



Altérations précoces des réseaux moteurs spinaux chez la souris SOD1, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique

Elodie Martin

► **To cite this version:**

Elodie Martin. Altérations précoces des réseaux moteurs spinaux chez la souris SOD1, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique. Sciences agricoles. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. <NNT : 2013BOR14873>. <tel-01249526>

HAL Id: tel-01249526

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01249526>

Submitted on 4 Jan 2016

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

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

UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Neurosciences

par

Elodie MARTIN

Altérations précoces des réseaux moteurs spinaux chez la souris SOD1, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique

Soutenance publique le 31 octobre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Pascal Legendre	DR, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M. Daniel Zytnicki	DR, Université Paris Descartes	Rapporteur
M. Philippe de Deurwaerdère	Pr, Université de Bordeaux	Président
M. Gwendal Le Masson	MD-PhD, Université de Bordeaux	Examineur
M. Pascal Branchereau	Pr, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

A ma mamie et mon papi,

Remerciements

En premier lieu, je tiens tout particulièrement à remercier Pascal Branchereau pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe et pour m'avoir encadrée pendant ces 3 années. Je garderai un excellent souvenir de nos longues journées et parfois soirées passées dans la salle d'électrophysique !!! Un grand merci pour votre disponibilité, votre compréhension, votre gentillesse et votre grande pédagogie.

Je tiens à remercier les membres du jury, Philippe De Deurwaerdère, Gwendal Le Masson, Pascal Legendre et Daniel Zytynicki d'avoir pris le temps d'évaluer et de corriger mon travail de thèse.

Un grand merci également aux autres membres de l'équipe qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse: William Cazenave dit aussi "Monsieur Génotypage" pour tous les nombreux génotypages et les PCR que tu as réalisés et Anne-Emilie Allain pour les Western-Blot. Votre gentillesse et votre soutien dans les moments difficiles m'ont été d'un énorme réconfort et m'ont permis d'avancer...Les longues discussions dans vos bureaux vont me manquer! Je vous souhaite le meilleur dans votre nouvelle vie de parents...Je tiens à remercier également Daniel Cattaert pour les simulations informatiques, les scripts et son aide pour les analyses qui parfois nous ont données beaucoup de mal ! Merci également pour votre gentillesse, votre patience et votre disponibilité ! Merci aussi à Jean-Paul Delbecque pour m'avoir montré le fonctionnement de l'HPLC. Je n'oublie pas ma camarade de la salle d'électrophysique, Sylvaine avec qui j'ai passé d'excellents moments notamment au congrès à la Nouvelle-Orléans, où j'ai pu lui faire découvrir de la nourriture parfois très étrange...Quelle aventure !!!

Je tiens également à remercier très chaleureusement Raphael Pineau et toute son équipe, Marie-Paule, Marcia, Benjamin et Sandra, pour s'être occupés de mes petites souris.

Je remercie aussi l'ARSLA (Association pour la Recherche de la Sclérose Latérale Amyotrophique) pour avoir contribué financièrement à l'avancée des recherches et pour m'avoir permis de faire ma thèse dans les meilleures conditions possibles et également le BIC de Bordeaux 2 (Bordeaux Imaging Center) et plus particulièrement Magaly, Sébastien et Philippe pour leur aide lorsque notre confocal nous a lâchement abandonné et également pour les quantifications.

Merci à Thomas Ducret, avec qui j'ai réalisé mon stage de Licence 3 et de Master 2, qui a très largement contribué à ma réussite au concours de l'école doctorale et avec qui j'ai publié mon premier article scientifique.

A mes collègues de bureau, Sébastien et Claire qui sont malheureusement partis et qui apportaient de la bonne humeur dans le bureau et les "charentaises" Adeline et Amandine que j'ai appris à connaître malheureusement tardivement et à qui je souhaite le meilleur pour la suite !!!! Marie-Charlotte, courage pour la fin de la thèse et bonne chance pour tes études de médecine ! Je suis convaincue que tu feras un excellent médecin ! Merci également aux autres personnes du 4^{ème} étage : les deux Nathalie, Jean-Luc, Pierre, Xavier, Philippe et Blaise. Merci également à notre gestionnaire Marie-Laure et notre retraitée Françoise pour les commandes de dernière minute, leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie également tous les enseignants-chercheurs, Clotilde, Morgane, Stéphanie, Nicole, Martin et Jean pour m'avoir aidée dans mon rôle de monitrice. Cette expérience d'enseignement fût très enrichissante.

Je n'oublie pas toute ma famille qui m'a toujours écoutée, encouragée et soutenue durant ces nombreuses années d'études. Une pensée pour mon papi qui était content que je fasse une thèse et qui souhaitait être présent le jour de ma soutenance. Le destin en a malheureusement décidé autrement mais je sais que de là-haut il me regarde et qu'il est fier de moi.

Les amis, un grand merci pour votre soutien dans la vie de tous les jours et pour avoir contribué indirectement au bon déroulement de ma thèse ! Je tiens à remercier tout particulièrement Léa, ma meilleure amie, qui a toujours été présente dans les bons comme les mauvais moments de ma vie et qui a toujours cru en moi ! Je te souhaite le plus grand bonheur avec Nico et le petit Gabriel. Ma petite Aurore, je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de ta thèse et pleins de bonnes choses dans ta vie personnelle avec Nico et vos deux petits bouts !

Un grand merci à Brice pour tout ce qu'il m'a apportée durant toutes ces années et qui arrive à me supporter au quotidien, ce qui n'est pas toujours facile...

Pour finir, j'ai une pensée toute particulière pour les 800 petits embryons qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse...

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
I. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA).....	8
1. Définition	8
2. Epidémiologie	8
3. Le gène SOD1	9
4. Modèles animaux permettant l'étude de la SLA	10
II. Mécanismes physiopathologiques responsables de la dégénérescence motoneuronale.....	12
1. Stress oxydatif	13
2. Excitotoxicité et glutamate	13
3. Agrégats protéiques cytoplasmiques	14
4. Altérations du transport axonal	15
5. Atteinte mitochondriale	15
6. Neuroinflammation et activation microgliale.....	16
7. Excitabilité.....	16
8. Potentiel d'équilibre des ions chlorure	17
III. La moelle épinière	19
1. Anatomie	19
2. Les différents types cellulaires présents dans la ME.....	21
a. Les motoneurones.....	21
b. Les interneurones	23
c. Les cellules gliales.....	24
3. Ontogenèse de la ME	25
a. Formation du tube neural et domaines progéniteurs.	25
b. Mise en place des activités dans le réseau moteur.....	26
MATERIEL ET METHODES	30
I. Génotypage	31
II. Gestation chez la souris.....	32
III. Prélèvement de la moelle épinière	32
IV. Electrophysiologie	33
1. Principe.....	33

2.	Protocoles expérimentaux	34
a.	Electrophysiologie : Patch-Clamp en configuration cellule-entière	34
i.	Caractéristiques des motoneurones et excitabilité.....	37
ii.	Injection des motoneurones	38
iii.	Etude des évènements synaptiques GABA/Glycine et Glutamate	39
iv.	Mesure de l'efficacité du co-transporteur KCC2	39
b.	Electrophysiologie : Patch-Clamp en configuration perforée	42
3.	Enregistrement extracellulaire: Locomotion fictive induite pharmacologiquement	45
V.	Immunomarquages	48
1.	Protocole.....	48
2.	Acquisition des images en microscopie confocale	50
3.	Analyse des images et quantifications.....	51
VI.	Reconstruction 3D des MNS.....	52
VII.	Simulations informatiques	53
1.	Morphologie du MN simulé	53
2.	Propriétés passives de tous les compartiments	53
3.	Les propriétés actives de l'axone et du segment initial	54
4.	Adaptation à la décharge	55
VIII.	Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).....	56
1.	Principe.....	56
2.	Protocole.....	58
IX.	Western-Blot	58
X.	PCR.....	60
XI.	Analyses statistiques	60
	PARTIE 1	62
	Une modification de la morphologie des MNs SOD1 ^{G93A} embryonnaires E17,5 induit une hyperexcitabilité.....	62
I.	Etude des propriétés des MNs	63
II.	Reconstructions 3D des MNs.....	67
III.	Simulations informatiques	73
	PARTIE 2	76
	Dysfonctionnement de l'homéostasie chlorure lié à une dérégulation de KCC2	76
I.	Mesure du potentiel d'équilibre des ions chlorure.....	77
II.	Implication du cotransporteur KCC2 dans l'altération du ECl des MNs SOD1 ^{G93A}	79
1.	Estimation de la quantité de co-transporteurs KCC2	79

