are less frequent than in older animals, mainly because of the immaturity of postural control at this age (Jamon and Clarac, 1998). To circumvent this problem, newborn rats were trained to follow a moving olfactory stimulus (see Materials and Methods), which elicited stable sequences of locomotion in which the basic pattern of limb extensor activity consisted of a clear left–right (homologous limbs) and anteroposterior (homolateral limbs) alternation (mean phase, 0.48 ± 0.02 and 0.59 ± 0.04 , respectively; mean cycle period, 1.22 ± 0.03 s; mean burst duration, 0.73 ± 0.02 s; $n = 5$ animals) (Fig. 1A1,A2) (Brocard et al., 1999; Navarrete et al., 2002). Contralateral forelimb and hindlimb extensor muscle activity (i.e., in

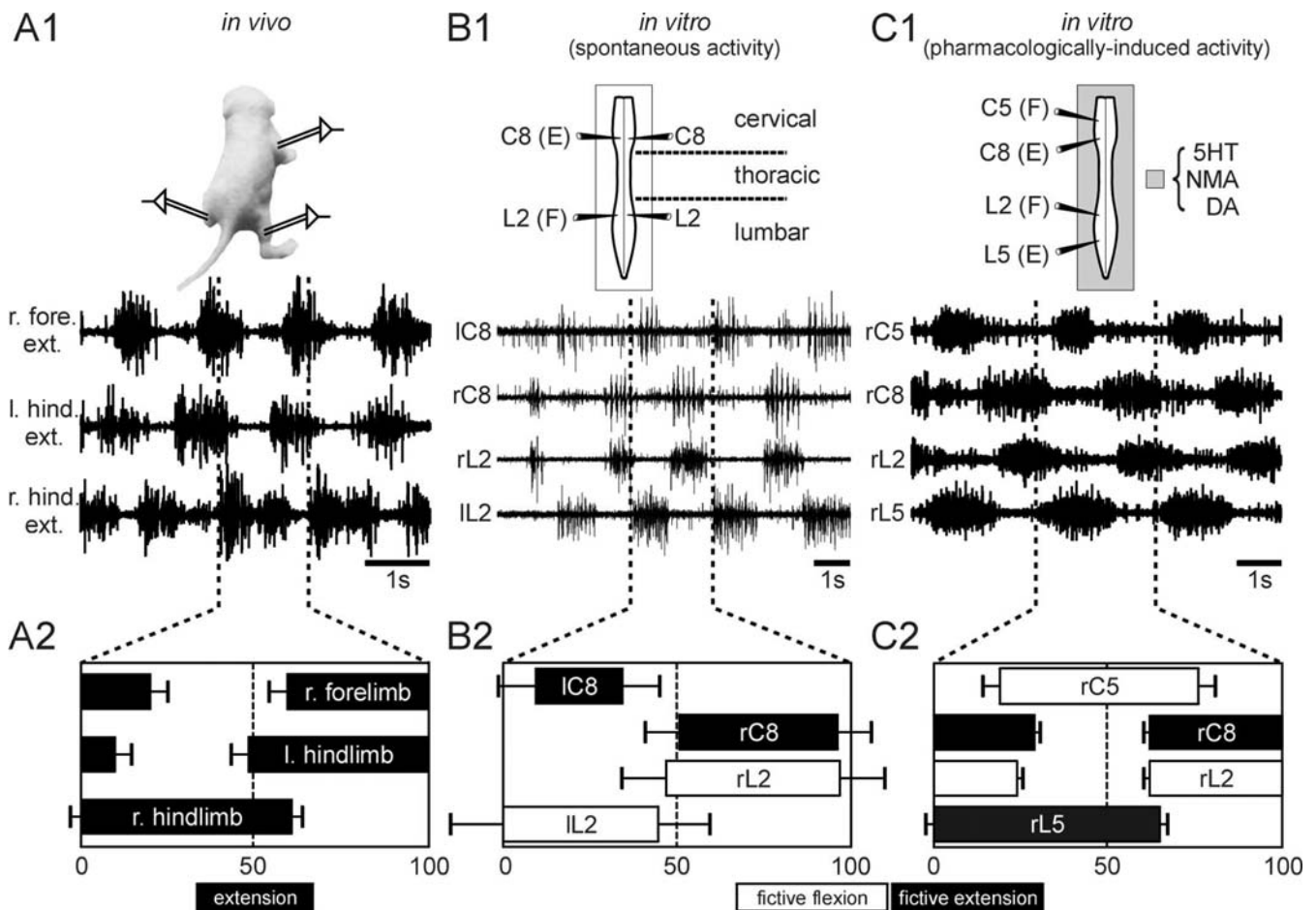


Figure 1. Motor pattern generation for walking in neonatal rat (3–7 d of age) spinal cord. **A1**, Electromyographic recordings of right forelimb (r. fore.) and bilateral hindlimb (l. and r. hind.) extensor muscles (ext.) during overground locomotion. **A2**, Phase diagram showing a single normalized locomotor cycle with onset and offset (\pm SEM as horizontal lines) of extensor EMG activity expressed as a percentage (5 animals). **B, C**, *In vitro* spinal cord preparation used to study coordination between spinal rhythm-generating circuitry during spontaneous (**B1**) and pharmacologically induced (**C1**) fictive locomotion. Extracellular recordings were made simultaneously from indicated cervical (C) and lumbar (L) ventral roots. In **C1**, stable episodes of fictive locomotion were evoked by perfusion of a saline containing serotonin (5-HT; 10^{-5} M), NMA (10^{-5} M), and DA (10^{-4} M). **B2, C2**, Phase diagrams (as in **A2**) illustrating “fictive gaits” corresponding to walking during spontaneous (**B2**; from 1 preparation) and pharmacologically induced (**C2**; from 18 preparations) rhythmicity. E, Extensor; F, flexor; r, right; l, left.

diagonal limbs) showed a high degree of in-phase coordination (phase difference in burst onset, $11.1 \pm 4.8\%$) (Fig. 1A2), consistent with both a walking gait (Orlovsky et al., 1999) and a limb coordination previously observed during free swimming in newborn rats (Bekoff and Trainer, 1979).

Locomotor rhythmicity and “fictive walking”

We next wished to determine whether the neuronal correlates of this pattern of interlimb coordination observed in the behaving animal is also expressed by locomotor circuits in the *in vitro* spinal cord. Under control saline conditions, such isolated preparations in which simultaneous recordings were made from cervical (C) and lumbar (L) ventral motor roots that normally innervate muscles of the forelimbs and hindlimbs, respectively, occasionally displayed short (≤ 10 s) episodes of spontaneous locomotor-like activity in a very small number of experiments (2 from 30 preparations measured) (Fig. 1B1). This rare spontaneous motor bursting, which presumably had a physiological relevance because it involved neurotransmitter release and actions that were endogenous to the spinal cord, was nonetheless well coordinated, showing a strict left–right alternation (mean period, 2.04 ± 0.13 s; mean burst duration, 0.83 ± 0.04 s; $n = 64$ motor bursts measured from one spontaneously active preparation). In

accordance with our *in vivo* observations, ipsilateral cervical extensor (C8) and lumbar flexor (L2) motoneurons tended to be synchronously active (Fig. 1B2). Note that motoneurons in C8 innervate forelimb extensor muscles, including the upper limb triceps, whereas axons in L2 innervate predominately hindlimb flexor muscles (see below).

In a large majority of preparations (28 of 30), however, the isolated spinal cord remained quiescent under control saline. In these cases, bath application of a mixture of NMA (10^{-5} M), 5-HT (10^{-5} M), and DA (10^{-4} M) almost always elicited sustained episodes of fictive locomotion (Fig. 1C1) (Barrière et al., 2004). In the presence of this neuromodulator mixture, the rhythmic motor activity expressed, which was very similar to the *in vivo* and spontaneous *in vitro* burst patterns described above, remained well coordinated and extremely stable (mean cycle period, 3.00 ± 0.12 s; mean burst duration, 1.82 ± 0.14 s; 18 preparations measured). The alternating rhythm recorded from homolateral C5 and C8 ventral roots (corresponding to the scapular girdle region), which have been identified previously as carrying flexor and extensor motor outputs, respectively (McKenna et al., 2000), is considered to be a close reflection of the operation of the cervical spinal generators engaged in forelimb locomotor movements (Ballion et al., 2001). Similarly, motor activity recorded from

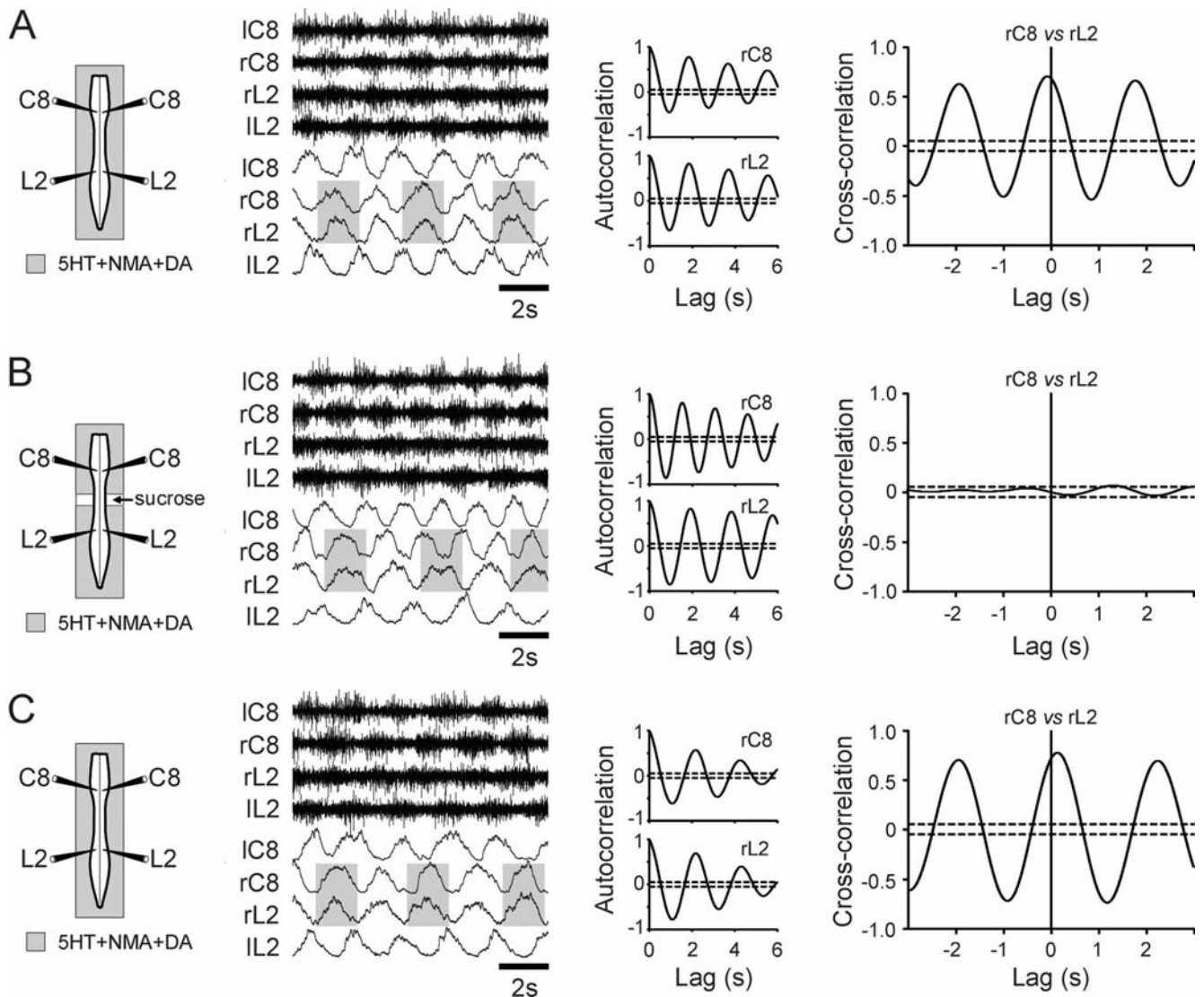


Figure 2. Effect of isotonic sucrose blockade of thoracic cord segments on cervical and lumbar locomotor rhythmicity. **A**, Left, Schematic of experimental procedure. Middle, Raw extracellular and integrated activity from cervical (bilateral C8) and lumbar (bilateral L2) ventral roots during 5-HT/NMA/DA-induced fictive locomotion. Right, Respective autocorrelograms of rectified data recorded from right C8 and right L2 ventral roots and cross-correlation between homolateral C8 and L2 activity showing an in-phase relationship (indicated by a positive cross-correlation coefficient at lag 0) in control conditions. Correlograms were computed from 120 to 190 s of activity and are superimposed with 95% (± 2 SEM) confidence intervals (dashed lines). **B**, Loss of rostrocaudal coordination after sucrose block of thoracic segments (schematic to the left). Same presentation as in **A**. Note that, despite decoupling (indicated by near flat cross-correlogram), both cervical and lumbar generators continued to operate at regular (see autocorrelograms) and similar (see Fig. 3A) frequencies. **C**, Recovery of control in-phase anteroposterior coordination after removal of sucrose blockade. C, Cervical ventral root; L, lumbar ventral root.

the homolateral L2 and L5 ventral roots, which respectively carry hindlimb flexor and extensor motor axons in the pelvic girdle region, is produced by the lumbar CPGs responsible for hindlimb locomotor movements (Kjaerulff and Kiehn, 1996). The burst-phase relationships within the activity pattern recorded from these different homolateral spinal roots invariably showed an out-of-phase coordination between flexor (C5 vs L2) and extensor (C8 vs L5) motor bursts of the two girdles (Fig. 1C2). These results therefore support the conclusion that despite the lack of sensory or brainstem inputs, the isolated cord of neonatal rat can reliably produce a motor pattern that corresponds to an interlimb coordination appropriate for quadrupedal walking or swimming (Fig. 1, compare B2–C2 and A2).

Propriospinal coupling between cervical and lumbar central pattern generators

The persistence of a well-coordinated fictive locomotor pattern in the *in vitro* spinal cord clearly indicates that quadrupedal limb

coordination is, to a large extent, mediated by propriospinal connections between the cervical and lumbar generators. To determine the nature of these central pathways, sucrose blockade of axonal conduction in thoracic segments (see Materials and Methods) was used to disconnect reversibly the anterior and posterior spinal generators to evaluate both their intrinsic rhythmogenic capacities and the role of any reciprocal coordinating influences (Fig. 2). Within 20 min of sucrose application to thoracic segments in all seven preparations tested, the cervical and lumbar locomotor-like rhythms, which were highly regular (revealed by autocorrelation analysis) and previously tightly coordinated (see cross-correlations) under 5-HT/NMA/DA perfusion (Fig. 2A), became completely independent (Fig. 2B, right, statistically flat cross-correlogram), with each rhythm maintaining a strict bilateral alternation. Moreover, the decoupled rhythms in L2 and C8 remained stable (Fig. 2B, autocorrelograms) with cycle periods (3.49 ± 0.57 and 2.68 ± 0.69 s, respectively) that were not signif-

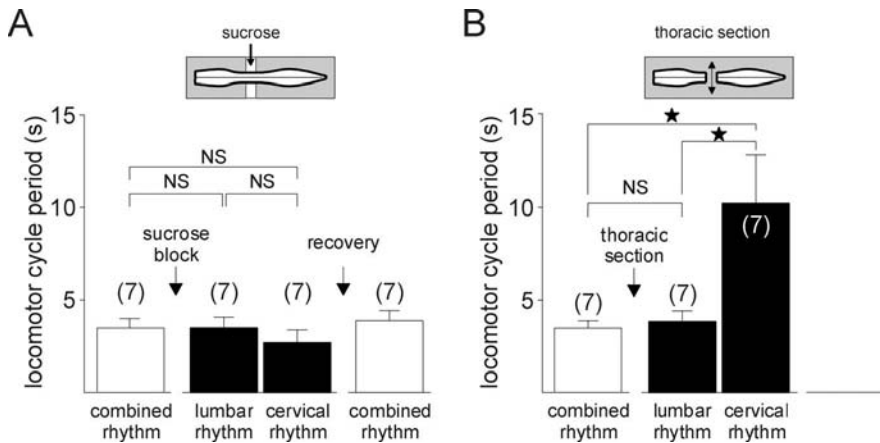


Figure 3. Histograms of combined lumbo-cervical locomotor cycle periods (mean values \pm SEM) in intact cord (open bars) and of independent lumbar and cervical periods (filled bars) during reversible sucrose blockade of thoracic cord (**A**) and after cord (at T7) transection (**B**). As indicated by the schematics at the left, **A** is from the same experiments as in Figure 2 and **B** is from a different series of experiments. Numbers of measured preparations are indicated in parentheses. * $p < 0.05$. NS, Not significantly different.

icantly modified by lumbo-cervical separation (Fig. 3A). The original anteroposterior coordination was restored within minutes of removing the sucrose blockade in all seven experiments (Figs. 2C, 3A). These results therefore suggest that the cervical and lumbar locomotor generators share similar intrinsic rhythmogenic capacities (at least in the presence of exogenous 5-HT/NMA/DA) and that neither regional circuit can be considered as the pacemaker leader in their anteroposterior coupling.

These findings, with thoracic cord sucrose blockade, differ from the results of another series of experiments ($n = 7$) in which the cervical and lumbar regions were separated by a complete thoracic cord transection (Fig. 3B) (Ballion et al., 2001), in which experiments were performed on 5-HT/NMDA-activated spinal

cords with the brainstem still present. After sectioning the cord (at T7), the burst period in L2 (3.83 ± 0.56 s) remained similar to the period of the single coordinated rhythm (3.49 ± 0.41 s) recorded before the lesion, but the burst period in C8 was now significantly increased to 10.23 ± 2.65 s ($p < 0.05$) (Fig. 3B), and C8 burst durations were substantially increased (data not shown) (see Discussion).

Existence of a caudorostral connectivity gradient between spinal generators

To explore the neural processes involved in interlimb coordination, the isolated cord was partitioned with a simple Vaseline barrier placed at different thoracic levels to allow differential perfusion of the posterior and anterior cord regions. A total of 25 preparations were used for these experiments, including seven cords with which separate trials were performed with different barrier positions. In control conditions in all cases, both cervical and lumbar generators were first activated by exposure of the entire cord to 5-HT/NMA/DA (Fig. 4A1).