2.	Mesure de l'efficacité globale du co-transporteur KCC2.....	81
3.	Implication de NKCC1 dans la dépolarisation ECl au niveau des MNs SOD1 ^{G93A} ?	84
4.	Mesure de la quantité de protéines KCC2 et NKCC1	86
5.	Mesure de l'expression relative du gène codant pour KCC2 et NKCC1	88
III.	Rôle de la sérotonine dans la régulation du ECl.....	89
1.	Voies descendantes sérotoninergiques dans la moelle épinière au stade de développement E17,5	90
2.	Dosages de la quantité de 5-HT au stade E17,5	93
3.	Rôle de la 5-HT dans la modification du ECl	93
	PARTIE 3	97
	Activité locomotrice-like préservée chez les souris SOD1 ^{G93A}	97
I.	Etude de l'activité locomotrice fictive induite pharmacologiquement.....	98
1.	Activité locomotrice induite par la 5-HT	98
2.	Activité locomotrice induite par un cocktail de 5-HT, NMDA et DA	103
II.	Etude de l'activité synaptique GABA/Glycine et Glutamate	106
III.	Etude immunohistochimique des acides aminés GABA et Glycine.....	111
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	113
I.	Partie 1 : Une modification de la morphologie des MNs SOD1 ^{G93A} embryonnaires E17,5 induit une hyperexcitabilité.....	115
1.	Hyperexcitabilité précoce liée à des changements morphologiques	115
2.	Causes présumées des changements morphologiques.....	116
3.	Modifications morphologiques au cours du développement.....	117
4.	MNs vulnérables vs MNs résistants	118
II.	Partie 2 : Dysfonctionnement de l'homéostasie chlorure lié à une dé-régulation de KCC2..	118
1.	Implication des co-transporteurs KCC2 et NKCC1 dans le ECl dépolarisé chez les souris SOD1 ^{G93A}	118
2.	Autres causes possibles d'un ECl dépolarisé	120
III.	Partie 3 : Activité locomotrice-like préservée chez les souris SOD1 ^{G93A}	122
1.	Locomotion fictive induite par la 5-HT.....	122
2.	Locomotion fictive induite par un cocktail composé de 5-HT, NMDA et DA	123
3.	Modification de la balance excitation/inhibition ?	123
IV.	Schéma récapitulatif.....	126
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
	ARTICLE 1.....	135
	ARTICLE 2.....	147

ABBREVIATIONS

- aCSF** : Artificial Cerebro Spinal Fluid
- AHP** : AfterHyperPolarisation
- BSA** : Bovine Serum Albumin
- CCC** : Cation Chloride Cotransporters
- C_m** : Capacitance membranaire
- CNQX** : 6-Cyano-7-NitroQuinoxaline-2,3-dione
- CPGs** : Central Pattern Generators
- CV_{per}** : Coefficient de Variation des périodes
- DA** : Dopamine
- EAAT2** : Excitatory amino-acid transporter 2
- ECl** : Potentiel d'équilibre des ions chlorure
- GABA** : Acide Gamma AminoButyrique
- GABA_AR** : Récepteur du GABA de type A
- GABA_BR** : Récepteur du GABA de type B
- GFP** : Green Fluorescence Protein
- GlyR** : Récepteur de la Glycine
- HPLC** : High-Performance liquid chromatography
- INs** : Interneurones
- KCC2** : Potassium (K) Chloride (C) transporter 2
- LMC** : Lateral Motor Column
- ME** : Moelle Epinière
- MMC** : Median Motor Column
- MNs** : Motoneurones
- NKCC1** : Sodium (N) Potassium (K) Chloride (C) transporteur 1
- NMDA** : N-Methyl-D-Aspartate
- PA** : Potentiel d'action
- PBS** : Phosphate Buffered Saline

PFA : ParaFormAldéhyde

PCR : Polymerase Chain Reaction

R_{in} : Résistance membranaire

ROS : Reactive Oxygen Species

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SNC : Système Nerveux Central

SOD1 : Superoxide Dismutase 1

TDP43 : TAR DNA-binding protein 43

TTX : Tetrodotoxine

5-HT : 5-HydroxyTryptamine ou sérotonine

5-HTP : 5-HydroxyTryptophane

INTRODUCTION

I. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

1. Définition

La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), initialement décrite par le neurobiologiste et physicien Jean-Marie Charcot à la fin du 19^{ème} siècle, est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones du cortex moteur, des motoneurons (MNs) du tronc cérébral et de la moelle épinière (ME). On distingue des formes sporadiques (90% des cas) et des formes familiales (10% des cas). Quelle que soit la forme de la maladie, les signes cliniques sont identiques. Cependant, en fonction de la région initiale d'atteinte, on distingue deux variétés de SLA : 1) une forme spinale qui affecte tout d'abord les MNs de la ME et qui est caractérisée par une atteinte de la motricité des membres supérieurs et inférieurs et 2) une forme bulbaire, affectant les MNs du tronc cérébral et provoquant des troubles de la parole et de la déglutition. Indépendamment de la forme initiale, la perte progressive de ces neurones entraîne une paralysie totale conduisant au décès des patients par insuffisance respiratoire dans un délai de 1 à 5 ans après diagnostic (Robberecht and Philips, 2013).

2. Epidémiologie

Si la SLA est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie de Parkinson et Alzheimer, elle n'en reste pas moins une maladie rare, avec une incidence (nombre de nouveaux cas par an) d'environ 1-2 pour 100 000 par an et une prévalence (nombre total de cas par an) de 4 à 6 pour 100 000 (Boillee et al., 2006). Cependant, ces valeurs peuvent être beaucoup plus importantes dans certaines régions du monde comme dans l'île de Guam (océan Pacifique) ou certaines îles de Micronésie, dans le Pacifique Sud et dans la péninsule de Kii au Japon (Gajdusek and Salazar, 1982) (Garruto et al., 1985) (Kurland and Mulder, 1954).

Si la forme sporadique est la plus fréquente (90% des cas), l'étude de la forme familiale a permis d'identifier de nombreuses mutations responsables de la maladie. Parmi ces mutations, on trouve 1) des répétitions de séquence survenant, par exemple, au niveau du chromosome 9 (40-50% des cas), 2) une mutation de l'enzyme superoxyde dismutase 1 (SOD1) (20% des cas), 3) une répétition d'un hexonucléotide dans la région du chromosome 9 nommée C9ORF72 (6%), 4) un dysfonctionnement de protéines se liant à l'ADN et l'ARN comme la TAR DNA-binding protein 43 (TDP43) ou FUS (1 à 5% des cas) et 5) un problème au niveau des protéines, de l'excitotoxicité ou encore un déficit du transport cellulaire (Robberecht and Philips, 2013).

3. Le gène SOD1

Dans 20% des cas des formes familiales, l'analyse génétique de familles atteintes de la forme familiale de la SLA révèle des mutations sur le gène SOD1 situé sur le chromosome 21 au niveau du locus q22. Ces mutations se transmettent de manière autosomique dominante (Siddique et al., 1991). La protéine SOD1 est une métallo-enzyme présente sous forme homodimérique. Son expression cytosolique est ubiquitaire. Chaque monomère comporte un atome de cuivre nécessaire à son activité enzymatique et un atome de zinc qui assure la stabilité de sa structure protéique (Figure 1).

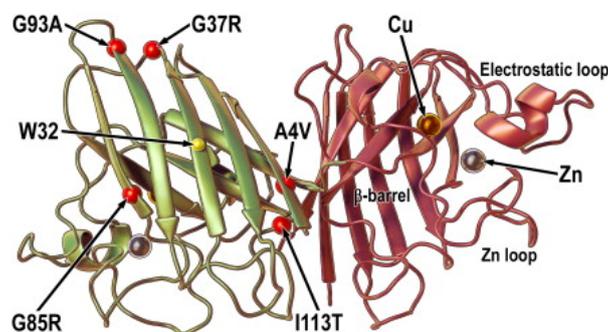


Figure 1 : Structure et fonction de la protéine SOD1 humaine WT. La protéine SOD1 est composée de deux monomères (en vert et rouge). Chaque monomère contient un atome de zinc (Zn, sphère grise) et un atome de cuivre (Cu, sphère brune). Cinq exemples de mutations induisant la SLA (G93A, G37R, G85R, I113T, A4V) sont indiqués en rouge (d'après (Ip et al., 2011)).

La protéine SOD1 intervient dans la détoxification des radicaux libres oxygénés issus du métabolisme aérobie des mitochondries. Elle joue un rôle dans la détoxification cellulaire en catalysant la réduction des ions superoxide (O_2^-) en formant du dioxygène (O_2) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il a été montré que la mutation de la protéine SOD1 n'induit pas une perte d'activité mais l'acquisition d'une nouvelle fonction toxique et létale pour la cellule qui reste encore indéterminée (Reaume et al., 1996).

Plus de 100 mutations du gène SOD1 ont été identifiées (Boillee et al., 2006) comme par exemple les mutations SOD1^{G93A} (glycine substituée par une alanine en position 93), SOD1^{G37R} (glycine substituée par une arginine en position 37), SOD1^{G85R} (glycine substituée par une arginine en position 85), SOD1^{I113T} (isoleucine substituée par une thréonine en position 113) ou encore SOD1^{A4V} (alanine substituée par une valine en position 4) (Figure 1).

4. Modèles animaux permettant l'étude de la SLA

Afin d'étudier la progression de la maladie, des modèles murins transgéniques ont été générés, par exemple en incorporant dans le génome d'une souris le gène humain SOD1 porteur de mutations SOD1 identiques à celles retrouvées dans des cas de SLA (Gurney et al., 1994). Ainsi, le premier modèle animal de la SLA, créé par Gurney et al. en 1994 (Gurney et al., 1994), est la souris SOD1^{G93A} qui présente un nombre important de transgène humain SOD1 muté (<30 copies) (appelée SOD1^{G93A} high). Le nombre de copies du transgène chez ces animaux est corrélé avec l'âge de début de la maladie et sa vitesse d'évolution (Dal Canto and Gurney, 1994) (Dal Canto and Gurney, 1997). Un autre modèle de souris SLA basé sur la mutation G93A et portant un nombre réduit de transgènes (<5 copies) (appelé SOD1^{G93A} low) a également été développé. D'autres modèles animaux de la SLA ont été développés, comme par exemple une souris surexprimant le gène TDP43 muté (Turner et al., 2008) (Robberecht and Philips, 2013) ou la souris Wobbler, qui possède une mutation ponctuelle (L967Q) au

niveau du gène *Vsp54* (Moser et al., 2013). Cependant, les modèles murins basés sur la mutation du gène SOD1 restent les plus utilisés et en particulier le modèle SOD1^{G93A}.

Le modèle SOD1^{G93A} high étant le plus couramment utilisé dans les différentes études, nous avons décidé de réaliser nos expériences sur ce modèle de souris afin de pouvoir confronter nos résultats avec les données de la littérature. Chez ces animaux mutés, les premiers symptômes observés sont l'affaiblissement des pattes postérieures et la diminution de l'activité motrice (vers P40-P50) (Kanning et al., 2010). Ils évoluent vers une paralysie motrice totale qui entraîne la mort en quelques jours à quelques semaines par asphyxie. En effet, ils possèdent une durée de vie limitée (50% de survie à 128.9 ± 9.1 jours). L'évolution dans le temps de la neurodégénérescence de ces souris a ainsi pu être décrite (Figure 2 d'après (Kanning et al., 2010)). Différents aspects de la maladie ont été répertoriés à savoir des changements systémiques et comportementaux (Figure 2, sur la gauche) ainsi que les changements moléculaires et cellulaires au niveau des unités motrices (Figure 2, sur la droite) de la naissance jusqu'à la mort de l'animal. De nombreux changements se produisent avant que la force musculaire ne soit réduite de moitié, comme des altérations électrophysiologiques à P10, suivi d'une ubiquitination et un stress du réticulum endoplasmique au niveau des neurones moteurs FF (fast-fatigable) conduisant à une mort axonale plus tardivement (vers P40). Ils sont accompagnés par des changements intracellulaires tels que la fragmentation du Golgi ou un gonflement mitochondrial (P60). Durant les mois suivants, ces changements deviennent exacerbés et généralisés à d'autres unités motrices, conduisant à une perte importante de neurones moteurs et de paralysie musculaire.

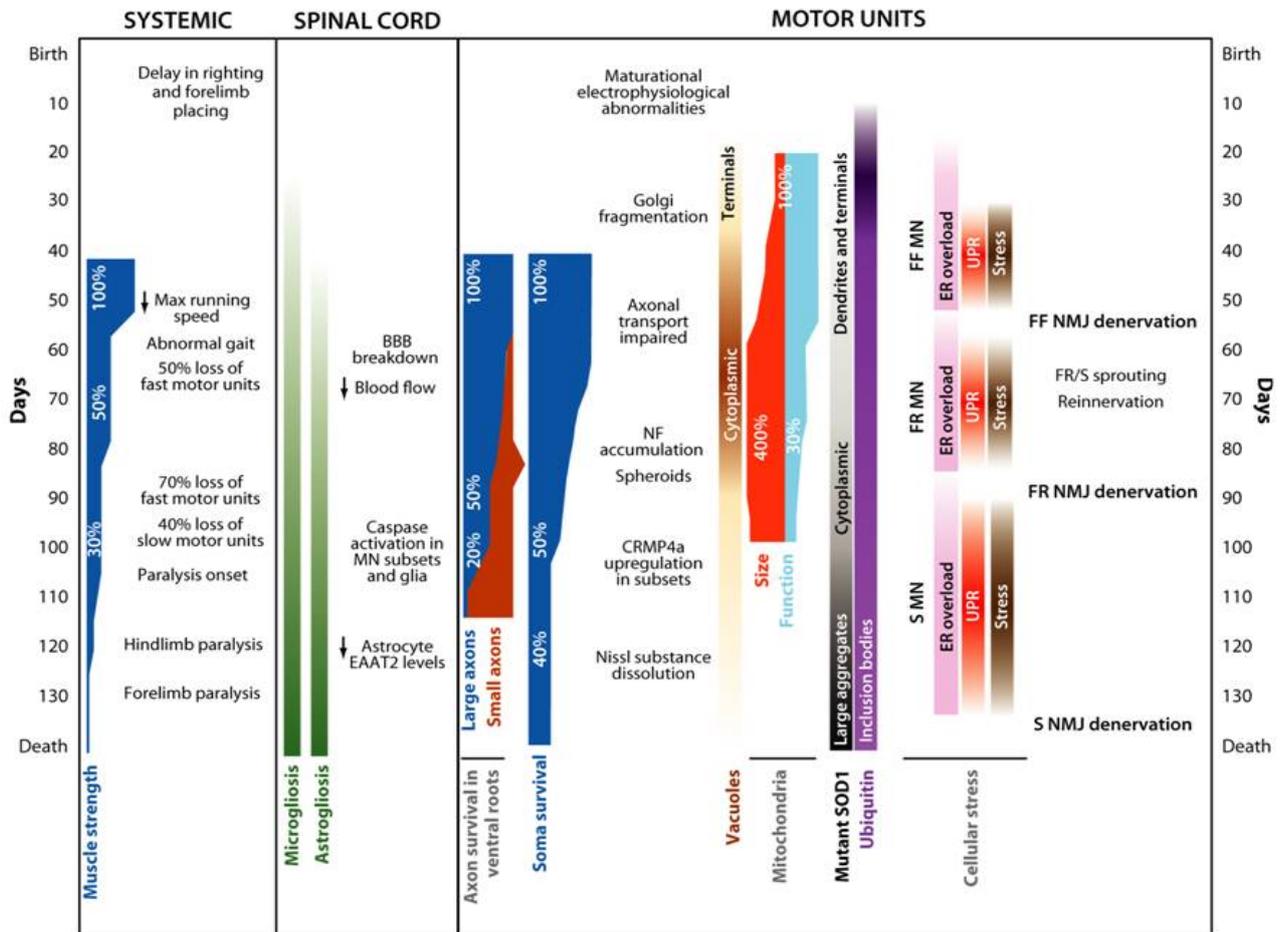


Figure 2 : Evolution dans le temps de la neurodégénérescence chez les souris SOD1^{G93A}. Ce diagramme donne un aperçu des mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant de la naissance jusqu'à la mort de l'animal (Kanning et al., 2010). Les premiers changements observés se situent en post-natal autour de P10. Ce n'est qu'après P50 que des changements dans la démarche et la vitesse de course sont détectés correspondant à une diminution rapide de la force musculaire globale et une diminution du nombre d'unités motrices intactes dans le muscle qui va sans cesse diminuer jusqu'à la paralysie totale de l'animal.

II. Mécanismes physiopathologiques responsables de la dégénérescence motoneuronale

L'utilisation des souris transgéniques SOD1^{G93A} et des autres mutations SOD1 a permis de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques responsables de la dégénérescence motoneuronale observée dans la SLA. Plusieurs processus pathologiques

comme un stress oxydatif, une excitotoxicité du glutamate etc, semblent participer à la dégénérescence des MNs dans la SLA. Cependant, le lien qui unit les différents mécanismes identifiés semble difficile à déterminer.

1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est une agression des constituants de la cellule due aux espèces réactives oxygénées (ROS) qui vont induire un effet délétère sur les lipides membranaires, les protéines intracellulaires et les acides nucléiques. Une dégradation importante de ces éléments va ainsi conduire à la mort cellulaire. De nombreuses enzymes, dont la SOD1, permettent la dégradation des ROS en molécules qui ne sont plus toxiques et protègent ainsi les cellules contre le stress oxydatif. L'enzyme SOD1 catalyse la dismutation d'ions superoxyde (O_2^-) pour former du dioxygène (O_2) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène, qui est une ROS, va être dégradé par la glutathione peroxydase en une molécule d'eau et d'alcool qui peut être assimilable par l'organisme (Cleveland and Rothstein, 2001).

La protection contre le stress oxydant est donc assurée par la SOD1. Cependant, il a été montré que la surexpression ou la suppression de l'enzyme endogène SOD1 n'a pas d'effet sur l'évolution et l'issue de la maladie suggérant ainsi que ce mécanisme ne joue pas un rôle important dans la physiopathologie de la SLA (Bruijn et al., 1998) (Roy et al., 1998). Une étude montre que SOD1 peut réguler directement l'activation de Nox2 qui intervient dans la production d'anions superoxyde (Harraz et al., 2008).

2. Excitotoxicité et glutamate

L'excitotoxicité liée au glutamate est due à l'action excessive ou prolongée du glutamate sur les récepteurs cibles du MN. Le glutamate va ainsi se fixer sur ses récepteurs post-synaptiques AMPA/NMDA, entraînant une importante dépolarisation membranaire du neurone cible associée à une entrée massive de calcium, ceci induisant une cascade de

processus intracellulaires, qui conduit progressivement à des altérations cellulaires irréversibles et l'activation des voies apoptotiques (Danbolt, 2001). Une augmentation du nombre de récepteurs au glutamate a également été décrit (van Zundert et al., 2012).