When the mixture was applied selectively to the cord caudal to T10–11 ($n = 13$ experiments), alternate bursting was now systematically induced in bilateral L2 ventral roots (Fig. 4A2), but in most cases, the C8 ventral roots remained silent (Fig. 4B), with only three preparations (23%) expressing coordinated lumbo-cervical rhythmicity. However, the more rostral the placement of the thoracic barrier, the higher the proportion of preparations producing such coordinated lumbo-cervical bursting during selective caudal exposure to 5-HT/NMA/DA [4 of 10 preparations (40%) with barrier at T4–7; all nine preparations (100%) with a

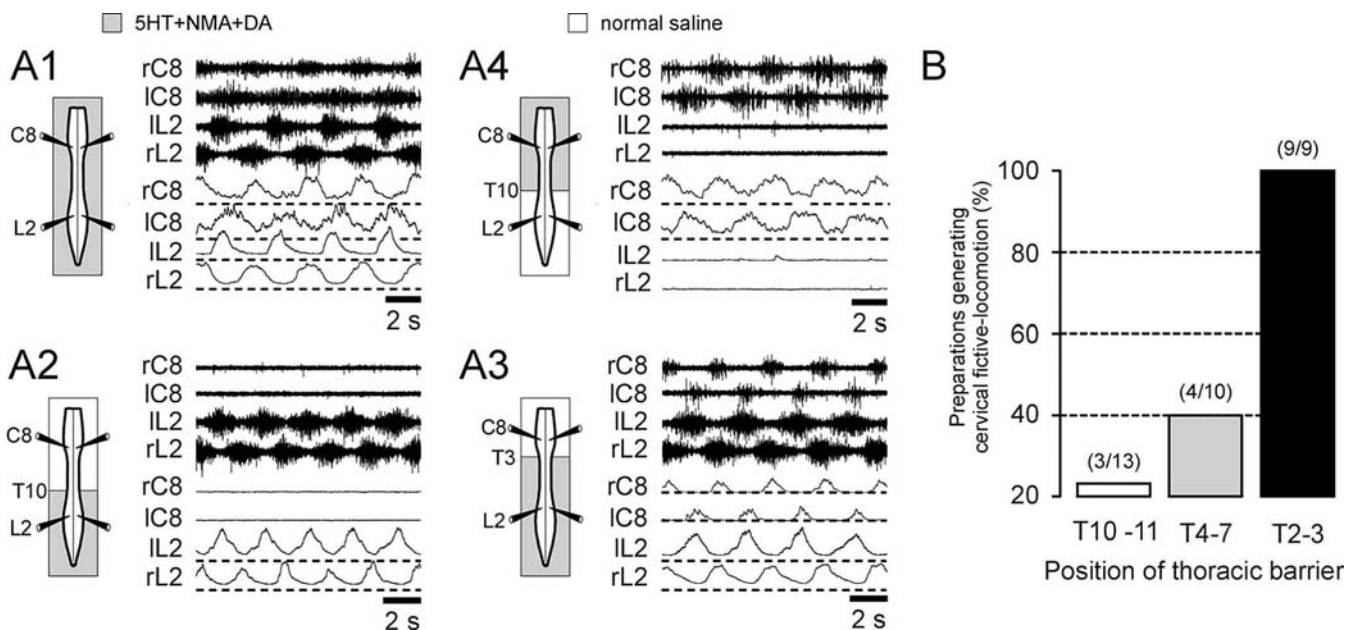


Figure 4. Ability of lumbar generators to drive cervical locomotor rhythmicity. **A**, Raw extracellular and integrated cervical (bilateral C8) and lumbar (bilateral L2) ventral root activity from the same preparation during application of 5-HT/NMA/DA to the whole cord (**A1**; control conditions) and to the spinal region caudal to T10 (**A2**), caudal to T3 (**A3**), and then rostral to T10 (**A4**). Dashed lines below each integrated trace indicate zero levels of background activity corresponding to tonic discharge. **B**, Histograms illustrating the relationship between preparations (proportions indicated in parentheses) producing fictive cervical locomotion during caudal pharmacological activation and thoracic barrier position. C, Cervical ventral root; L, lumbar ventral root.

T2–3 barrier] (Fig. 4A3,B). In the latter cases, it is noteworthy that both the amplitude of cervical bursting and the level of background tonic activity were weaker compared with control whole-cord pharmacological activation (Fig. 4, compare A3 and A1). This presumably corresponded to differences between the experimental activation of the cervical generators by 5-HT/NMA/DA (Fig. 4A1) and the propriospinal action of the lumbar generators on their cervical counterparts via endogenous transmitter release in the absence of exogenous chemicals in the rostral cord region (Fig. 4A3).

In contrast, in a corollary experiment in which 5-HT/NMA/DA was now applied rostral to the thoracic barrier, the chemically activated cervical generators were never able to elicit lumbar locomotor-related activity (Fig. 4A4), whatever the position of the barrier (T4, $n = 5$ trials; T10, $n = 5$ trials). Together, these observations confirm the existence of propriospinal coupling between lumbar and cervical generators, which is predominantly caudorostral in direction, and furthermore, the effectiveness of this ascending influence is enhanced with the number of thoracic segments exposed to caudal 5-HT/NMA/DA activation.

To characterize further this lumbar-to-cervical coordination, a series of split-bath experiments was done in conjunction with pharmacological manipulation of synaptic transmission. Again, spinal cords ($n = 12$) were first activated with 5-HT/NMA/DA to obtain control fictive locomotor patterns (Fig. 5A1) with an out-of-phase coordination between the two sides (Fig. 5A2) (mean cross-correlation coefficient: bilateral C8 ventral roots, -0.38 ± 0.05 ; bilateral L2 roots, -0.64 ± 0.02) (Fig. 5A3). BIC (0.25×10^{-5} M) and STR (0.25×10^{-5} M) were then coapplied caudal to T7 while the entire spinal cord remained activated with 5-HT/NMA/DA. As a consequence of the selective blockade of caudal inhibitory GABA/glycinergic synapses (Bracci et al., 1996), slow synchronous bursting now occurred in the L2 roots of all 12 preparations, but unexpectedly, it also occurred in left–right C8, where inhibitory synapses were not exposed to the antagonists and therefore presumably remained functional (Fig. 5B1,B2). This dramatic alteration to generalized synchronous bursting is reflected in the switch in sign of the cross-correlation coefficients seen in Figure 5B3 (compare with A3), which now corresponded to an in-phase left–right coordination occurring at both caudal and rostral

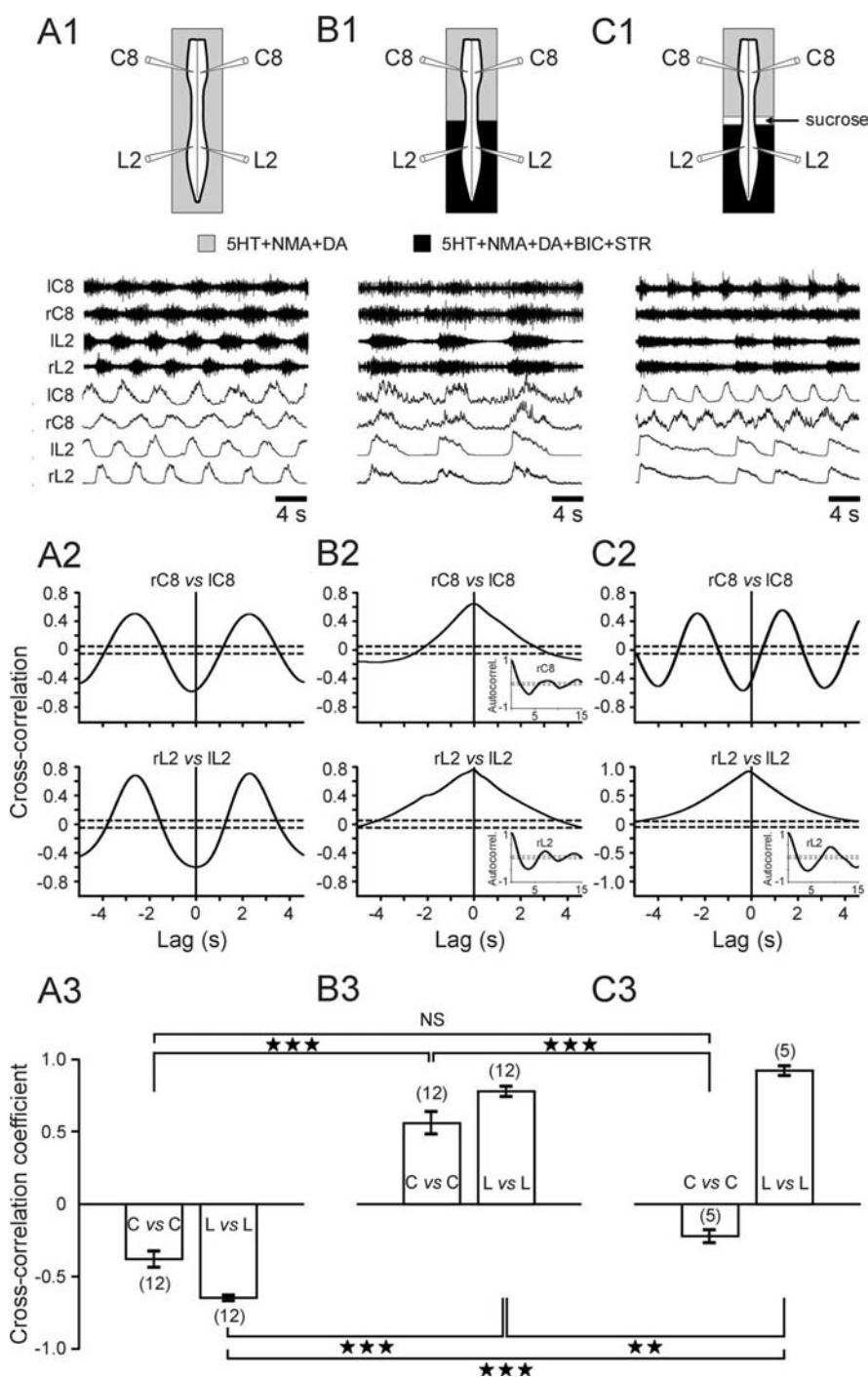


Figure 5. Caudorostral influence from lumbar to cervical generators in the absence of caudal synaptic inhibition. **A1, B1, C1**, Top, Schematics of experimental procedures; bottom, raw (upper) and integrated (lower) ventral root activity at cervical (bilateral C8) and lumbar (bilateral L2) levels during 5-HT/NMA/DA perfusion to the whole cord (**A1**) and (**B1**) when the spinal region caudal to T7 is additionally bathed with BIC (0.25×10^{-5} M) and STR (0.25×10^{-5} M). **C1**, Same saline conditions as in **B1** but after additional sucrose blockade of axonal conduction through thoracic spinal segments. **A2, B2, C2**, Cross-correlograms (corresponding to **A1, B1, C1**, respectively) showing strict alternation (**A2**, control conditions) and then synchronization (**B2**, during lumbar BIC plus STR application) between bilateral ventral roots at both lumbar (L2) and cervical (C8) levels. **C2**, Cross-cord cervical alternation was restored by thoracic cord conduction block, although the lumbar roots continued to burst in synchrony. Each cross-correlogram was computed from 120 to 190 s of activity; dashed lines indicate 95% (± 2 SEM) confidence interval. Auto-correlograms occurring under BIC/STR are added as insets in **B2** and in the bottom of **C2**. **A3, B3, C3**, Mean cross-correlation coefficients (\pm SEM) of left–right motor root activity at cervical (C) and lumbar (L) levels under control saline (**A3**), during caudal blockade of synaptic inhibition (**B3**), and after additional thoracic conduction block (**C3**). Numbers of preparations are indicated in parentheses. ****** $p < 0.01$; ******* $p < 0.001$. NS, Not significantly different.

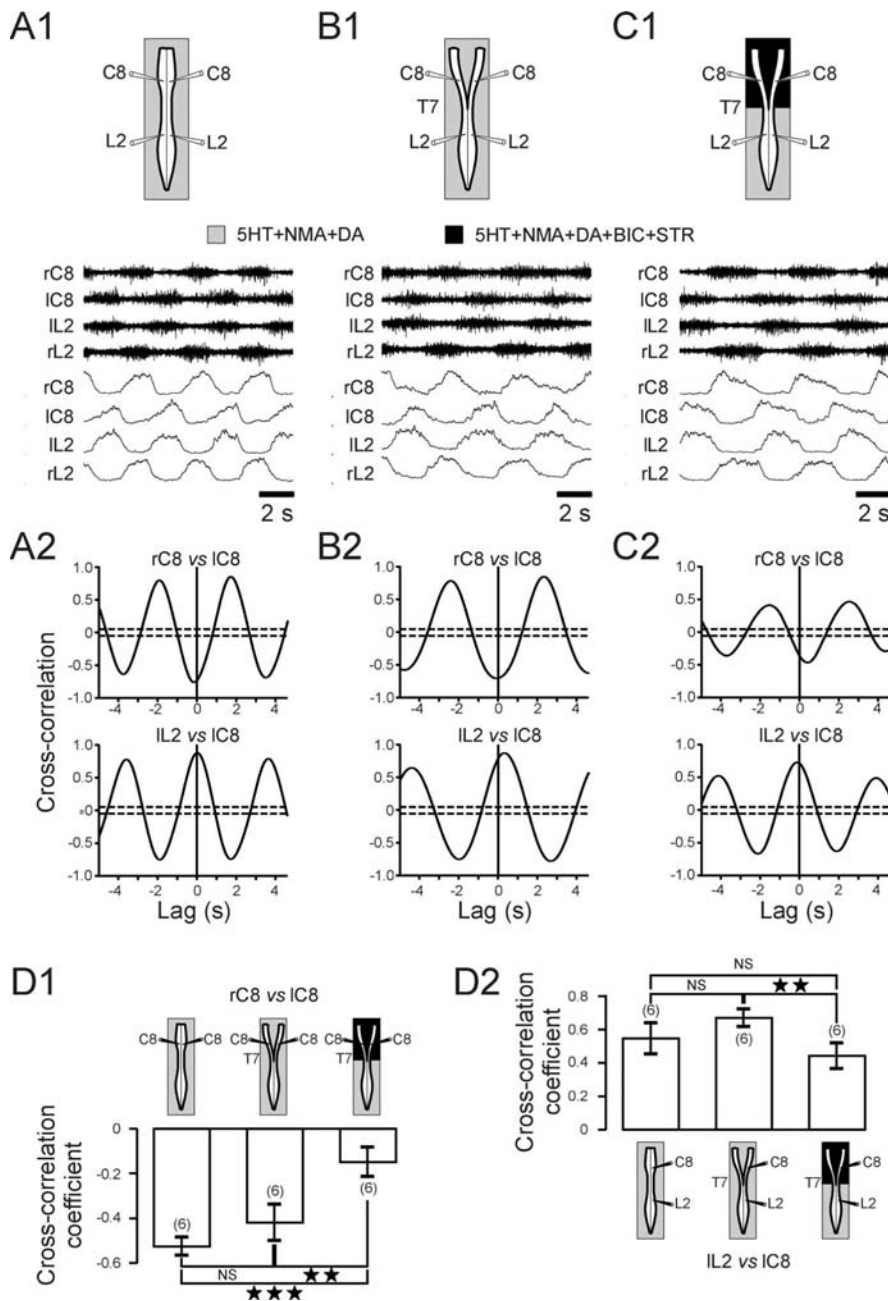


Figure 6. Involvement of ascending lumbar excitation in bilateral cervical alternation and caudorostral coordination. **A1, B1, C1**, Ventral root activity at cervical (bilateral C8) and lumbar (bilateral L2) levels during 5-HT/NMA/DA perfusion to the whole cord (**A1**), after a midsagittal lesion extending from C1 to T7 (**B1**), and when BIC plus STR was additionally applied to the cord anterior to T7 (**C1**). **A2, B2, C2**, Corresponding cross-correlograms illustrating left–right cervical (C8 vs C8) and caudorostral (homolateral L2 vs C8) coordinations in control conditions (**A2**), after sagittal cervicothoracic lesion (**B2**), and then after rostral BIC plus STR application (**C2**). Sample size, 120–190 s. Dashed lines indicate 95% (± 2 SEM) confidence interval. **D**, Mean cross-correlation coefficients (\pm SEM) of right versus left cervical ventral root bursts (**D1**) and homolateral L2 versus C8 (**D2**) motor bursts under the three different experimental conditions. Note that left–right alternation persisted at the cervical level despite longitudinal cord section and pharmacological blockade of cervical synaptic inhibition. Numbers of preparations are indicated in parentheses. $***p < 0.01$; $****p < 0.001$. NS, Not significantly different.

tral spinal levels (L2 ventral roots, 0.78 ± 0.03 ; C8 ventral roots, 0.56 ± 0.07 ; $p < 0.001$). It is also noteworthy that, under these conditions of lumbar inhibitory synaptic blockade, synchronous bursting also occurred in homolateral flexor (L2) and extensor (L5) ventral roots (data not shown). Finally, to verify that the synchronous cervical activity was indeed strictly a result of lum-

bar input, the two spinal regions (still under the same saline conditions) of five preparations were decoupled by a sucrose block placed at the intervening thoracic level (Fig. 5C1, schematic). This led to an immediate restoration of faster, bilaterally alternating activity at the cervical level (Fig. 5C1, top C2, left histogram bars in C3), meaning that the lumbar generators were no longer able to impose their slower, still synchronously bursting rhythm on the cervical CPGs, which were now free to re-express their inherent pattern-generating properties.