L'hypothèse d'une excitotoxicité due à un excès de glutamate a été soulevée par la mise en évidence de l'élévation des taux de glutamate dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de SLA (Rothstein et al., 1995). De plus, l'expression et la fonction du transporteur EAAT2 (Excitatory amino-acid transporter 2) assurant la recapture du glutamate est altérée dans les cas de SLA (Rothstein et al., 1995). Il est à noter qu'actuellement, le seul traitement donné aux patients est le Riluzole qui agit sur la libération de glutamate au niveau de la fente synaptique (Jehle et al., 2000) et protège les neurones contre la toxicité de certaines protéines SOD1 mutées (Roy et al., 1998). Cependant, ce traitement ne prolonge la vie des patients que seulement de quelques mois. Aucun traitement curatif n'est connu à ce jour d'où la nécessité de comprendre les mécanismes impliqués dans la mort des MNs ainsi que de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques.

3. Agrégats protéiques cytoplasmiques

Les protéines SOD1 mutées forment des agrégats protéiques chez les patients atteints de SLA comme chez les modèles de souris transgéniques (Bruijn et al., 1998). Ces agrégats de SOD1 mutées ont la capacité de se lier à d'autres protéines. Ils ont un effet toxique sur la cellule, en séquestrant des protéines essentielles à la machinerie cellulaire. Les protéines qui interagissent avec la protéine SOD1 mutée voient ainsi leur activité bloquée. Les agrégats multi-protéiques ainsi formés désorganisent la cellule et ses organelles (Shaw and Valentine, 2007).

4. Altérations du transport axonal

Les neurofilaments, composants majeurs du cytosquelette des neurones moteurs, ont un rôle essentiel dans la régulation du transport axonal. Une accumulation anormale des neurofilaments au niveau des neurones moteurs ainsi que dans leur axone a été observée chez des patients atteints de la SLA et est un marqueur anatomopathologique de la maladie (Rouleau et al., 1996). Les neurofilaments au niveau de la SLA ont donc été décrits comme étant responsables d'un transport axonal défectueux, cette atteinte pouvant être interprétée comme la cause ou la conséquence de la neurodégénération (Julien and Beaulieu, 2000).

5. Atteinte mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, la régulation de l'apoptose, l'homéostasie calcique ou encore la production de radicaux libres oxygénés. Il est admis que le fonctionnement mitochondrial s'altère avec l'âge, pouvant avoir un lien avec la révélation tardive des maladies neurodégénératives (Cluskey and Ramsden, 2001). De plus, il a été montré que la présence de protéines SOD1 mal conformées altérait la chaîne respiratoire mitochondriale (Dupuis et al., 2004) et plus spécifiquement le complexe II et IV mitochondrial (Menziés et al., 2002). Une récente étude montre également que la SOD1 mal conformée induit une augmentation de la vulnérabilité des mitochondries et perturbe l'homéostasie calcique en agissant *via* une liaison directe sur des canaux voltage-dépendants localisés sur la membrane des mitochondries (Voltage-dépendant anion channel 1 ou VDAC1) (Jaiswal and Keller, 2009) (Israelson et al., 2010) et conduit, par une cascade de phénomènes, à la dégénérescence du MN.

Il a également été mis en évidence des altérations morphologiques et fonctionnelles de la mitochondrie au niveau des neurones MNs. Plus particulièrement, des altérations de la dynamique mitochondriale ont été décrites comme étant responsables de la dégénérescence

des MNs (Magrane et al., 2012). En effet, les MNs présentent une altération de la fusion mitochondriale au niveau des axones et des corps cellulaires ainsi qu'une atteinte sélective du transport axonal rétrograde avec une fréquence et une vitesse de mouvement réduite. La fusion et le transport sont associés à une plus petite taille des mitochondries, une diminution de leur densité et une altération de leur potentiel de membrane (hyperpolarisation).

6. Neuroinflammation et activation microgliale

Au sein du système nerveux central (SNC), la microglie existe dans les conditions physiologiques sous la forme inactivée. Lors d'agression du SNC, ces cellules s'activent et stimulent les neurones et les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) en libérant des substances inflammatoires et cytotoxiques comme les radicaux libres, le glutamate ou le NO (Kreutzberg, 1996) (Hanisch, 2002). Dans les modèles de souris transgéniques SOD1, cette activation microgliale est intense et augmente au cours de l'évolution (Hall et al., 1998). La surexpression de facteurs pro-inflammatoires lors des phases pré-symptomatiques précoces ainsi que l'expansion de l'activation immunitaire chez les souris SOD1 suggèrent ainsi que les mécanismes immuno-inflammatoires pourraient contribuer à la progression de la maladie.

Il a également été montré que les neurones moteurs mutés SOD1 restent viables s'ils sont entourés de cellules saines. Cependant, les MNs sains dégèrent s'ils sont entourés de cellules non-neurales mutées SOD1. L'atteinte motoneuronale serait donc conditionnée par la libération de molécules toxiques par les cellules non-neurales anormales comme la microglie (Clement et al., 2003).

7. Excitabilité

Des études se sont focalisées sur les changements d'excitabilité des MNs SOD1 et émettent l'hypothèse que la SLA impliquerait des changements au niveau des propriétés fonctionnelles intrinsèques des MNs (Boillee et al., 2006) (Bruijn et al., 2004). Cependant,

selon la mutation SOD étudiée et le stade auquel sont réalisées les expériences, une hyperexcitabilité ou une hypoexcitabilité a été mise en évidence. En effet, il a été montré une hyperexcitabilité au niveau des SOD1^{G93A} high (Kuo et al., 2004) (Kuo et al., 2005) (Pieri et al., 2003) et une hypoexcitabilité a été décrite au niveau des SOD1^{G85R} et SOD1^{G93A} low (Bories et al., 2007). Une hyperexcitabilité augmente ainsi, pour un même input excitateur, le nombre de potentiels d'action (PAs) émis au niveau du soma et de l'axone des MNs SOD1 ce qui pourrait contribuer aux divers mécanismes pathologiques impliqués dans la dégénérescence motoneuronale (Cleveland and Rothstein, 2001). En effet, l'hyperexcitabilité observée serait impliquée dans le développement du stress oxydatif (Lancelot et al., 1998) et l'augmentation du métabolisme mitochondrial (Roy et al., 1996). De plus, l'hyperexcitabilité induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui joue un rôle critique dans la dégénérescence des MNs (Fritz et al., 2013).

8. Potentiel d'équilibre des ions chlorure

Dans le système nerveux central (SCN) mature, les deux principaux neurotransmetteurs inhibiteurs sont le GABA et la Glycine. Par leur liaison à leur récepteur respectif (GABA_AR et GlyR), ils vont activer des canaux perméables aux ions chlorure. Ces deux acides aminés ont leur action modulée en fonction du potentiel d'équilibre des ions chlorures (ECl). Il a été montré qu'aux stades précoces de développement, le GABA et la Glycine sont des neurotransmetteurs excitateurs (Owens and Kriegstein, 2002) et qu'un basculement de l'excitation vers l'inhibition se produit après le stade de développement E15,5 au niveau des MNs lombaires spinaux chez la souris (Delpy et al., 2008).

Ce basculement de l'action dépolarisante du GABA et de la Glycine à une action inhibitrice est dû à une dérégulation d'une famille de co-transporteurs, les CCCs (cation chloride cotransporters) (Blaesse et al., 2009) dont les principaux dans les neurones sont NKCC1 (Co-transporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻ isoforme 1), qui fait rentrer les ions chlorure dans la

cellule et KCC2 (co-transporteur K^+-Cl^- de type 2) qui extrude le chlorure des neurones. En effet, aux stades précoces du développement, il est admis que NKCC1 est prédominant, maintenant ainsi une concentration intracellulaire en chlorure très élevée. De plus, aux stades plus tardifs, l'efficacité de NKCC1 est diminuée alors que KCC2 devient prédominant, diminuant ainsi la concentration intracellulaire en chlorure (Ben-Ari, 2001) (Owens and Kriegstein, 2002) (Delpy et al., 2008). Cependant, dans certaines pathologies, notamment au niveau de la SLA, à des stades pré-symptomatiques, il a été observé une diminution d'ARNm KCC2 ou une augmentation d'ARNm NKCC1 (Fuchs et al., 2010). Même si cela n'a pas été démontré, nous pouvons penser que cette diminution de KCC2 entraînerait une augmentation de la concentration intracellulaire en chlorure. Un changement du E_{GABA} peut déclencher un efflux de chlorure et une dépolarisation, et ainsi une augmentation de l'excitabilité du MN et donc entraîner la mort du MN (De Koninck, 2007).

Les études sur la SLA se focalisent pour la quasi-totalité à des stades de développement post-nataux et surtout plus tardifs encore (pré-symptomatiques). Nous avons émis l'hypothèse que la maladie est neurodéveloppementale, basée sur une altération de l'homéostasie chlorure. En effet, nous pensons qu'une mauvaise construction du réseau pendant la vie embryonnaire serait la cause de tous les dysfonctionnements observés en période post-natale et pré-symptomatique (van Zundert et al., 2012). Le groupe de Pascal BRANCHEREAU étant spécialisée dans l'étude de la ME embryonnaire, nous avons réalisé nos travaux sur des MNs spinaux au stade de développement E17,5. En effet, à ce stade, les réseaux sont fonctionnels (Branchereau et al., 2000a) et la jonction neuromusculaire est en place (Koo and Pfaff, 2002) même si une maturation post-natale se produit encore (Clarac et al., 2004).