In assessing the extent to which lumbar locomotor circuitry can impose temporal patterning at the cervical level, we hypothesized that, under normal conditions, the bilateral alternation of cervical locomotor activity should be governed, at least in part, by alternating input from the lumbar generators. To test this idea, we examined the evolution of left–right and anteroposterior coordination in a 5-HT/NMA/DA-induced locomotor rhythm in six preparations in response to combined axial cord lesions in the rostral region and inhibitory synaptic blockade. Under control chemical activation (Fig. 6A1), the cervical and lumbar generators produced fictive locomotor rhythmicity with a typical out-of-phase coordination between C8 ventral roots (mean cross-correlation coefficient, -0.53 ± 0.04) (Fig. 6A2, left D1), whereas homolateral C8 and L2 roots remained in-phase (mean cross-correlation coefficient, 0.55 ± 0.09) (Fig. 6A2, left D2). To suppress cervical cross-cord connectivity involved in bilateral C8 burst alternation, a midsagittal cord section was made, which extended from C1 to T7 (Fig. 6B1, schematic). Surprisingly, despite this surgical decoupling, an antiphase coordination persisted between the left and right C8 ventral roots (Fig. 6B1), with the mean cross-correlation coefficient displaying a small but insignificant reduction (from -0.42 ± 0.08 ; $p = 0.236$) (Fig. 6B2, middle bar in D1). Similarly, the synchrony between homolateral C8 and L2 was also preserved (Fig. 6B1), showing a positive and statistically unaltered correlation coefficient (0.67 ± 0.05 ; $p = 0.101$) from control (Fig. 6B2, middle bar in D2). Furthermore, when BIC/STR was added to a split-bath compartment that was set up rostral to T7 (Fig. 6C1, schematic), these phase relationships were still maintained (Fig. 6C1, C2), although the mean cross-correlation coefficients were significantly decreased (homologous C8 vs C8, -0.15 ± 0.06 ; homolateral L2 vs C8, 0.44 ± 0.08) (Fig. 6, right D1, D2). These results therefore indicate that both inhibitory and excitatory synaptic pathways from the lumbar generators coordinate cervical locomotor pat-

terns. These results therefore indicate that both inhibitory and excitatory synaptic pathways from the lumbar generators coordinate cervical locomotor pat-

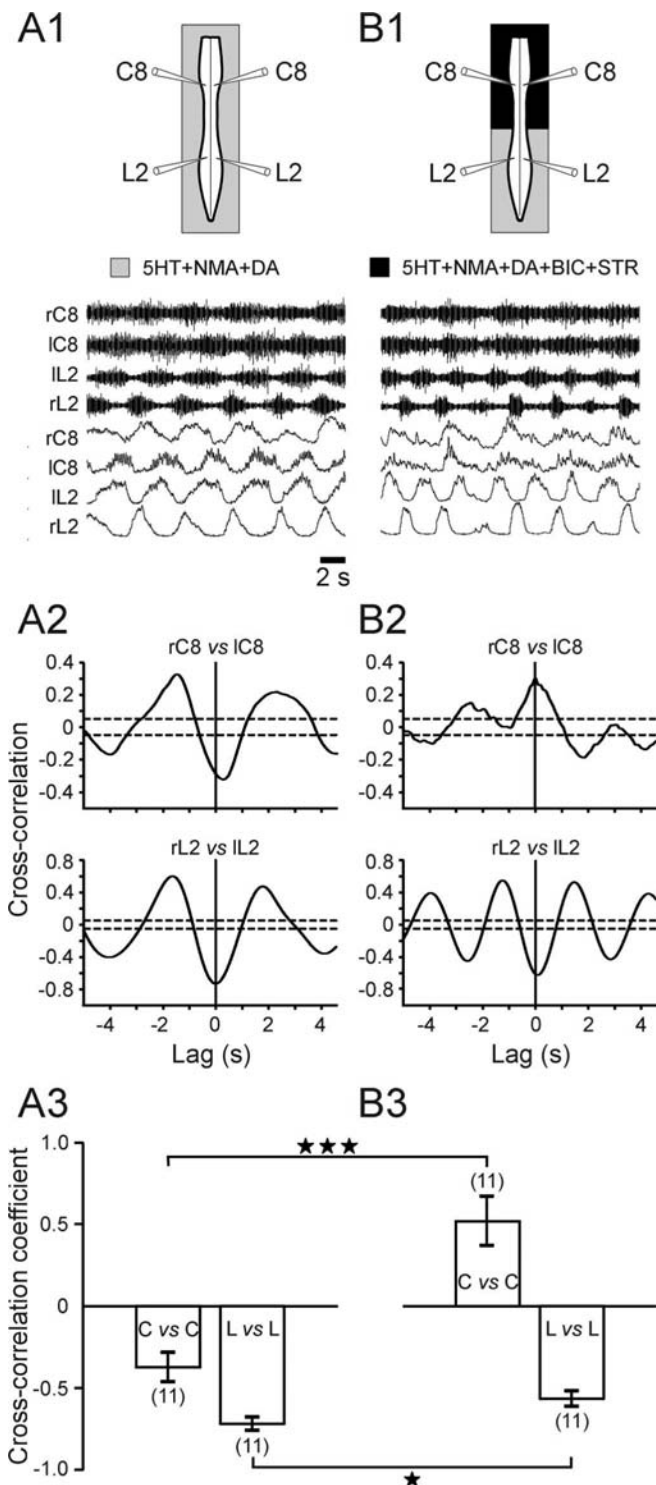


Figure 7. Lack of effect of blockade of cervical synaptic inhibition on bilateral lumbar rhythmicity. **A1, B1**, Ventral root activity at cervical (bilateral C8) and lumbar (bilateral L2) levels during 5-HT/NMA/DA perfusion of the whole cord (**A1**) and when BIC plus STR is added rostrally to T7. **A2, B2**, Cross-correlograms showing coordination between bilateral ventral roots at C8 and L2 levels in control conditions (**A2**) and after rostral BIC plus STR application (**B2**). Note that left and right lumbar rhythmicity continues to alternate while cervical activity becomes bilaterally synchronized. **C**, Mean cross-correlation coefficients (\pm SEM) of right versus left motor root activity. Numbers of preparations are indicated in parentheses. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

tering, with ascending excitation playing a major role in both lumbo-cervical coupling and cervical left–right alternation.

In a final step, the contribution of any descending cervicolumbar influences to interlimb coupling was assessed in a corollary experiment to that of Figure 5, in which saline with BIC/STR was added to regions rostral to T7 of otherwise intact isolated cords ($n = 11$). Under these conditions, cervical left–right alternation in the activated control cord (Fig. 7A1) was replaced by synchronous bursting (Fig. 7B1) with an associated switch in sign of the mean correlation coefficient (-0.37 ± 0.08 vs 0.52 ± 0.15 ; $p < 0.001$) (Fig. 7, top A2, B2, left bars in A3, B3). Importantly, however, the phase relationships at the lumbar level remained unchanged, although the correlation coefficient was slightly but significantly decreased (-0.72 ± 0.04 vs -0.56 ± 0.04 ; $p < 0.05$) (Fig. 7, bottom A2, B2, right bars in A3, B3). It is also noteworthy that cross-correlation analysis revealed a complete lack of cervicolumbar coupling under these experimental conditions (data not shown). Therefore, these findings demonstrate that the cervical generators are unable to impose their rhythm structure on their lumbar counterparts.

Discussion

The findings of this study, which are summarized in Figure 8, show that the locomotor CPGs in the newborn rat spinal cord are interconnected principally via propriospinal neural circuitry that extends from rhythmogenic lumbar to cervical cord levels, involving a caudorostral excitability gradient that derives from a combination of ascending excitatory and inhibitory synaptic influences.

Fictive quadrupedal walking

Recordings from cervical and lumbar motor roots of the isolated spinal cord allowed coupling patterns between the networks that normally control forelimbs and hindlimbs to be compared with the coordination of actual quadrupedal movements in the freely behaving animal. The rhythmic locomotor-like activity recorded *in vitro* displayed a stereotyped diagonal coordination pattern that corresponded to the predominantly walking-like gait observed *in vivo* during both olfactory guided air stepping (Fig. 1A) (Jamon and Clarac, 1998) and free swimming (Bekoff and Trainer, 1979) as well as following pharmacological induction by the intraperitoneal injection of L-DOPA (McEwen et al., 1997). In this way, flexor and extensor synergies occurred between homolateral cervical and lumbar motor bursts, which also fired in strict left–right alternation. It is important to remember that our *in vitro* experiments were performed on completely isolated spinal cords in the absence not only of movement-related proprioceptive feedback but also of the brainstem and other higher structures. Therefore, the coordination patterns seen were necessarily mediated solely by synaptic pathways that were intrinsic to the spinal cord, without the participation of more distributed sensorimotor and supraspinal circuitry, which also play an important role in forelimb–hindlimb coordination (English, 1989).

Coordination of independent cervical and lumbar CPGs

In the present study, the use of a localized thoracic axonal-conduction block to decouple the cervical and lumbar generators unmasked separate cervical rhythmicity, which was clearly locomotor-like in terms of its bilateral alternation, burst duration, and cycle frequency (Figs. 2, 3A). The similarity in cycle frequency of the independent cervical and lumbar generators after sucrose-block separation was unexpected in light of findings reported previously (Ballion et al., 2001) (Fig. 3B), in which cervical rhythmicity expressed after thoracic cord transection was

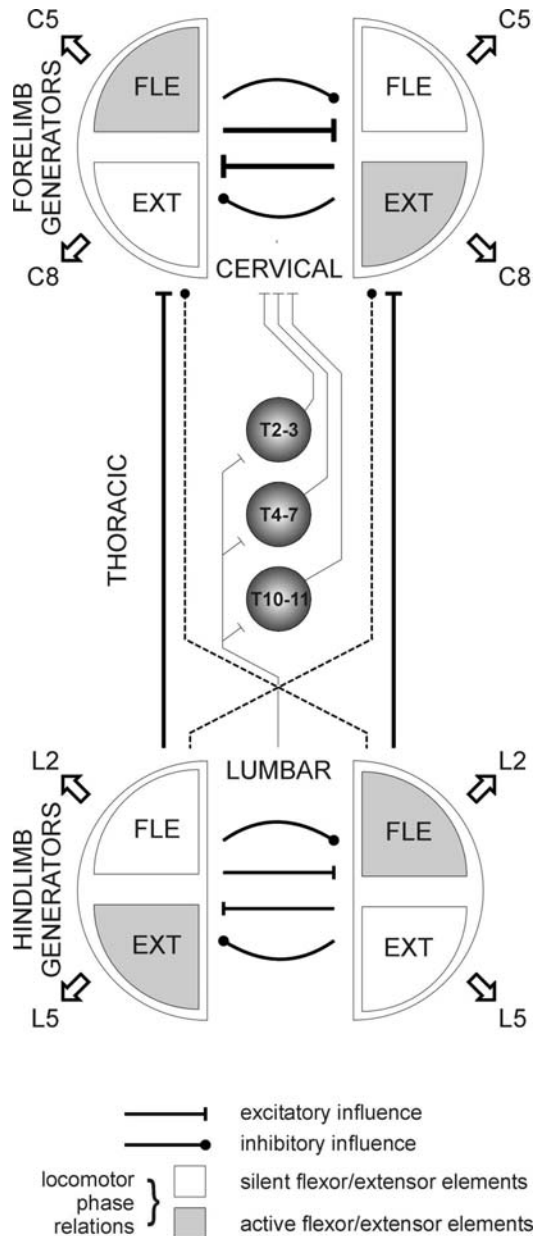


Figure 8. Summary of central spinal pathways contributing to interlimb coordination in quadrupedal locomotion. See Discussion for an explanation. EXT, Extensor; FLE, flexor; T, thoracic segment.

considerably slower than in the intact cord. Although uncertainty remains as to whether the slow, isolated cervical rhythm with prolonged motor bursts corresponded to actual forelimb locomotion (Cowley et al., 2003), our sucrose-block experiments suggest that forelimb locomotor network rhythmogenesis is inherently stronger than previously thought. This, in turn, indicates that thoracic-cord sectioning disrupts the functional integrity of cervical rhythm-generating circuitry and warns against using mechanical lesions alone to assess the modular rhythm-generating capability of spinal circuitry.

Coordination between cervical and lumbar generators is asymmetrical in the sense that rhythmically active lumbar generators can drive their cervical counterparts in the absence of pharmacological activation at the cervical level but not vice versa (Fig. 4). Importantly, moreover, the use of different barrier positions to separate rostral spinal regions from 5-HT/NMA/DA-activated

caudal regions disclosed an ascending lumbar influence on the cervical generators, which increased as a function of the number of drug-exposed thoracic segments. This demonstrates that the thoracic segments are not simply passive conveyors of phasic information from more caudal cord regions but are themselves constitutive elements of a more distributed, rostrally projecting network that is rhythmically active with the lumbar generators. Although the segmental thoracic circuitry is itself not rhythmogenic (Ballion et al., 2001), it evidently undergoes increased excitability in the presence of 5-HT/NMA/DA. Such thoracic region activation, in combination with presumed direct, feedforward axonal projections from each thoracic segment to the cervical region (Fig. 8), indicates a caudorostral excitability gradient that, with sufficient actively participating segments, could drive bilaterally alternating rhythmicity at the nondrug-exposed cervical level (Fig. 4A3).

The active contribution of intervening thoracic segments to caudo-rostral coordination invites comparison with evolutionary-primitive, metamericly segmented vertebrates such as lamprey, frog larvae, and the newt, in which body undulations during swimming are driven by segmentally distributed chains of coupled oscillators that are appropriately coordinated by gradients of neuronal excitability extending progressively along the cord (Matsushima and Grillner, 1992; Tunstall and Roberts, 1994; Delvolvé et al., 1997). However, a fundamental difference is that in these lower vertebrate classes, all coupled segments contribute equally to body propulsion, whereas in quadruped mammals, thoracic cord circuitry uses locomotor and other synaptic drives to produce compensatory movements by axial musculature during a variety of behaviors, including locomotion (Gramsbergen et al., 1999; Cazalets and Bertrand, 2000). However, in fast-running feline mammals, thoracic muscles contribute actively to limb-based propulsion (Hildebrand, 1961), although here, trunk movements are generated by alternating dorsoventral contractions (Koehler et al., 1984).

Pathways mediating lumbar-thoracic control of cervical generators

The extent to which the lumbar generators can influence their cervical partners was particularly evident in experiments in which the left–right coordination of lumbar rhythmicity was selectively altered by pharmacological manipulation. Blockade of synaptic inhibition in the caudal region produced a single, in-phase lumbar rhythm (Cowley and Schmidt, 1995; Bracci et al., 1996) that was also able to drive bilaterally synchronous cervical rhythmicity, despite the maintenance of cross-cord inhibitory connections (see below) that would normally ensure bilateral cervical alternation (Fig. 5). Conversely, the ability of the lumbar generators alone to impose left–right alternation between the cervical generators was revealed by mechanically decoupling the latter with a midsagittal section of the rostral cord region under conditions of whole-cord chemical activation (Fig. 6). This caudo-rostral drive appeared to be mediated principally by homolateral excitatory pathways, because the coordination persisted after additional blockade of synaptic inhibition in the sectioned cervical cord region. However, a slight but significant decrease in the cervical cross-cord coupling coefficient indicated that ascending (possibly diagonal) inhibitory lumbar influences were also involved. Together, therefore, these results suggest that in the newborn rat, a combination of excitatory and inhibitory propriospinal pathways mediate interlimb coordination, with rostrally projecting excitation, in particular, serving both to maintain forelimb–

hindlimb coupling and to reinforce left–right forelimb alternation.

Evidence that left–right forelimb coupling, as for the hindlimb generators (Cowley and Schmidt, 1997; Butt et al., 2002), involves a combination of local reciprocal inhibition and excitation, derived from the switch seen from bilateral alternation to synchrony after blockade of all cervical synaptic inhibition in the chemically activated intact cord (Fig. 7) (Ho, 1997). Under these conditions, however, the lumbar generators were now unable to impose bilateral alternation at the cervical level, indicating that ascending excitation alone was insufficient to counteract the remaining cross-cord excitation in the rostral cord. Finally, it is noteworthy that a bilaterally synchronous cervical rhythm was unable, in a reciprocal manner, to force an in-phase lumbar pattern (Fig. 7), further indicating a substantially weaker descending influence from the cervical to lumbar generators.

A similar dominance of the lumbar generators over their cervical counterparts was previously reported in the spinal rabbit (Viala and Vidal, 1978), in which labile forelimb locomotor rhythmicity was found to be driven by more robust hindlimb network activity. In the neonatal rat spinal cord, however, the similarity in frequencies of the independent cervical and lumbar generators seen after sucrose-block separation suggests that, here, phase coordination between lumbar and cervical locomotor circuitry derives principally from a caudorostral asymmetry in coupling pathways between the two spinal levels rather than from a “trailing oscillator” configuration (Matsushima and Grillner, 1992), in which lumbar oscillators with an intrinsically higher rhythmogenic capacity entrain their less excitable cervical partners. It is also relevant here that earlier in the developing rat spinal cord, the pathways mediating lumbocervical coupling appear to become functional after the lumbar (Nishimaru and Kudo, 2000) and cervical CPG circuits, because uncoordinated rhythmic forelimb and hindlimb movements can occur in the late embryonic animal (Bekoff and Lau, 1980).

The anatomical pathways mediating lumbocervical coordination remain to be identified, although long ascending propriospinal pathways that are presumed to ensure hindlimb–forelimb coordination have been identified in cat spinal columns (English et al., 1985). More recently, a population of so-called “long-range” commissural interneurons has been identified in neonatal rat, which cross the lumbar cord, have ascending contralateral axons (Eide et al., 1999; Stokke et al., 2002), and serve to coordinate bilateral hindlimb locomotor activity (Butt and Kiehn, 2003). However, that the axons of these lumbar interneurons extend to a maximum of only six segments from their segment of origin (Birinyi et al., 2003), at most, renders them potential candidates for the first stage of an indirect, local-circuit pathway to the cervical cord.

Wider implications

Establishing the neural substrates of interlimb coordination in quadrupedal animal models also offers important insights into locomotor neural substrates of bipedal primates (Wannier et al., 2001; Dietz, 2002), with consequent clinical implications (Dietz et al., 1999; Taub et al., 2002). Of particular relevance is the finding that basic neural mechanisms in bipeds and quadrupeds are shared, including spinal CPG circuitry (Dietz, 2002) and propriospinal pathways that coordinate cervical and lumbar networks controlling upper and lower limb movements during locomotion (Nathan et al., 1996). In this context, furthermore, it is interesting that in spinal cord-injured humans, the capacity to re-express normal locomotor movement increases with the level of spinal

lesion (Dietz et al., 1999), indicating that the neuronal circuitry underlying bipedal locomotor rhythmicity is not restricted to a specific spinal region but extends from lumbar through to cervical levels. This is also consistent with our observations in the neonatal rat, in which the degree of coupling between hindlimb and forelimb locomotor-generating networks is enhanced as the functional integrity of thoracolumbar circuitry is increased in the rostral direction.

References

- Ballion B, Morin D, Viala D (2001) Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 14:1727–1738.
- Barrière G, Mellen N, Cazalets JR (2004) Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* 19:1325–1335.
- Bekoff A, Lau B (1980) Interlimb coordination in 20-day-old rat fetuses. *J Exp Zool* 214:173–175.
- Bekoff A, Trainer W (1979) The development of inter-limb co-ordination during swimming in postnatal rats. *J Exp Biol* 83:1–11.
- Birinyi A, Viszokay K, Weber I, Kiehn O, Antal M (2003) Synaptic targets of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats. *J Comp Neurol* 461:429–440.
- Bracci E, Ballerini L, Nistri A (1996) Localization of rhythmogenic networks responsible for spontaneous bursts induced by strychnine and bicuculline in the rat isolated spinal cord. *J Neurosci* 16:7063–7076.
- Brocard F, Vinay L, Clarac F (1999) Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Dev Brain Res* 117:81–89.
- Butt SJ, Kiehn O (2003) Functional identification of interneurons responsible for left–right coordination of hindlimbs in mammals. *Neuron* 38:953–963.
- Butt SJ, Leuret JM, Kiehn O (2002) Organization of left–right coordination in the mammalian locomotor network. *Brain Res Brain Res Rev* 40:107–117.
- Cazalets JR, Bertrand S (2000) Ubiquity of motor networks in the spinal cord of vertebrates. *Brain Res Bull* 53:627–634.
- Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1992) Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J Physiol (Lond)* 455:187–204.
- Cazalets JR, Borde M, Clarac F (1995) Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J Neurosci* 15:4943–4951.
- Cowley KC, Schmidt BJ (1995) Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the *in vitro* neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 74:1109–1117.
- Cowley KC, Schmidt BJ (1997) Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 77:247–259.
- Cowley KC, Zaporozhets E, Schmidt BJ (2003) Influence of the thoracolumbar region on locomotor and non-locomotor rhythm generation *in vitro* neonatal rat spinal cord. *Soc Neurosci Abstr* 29:277.10.
- Delvolvé I, Bem T, Cabelguen J-M (1997) Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*. *J Neurophysiol* 78:638–650.
- Dietz V (2002) Do human bipeds use quadrupedal coordination? *Trends Neurosci* 25:462–467.
- Dietz V, Nakazawa K, Wirz M, Erni T (1999) Level of spinal cord lesion determines locomotor activity in spinal man. *Exp Brain Res* 128:405–409.
- Eide AL, Glover J, Kjaerulff O, Kiehn O (1999) Characterization of commissural interneurons in the lumbar region of the neonatal rat spinal cord. *J Comp Neurol* 403:332–345.
- English AW (1979) Interlimb coordination during stepping in the cat: an electromyographic analysis. *J Neurophysiol* 42:638–650.
- English AW (1989) Interlimb coordination during locomotion. *Am Zool* 29:255–266.
- English AW, Tigges J, Lennard PR (1985) Anatomical organization of long ascending propriospinal neurons in the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 240:349–358.
- Gramsbergen A, Geisler HC, Taekema H, van Eykern LA (1999) The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 112:217–228.