Nos travaux étant axés sur le modèle de la ME, il est important d'aborder quelques généralités sur son développement avant de présenter nos résultats.

III. La moelle épinière

1. Anatomie

La ME joue un rôle de relais entre les différents organes et le cerveau. Elle va ainsi transmettre les informations motrices vers les muscles et les informations sensorielles vers le cerveau. La ME est un cordon de tissu nerveux logé dans la colonne vertébrale d'environ 43 cm de longueur chez l'Homme avec des renflements de ses parties cervicale et lombaire (Figure 3A). Elle est divisée en plusieurs parties : cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et coccygienne. Comme le cerveau, elle est entourée de méninges : dure-mère (sur la face externe), arachnoïde et pie-mère (au contact de la moelle). Des paires de nerfs spinaux, sortant entre les vertèbres de chaque côté de la ME pour innover différents organes, permettent de segmenter la ME en 31 éléments appelés segments médullaires (8 nerfs spinaux cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrés et 1 coccygien). Chaque segment présente un nerf mixte regroupant l'ensemble des informations issues des racines dorsales (véhiculant les informations sensorielles) et des racines ventrales (transportant les informations motrices) (Figure 3B).

En coupe frontale, la ME est composée de 2 parties (Figure 3B) : 1) la substance blanche qui est située en périphérie et 2) la substance grise située au centre. La substance blanche est constituée majoritairement d'axones entourés de gaines de myéline. Elle permet le passage de l'information entre les segments de la ME (informations proprioceptives) ou en provenance du cerveau ou vers ce dernier. Elle est donc composée de voies ascendantes sensibles et descendantes issues du tronc cérébral ou du cortex moteur.

Située à l'intérieur de la ME, la substance grise est, quant à elle, formée par l'ensemble des corps cellulaires des différentes populations neuronales. En forme de H, elle comprend de chaque côté une corne dorsale (lieu de réception des informations sensorielles)

et une corne ventrale. La substance grise centrale entoure le canal de l'épendyme dans lequel circule du liquide céphalo-rachidien (Figure 3B).

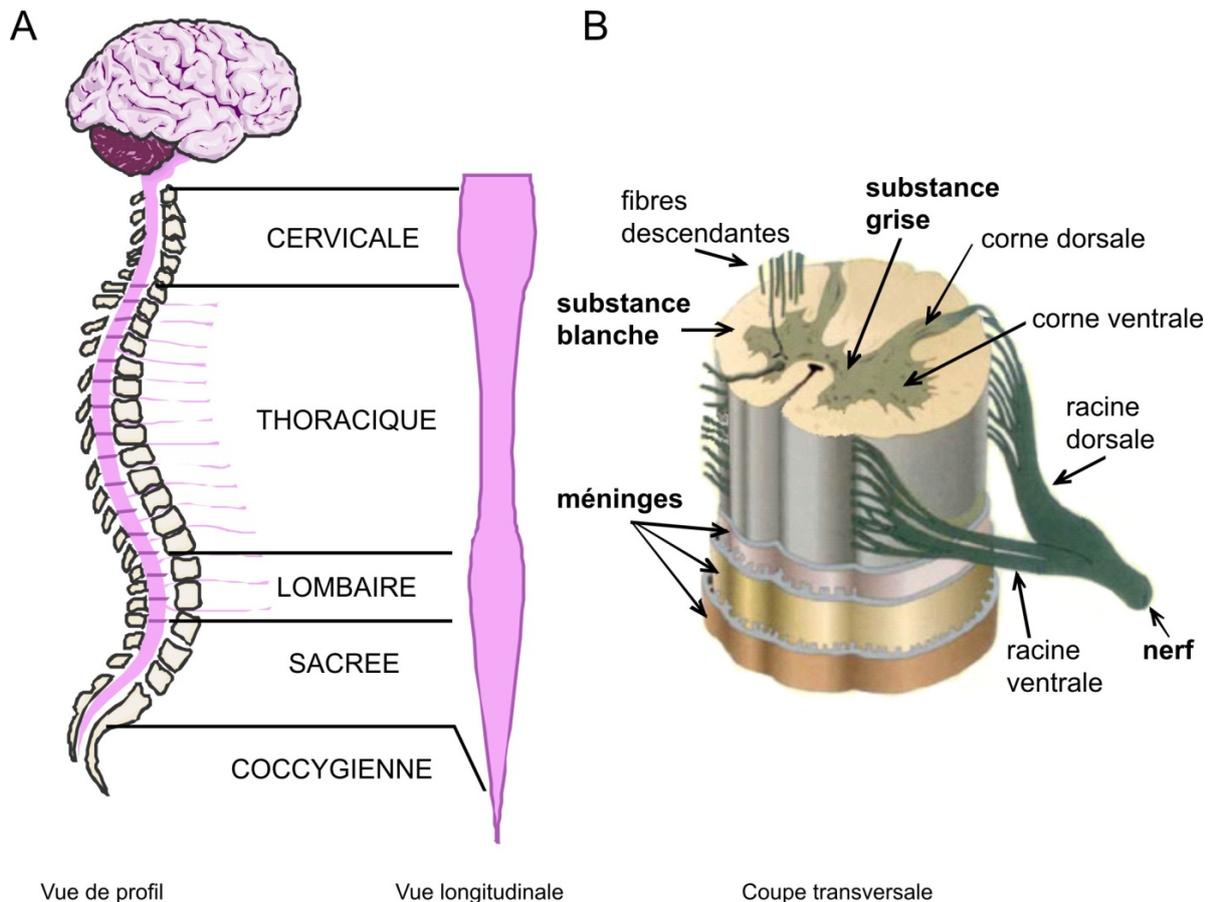


Figure 3 : Anatomie de la ME chez l'Homme. La ME se loge dans la colonne vertébrale et se présente sous la forme d'un tube présentant des renflements en parties cervicale et lombaire. (A). La ME présente une organisation typique bien visible en coupe transversale: les corps cellulaires des cellules nerveuses sont regroupés dans le centre de la ME et composent la substance grise (B). Les cornes dorsales reçoivent les informations sensorielles et les cornes ventrales sont le point de départ des informations motrices qui passent dans les nerfs. La substance blanche est composée de fibres myélinisées ascendantes, descendantes et propriospinales. La ME est protégée par 3 couches de méninges (pie-mère, arachnoïde et dure-mère, de l'intérieur vers l'extérieur). (Image modifiée d'après <http://lecerveau.mcgill.ca/>)

2. Les différents types cellulaires présents dans la ME

Plusieurs types cellulaires sont présents dans la ME.

a. Les motoneurones

Les motoneurones (MNs) se localisent dans les cornes ventrales de la substance grise. Ils acquièrent de nombreuses caractéristiques, constituant ainsi des sous-types distincts, qui sont basés sur la position de leurs corps cellulaires dans la ME et sur leur mode de projections axonales dans la périphérie (Figure 4). Ils sont ainsi divisés en 2 classes, les MNs viscéraux, innervant les différents organes et les MNs somatiques, innervant les muscles. Parmi les MNs somatiques, on distingue : 1) Les MNs alpha (MNs α) qui innervent les muscles squelettiques responsables de la motricité du corps et 2) les MNs gamma (MNs γ) qui régulent l'activité tonique des muscles en innervant les fibres intrafusales.

Les MNs α sont eux-mêmes divisés en plusieurs catégories : 1) les MNs α FF (Fast-twitch, Fatigable) qui innervent les fibres glycolytiques à contraction rapide et peu résistantes à la fatigue (Fibres de type II B), 2) les MNs α FR (Fast-twitch, Fatigue-Resistant) qui innervent les fibres oxydatives à contraction rapide et résistantes à la fatigue (Fibres de type II A) et les MNs α S (Slow-twitch, Fatigue-Resistant) qui innervent les fibres oxydatives à contraction lente et résistantes à la fatigue (Fibres de type I) (Kanning et al., 2010).

Au fur et à mesure de l'avancée du développement embryonnaire, des groupes s'organisent formant des colonnes sur toute la longueur de la ME. Au stade de développement E17,5, Les MNs s'organisent en une colonne médiane et deux colonnes latérales (Morikawa et al., 2009). Au niveau des MNs somatiques, on retrouve : 1) les neurones moteurs de la colonne latérale (LMC) qui sont divisés en un groupe médian qui innervent les muscles des membres ventraux et un groupe latéral qui innervent les muscles des membres dorsaux et 2) les neurones moteurs de la colonne médiane (MMC) qui sont divisés en un groupe médian qui

projetée au niveau des muscles axiaux et un groupe latéral (non représenté sur la figure 4) qui se trouve seulement au niveau thoracique et projetant au niveau des muscles externes (Jessell, 2000).

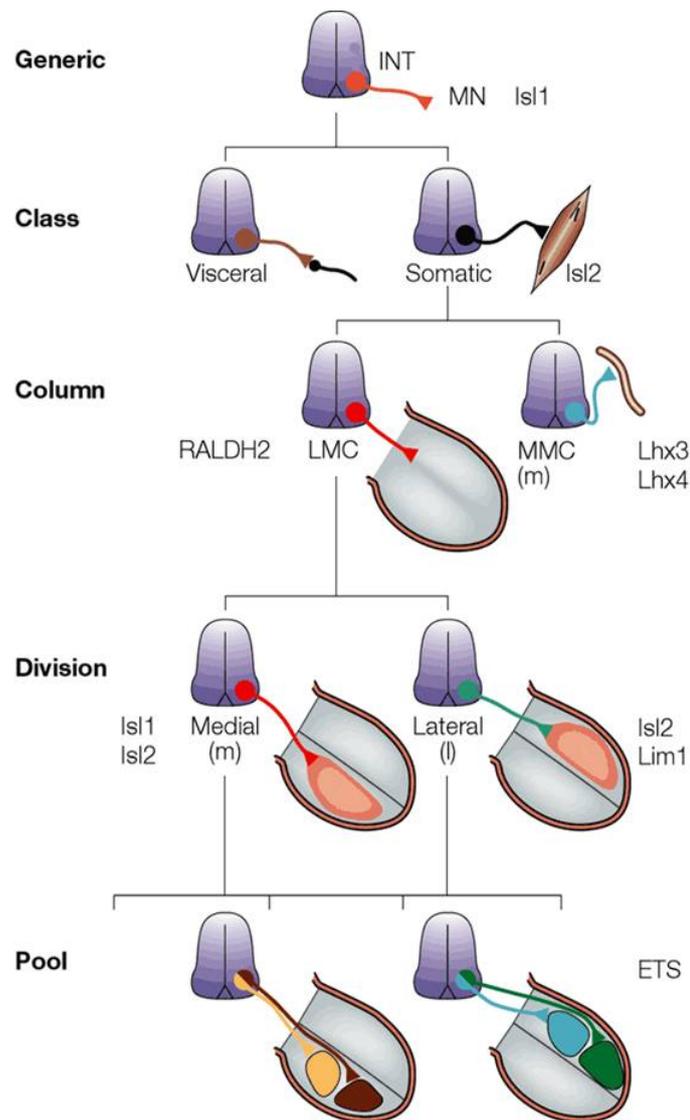


Figure 4 : Hiérarchie des MNs identifiés. Les MNs sont organisés en colonne le long de la ME et forment des groupes qui innervent différents muscles selon leur localisation dans la ME. *LMC* : colonne motrice latérale, *MMC* : colonne motrice médiane. (D'après (Jessell, 2000)).

b. Les interneurones

Les interneurones (INs) spinaux sont essentiels à la transmission de l'information en permettant son intégration et sa modulation. Ils peuvent être classés selon leur type de projection axonale : 1) les INs commissuraux jouent un rôle essentiel pour la coordination droite/gauche des activités motrices et 2) les INs intersegmentaires relaient l'information vers les segments antérieurs ou postérieurs. Une fois activés par les voies sensorielles ou descendantes, les INs libèrent des neurotransmetteurs au niveau des synapses qu'ils forment entre eux ou avec les MNs. C'est l'intégration par les MNs de l'ensemble des données fournies par les INs qui aboutit à une modulation fine de la contraction musculaire nécessaire à la production de mouvements précis et coordonnés.

Dans la ME, certains INs forment des circuits possédant des activités rythmiques ce qui permet d'activer de manière rythmique les MNs et donc les muscles : ce sont les CPGs (central pattern generators ou générateurs de patrons centraux). Ils sont disposés tout le long de la ME et ont différentes cibles selon leur localisation : les CPGs localisés en cervical contrôlent les membres supérieurs et les CPGs au niveau des parties thoraco-lombaires contrôlent les membres inférieurs. Ces centres génèrent des activités rythmiques pour le tonus musculaire mais aussi des patrons d'activité contrôlant la contraction se produisant selon une alternance gauche/droite et muscles fléchisseurs/extenseurs (Kiehn, 2011).

Parmi les INs impliqués dans la locomotion, on distingue : 1) les INs V0 qui jouent un rôle dans l'alternance droite/gauche, avec les V0_D qui sont inhibiteurs et les V0_V excitateurs, 2) les INs V2a glutamatergiques (excitateurs) qui sont impliqués dans la stabilisation et la précision du patron locomoteur, 3) les INs V2b GABAergiques et Glycinerigiques (inhibiteurs) qui participent à la coordination de l'activité motrice au sein de la ME et 4) les INs V3 qui jouent un rôle dans la précision et la régularité des patrons de décharge *via* des projections controlatérales en libérant du glutamate (Kiehn, 2011).

c. Les cellules gliales

Dans le système nerveux, les cellules gliales constituent l'environnement des neurones. Elles assurent le maintien de l'homéostasie, produisent la myéline, et jouent un rôle de soutien, de protection du système nerveux en apportant les nutriments et l'oxygène (Hewett, 2009). Plusieurs types cellulaires sont maintenant bien connus : les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (Hewett, 2009).

Les astrocytes apportent un support structural aux neurones et assurent l'homéostasie hydrique. Ils jouent un rôle essentiel dans la barrière hématoencéphalique au niveau du cerveau en modulant notamment rapidement la perméabilité des cellules endothéliales. Ils participent également activement à la signalisation en régulant l'homéostasie calcique, la production de certains neuropeptides mais aussi en modulant la transmission synaptique par la capture rapide du glutamate libéré dans la fente synaptique (Rowitch and Kriegstein, 2010) (Hewett, 2009).

Les oligodendrocytes sont à l'origine de la gaine de myéline entourant les axones des fibres nerveuses mais sont aussi responsables du regroupement des canaux sodiques voltage dépendants *via* la sécrétion de facteurs (Dupree et al., 2004) qui sont des éléments essentiels pour la conduction saltatoire de l'activité nerveuse le long des axones des MNs.

La microglie est un ensemble de cellules provenant du système immunitaire. Ce sont de petites cellules mobiles ayant une fonction phagocytaire et qui libèrent aussi des cytokines pour activer le recrutement de leucocytes. La microglie peut aussi moduler le réseau neuronal lui-même en augmentant la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux au cours du développement et en remodelant les synapses (Harry and Kraft, 2012). Il a été récemment montré que les cellules microgliales envahissent le SNC durant le développement

embryonnaire par différents mécanismes comme en interagissant avec des fibres de cellules radiaires au cours de leur processus de colonisation (Rigato et al., 2011).

3. Ontogenèse de la ME

a. Formation du tube neural et domaines progéniteurs.

La mise en place du SNC est un processus long qui commence pendant les stades précoces de la vie embryonnaire et se prolonge après la naissance. L'ensemble des processus permettant la formation du tube neural est appelé neurulation et se déroule en plusieurs étapes (Gammill and Bronner-Fraser, 2003). Au début de la vie embryonnaire, la plaque neurale, constituée de cellules ectodermiques se spécialisant en neuroectoderme sous l'influence de signaux, va s'invaginer en une gouttière neurale. Les replis de cette gouttière neurale vont fusionner formant ainsi le tube neural qui va donner par la suite les différentes structures de SNC (encéphale et ME) (Figure 5).

Différents signaux inductifs vont permettre la formation des structures spécialisées du système nerveux. La protéine Sonic hedgehog (Shh) libérée par la notocorde et la plaque du plancher est essentielle pour la formation des MNs du côté ventral de la ME. A l'inverse, les Bone Morphogenic Proteins (BMPs) et Wnt, sécrétés par la plaque du toit, exercent un rôle répresseur sur Shh. Ces molécules diffusent selon un gradient de concentration et vont avoir des effets différents sur les cellules de l'embryon en formation selon leur concentration. Face à BMP, Shh contribue à l'établissement de la polarité dorso-ventrale de l'embryon (Gammill and Bronner-Fraser, 2003), (Lee and Pfaff, 2001), (Briscoe and Novitch, 2008), (Ulloa and Marti, 2010).