- Grillner S (1981) Control of locomotion in bipeds, tetrapods and fish. In: Handbook of physiology, Sec 2. The nervous system (Brookhardt JM, Mountcastle VB, eds), pp 1179–1236. Bethesda, MD: American Physiological Society.
- Hildebrand M (1961) Further studies on the locomotion of the cheetah. *J Mammal* 42:84–89.
- Ho SM (1997) Rhythmic motor activity and interlimb co-ordination in the developing pouch young of a wallaby (*Macropus eugenii*). *J Physiol (Lond)* 501:623–636.
- Jamon M, Clarac F (1998) Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav Neurosci* 112:1218–1228.
- Juvin L, Nargeot R, Morin D (2003) Central and sensory mechanisms underlying intersegmental coordination in quadrupedal fictive locomotion. *Soc Neurosci Abstr* 29:277.18.
- Kiehn O, Butt SJ (2003) Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog Neurobiol* 70:347–361.
- Kjaerulff O, Kiehn O (1996) Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro*: a lesion study. *J Neurosci* 16:5777–5794.
- Koehler WJ, Schomburg ED, Stephens H (1984) Phasic modulation of trunk muscles afferents during fictive spinal locomotion in cats. *J Physiol (Lond)* 353:187–197.
- Kremer E, Lev-Tov A (1997) Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *J Neurophysiol* 77:1155–1170.
- Marder E, Calabrese RL (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76:687–717.
- Matsushima T, Grillner S (1992) Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord. *J Neurophysiol* 67:373–388.
- McEwen ML, Van Hartesveldt C, Stehouwer DJ (1997) L-DOPA and quipazine elicit air-stepping in neonatal rats with spinal cord transections. *Behav Neurosci* 111:825–833.
- McKenna JE, Prusky GT, Whishaw IQ (2000) Cervical motoneuron topography reflects the proximodistal organization of muscles and movements of the rat forelimb: a retrograde carbocyanine dye analysis. *J Comp Neurol* 419:286–296.
- Nathan PW, Smith M, Deacon P (1996) Vestibulospinal, reticulospinal and descending propriospinal nerve fibres in man. *Brain* 119:1809–1833.
- Navarrete R, Sławińska U, Vrbová G (2002) Electromyographic activity patterns of ankle flexor and extensor muscles during spontaneous and L-DOPA-induced locomotion in freely moving neonatal rats. *Exp Neurol* 173:256–265.
- Nishimaru H, Kudo N (2000) Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Res Bull* 53:661–669.
- Orlovsky GN, Deliagina TG, Grillner S (1999) Quadrupedal locomotion in mammals. In: Neuronal control of locomotion: from mollusc to man (Orlovsky GN, Deliagina, TG, Grillner S, eds), pp 154–246. New York: Oxford UP.
- Rossignol S (1996) Neural control of stereotypic limb movements. In: Handbook of physiology, Sec 12. Exercise: regulation and integration of multiple movements (Rowell RB, Shepherd JT, eds), pp 173–216. Bethesda, MD: American Physiological Society.
- Stein PSG, Grillner S, Selverston AI, Stuart DG (1997) Neurons, networks, and motor behavior. Cambridge, MA: MIT.
- 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* 446:349–359.
- Taub E, Uswatte G, Elbert T (2002) New treatments in neurorehabilitation founded on basic research. *Nat Rev Neurosci* 3:228–236.
- Tunstall MJ, Roberts AA (1994) Longitudinal gradient of synaptic drive in the spinal cord of *Xenopus* embryos and its role in co-ordination of swimming. *J Physiol (Lond)* 474:393–405.
- Viala D, Vidal C (1978) Evidence for distinct spinal locomotion generators supplying respectively fore- and hindlimbs in the rabbit. *Brain Res* 155:182–186.
- Wannier T, Bastiaanse C, Colombo G, Dietz V (2001) Arm to leg coordination in humans during walking, creeping and swimming activities. *Exp Brain Res* 141:375–379.

LOCOMOTOR RHYTHMOGENESIS IN THE ISOLATED POSTNATAL RAT SPINAL CORD: A PHASE-COUPLED SET OF SYMMETRICAL FLEXION-EXTENSION OSCILLATORS

Laurent JUVIN, John SIMMERS et Didier MORIN

Sous-expertise

LOCOMOTOR RHYTHMOGENESIS IN THE ISOLATED RAT SPINAL CORD: A PHASE-COUPLED SET OF SYMMETRICAL FLEXION-EXTENSION OSCILLATORS

Laurent JUVIN, John SIMMERS and Didier MORIN

Universités Bordeaux 1 & 2, Centre National de la Recherche Scientifique,
Bordeaux, France

Running head : Burst timing in quadrupedal locomotor networks

Corresponding author :

Dr Didier MORIN
Université Victor Segalen Bordeaux 2 & CNRS,
Laboratoire Mouvement - Adaptation - Cognition
bâtiment 2A, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

Phone: (33) 05 57 57 47 73

Fax: (33) 05 56 90 14 21

E-mail: didier.morin@umr5543.u-bordeaux2.fr

Pages : 28

Figures : 5

Tables : 1

Abstract : 248 words

ABSTRACT

The temporal properties of limb motoneuron bursting underlying quadrupedal locomotion were investigated in isolated spinal cord preparations from postnatal 0-4 and 10-12 day old rats. When activated either with differing combinations of N-methyl-aspartate (NMA), serotonin (5-HT) and dopamine (DA), or by electrical stimulation of the brainstem, the isolated cord from the P0-4 neonate generated sustained episodes of fictive locomotion with a constant phase relationship between cervical and lumbar ventral root bursts. Alternation occurred between ipsi- and contra-lateral flexor and extensor motor root bursts, and at all cycle rates observed *in vitro*, the cervical and lumbar locomotor networks were active in a diagonal coordination pattern that corresponded to fictive walking. However, unlike typical locomotion in adult animals in which extensor rather than flexor motoneuron bursts vary with cycle period, in the isolated newborn rat cord, an increase in fictive locomotor speed was associated with a decrease in the duration of both extensor *and* flexor bursts, at cervical and lumbar levels. This symmetry in flexor/extensor phase durations did not appear to derive from a latent immaturity of spinal locomotor circuitry at P0-4, since similar parallel relationships between burst and cycle durations were observed in fictive locomotor rhythms recorded from the isolated spinal cords of animals at P10-12, an age when adult-like locomotion occurs. However, EMG recordings from intact P10-12 juveniles during treadmill walking revealed an extensor-dominated pattern as in adult locomotion, thus indicating that descending and/or sensory inputs are normally responsible for imposing extensor biasing on otherwise symmetrically-alternating extensor/flexor oscillators.

Key words: postnatal rat; locomotion; spinal network coordination; flexor and extensor motor bursting; *in vitro* spinal cord.

INTRODUCTION

Mammalian locomotion is generated by localized neuronal circuits or central pattern generators (CPGs) within the spinal cord which interact to produce coordinated movements of the different limbs and body regions. The locomotor CPGs of quadruped mammals consist of half-center modules located in the cervical and lumbar regions of the spinal cord, with each module being responsible for alternate rhythmic contractions of antagonistic flexor and extensor muscle groups in the corresponding forelimb or hindlimb (Grillner 1981). In recent years, considerable progress in understanding the neuronal organization and operation of mammalian locomotor CPG networks has been made using the isolated spinal cord of the newborn rat (Kiehn and Butt 2003), since this *in vitro* preparation can produce rhythmic motor output patterns similar to those underlying locomotion in the intact adult (Smith and Feldman 1987; Cazalets et al. 1992; Cowley and Schmidt 1994; Kiehn and Kjaerulff 1996). Such *in vitro* locomotor-related activity, which can be elicited by neurochemical (*op. cit.*) or brainstem electrical stimulation (Noga et al. 2003; Zaporozhets et al. 2004), thus corresponds to the alternate activation of homologous (left-right) limb muscles of the same (cervical or lumbar) girdle as well as of antagonistic flexor and extensor muscles in each limb. To date the neonatal rat spinal cord model has been mostly used to investigate the neuronal correlates of lumbar CPG activity responsible for rhythmic hindlimb movements. More recently, attention has also become focused on the spinal mechanisms that are necessary to couple the cervical and lumbar CPG networks to produce coordinated quadrupedal locomotion (Ballion et al. 2001; Juvin et al. 2005).

During overground locomotion in adult animal species, including cats (Goslow et al. 1973; Halbertsma 1983), rats (Navarette et al. 2002; Slawinska et al. 2000) and

humans (Grillner et al. 1979), changes in stepping rate typically result from a change in the duration of the extensor (stance) phase of a limb movement cycle whereas the flexor (swing) phase duration remains relatively constant (reviewed by Orlovsky et al. 1999). Thus the duration of extensor-related activity is usually strongly correlated with the locomotor cycle period, whereas flexor activity is not. Consequently, the portion of each cycle occupied by extensor activity tends towards constancy, whereas flexor activity has a consistently shorter duration and occupies a smaller fraction of each cycle as periods become longer.

In principle, the physiological basis for this extensor phase "dominance" or "biasing" during stepping in the freely-behaving animal could derive from one (or a combination) of three different sources: 1), phasic sensory inputs arising from actual limb movements are able differentially to prolong the extensor phase of otherwise simple alternating CPG half-centers (Engberg and Lundberg 1969; Barbeau and Rossignol 1987; McCrea 2001; Rossignol et al. 2006); 2), the extensor biasing in locomotor network activity is conferred by descending influences from the brainstem (Armstrong 1988; Leblond and Gossard 1997); or 3), the extensor/flexor asymmetry is an inbuilt property of the spinal rhythm-generating circuitry itself (Dubuc et al. 1988; Grillner and Dubuc 1988). However, despite a considerable literature on the subject, consistent direct evidence for (or against) any of these possibilities is surprisingly still lacking, possibly in large part due to the necessity to perform the appropriate adult animal experiments *in vivo*, and under differing conditions of decerebration and deafferentation.

Using combined cervical and lumbar ventral root recordings from isolated *in vitro* preparations of the neonatal (P0-4) rat spinal cord, we show here that in contrast to the intact adult, the durations of both extensor and flexor motor root bursts at the

two cord levels vary equally with cycle period during both neurochemically- and electrically-evoked fictive locomotion. Despite several fold changes in cycle period, the isolated cord generated a solitary coordination pattern corresponding to quadrupedal walking. Chemically-evoked fictive locomotion with equal flexor/extensor phase durations was also expressed by isolated spinal cords from juvenile rats at P10-12, when body-supported walking occurs. However, intact P10-12 animals displayed the characteristic adult-like, extensor-dominated pattern during treadmill walking, indicating that the extensor biasing *in vivo* derives from central and/or peripheral inputs to the locomotor CPGs which then revert to simple half-center oscillators after these extrinsic influences are removed. Part of this work has been presented previously in abstract form (Juvin et al. 2006).

METHODS

Dissection and in vitro preparation

Experiments were conducted on two age groups (0-4 and 10-12 days old) of Wistar rats which were anaesthetized by hypothermia and rapidly decapitated and eviscerated. The skin, muscles and bones were removed and the preparation was then placed in a 25 ml chamber filled with circulating (flow rate 5-10 ml/min) artificial cerebrospinal fluid (aCSF; see composition below) maintained at 10°C throughout the dissection. The entire spinal cord was isolated with its ventral roots still attached to allow subsequent extracellular recordings (see below). In some experiments on neonatal (P0-4) animals, one side of the spinal cord and its ventral roots were exposed while the ventral roots of the other side were kept intact. The branch of the deep peroneal nerve to the *tibialis anterior* (ankle flexor muscle) and the *gastrocnemius* (ankle extensor) nerve were then located and sectioned peripherally

at the muscle level to allow locomotor activity to be recorded from their central cut ends. All preparations were placed in a 10 ml recording chamber and superfused continuously (flow rate 3-5 ml/min) with an aCSF warmed to 25°C, equilibrated with 95% O₂ / 5% CO₂ (pH 7.4) and containing (in mM): 113 NaCl, 4.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃ and 11 D-glucose. Experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive.

Ventral root recordings and induction of locomotor activity

Electrical activity of selected spinal ventral roots was recorded using glass suction electrodes or Vaseline-insulated, stainless-steel pin electrodes. Signals were amplified (x10000) by home-made AC amplifiers, bandpass-filtered (0.1-1 kHz), full-wave rectified, integrated ($\tau = 20$ ms), digitized and stored on a computer hard disk (using Spike2 software from Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) for off-line analysis.

In most experiments, rhythmic locomotor-related activity was pharmacologically induced in isolated spinal cords, beginning 2 hr after dissection. Drugs were bath-applied by gravity supply, and unless otherwise specified, consisted of a mixture of N-methyl-D, L-aspartate (NMA, 5 - 20 μ M), serotonin (5-HT, 10 μ M) and dopamine (DA, 100 μ M) (all purchased from Sigma, France).

In a further series of experiments, the brainstem was left attached to the spinal cord in order to stimulate descending spinal pathways without pharmacological activation of spinal locomotor circuitry. The experimental procedure used to stimulate bulbospinal projections capable of inducing locomotor-like activity was previously described in detail (Zaporozhets et al. 2004). Briefly, a stimulating silver wire electrode inserted into a glass capillary was manipulator-positioned in contact with

the medio-ventral surface of the brainstem. Stable, well-organised episodes of fictive locomotion were then elicited by applying stimulus pulse trains (range 2-5 V, 10-20 ms duration at 2 Hz) to the back of the electrode with a digital stimulator (A.M.P.I., Jerusalem, Israel).

EMG recordings and treadmill locomotion

To monitor actual locomotor activity *in vivo*, older (P10-12) rats were anaesthetized by hypothermia until the loss of reflex responsiveness to tail pinching. Bipolar electrodes for electromyography (made from 50 μ m silver wire) were then inserted into the *tibialis anterior* and *gastrocnemius* muscles of a hindlimb and secured externally to the skin by means of tissue glue (collodion, Sigma). Animals were warmed and the temperature of the EMG recording set-up was maintained at $\sim 30^{\circ}\text{C}$ by means of spotlights.

Limb muscle activity was recorded during stable episodes (≥ 10 cycles) of locomotion by rats placed on a low-speed motorized treadmill enclosed in a Plexiglass chamber. Rather than imposing different locomotor speeds, the treadmill was used to sustain fixed-position stepping by manually adjusting the belt velocity with a variable-speed controller to match belt speed to the spontaneous stepping of the animal.

Data Analysis

To evaluate the relationship between the durations of flexor and extensor motor activity and cycle period during fictive and real locomotion, the mean durations of individual ventral root bursts or activity of a given muscle were measured from the integrated transforms of raw electroneurogram (ENG) or electromyogram (EMG)

signals and were then plotted against the corresponding locomotor cycle period. Unless otherwise stated, burst and cycle duration means were calculated from either ≥ 20 randomly selected cycles or ≥ 10 consecutive cycles occurring during a recorded locomotor sequence in a given *in vitro* preparation (ENG) or animal (EMG), respectively. Linear regression lines were then fitted to the scatterplots and coefficients of linear regression (r) were calculated and their statistical significance was established using the Pearson test. The phase of the onsets and terminations of ipsilateral ventral root discharges were determined as a fraction of the corresponding cycle that had elapsed before the start and finish, respectively, of a given burst. The relative onset, offset, and duty cycle (burst duration/cycle period) of cervical and lumbar rhythmic activity were then expressed in a percentage normalized cycle. Statistical values were given as means \pm SEM and differences between means were analyzed using a statistical software package (Sigma Stat for Windows, SPSS, Chicago, IL) and assessed by one-way ANOVA with a Student-Newman-Keuls post-test. Unless otherwise specified, the level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Temporal characteristics of chemically-induced fictive locomotion

As previously reported (Barrière et al. 2004; Juvin et al. 2005), a bath-applied mixture of NMA (10 μ M), 5-HT (10 μ M) and DA (100 μ M) elicited stable bouts of fictive locomotion (mean cycle period 3.2 ± 0.1 s; 13 preparations measured) in otherwise quiescent isolated cords of 0 to 4 day old animals (Table 1; Fig. 1A and B, middle shaded bar). The rhythmic pattern was characterized by a left/right alternation of bursts in homologous motoneurons at both cervical and lumbar levels and consistent with an interlimb coordination appropriate for quadrupedal stepping, an alternation

between activity in homolateral flexor (C5 vs L2) and extensor (C8 vs L5) ventral roots (Fig. 1A).

To assess the extent to which this typical activity pattern in the isolated spinal cords of newborn animals had acquired other basic temporal features of adult locomotion, the relationship between burst and cycle duration during drug-evoked sequences of fictive locomotion was examined. In the first step, in order to ensure unequivocal interpretation of burst-cycle duration relationships, the range of cycle periods expressed by a given *in vitro* preparation was increased by bath-applying NMA at three different concentrations (5, 10 and 20 μM ; Morin and Viala 2002). Under these different NMA concentrations, but with the accompanying 5-HT and DA remaining constant (at 10 μM and 100 μM , respectively), cycle periods varied significantly by >2 fold from a maximum mean value of 4.4 ± 0.3 s (7 preparations) with 5 μM NMA to a minimum mean of 2.1 ± 0.1 s with NMA at 20 μM ($n = 11$) (Table 1 and Fig. 1B, shaded bars).

As seen in Fig. 1C, where individual measurements of homolateral C5/C8 (upper) and L2/L5 (lower) root activity in the cervical and lumbar cord, respectively, were plotted against the corresponding cycle period, the durations of both flexor (C5, L2) and extensor (C8, L5) motor bursts were positively correlated with the cycle period of chemically-induced fictive locomotion over the three NMA concentrations. In L2 roots (Fig. 1C lower, open circles), burst durations ranged from means of 1.1 ± 0.1 s with 20 μM NMA ($n = 11$ preparations) to 2.5 ± 0.2 s with 5 μM NMA ($p < 0.001$; $n = 7$; Table 1). L5 bursts also varied significantly over the same range of NMA concentrations from 1.1 ± 0.1 to 2.7 ± 0.4 s ($p < 0.01$) (Fig. 1C lower, filled circles). The coefficients of linear regression for the flexor (L2) and extensor (L5) burst/period ratios were both strongly positive and had equal values of 0.92 ($p < 0.001$).

As for lumbar activity, a positive correlation also occurred between burst duration and cycle period in homolateral cervical motor output (Fig. 1C upper). Here, flexor (C5) burst durations varied over the range of NMA concentrations from 0.9 ± 0.1 to 2.1 ± 0.1 s ($p < 0.001$), while extensor (C8) bursts altered from 1.3 ± 0.1 to 2.3 ± 0.2 s ($p < 0.01$). Again the corresponding coefficients of linear regression for the cervical flexor and extensor burst-cycle duration relationships were both significantly positive with values of 0.70 ($p < 0.05$) and 0.92 ($p < 0.001$), respectively.

In a set of control experiments, the three different concentrations of NMA (5, 10 or 20 μM) were applied with 5-HT (10 μM) to isolated cords in the absence of DA. Under such conditions, although the range of locomotor cycle periods was significantly reduced (Fig. 1B, open bars) and the rhythms were faster but more irregular (see also Barrière et al. 2004), both extensor and flexor burst durations at cervical and lumbar levels remained significantly correlated with the cycle period (data not shown). This suggests, therefore, that the similar dependence of flexor and extensor burst durations on cycle period did not derive from differential influences of the two exogenous amines when acting in combination (Kiehn and Kjaerulff 1996; see also Barthe and Clarac 1997).

A fictive stepping pattern with phase-constant coordination

During locomotion in freely moving quadrupeds, shifts in speed not only result principally from changes in the stance (extensor) phase of a given limb's movement cycle, but are also accompanied by alterations in forelimb-hindlimb coordination that underlie different locomotor gaits (Orlovsky et al. 1999). To establish whether neural correlates of such changes in interlimb coordination are also expressed by locomotor circuitry in the isolated neonatal rat spinal cord, we determined the phase

relationships between antagonistic cervical and lumbar ventral root bursts during chemically-induced rhythmicity (Fig. 1D). This analysis allowed comparison of the relative onset, offset and duty cycle (the fraction of a cycle during which a given ventral root was active) of motor root bursts within a single normalized cycle. Moreover, to test for any alterations in phase relationships that were related to cycle period, bursts occurring in short- (mean 2.1 s), medium- (3.2 s) and long-duration (4.4 s) cycles that corresponded to the three different NMA concentrations applied (see Fig. 1B) were analyzed separately. However, despite significant modifications in locomotor cycle period under these different neurochemical conditions, the antero-posterior phase relationships, which consisted of a symmetrical out-of-phase coordination between homolateral flexor (C5, L2) and extensor (C8, L5) motor bursts at the cervical and lumbar levels, remained unaltered in the three cycle period categories (Fig. 1D). As expected from the similarly positive correlations of burst durations in flexor and extensor motor roots with cycle period seen in Fig. 1C, the duty cycles of bursts in each of the four roots did not change significantly ($p > 0.05$) over the range of cycle periods examined, with flexor and extensor bursts occupying approximately equal proportions (ca. $\geq 50\%$) of each cycle. Furthermore, the phases in each cycle (arbitrarily defined as the time between the start of consecutive L5 root bursts) at which burst onset and termination occurred did not change significantly or consistently with cycle period in any ventral root (Fig. 1D). These results therefore support the conclusion that the inherent coordination between the activities of cervical and lumbar CPGs in the newborn rat spinal cord is restricted to a single stereotyped pattern in which flexor and extensor motor root bursts express an out-of-phase symmetry that remains constant with varying cycle periods.

Correspondence between ventral root and muscle nerve activity

Flexor and extensor motor pools overlap within the mammalian spinal lumbar enlargement (Nicolopoulos-Stournaras and Iles 1983) and their axons may share the same ventral root exit from the cord (Cowley and Schmidt 1994; Yakovenko et al. 2002). Thus the discharge of individual neurons within a given root population may be masked by overlapping firing in cells with different properties and functions, thereby preventing the accurate determination of single unit burst durations. To assess this potential problem, additional experiments (n = 5) were performed in which identified *tibialis anterior* (TA) and *gastrocnemius* (G) nerve branches that innervate ankle flexor and extensor muscles, respectively, were dissected out until close to their muscle targets. After cord isolation, these muscle nerves were recorded simultaneously with the contralateral L2 and L5 ventral roots (Fig. 2A). Here again, under NMA, 5-HT and DA, the burst durations in identified TA and G terminal nerve branches were positively correlated with locomotor cycle period (Fig. 2B lower), and in a very similar manner to the corresponding whole-root activity recorded on the other side of the cord (Fig. 2B upper). This finding therefore further supports the conclusion that the limb generators in the *in vitro* spinal cord produce alternating rhythmicity in which bursts in individual flexor/extensor motoneurons do indeed co-vary as a function of the fictive step cycle duration.

Locomotor patterns induced by brainstem electrical stimulation

Since the pioneering study of Smith and Feldman (1987), the bath-application of neuroactive substances has been widely used to induce fictive locomotor-like activity in the peri-natal rat spinal cord *in vitro*. However this method has the potential limitation of causing a non-specific activation of spinal neurons, some of which,

although not belonging to the locomotor circuitry *per se*, may exert spurious effects on burst timing during neurochemically-activated CPG output. Therefore, to determine whether generalized drug exposure was somehow shaping the phase durations of motoneuron activity, we employed a more selective means to elicit fictive locomotion, namely via electrical stimulation of descending bulbospinal projections in isolated cords with the brainstem left attached (Fig. 3A). This effective method of eliciting stable locomotor rhythms *in vitro* (Zaporozhets et al. 2004) appears to mimic endogenous brainstem activation of spinal stepping generators, with cycle frequency varying as a function of stimulus intensity (see Methods).

As previously observed during whole-cord neurochemical activation (Figs. 1C, 2B), the duration of both extensor and flexor bursts recorded from homolateral lumbar (Fig. 3B lower) and cervical (Fig. 3B upper) ventral roots remained significantly and positively correlated to the fictive stepping period during brainstem electrical stimulation. Moreover, a statistical comparison revealed no fundamental differences between burst phase relationships in the patterns elicited by the two methods of rhythm induction (compare Figs. 1D and 3C). Here again, the duty cycles of flexor and extensor motor root bursts were similar (occupying approximately 50% of each cycle), and as seen in the phase diagrams of Fig. 3C (which derived from arbitrarily-chosen short, medium, and long duration ranges of cycle period), the relative timing within this symmetrical burst pattern did not change significantly with modifications in cycle duration.

In vivo and in vitro locomotor activity in older (P10-12) animals

The similar temporal relationships of flexor and extensor bursts with cycle period in the isolated spinal cords of P0-4 animals could be an age-related property

of central locomotor circuitry (Vinay et al. 2000), requiring further postnatal development before an ability to generate the mature extensor-dominated pattern emerges. To test this possibility, a series of *in vivo* and *in vitro* experiments ($n = 9$) was conducted on older rats (P10-12) at an age when adult-like patterns of locomotion occur (Westerga and Gramsbergen 1990), while remaining sufficiently young for their spinal cords to stay viable under *in vitro* experimental conditions. Firstly, animals ($n = 5$) were placed on a treadmill in order to monitor actual locomotion via EMG recordings from homolateral *tibialis anterior* and *gastrocnemius* muscles (Fig. 4A1). Under these *in vivo* conditions, and as typically seen in fully adult animals, changes in stepping cycle period were due more to variations in extensor (stance) phase duration than in flexor (swing) phase duration. This is evident in the scatterplots of Fig. 4A2, where the significantly stronger association between extensor (G) muscle activity and step cycle duration ($r = 0.81$) than flexor (TA) muscle activity ($r = 0.52$), resulted in an asymmetrical pattern in which extensor bursts consistently occupied $\geq 50\%$ of the step cycle period, whereas flexor bursts varied less and occupied $< 50\%$ of each cycle.

In 3 from 9 isolated spinal cord preparations taking from a further group of P10-12 animals, bath application of a mixture of NMA, 5-HT and DA at concentrations similar to those used on newborn rats was effective in generating bouts of fictive locomotion with cycle periods ranging from 1 to 5 s. No significant differences were now found between the phase relationships of motor bursts in these older spinal cords (data not shown, but compare Fig. 4B1 with 1A) and those of the chemically-induced locomotor patterns recorded in the cords of P0-4 animals. Moreover, when plotted against cycle period (Fig. 4B2), the durations of both extensor (C8 and L5) and flexor (L2) root bursts displayed an equivalent cycle-period

dependence which was now very similar to that observed during locomotor output in the spinal cords of younger P0-4 animals (compare Fig. 4B2 with Fig. 1C). Therefore, after spinal cord isolation *in vitro*, the locomotor oscillators of P10-12 animals appear to operate as simple alternating half-centres with equal flexion and extension phase durations.

DISCUSSION

This study demonstrates that after isolation *in vitro*, and under either chemical or electrical activation, the neonatal rat spinal cord generates locomotor-related rhythmicity with a single pattern of coordination in which antagonistic flexor and extensor bursts occupy similar proportions of each cycle, and both flexor and extensor phases of the motor rhythm at cervical and lumbar levels remain positively correlated with cycle duration. Thus despite significant modifications in cycle period (by manipulation of NMA concentration or by altering parameters of brainstem stimulation), the fictive gait generated by the isolated cord always corresponded to quadrupedal walking, i.e. alternating bursting in homologous (left-right) motoneurons of the same (cervical or lumbar) segment as well as in homolateral antagonistic (flexor-extensor) motoneurons.

During normal locomotion, proprioceptive feedback from limb muscles and joints as well as descending inputs to the spinal cord have been repeatedly reported to play a crucial role in setting the overall timing of the step cycle by adjusting the durations of the extensor (stance) and flexor (swing) phases of the step cycle and regulating the transitions between these cycle phases (for recent reviews, see McCrea 2001; Lam and Pearson 2002; Rossignol et al. 2006). By selectively phase-advancing or -delaying components of the step cycle, proprioceptive afferents can

adjust the frequency of stepping and match CPG output to actual limb forces and movements. During normal overground or treadmill stepping, intact adult animals usually adapt their speed through a shortening of the stance phase as speed increases, whereas the swing phase remains relatively constant (Goslow et al. 1973; Grillner 1981; Halbertsma 1983; Nicolopoulos-Stournaras and Iles 1984; see Fig. 5 left). A similar asymmetric control of extensor phase duration has been reported in spinalized cats during different speeds of treadmill locomotion (Barbeau and Rossignol, 1987), suggesting that proprioceptive inputs from muscles and/or joints play the major role in locomotor speed adaptation.

Surprisingly, however, direct evidence for such an adaptive influence has been fragmentary and even conflicting. For example, in an early study on fictive locomotor patterns recorded from spinalized and paralyzed cats, no significant differences between the slopes of the burst-cycle duration relationship for limb flexor and extensor motoneurons were observed (Baker et al. 1984). In contrast, a weak or absent dependence of flexor burst duration on cycle period was observed in fictive locomotor patterns recorded from de-afferented decorticate cats (Grillner and Zangger 1984), or paralyzed (Grillner and Dubuc 1988) or de-efferented spinal preparations (Pearson and Rossignol 1991), appearing to suggest that phasic sensory feedback does not after all make a major contribution to extensor/flexor burst duration asymmetries in the normal intact animal. Indeed, it has been inferred that the preferential alteration in extensor burst duration during changing locomotor speeds derives from hard-wired asymmetry in the central locomotor CPG circuitry itself (Grillner and Dubuc 1988), since in spinal and decorticate cat preparations, flexor and extensor burst durations were reported to showed the same asymmetrical relationship with cycle duration as in ordinary intact locomotion.

Inconsistent data have also been previously reported in the neonatal rat. For example, Navarrete et al. (2002) reported that L-DOPA-induced locomotion in freely moving neonatal rats differs from overground locomotion in the adult in that the activity durations of extensor and flexor muscles in newborn animals appear to be equally correlated to step cycle period. However, this conclusion derived from a limited range of cycle durations for a given preparation, thereby risking ambiguity in apparent burst-cycle duration relationships. In contrast, Kiehn and Kjaerulff (1996) reported in the *in vitro* neonatal rat that extensor EMG burst durations are more strongly correlated with cycle period than flexor muscle activity, although these relationships are more variable than in the adult locomotor pattern, with the strength of the extensor/flexor asymmetry appearing to differ according to the neurochemicals used for rhythm induction. In this latter study, however, semi-isolated preparations were used in which the recorded hind-limb remained attached to the spinal cord, and thus the observation of adult-like extensor burst dominance remained consistent with a biasing action of sensory feedback from the still intact limb. In our experiments on completely isolated spinal cords, exposure to 5HT alone or in combination with DA produced locomotor rhythms with different frequency ranges, but otherwise the basic temporal properties of the two patterns remained similar. In addition, our finding that brainstem electrical stimulation also elicited symmetrical flexor/extensor locomotor patterns further argues against the possibility that pharmacological rhythm-induction was somehow responsible for selectively altering the relationship between flexor burst duration and step cycle period.

The possibility that the extensor phase dominance seen during intact adult locomotion may reflect an intrinsic asymmetry in central locomotor circuitry has been called into question by a recent study of brainstem stimulation-induced fictive

locomotion in adult decerebrate cats by Yakovenko et al. (2005), who reported that depending on the preparation, spontaneous variations in cycle duration could be due to changes in either extensor or flexor phase durations. Moreover, modelling revealed that such alternative phase dominance could be explained by inherent imbalances in the background excitatory drive to the extensor and flexor CPG half-centers. Our present results are therefore consistent with, and extend on, this view (see also Baker et al. 1984): when completely deprived of supraspinal and proprioceptive influences under steady-state *in vitro* conditions (Fig. 5 right), the half-centers of each locomotory CPG are presumably exposed to equivalent levels of background excitation, thereby leading to an unbiased responsiveness of flexor and extensor burst durations to cycle period changes. This lack of bias in the fictive locomotor patterns of isolated spinal cords of both P10-12 and younger P0-P4 animals was also evident from the similarity in the duty cycles of flexor and extensor bursts, both of which remained relatively constant at 50 - 55% at all cycle periods. This is in contrast to the strongly asymmetrical flexor/extensor duty cycle ratios found *in vivo* during overground locomotion in P3 and P10 rats alike (Jamon and Clarac 1998), where flexor and extensor muscle activity occupy ca. 30% and 70%, respectively, of an average step cycle (see also Fig. 4A2). Interestingly, during air-stepping in body-supported neonatal rat (P3), in which load detecting sensory inputs are presumably diminished in the absence of ground contact (Fady et al. 1998), the duty cycles of flexor and extensor bursts display closer equivalence at >40% and <60% of the step cycle, respectively.

Similar differences in the flexor/extensor phase durations are evident from the qualitative inspection of limb muscle and nerve recordings from mice during real (*in vivo*) and fictive (*in vitro*) locomotion (see for example Fig. 1 in Gordon and Whelan

2006). Whereas during intact adult treadmill walking a typical extensor phase-dominance can be seen (Pearson et al. 2005), during fictive locomotion in the isolated neonatal mouse spinal cord, a symmetrical flexor/extensor phase relationship occurs (Whelan et al. 2000). In semi-isolated spinal cord preparations, moreover, without the brainstem but with the hind limbs attached, intermediate levels of asymmetry in the flexor/extensor phase durations are now apparent (Gordon and Whelan 2006; Pearson et al. 2003).

In conclusion, our findings in the rat at early postnatal and juvenile stages are in general agreement with the original hypothesis of Engberg and Lundberg (1969) in which the unit CPGs for both forelimbs and hindlimbs consist of simple flexor and extensor half-centers that contribute equally to rhythmogenesis, but during normal locomotion, an extensor half-center dominance is conferred by sensory feedback from the moving limb and/or by descending inputs from the brainstem.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Charlotte Micon for assistance with the peripheral limb-nerve recording experiments.

GRANTS

This research was supported by grants from the "Conseil Régional d'Aquitaine / Fond Européen du Développement Régional" and the "Fondation pour la Recherche Médicale". Laurent Juvin was also supported by the "Demain Debout" and "Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale" organizations.

REFERENCES

- Armstrong DM.** The supraspinal control of mammalian locomotion. *J Physiol.* 405: 1-37, 1988.
- Baker LL, Chandler SH, and Goldberg LJ.** L-dopa-induced locomotor-like activity in ankle flexor and extensor nerves of chronic and acute spinal cats. *Exp Neurol* 86: 515-26, 1984.
- Ballion B, Morin D, and Viala D.** Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 14:1727-1738, 2001.
- Barbeau H and Rossignol S.** Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412: 84-95, 1987.
- Barrière G, Mellen N, and Cazalets JR.** Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* 19:1325-1335, 2004.
- Barthe JY and Clarac F.** Modulation of the spinal network for locomotion by substance P in the neonatal rat. *Exp Brain Res* 115:485-492, 1997.
- Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y, and Clarac F.** Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J Physiol* 455:187-204, 1992.
- Cowley KC and Schmidt BJ.** Some limitations of ventral root recordings for monitoring locomotion in the in vitro neonatal rat spinal cord preparation. *Neurosci Lett* 171:142-146, 1994.
- Dubuc R, Cabelguen JM, and Rossignol S.** Rhythmic fluctuations of dorsal root potentials and antidromic discharges of primary afferents during fictive locomotion in the cat. *J Neurophysiol* 60:2014-2036, 1988.
- Engberg I and Lundberg A.** An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiol Scand* 75: 614-630, 1969.
- Fady J-C, Jamon M, and Clarac F.** Early olfactory-induced rhythmic limb activity in the newborn rat. *Dev Brain Res* 108: 111-123, 1998.
- Gordon IT and Whelan PJ.** Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators. *J Exp Biol* 209: 2007-2013, 2006.
- Goslow GE, Reinking R M, and Stuart DG.** The cat step cycle: hind limb joint angles and muscle lengths during unrestrained locomotion. *J Morphol* 141: 1-41, 1973.
- Grillner S.** Control of locomotion in bipeds, tetrapods and fish. In: Handbook of physiology, Sec 2. The nervous system (Brookhardt JM, Mountcastle VB, eds), Bethesda, MD: American Physiological Society, pp 1179-1236, 1981.