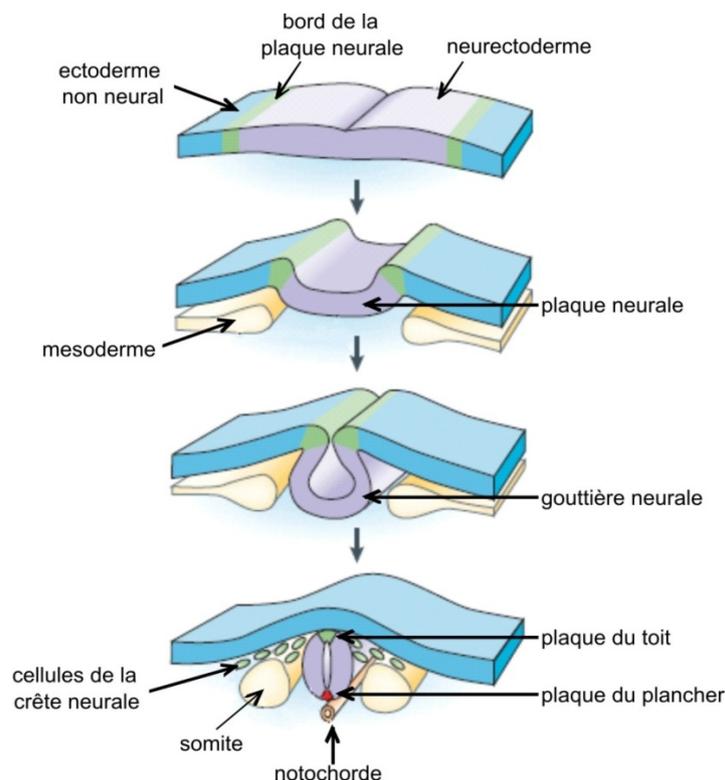


Figure 5: Neurulation ou formation du tube neural lors du développement embryonnaire. Dérivé de l'ectoderme, le neuroectoderme (ou plaque neurale) va se plisser et s'invaginer donnant la gouttière neurale dont les bords vont fusionner pour former le tube neural que l'on peut orienter selon l'axe antéro-postérieur avec la plaque du plancher et la plaque du toit respectivement. Ces 2 structures (et la notochorde) sont responsables de la sécrétion dans le milieu de facteurs de transcriptions qui vont permettre la maturation du tissu nerveux (*modifié d'après (Gammill and Bronner-Fraser, 2003)*).

b. Mise en place des activités dans le réseau moteur

Nous avons ainsi vu que les populations cellulaires se mettent progressivement en place dans la ME. Il en est de même pour les activités du réseau qui apparaissent peu à peu dans les réseaux moteurs.

Dans la ME de souris, avant même l'apparition des synapses chimiques, des activités rythmiques spontanées sont observées dans le réseau moteur chez la souris (E10,5) (Spitzer, 2006). Des mouvements calciques sont responsables de ces bouffées qui favorisent l'extension des neurites au niveau des cônes de croissance (Spitzer, 2006). Suite à la formation des synapses chimiques, les activités spontanées sont régulées notamment dans leur synchronie. L'enregistrement électrophysiologique de racines ventrales a permis de montrer

que les premières activités sont régulières, synchrones et apparaissent dès le stade E11,5 au niveau de la ME de souris (Branchereau et al., 2002).

La mise en place des activités de type locomotrice, induites pharmacologiquement, est également progressive et se déroule en 3 étapes. Tout d'abord, aux stades E11,5 et E13,5 les activités enregistrées sur les paires de racines sont synchrones entre les cotés droit et gauche. Puis, ces activités deviennent irrégulières et asynchrones au stade E14,5. Enfin, au stade E17,5, l'alternance stricte entre les racines ipsi- et contra-latérales est observée (Figure 6) ce qui permet une bonne coordination gauche/droite dans les mouvements (Branchereau et al., 2000b).

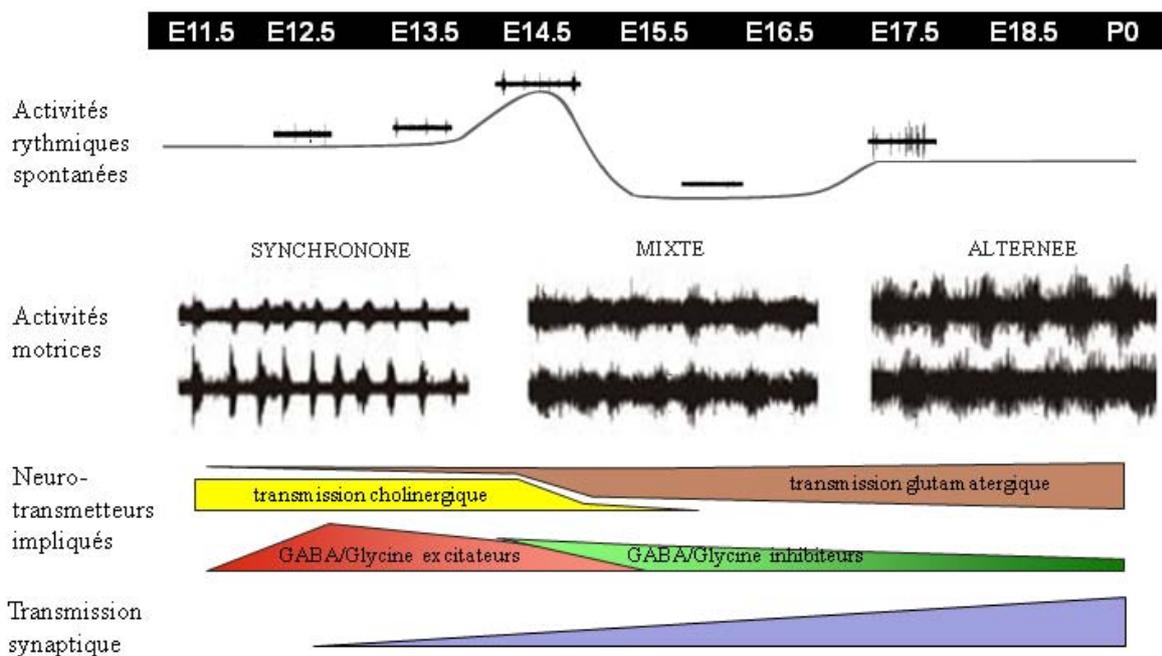


Figure 6 : Mise en place des activités dans la ME de souris lors de la vie embryonnaire. La ME est le siège d'activités rythmiques spontanées dès le stade E11,5. Elles sont alors lentes et se propagent le long de la ME. Les activités de type locomoteur qui sont synchrones au début du développement deviennent progressivement alternées. La transmission synaptique se met elle aussi progressivement en place avec une transmission GABA et Glycinergique qui est excitatrice au début puis qui bascule vers des effets inhibiteurs vers la fin de la vie embryonnaire alors que les activités liées à la libération de glutamate sont de plus en plus présentes (D'après (Allain et al., 2011)).

Les activités électriques spontanées sont dues à une transmission synaptique qui est majoritairement excitatrice dans les stades précoces du développement embryonnaire. Il a été démontré que la libération de GABA et de Glycine a des effets excitateurs au début de leur signalisation (E12,5-E13,5) puis il se produit un effet dépolarisant "shuntant" qui va lentement évoluer vers des effets inhibiteurs (après E15,5) (Figure 6) (Sibilla and Ballerini, 2009). Ce phénomène est dû à une répartition différente des ions chlorure de part et d'autre de la membrane plasmique selon les stades de développement.

Le GABA peut se fixer sur 3 types de récepteurs : 1) les récepteurs canaux de type A ($GABA_A R$) qui laissent passer les ions chlorure, 2) les récepteurs de type B ($GABA_B R$) qui, par l'intermédiaire de protéines G (récepteurs métabotropiques), sont reliés à des canaux laissant passer les ions calcium et potassium et 3) récemment les $GABA_C$ qui ont été décrits dans la rétine et certaines structures du SNC. Ils laissent passer les ions chlorure mais sont encore assez mal étudiés à l'heure actuelle (Le-Corronc et al., 2011). Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudiés les $GABA_A R$ car nous nous sommes intéressés à l'homéostasie chlorure.

Les récepteurs Glycine (GlyR) permettent également le passage des ions chlorure. Ils sont formés par l'association de 5 sous-unités $\alpha 2$ aux stades précoces de développement puis ils vont être progressivement remplacés par des récepteurs hétéromériques $\alpha 1$ ou $\alpha 3$ associés avec β (Legendre et al., 2009).

Enfin, on distingue deux catégories de récepteurs glutamatergiques : 1) les récepteurs glutamatergiques AMPA ou kaïnate (ionotropiques) (étudiés au cours de cette thèse) qui sont responsable de la transmission synaptique rapide et 2) les récepteurs glutamatergiques NMDA (métabotropiques) qui participent à l'intégration du signal excitateur.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse visent ainsi à étudier au niveau ME embryonnaires (E17,5) issues d'embryons WT et SOD1^{G93A} de la même portée : 1) la morphologie et l'excitabilité des MNs, 2) le potentiel d'équilibre des ions chlorure et 3) la locomotion fictive induite pharmacologiquement.

Le premier chapitre montre ainsi qu'une modification de la morphologie, à savoir une réduction des branches terminales (et intermédiaires) au niveau des MNs SOD1^{G93A}, induit une hyperexcitabilité.

Le second chapitre montre que l'équilibre des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 est perturbé dès les stades embryonnaires de développement induisant une modification du ECl. Nous montrons que c'est la 5-HT qui joue un rôle dans la modulation du ECl *via* KCC2.

Enfin, la troisième partie montre que bien que le ECl soit modifié et moins apte à générer des inhibitions, la locomotion fictive induite pharmacologiquement n'est pas altérée si l'activation du CPG est maximale. De plus, l'étude de l'activité GABAergique/Glycinergique et la densité de marquage des acides aminés GABA/Glycine ne nous permet pas d'expliquer la locomotion non altérée.

MATERIEL ET METHODES

Dans cette thèse, nous avons travaillé avec des embryons de souris transgéniques B6SJL-TgN(SOD1-G93A)/1Gur/J exprimant le mutant humain SOD1 (Superoxide Dismutase 1) de façon hétérozygote. Nous avons également utilisé des souris Hb9-eGFP SOD1 surexprimant la Green Fluorescence Protein (GFP) dans les MNs via l'insertion de sa séquence codante après une copie du promoteur Hb9, facteur de transcription essentiel pour la différenciation des MNs (Arber et al., 1999). Toutes les études ont été réalisées au stade de développement E17,5. Ces deux lignées de souris sont entretenues dans l'animalerie mutualisée de l'Université Bordeaux 1 sous la direction de M. Raphaël PINEAU.