- Grillner S and Dubuc R.** Control of locomotion in vertebrates: spinal and supraspinal mechanisms. *Adv Neurol* 47: 425-453, 1988.
- Grillner S, Halbertsma J, Nilsson J, and Thortensson A.** The adaptation to speed in human locomotion. *Brain Res* 165: 177-182, 1979.
- Grillner S and Zangger P.** The effect of dorsal root transection on the efferent motor pattern in the cat's hindlimb during locomotion. *Acta Physiol Scand* 120: 393-405, 1984.
- Halbertsma JM.** The stride cycle of the cat: the modelling of locomotion by computerized analysis of automatic recordings. *Acta Physiol Scand Suppl* 521:1-75, 1983.
- Jamon M and Clarac F.** Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav Neurosci* 112:1218-1228, 1998.
- Juvin L, Simmers J, and Morin D.** Remote sensory control of locomotor pattern-generator coordination in neonatal rat. *Soc Neurosci Abstr* 252, 2006.
- Juvin L, Simmers J, and Morin D.** Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J Neurosci* 25:6025-6035, 2005.
- Kiehn O and Butt SJ.** Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog Neurobiol* 70:347-361, 2003.
- Kiehn O and Kjaerulff O.** Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *J Neurophysiol* 75: 1472-1482, 1996.
- Lam T and Pearson KG.** The role of proprioceptive feedback in the regulation and adaptation of locomotor activity. *Adv Exp Med Biol* 508: 343-355, 2002.
- Leblond H and Gossard J-P.** Supraspinal and segmental signals can be transmitted through separate spinal cord pathways to enhance locomotor activity in extensor muscles in the cat. *Exp Brain Res* 114: 188-192, 1997.
- McCrea DA.** Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J Physiol* 533: 41-50, 2001.
- Morin D and Viala D.** Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs. *J Neurosci* 22: 4756-4765, 2002.
- Navarrete R, Slawinska U, and Vrbova G.** Electromyographic activity patterns of ankle flexor and extensor muscles during spontaneous and L-DOPA-induced locomotion in freely moving neonatal rats. *Exp Neurol* 173: 256-265, 2002.

- Nicolopoulos-Stournaras S and Iles JF.** Hindlimb muscle activity during locomotion in the rat (*Rattus norvegicus*) (Rodentia-Muridea). *J Zool (Lond)* 203: 427-440, 1984.
- Nicolopoulos-Stournaras S and Iles JF.** Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 217: 75-85, 1983.
- Noga BR, Kriellaars DJ, Brownstone RM, and Jordan LM.** Mechanism for activation of locomotor centers in the spinal cord by stimulation of the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90: 1464-1478, 2003.
- Orlovsky GN, Deliagina TG, and Grillner S.** Quadrupedal locomotion in mammals. In *Neuronal control of locomotion: from mollusc to man*, edited by Orlovsky GN, Deliagina, TG, and Grillner S. New York, USA: Oxford University Press, 1999, p. 154-246.
- Pearson KG, Acharya H, and Fouad K.** A new electrode configuration for recording electromyographic activity in behaving mice. *J Neurosci Methods* 148: 36-42, 2005.
- Pearson KG and Rossignol S.** Fictive motor patterns in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 66: 1874-1887, 1991.
- Pearson SA, Mouihate A, Pittman QJ, and Whelan PJ.** Peptidergic activation of locomotor pattern generators in the neonatal spinal cord. *J Neurosci* 23: 10154-10163, 2003.
- Rossignol S, Dubuc R, and Gossard JP.** Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86: 89-154, 2006.
- Slawinska U, Majczynski H, and Djavadian R.** Recovery of hindlimb motor functions after spinal cord transection is enhanced by grafts of the embryonic raphe nuclei. *Exp Brain Res* 132: 27-38, 2000.
- Smith JC and Feldman JL.** In vitro brainstem-spinal cord preparations for the study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J Neurosci Meth* 21: 321-333, 1987.
- Vinay L, Brocard F, and Clarac F.** Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 12: 4562-4566, 2000.
- Westerga J and Gramsbergen A.** The development of locomotion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 57: 163-174, 1990.
- Whelan P, Bonnot A, and O'Donovan MJ.** Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J Neurophysiol* 84: 2821-2933, 2000.

Yakovenko S, McCrea DA, Stecina K, and Prochazka A. Control of locomotor cycle durations. *J Neurophysiol* 94: 1057-1065, 2005.

Yakovenko S, Mushahwar V, VanderHorst V, Holstege G, and Prochazka A. Spatiotemporal activation of lumbosacral motoneurons in the locomotor step cycle. *J Neurophysiol* 87: 1542-1553, 2002.

Zaporozhets E, Cowley KC, and Schmidt BJ. A reliable technique for the induction of locomotor-like activity in the in vitro neonatal rat spinal cord using brainstem electrical stimulation. *J Neurosci Meth* 139: 33-41, 2004.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Motor pattern generation for fictive quadrupedal stepping in neonatal rat (P0-4) spinal cord. *A: left*, Schematic of isolated spinal cord with extracellular recording locations from homolateral (r, right) cervical (flexor, C5; extensor, C8) and lumbar (flexor, L2; extensor, L5) ventral roots. *right*, Raw extracellular and corresponding integrated (*j*) activity during fictive locomotion evoked by bath-application of NMA (10 μ M), 5-HT (10 μ M) and DA (100 μ M). *B*: Histograms showing relationship between cycle period of chemically-induced rhythmicity and the concentration (5, 10 or 20 μ M) of NMA used with 5-HT alone (open bars), or with 5-HT + DA (shaded bars). Vertical lines indicate SEM and numbers of measured preparations for each condition are indicated in parentheses. *, $p < 0.05$; NS, not significant. *C*: Scatter plots showing the relationship between homolateral lumbar (lower) and cervical (upper) burst durations and rhythm cycle period. Data pooled from 13 preparations. Each point represents the mean burst duration for at least 20 cycles of the same duration from a single preparation. A given preparation can be represented by up to 3 points. Both flexor (L2, C5; open circles) and extensor (L5, C8; filled circles) burst durations are positively correlated with cycle period. Each line is the linear regression for the corresponding pool of flexor and extensor bursts. r , coefficient of linear regression. *D*: Phase diagrams showing two normalized cycles of fictive locomotion under different NMA concentrations (*top*, 5 μ M; *middle*, 10 μ M; *bottom*, 20 μ M). Cycles were normalized to the onset of consecutive bursts of activity in the L5 ventral root. Despite differences in mean cycle period, the phase relationships in all three cases remained constant and corresponded to fictive walking.

FIG. 2. Correspondence between locomotor-related bursting recorded from lumbar ventral roots and identified peripheral limb nerves. *A*: Experimental preparation (left) showing recording positions from right lumbar roots (rL2 and rL5), and the left *tibialis anterior* (ITA) and *gastrocnemius* (IG) nerve branches, and activity pattern (raw and integrated traces at right) induced by a mixture of NMA (10 μ M), 5HT (10 μ M) and DA (100 μ M). *B*: Scatter plots of burst duration versus cycle period for flexor (L2) and extensor (L5) ventral root activity (upper), and flexor (TA) and extensor (G) peripheral nerve activity (lower). Note the similarity in the relations between burst and cycle duration at the two recording levels. Data were pooled from 5 preparations, with each point representing the burst-cycle duration ratio for a single cycle.

FIG. 3. Brainstem electrical stimulation also induces phase-locked fictive locomotion in the isolated P0-4 spinal cord. *A*: Schematic of brainstem/spinal cord preparation (left) and extracellular recordings (right) from homolateral cervical (C5, C8) and lumbar (L2, L5) ventral roots during electrical stimulation (stim; lower trace) of the ventral surface of the brainstem. *B*: Flexor/extensor burst durations at lumbar (lower plots) and cervical (upper plots) levels as a function of rhythm cycle period. Each point represents the mean burst duration for at least 20 cycles in a single preparation. The data set was obtained from 11 preparations, with a given preparation being represented by up to three points. *C*: Phase diagrams showing two normalized fictive step cycles during electrically-evoked fictive locomotion. Cycles were normalized to burst onset in right L5. To test for cycle period-dependent changes in phase relationships, bursts were divided into three cycle period groups (with means (P) of 6.4 s, 4.2 s and 3.0 s) and their phase diagrams were constructed separately.

FIG. 4. Real and fictive locomotion in 10-12 day old rats. *A1*: Treadmill locomotion of intact animal (see schematic at left) during EMG recordings from the flexor *tibialis anterior* (TA) and extensor *gastrocnemius* (G) muscles of the same hindlimb. *B1*: Chemically-induced fictive locomotion in the isolated spinal cord as recorded from cervical (C8) and lumbar (left/right L2 and L5) ventral roots. NMA, 5-HT and DA were bath-applied at 10, 10 and 100 μ M, respectively. *A2-B2*: Scatter plots showing relationships between the duration of flexor (open circles) and extensor activity (filled symbols) and real (*A2*) or fictive (*B2*) locomotor cycle period. In both cases, each point represents the mean burst duration for ≥ 10 cycles of the same duration in a single preparation. Data sets in *A2* and *B2* were obtained from 5 and 3 animals, respectively.

FIG. 5. Schematic representation of locomotor circuitry responsible for flexor (Fle) and extensor (Ext) burst activity during real (*in vivo*) and fictive (*in vitro*) quadrupedal locomotion. Shaded circles denote same phase flexor/extensor activity at bilateral cervical (C5, C8) and lumbar (L2, L5) levels. Note left-right and homolateral flexor-extensor alternation corresponding to a walking gait. In the intact stepping animal (left panel) with brainstem descending pathways and movement-derived sensory input from the limbs, the step cycle is dominated by extensor muscle activity, the duration of which is positively correlated with the cycle period while flexor activity changes much less. In the isolated cord however (right panel), descending and sensory inputs are absent and the fictive locomotor pattern now consists of symmetrical flexor-extensor alternation, with bursts in both phases displaying a positive correlation with cycle duration. See Discussion for further explanation.

TABLE 1. Cycle periods and motor burst durations of fictive locomotion recorded simultaneously from homolateral cervical (C5, C8) and lumbar (L2, L5) ventral roots of isolated spinal cords after bath application of three different concentrations of NMA together with 5HT and DA at constant concentrations of 10 μ M and 100 μ M, respectively.

NMA (μ M)	N	Locomotor Period (s)	Burst Duration (s)			
			C5	C8	L2	L5
5	7	4.4 \pm 0.3	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.2	2.5 \pm 0.2	2.7 \pm 0.4
10	13	3.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1
20	11	2.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1

N: number of preparations, §: p<0.001, £: p<0.01, NS: non-significant

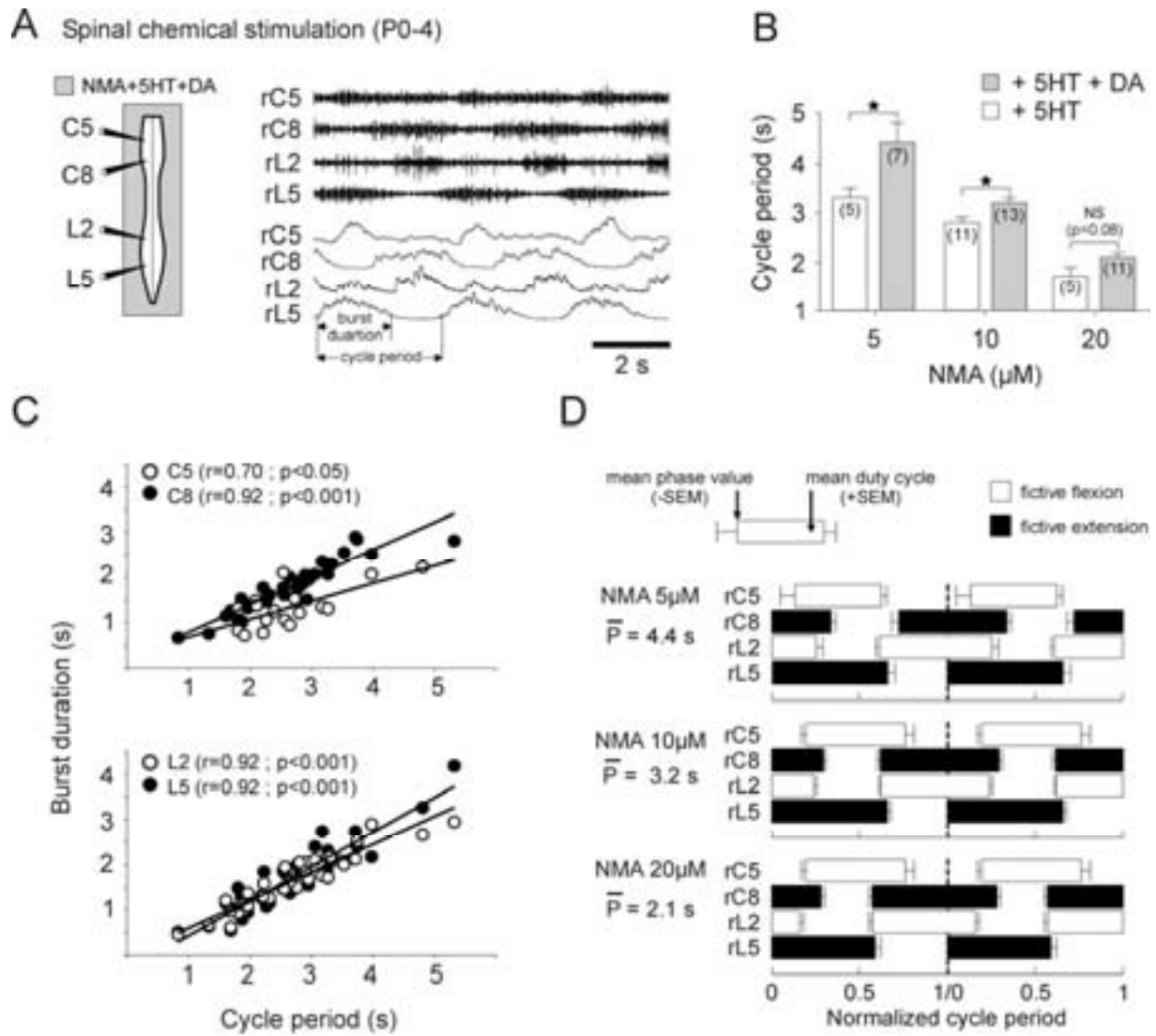


Figure 1

Juvin, Simmers, Morin

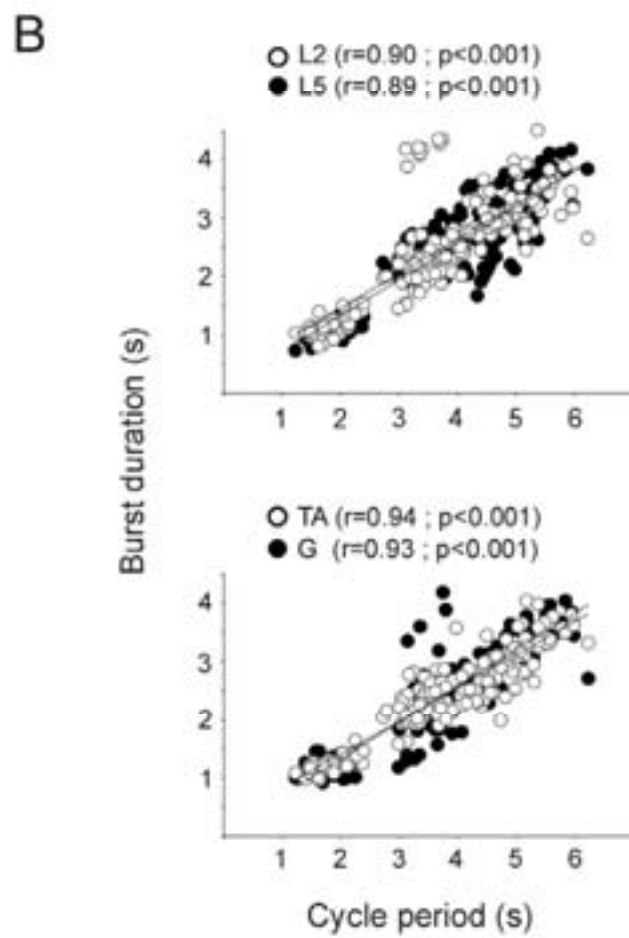
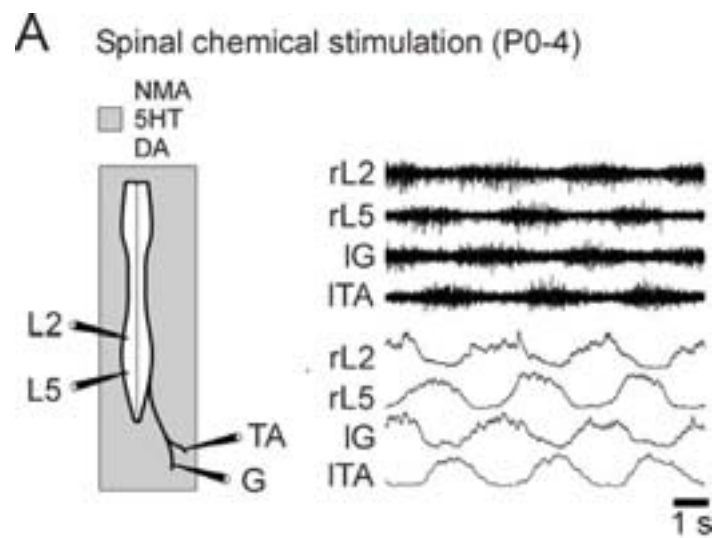


Figure 2

Juvin, Simmers, Morin

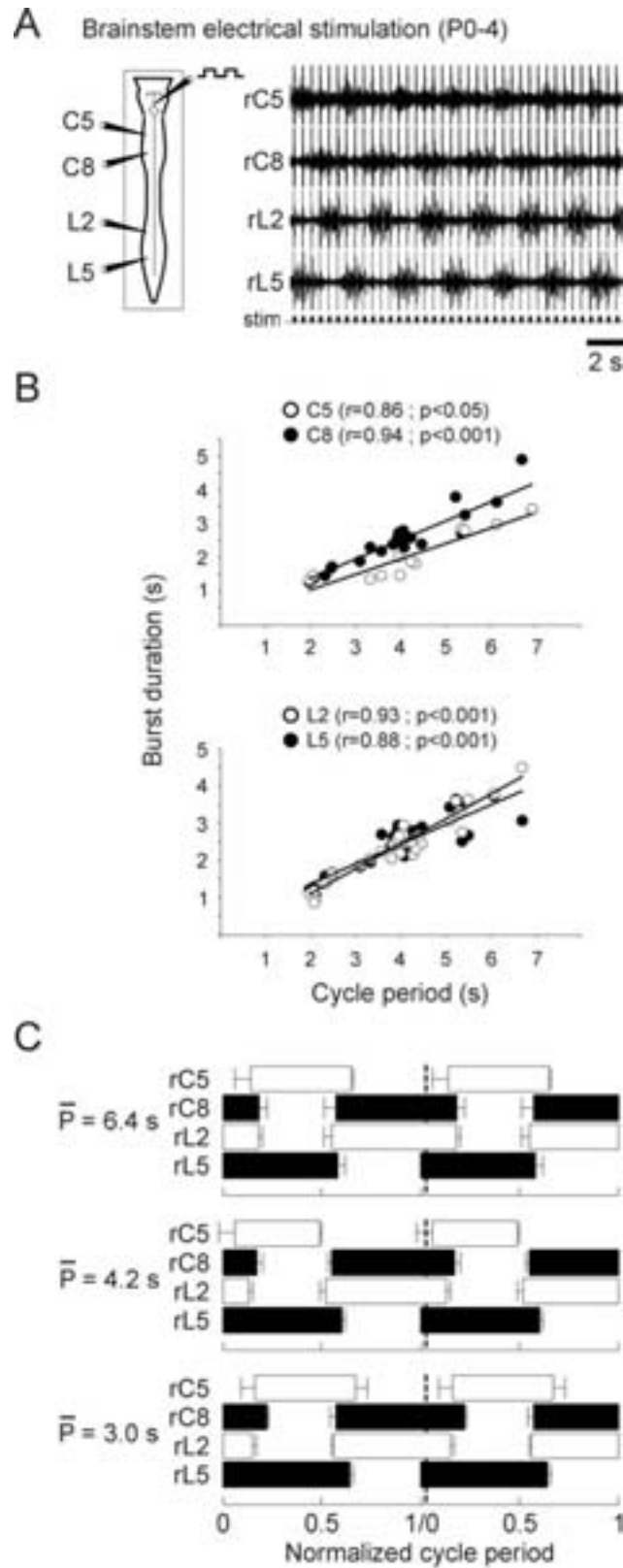


Figure 3

Juvin, Simmers, Morin

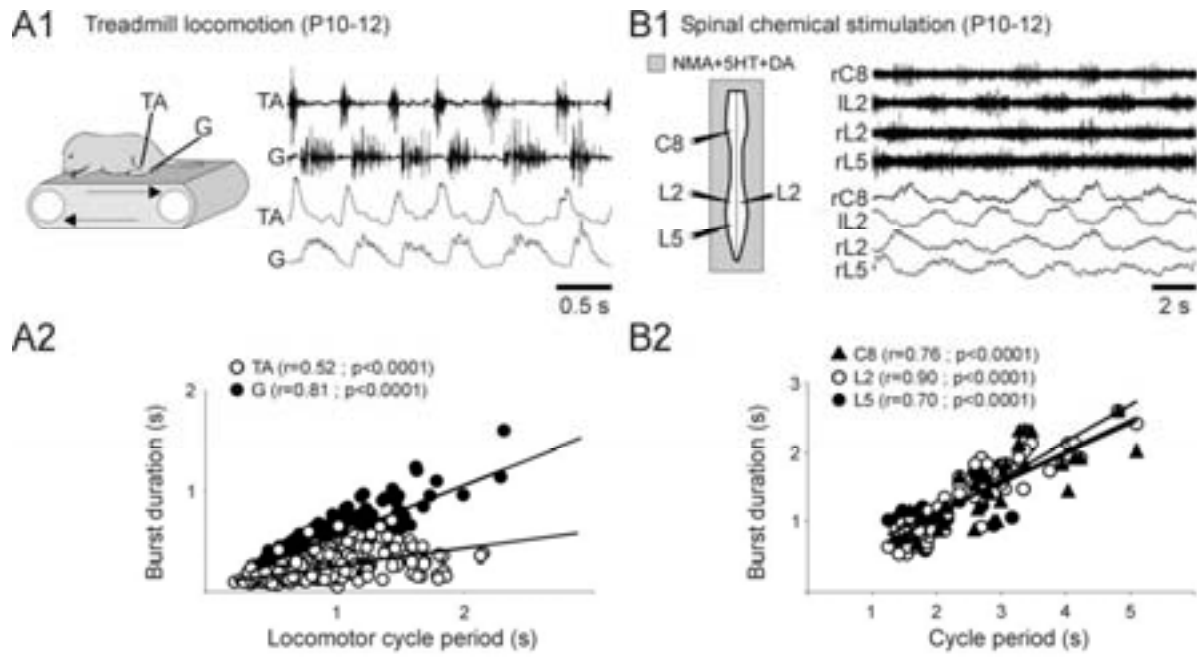


Figure 4

Juvin, Simmers, Morin

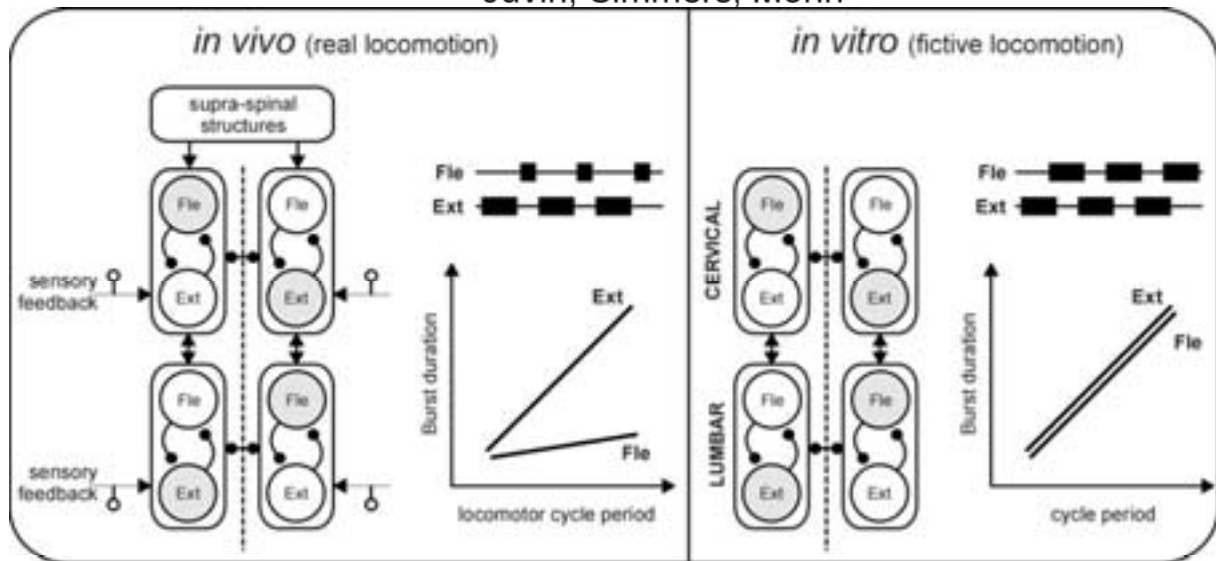


Figure 5

Juvin, Simmers, Morin

ARTICLE ORIGINAL

DESCENDING RESPIRATORY POLYSYNAPTIC INPUTS TO CERVICAL AND THORACIC
MOTONEURONS DIMINISH DURING EARLY POSTNATAL MATURATION IN RAT SPINAL CORD

Laurent JUVIN et Didier MORIN

European Journal of Neuroscience (2005) 21: 808–813

SHORT COMMUNICATION

Descending respiratory polysynaptic inputs to cervical and thoracic motoneurons diminish during early postnatal maturation in rat spinal cord

Laurent Juvin and Didier Morin

Universités Bordeaux 1 & Victor Segalen Bordeaux 2, Laboratoire Physiologie et Physiopathologie de la Signalisation Cellulaire, UMR CNRS 5543, Equipe Neurobiologie Adaptative des Systèmes Moteurs, zone Nord, bâtiment 2A, BP 22, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Keywords: *in vitro* preparation, mammal, respiration, spinal development, Sprague–Dawley rat

Abstract

Isolated brainstem–spinal cord preparations were used to explore the coexistence of a direct and an indirect descending drive from the brainstem respiratory centre to cervical and thoracic respiratory motoneurons in the neonatal Sprague–Dawley rat. Polysynaptic spinal relay pathways from the respiratory centre were suppressed by selectively perfusing the cord with mephenesin (1 mM) or a solution enriched with Ca^{2+} and Mg^{2+} . At birth, both direct and spinally relayed pathways are functional and contribute equally to the global descending respiratory drive. However, during the first postnatal week, significant maturational changes appear in the way the respiratory centre controls its target respiratory motoneurons in the cervical and thoracic spinal cord, with the direct respiratory drive becoming progressively predominant with maturation (from 50% to around 75% of the global descending command). The relative contributions of the monosynaptic and the polysynaptic spinal pathways may therefore have important implications for effective respiratory control during early postnatal development.

Introduction

As the respiratory act must be effective at birth, the neural network that generates and controls respiration must be established during the embryonic period, even though significant maturational changes in the respiratory system continue to occur during the first weeks of life.

Knowledge of the cellular and synaptic mechanisms likely to be involved in respiratory rhythm generation throughout this perinatal period has benefited to a great extent from the development of *in vitro* preparations of neonatal rodents (reviewed in Funk & Feldman, 1995; Onimaru *et al.*, 1997; Ballanyi *et al.*, 1999). In the newborn rat, for example, the precise distribution of the main brainstem respiratory neuronal populations (especially the ventral respiratory group, VRG) has now been established, thereby confirming that the major anatomical features of this bulbospinal respiratory system are mature at birth (Ellenberger, 1999). However, efferent projections of inspiratory neurons of the VRG into the neonate spinal cord are still poorly documented. In the adult rat, several anatomical studies using different anterograde and retrograde tracers have revealed that VRG neurons and the Böttinger complex project directly down the spinal cord to the phrenic motoneurons (Ellenberger & Feldman, 1988; Yamada *et al.*, 1988; Ellenberger *et al.*, 1990; Dobbins & Feldman, 1994). Moreover, electrophysiological studies using cross-correlation approaches have further confirmed the direct

connection from VRG neurons to phrenic motoneurons (Duffin & van Alphen, 1995; Tian & Duffin, 1996b). This ensemble of experimental data therefore constitutes strong evidence for the existence of a monosynaptic descending respiratory drive to spinal respiratory motoneurons. Interestingly, however, as already reported in adult cat (reviewed in Monteau & Hilaire, 1991; Bianchi *et al.*, 1995), spinal collaterals of some VRG neurons have been identified in the upper cervical cord of adult rat (Lipski *et al.*, 1994), making monosynaptic connections onto C1 and C2 inspiratory neurons (Tian & Duffin, 1996b). Further reports have shown that some upper cervical inspiratory neurons, which project mainly to the thoracic and lumbar spinal cord in adult cat (Miller *et al.*, 1985; Lipski & Duffin, 1986) but not in adult rat (Lipski *et al.*, 1993), make monosynaptic and paucisynaptic contacts with phrenic motoneurons (cat, Nakazono & Aoki, 1994; rat, Tian & Duffin, 1996a). Taken together therefore, these results suggest that in the adult animal, the upper cervical cord could constitute a spinal relay for a polysynaptic respiratory drive from the medullary centres to spinal motor outputs.

The current study was conducted in order to explore the existence of a spinal respiratory relay in the neonatal rat and to establish any maturational changes in this descending respiratory drive during early stages of postnatal life. Spontaneous fictive respiratory activity was analysed in the *in vitro* preparation of the brainstem and spinal cord using both extracellular cranial and spinal ventral root recordings. Our results show that (i) a substantial ($\approx 50\%$) spinally relayed respiratory component is indeed present at birth, but that (ii) this indirect pathway is dramatically reduced within the first few days.

Correspondence: Dr Didier Morin, as above.
E-mail: didier.morin@umr5543.u-bordeaux2.fr

Received 7 May 2004, revised 24 November 2004, accepted 29 November 2004

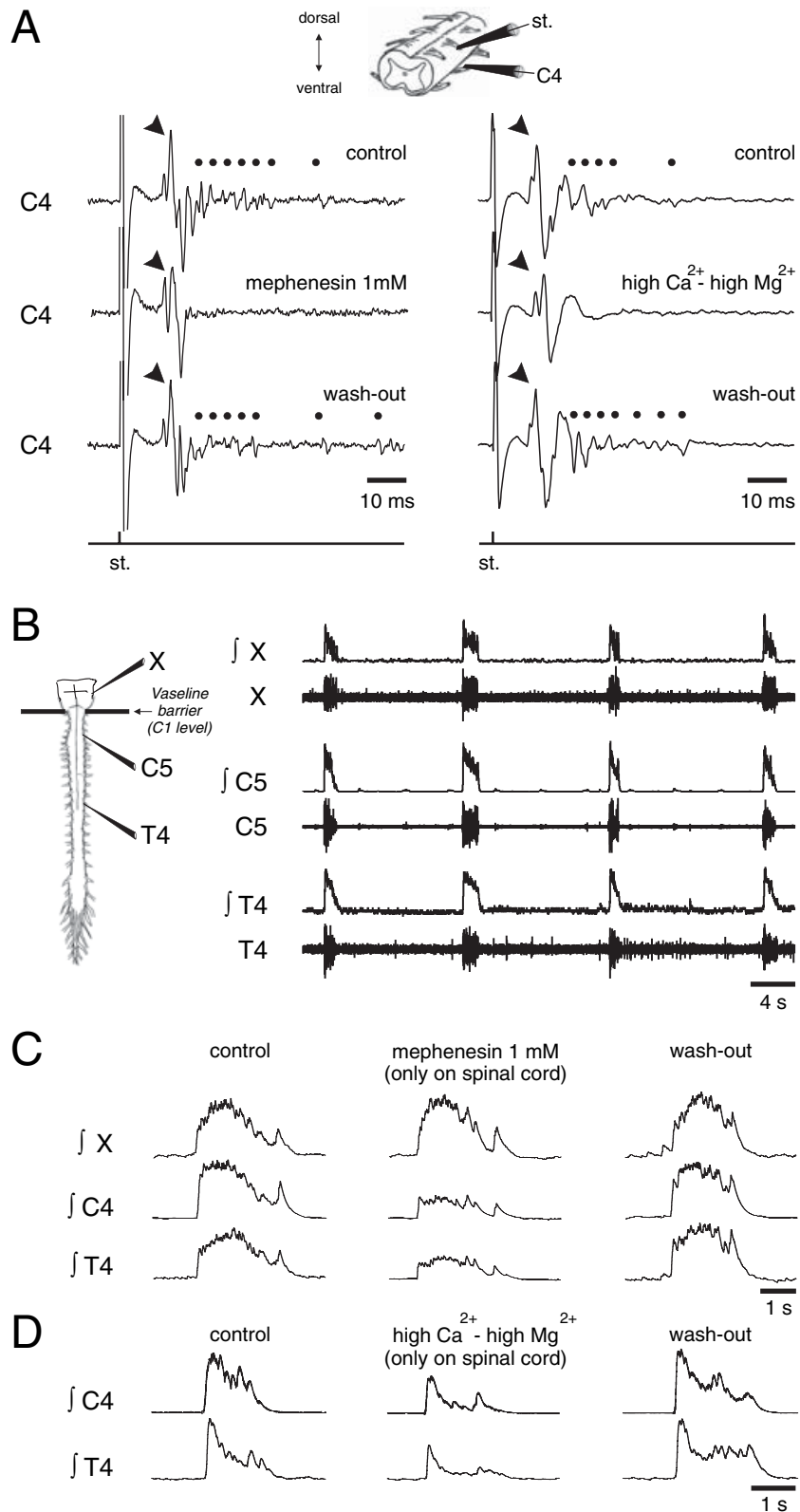


FIG. 1. Co-existence of a direct and a spinally relayed respiratory drive to cervical and thoracic motoneurons in the neonatal rat. (A) Evidence for the ability of mephenesin (1 mM, left traces) and high Ca^{2+} -high Mg^{2+} (right traces) to block polysynaptic excitation of cervical (C4) motoneurons (indicated by dots) without affecting the monosynaptic response (arrow head) to an afferent dorsal root stimulation (st., single shock, 0.5 ms, 1.2 V). (B) Spontaneous respiratory activity recorded from cranial (X, vagal nerve) and spinal (C, cervical; T, thoracic) ventral motor roots of the isolated spinal cord (see schema). Raw and integrated (integral sign) activity is shown for each motor root. (C) Integrated vagal, cervical and thoracic activity before and during mephenesin application. Note that the drug application was restricted to the spinal cord by a Vaseline barrier placed rostrally near the brainstem (see schema in B). (D) Integrated cervical and thoracic motor activity before and during high Ca^{2+} -high Mg^{2+} application restricted to the cord.

Materials and methods

In vitro brainstem-spinal cord preparations

Experiments were performed on isolated *in vitro* preparations of brainstem-spinal cord from new-born rats ($n = 33$; Sprague-Dawley; 0–4 days old from different litters; Iffa Credo-Charles Rivers, France) and carried out in accordance with the European Communities Council Directive. Animals were deeply anaesthetized with ether and decerebrated just rostrally to the fifth cranial nerves. The skin and muscles were rapidly removed and preparations were then placed in a 25-mL chamber containing artificial cerebrospinal fluid (see composition below) maintained at 10 °C during the dissection. The brainstem and spinal cord with its dorsal and ventral roots still attached were gently isolated and the neuraxis was fixed on a Sylgard resin block with the ventral surface upwards. Preparations were superfused continuously with an artificial cerebrospinal fluid equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4) and containing (in mM): 113 NaCl, 4.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃ and 11 D-glucose.

Recordings and electrical stimulation

After dissection, preparations were placed in a 10-mL recording chamber partitioned into two baths with independent perfusion systems (see schema in Fig. 1B). Perfusion rates (3–5 mL/min) to rostral and caudal chambers were adjusted to change the total chamber volume within 2 min. A Vaseline bridge allowed the brainstem and spinal cord to remain partitioned at the high cervical level (C1) (note that watertightness was checked at the end of each experiment by adding dye (Fast Green, Sigma, France) to one side of the partitioned chamber). The temperature of the artificial cerebrospinal fluid was then progressively raised to 25 °C and both spinal ventral root and cranial nerve activities were recorded using glass suction electrodes. Signals were amplified ($\times 10\,000$) by home-made amplifiers, bandpass-filtered (0.1–3 kHz), rectified, integrated ($\tau = 100$ ms), displayed on oscilloscope (Hameg, Germany) and stored on a computer hard disk (Spike 2, Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK) for off-line analysis. Single stimulus pulses over a range of 0.2–2 V with a 0.5 ms duration were applied to dorsal spinal roots via glass suction electrodes using an eight-channel digital stimulator (A.M.P.I., Jerusalem, Israel).

Drug application and modified saline

Pharmacological substances or modified saline were bath-applied at least 30 min after the end of dissection by means of gravity supply. Mephenesin (1 mM, Sigma, France) or a saline enriched in Ca²⁺ (7.5 mM) and Mg²⁺ (8 mM) were used to suppress polysynaptic transmission (Lev-Tov & Pinco, 1992; Bertrand & Cazalets, 1999).

Data analysis

Rhythmic respiratory-related motor activity was characterized in terms of burst duration and the area (surface under the curve) of integrated burst activity (see top panel in Fig. 2). Averaging integrated respiratory activity (over 20–30 cycles) assessed changes in respiratory discharge pattern before and after experimental procedures. Data analysis was aided by software (Spike 2, Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK). Statistical values were expressed as mean \pm SEM. Differences between means were analysed using a statistical software package (Sigma Stat) and assessed by one-way ANOVA with a Student–Newman–Keuls post-test. Changes in mean values for each parameter were taken to be significant at $P < 0.05$.

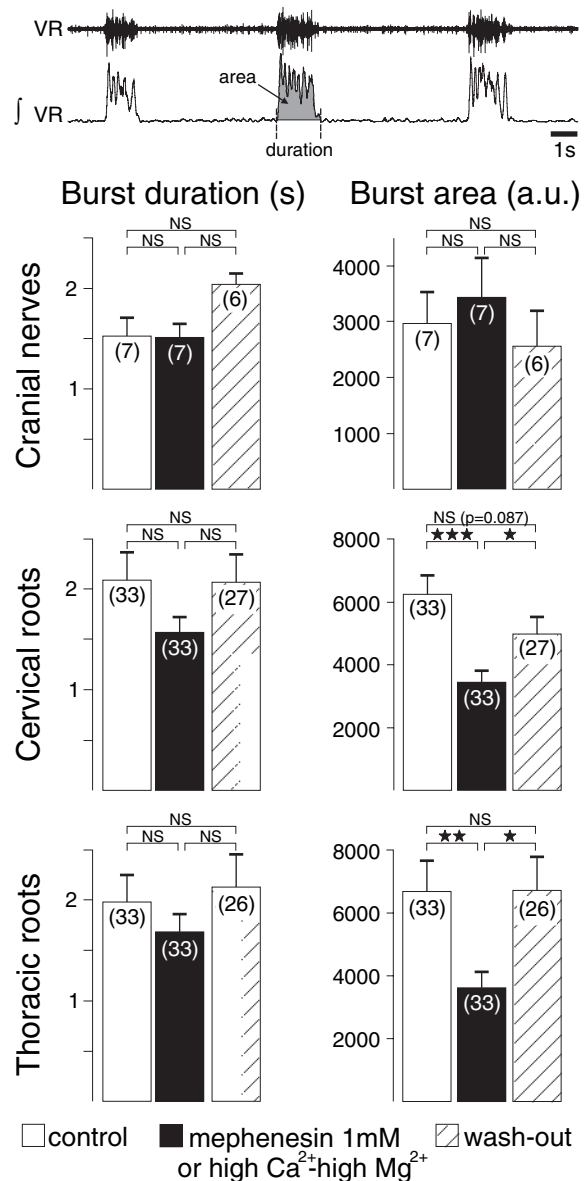


FIG. 2. Mean burst duration and integrated burst area of cranial and spinal (cervical and thoracic) respiratory motor output before, during and after washout of mephenesin (1 mM) or high Ca²⁺-high Mg²⁺ application restricted to the spinal cord. a.u., arbitrary unit; vertical bars, mean values; vertical lines, SEM. NS, non significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Numbers of experiments are reported in parentheses. The methods to calculate burst duration and area are shown on the upper traces. VR, ventral root.

Results

In order to investigate the descending respiratory drive in the neonate, isolated spinal cords were perfused either with a solution containing mephenesin (1 mM) or a high Ca²⁺/Mg²⁺ solution, both of which have been previously found to strongly attenuate polysynaptic spinal pathways (Vinay *et al.*, 1995). Figure 1A demonstrates the effectiveness of these modified salines in differentiating between monosynaptic and polysynaptic pathways by observing their effects on cervical motor responses evoked by dorsal root (DR) stimulation. Under control conditions, a suprathreshold pulse of DR stimulation induces a fast-rising early motor response followed by a long-lasting ventral root discharge. The short and constant latency (8.6 ± 0.6 ms, $n = 6$) of the rapid response is consistent with the activation of a monosynaptic

sensori-motor pathway, whereas the long-lasting discharge reflects the parallel activation of a polysynaptic circuit. The application of mephenesin ($n = 3$; Fig. 1A, left) or a high Ca^{2+} /high Mg^{2+} solution ($n = 3$; Fig. 1A, right) reversibly abolishes the delayed long-lasting component without affecting the early short-lasting motor response, presumably due to an increase in spike threshold and a consequent blockade of transmission through the polysynaptic pathways (Berry & Pentreath, 1976). As the effectiveness of the two modified salines was found to be equivalent (see also Vinay *et al.*, 1995), all subsequent results on respiratory spinal pathways have been pooled.

The isolated *in vitro* brainstem-spinal cord preparation spontaneously generates respiratory rhythmicity (Fig. 1B) originating from the medulla. This cyclic activity occurs co-ordinately in both the cranial nerves (vagal or hypoglossal nerves) and spinal ventral roots (cervical and thoracic motor output). To reveal the presence of an indirect spinal respiratory relay in the neonatal rat spinal cord and to evaluate its respective contribution to the global descending respiratory drive at birth, mephenesin ($n = 14$; Fig. 1C) or high Ca^{2+} /high Mg^{2+} solution ($n = 19$; Fig. 1D) was now applied specifically to the spinal cord (but not the brainstem; see schema in Fig. 1B). Although duration of spontaneous respiratory-like bursts remained unchanged, the area of integrated cervical and thoracic respiratory activity was significantly and reversibly decreased by 54.9% ($P < 0.001$; $n = 33$) and 54.1% ($P = 0.01$; $n = 33$), respectively, of control values (Figs 1C and D, and 2). Consequently, this remaining respiratory activity is assumed to correspond to the direct bulbospinal component of the respiratory

drive to spinal motoneurons. An action on medullary respiratory centres cannot account for the results obtained in these experiments as no significant change in integrated cranial respiratory activity was observed (Fig. 1C, top traces and Fig. 2). Indeed, perfusion of mephenesin or high Ca^{2+} /high Mg^{2+} solution on the medullary structures in the brainstem systematically stops spontaneous respiratory-like rhythmicity (data non shown). These results are therefore consistent with the hypothesis that both direct (monosynaptic) and spinally relayed (polysynaptic) respiratory drives coexist at birth and are functional to an approximately equivalent extent.

It is well-known that during the first postnatal weeks, critical maturational changes occur in the central respiratory network (reviewed in Hilaire & Duron, 1999). Therefore to evaluate whether any concomitant postnatal maturation occurs in the descending respiratory drives, the respective contributions of the direct and the spinally relayed components were analysed in different postnatal age groups, with the assumption that the difference between control measurements and respiratory motor activity remaining after pharmacological treatment indicating the spinally relayed component of the respiratory drive. At the cervical level during the first three postnatal days, the direct bulbospinal and spinally relayed proportions were found to be equivalent (mean value of the direct bulbospinal component, $50.5 \pm 2.2\%$, $n = 27$) and no significant differences appeared in the different age groups (Fig. 3). At P3–4, however, the direct bulbospinal component of the respiratory command became significantly predominant ($78.3 \pm 9.0\%$, $n = 7$) compared to the

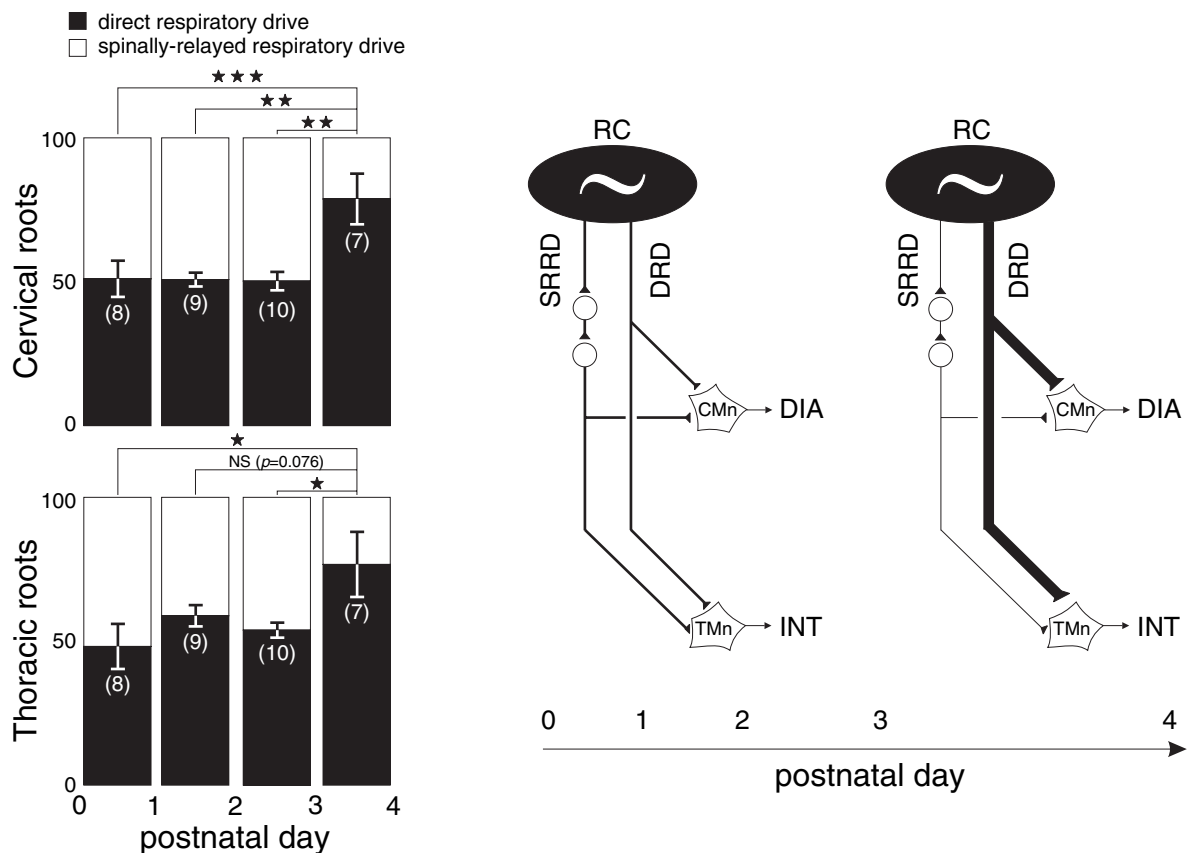


FIG. 3. Maturation changes in the relative contribution of direct and spinally relayed pathways to the descending drive to spinal respiratory motoneurons. Vertical bars, mean values; vertical lines, SEM. NS, non significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Note that the contribution of the direct respiratory drive (black bars) was taken as the ratio between mephenesin (or high Ca^{2+} -high Mg^{2+}) treated and control burst areas. (Right) Schematic representation of postnatal modifications in descending respiratory pathways. RC, brainstem respiratory centres; SRRD, spinally relayed (polysynaptic) respiratory drive; DRD, direct (monosynaptic) respiratory drive; CMn, cervical motoneuron; DIA, diaphragm; TMn, thoracic motoneuron; INT, intercostal muscle.

younger groups of animals. A similar maturational change was evident at the thoracic level (mean value of the direct bulbospinal component at P0–3, $55.0 \pm 3.0\%$, $n = 27$; at P4, $76.4 \pm 11.4\%$, $n = 7$).

Discussion

The results described here provide new evidence for the existence of a direct and a spinally relayed respiratory pathway to cervical and thoracic spinal motoneurons in the newborn rat. They also show that these two parallel axes contribute equally to the descending respiratory drive at birth. However, within the first few days after birth a maturational change occurs whereby the direct respiratory command becomes prevalent. This developmental transition is represented schematically in Fig. 3.

It is well-established that medullary respiratory neurons in rat are functionally connected to phrenic motoneurons before birth. In an anatomical study, Song *et al.* (2000) reported that medullary bulbospinal neurons belonging to the putative early VRG nucleus send their axons to the cervical cord, penetrating into the grey matter and approaching the phrenic motoneurons at embryonic day (E) 17. In agreement with this observation, *in vitro* physiological studies have indicated that cervical respiratory-like rhythmicity appears over the same period (E16–17, Di Pasquale *et al.*, 1992; Greer *et al.*, 1992) and becomes stable at E20 (Di Pasquale *et al.*, 1992). However, evidence for a monosynaptic and/or a polysynaptic connection through spinal interneurons at this developmental stage has hitherto not been reported. Using a reversible block of polysynaptic pathways, we show that at birth, both phrenic (cervical; see also Parkis *et al.*, 1999) and intercostal (thoracic) motoneurons receive both a direct and a spinally relayed respiratory drive from the brainstem. It is likely, but not definitively proven, that these two components originate from the same medullary structures. As mephenesin or high Ca^{2+} -high Mg^{2+} perfusion did not significantly change the respiratory burst duration (see Fig. 2), we can assume that the direct and the spinally relayed commands either share the same origin, or at least originate from distinct but closely interacting medullary structures.

The coexistence of a direct and a spinally relayed descending pathway conveying medullary respiratory drives seems to have been well-established, especially in adult mammals (reviewed in Monteau & Hilaire, 1991; Bianchi *et al.*, 1995). The exact role of both types of transmission, however, has yet to be elucidated. Although the existence of a monosynaptic and a polysynaptic respiratory input to a given motoneuron remains to be determined, one possibility is that these two components of the global bulbospinal command combine to provide flexibility in motoneuronal excitability. As a consequence, a wide variety of respiratory outputs can be produced (for example, underlying eupnea, coughing or sneezing). Moreover, we observe that during the first three postnatal days, the direct and the spinally relayed components contribute equally to the overall respiratory drive. Considering the immaturity of the respiratory system soon after birth (reviewed in Hilaire & Duron, 1999), it is also possible that this equivalent contribution to the descending respiratory drive constitutes a security system that compensates for any dysfunction of one or other pathway.

Interestingly, the first postnatal week seems to represent a critical maturational period as the direct respiratory drive to cervical motoneurons then becomes significantly dominant by the fourth postnatal day. Although the mechanism(s) underlying this change remain unknown, it could be a developmental process such as axon myelination, which promotes the dominance of direct respiratory drive in older animals by reducing the risk of transmission failure in longer

monosynaptic pathways. Moreover, during the perinatal development of respiratory motoneurons, changes in expression of ionic conductances (Martin-Caraballo & Greer, 1999) and/or postsynaptic receptors could selectively increase the functional importance of direct respiratory pathways. Finally, abnormalities in the functional switch between direct and spinally relayed respiratory drives could be a source of respiratory failures reported in certain pathologies during early childhood.

Acknowledgements

We thank Dr John Simmers for his contribution to the manuscript. We also acknowledge the skilful assistance of all technical services of our laboratory. This work was supported by the 'Conseil Régional Aquitaine', the 'Fondation pour la Recherche Médicale' and the 'Demain Debout' organization.

Abbreviations

VRG, ventral respiratory group.

References

- Ballanyi, K., Onimaru, H. & Homma, I. (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Prog. Neurobiol.*, **59**, 583–634.
- Berry, M.S. & Pentreath, V.W. (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res.*, **105**, 1–20.
- Bertrand, S. & Cazalets, J.R. (1999) Presynaptic GABAergic control of the locomotor drive in the isolated spinal cord of neonatal rats. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 583–592.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubié, M. & Champagnat, J. (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.*, **75**, 1–45.
- Di Pasquale, E., Monteau, R. & Hilaire, G. (1992) *In vitro* study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp. Brain Res.*, **89**, 459–464.
- Dobbins, E.G. & Feldman, J.L. (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J. Comp. Neurol.*, **347**, 64–86.
- Duffin, J. & van Alphen, J. (1995) Bilateral connections from ventral group inspiratory neurons to phrenic motoneurons in the rat determined by cross-correlation. *Brain Res.*, **694**, 55–60.
- Ellenberger, H.H. (1999) Nucleus ambiguus and bulbospinal ventral respiratory group neurons in the neonatal rat. *Brain Res. Bull.*, **50**, 1–13.
- Ellenberger, H.H. & Feldman, J.L. (1988) Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats. *J. Comp. Neurol.*, **269**, 47–57.
- Ellenberger, H.H., Feldman, J.L. & Goshgarian, H.G. (1990) Ventral respiratory group projections to phrenic motoneurons: electron microscopic evidence for monosynaptic connections. *J. Comp. Neurol.*, **302**, 707–714.
- Funk, G.D. & Feldman, J.L. (1995) Generation of respiratory rhythm and pattern in mammals: insights from developmental studies. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 778–785.
- Greer, J.J., Smith, J.C. & Feldman, J.L. (1992) Respiratory and locomotor pattern generated in the fetal rat brain stem-spinal cord *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, **67**, 996–999.
- Hilaire, G. & Duron, B. (1999) Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol. Rev.*, **79**, 325–360.
- Lev-Tov, A. & Pinco, M. (1992) *In vitro* studies of prolonged synaptic depression in the neonatal rat spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)*, **447**, 149–169.
- Lipski, J. & Duffin, J. (1986) An electrophysiological investigation of propriospinal inspiratory neurons in the upper cervical cord of the cat. *Exp. Brain Res.*, **61**, 625–637.
- Lipski, J., Duffin, J., Kruszezka, B. & Zhang, X. (1993) Upper cervical inspiratory neurons in the rat: an electrophysiological and morphological study. *Exp. Brain Res.*, **95**, 477–487.
- Lipski, J., Zhang, X., Kruszezka, B. & Kanjhan, R. (1994) Morphological study of long axonal projections of ventral medullary inspiratory neurons in the rat. *Brain Res.*, **640**, 171–184.

- Martin-Caraballo, M. & Greer, J.J. (1999) Electrophysiological properties of rat phrenic motoneurons during perinatal development. *J. Neurophysiol.*, **81**, 1365–1378.
- Miller, A.D., Ezure, K. & Suzuki, I. (1985) Control of abdominal muscles by brain stem respiratory neurons in the cat. *J. Neurophysiol.*, **54**, 155–167.
- Monteau, R. & Hilaire, G. (1991) Spinal respiratory motoneurons. *Prog. Neurobiol.*, **37**, 83–144.
- Nakazono, Y. & Aoki, M. (1994) Excitatory connections between upper cervical inspiratory neurons and phrenic motoneurons in cats. *J. Appl. Physiol.*, **77**, 679–683.
- Onimaru, H., Arata, A. & Homma, I. (1997) Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: an approach using *in vitro* preparation. *Jpn. J. Physiol.*, **47**, 385–403.
- Parkis, M.A., Dong, X.-W., Feldman, J.L. & Funk, G.D. (1999) Concurrent inhibition and excitation of phrenic motoneurons during inspiration: phase-specific control of excitability. *J. Neurosci.*, **19**, 2368–2380.
- Song, A., Ashwell, K.W.S. & Tracey, D.J. (2000) Development of the rat phrenic nucleus and its connections with brainstem respiratory nuclei. *Anat. Embryol.*, **202**, 159–177.
- Tian, G.F. & Duffin, J. (1996a) Connections from upper cervical inspiratory neurons to phrenic and intercostal motoneurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. *Exp. Brain Res.*, **110**, 196–204.
- Tian, G.F. & Duffin, J. (1996b) Spinal connections of ventral group bulbospinal inspiratory neurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. *Exp. Brain Res.*, **111**, 178–186.
- Vinay, L., Cazalets, J.-R. & Clarac, F. (1995) Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonate rat. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 143–151.
- Yamada, H., Ezure, K. & Manabe, M. (1988) Efferent projections of inspiratory neurons of the ventral respiratory group. A dual labelling study in the rat. *Brain Res.*, **455**, 283–294.