I. Génotypage

Des femelles B6-SJL (Janvier Labs, Le Genest St Isle) issues d'un croisement entre une souris C57B6 et une souris SJL sont accouplées avec des mâles SOD1^{G93A} dont la lignée provient de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA) (<http://jaxmice.jax.org/strain/002726.html>) portant la mutation SOD1^{G93A} où une glycine est remplacée par une alanine en position 93. Pour fabriquer cette souris, le transgène a été injecté dans un œuf fertilisé B6SJL F1 (Gurney et al., 1994). Ces souris SOD1^{G93A} transgéniques possèdent une durée de vie limitée (50% survivent à 128.9 ± 9.1 jours) ce qui nécessite un génotypage régulier des mâles reproducteurs. Les souris Hb9-GFP, dont les femelles vont être accouplées avec des mâles SOD1^{G93A}, doivent également être génotypées. Enfin, un génotypage de nos embryons de souris est nécessaire car toutes nos expériences sont réalisées en aveugle. Pour cela, les bouts de queue sont prélevés et lysés avant de réaliser l'amplification par PCR. Les amorces utilisées sont listées dans la table 1.

Génotypage	Amorces	Séquence 5' → 3'	Taille fragment (pb)
SOD1 ^{G93A}	oIMR0113	CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA	muté : 236
	oIMR0114	CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA	muté : 236
	oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	sauvage : 324
	oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	sauvage : 324
Hb9-eGFP		GCTGTTCACCGGGGTGGTGC	sauvage : pas de fragment muté : 600

Table 1: Séquences des amorces utilisées pour les génotypages et tailles des fragments amplifiés.

II. Gestation chez la souris

La gestation chez les souris utilisées B6-SJL (issues d'un croisement entre une souris C57B6 et d'une souris B6J) dure 18 jours contrairement aux autres souris classiquement utilisées (souche OF1 ou Hb9) où la gestation dure 19 jours. Pour la reproduction, les femelles sont placées dans une cage avec plusieurs mâles entre 20h et 8h. Comme il n'est pas possible de déterminer l'heure précise de l'accouplement, l'incertitude de la date d'accouplement est exprimée par une approximation de 0,5 jour sur l'âge des embryons. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des embryons au stade de développement E17,5 soit un jour avant la naissance pour nos souris.

III. Prélèvement de la moelle épinière

Après sacrifice de la souris gestante par dislocation cervicale, une laparotomie est réalisée et les cornes utérines sont prélevées. Le muscle utérin est ensuite coupé et les sacs amniotiques contenant les embryons sont ouverts pour en extraire les embryons. Ceux-ci sont alors plongés dans du liquide physiologique bullé avec 95% O₂ et 5% CO₂ dans l'attente des expériences. Ce milieu extracellulaire utilisé est composé des éléments suivants en mM :

NaCl 111,5 ; KCl 6 ; CaCl₂ 2H₂O 2 ; MgCl₂ 6H₂O 1 ; NaHCO₃ 25 ; NaH₂PO₄ H₂O 1 et D-Glucose 11. Il est appelé communément K⁺ 6 mM. Les embryons peuvent ainsi être maintenus en vie plusieurs heures. Toutes les expériences ont été réalisées sur des embryons présentant des mouvements clairs, spontanés ou à la suite de stimulations sensorielles.

Afin de prélever la ME, les embryons sont décapités au niveau de la flexure pontique. La queue est coupée et congelée afin de réaliser ultérieurement le génotypage. Les embryons sont ensuite fixés en décubitus dorsal, à l'aide de minuties, dans une boîte de pétri recouverte de polymère de silicone (Sylgard®, Dow Corning Michigan USA). L'ensemble des viscères est enlevé puis les vertèbres et les racines spinales dorsales et ventrales sont coupées une à une, à l'aide de ciseaux fins, pour dégager la ME de la colonne vertébrale. La suite de la dissection va dépendre de l'expérience réalisée *a posteriori*.

IV. Electrophysiologie

1. Principe

Tous les organismes vivants sont composés de cellules limitées par des membranes plasmiques limitant des milieux liquides imperméables aux ions. Cependant, des canaux ioniques permettent un passage sélectif d'ions à travers les membranes. La membrane plasmique constitue donc une barrière à perméabilité sélective qui sépare les compartiments intracellulaire et extracellulaire. La concentration des différents ions est différente de part et d'autre de la membrane plasmique à cause des pompes, des différents transporteurs et des canaux de fuite qui permettent l'entrée ou la sortie d'ions. La distribution différentielle des ions induit une différence de charges électriques de part et d'autre de la membrane plasmique : classiquement, les neurones ont leur milieu intracellulaire chargé négativement par rapport au milieu extracellulaire. Lorsqu'un canal perméable à une catégorie ionique s'ouvre, les ions se déplacent selon 2 facteurs : le gradient de concentration ou gradient

chimique, qui représente la répartition des ions concernés de part et d'autre de la membrane, et le gradient électrique, qui représente la répartition globale des charges de part et d'autre de la membrane. Chez l'adulte, le potentiel de repos de la membrane du MN est proche de -70 mV. Chez l'embryon, les variations de potentiel de repos des MNs ont été précédemment mesurés au laboratoire (Delpy et al., 2008). Ainsi, au stade E13,5, le potentiel de membrane est de -55 mV puis de -60 mV au stade E15,5 et enfin de -70 mV au stade E17,5.

Si le potentiel de membrane est très proche du potentiel d'équilibre de l'ion, les mouvements de l'ion concerné sont faibles et le flux net est nul. Prenons le cas du récepteur canal GABA_AR ou GlyR, perméable principalement aux ions chlorure. Si le potentiel de membrane est inférieur au potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl), lors de l'ouverture du récepteur laissant passer cet ion, il se produira une dépolarisation afin d'atteindre le ECl (sortie d'ions chlorure). Les ions chlorure étant chargés négativement, chacun de leur mouvement induit un déplacement de charges et le courant ainsi créé peut être indirectement enregistré. Ce phénomène est le principe de l'électrophysiologie. Les systèmes expérimentaux nous permettent d'imposer un potentiel de membrane (en millivolt, mV) à la cellule enregistrée et de mesurer les variations des courants ioniques (le plus souvent en pico-ampère, pA) et inversement.

2. Protocoles expérimentaux

a. Electrophysiologie : Patch-Clamp en configuration cellule-entière

La ME extraite de l'embryon (voir partie 3) (prélèvement de la ME) est positionnée et maintenue immobile, grâce à un filet que l'on positionne au dessus, dans une chambre d'enregistrement, dans la configuration dite "livre ouvert" (Figure 8A). La face ventrale de la ME est positionnée vers le haut ce qui permet un accès aux MNs. Les MNs enregistrés au cours de cette thèse sont identifiés grâce à la morphologie de leur corps cellulaire en forme de

poire, à leur disposition dans la colonne latérale (Delpy et al., 2008), à leur valeur de résistance de membrane et à leur phénotype.

En effet, au stade de développement E17,5, les INs ont une résistance de membrane 5 à 10 fois supérieure à celle des MNs (Brocard et al., 1999). Aussi, grâce à un marqueur de la colonne latérale (FoxP1, 1/500, Millipore), nous avons vérifié que les MNs que nous étudions appartiennent à la colonne latérale (Figure 7) (voir protocole ci-après).

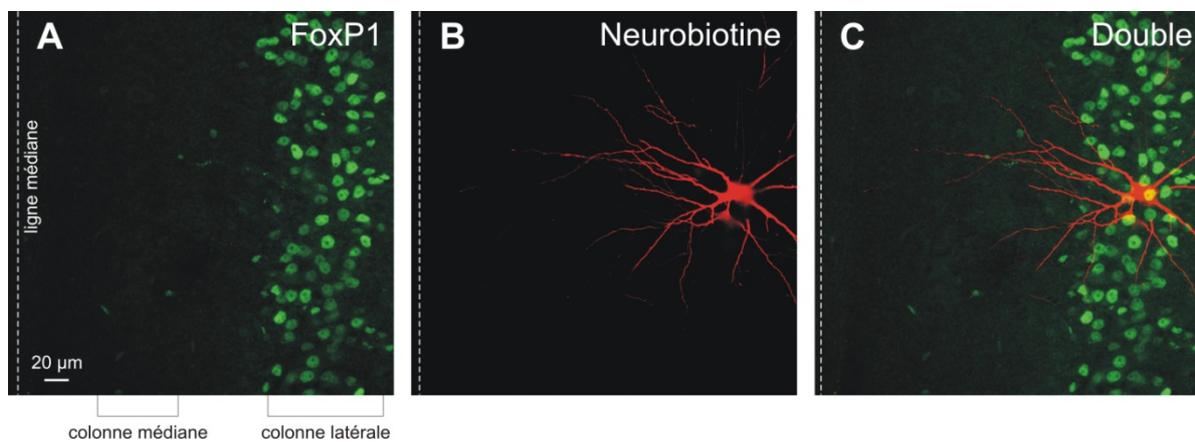


Figure 7 : Identification des MNs enregistrés. (A) La ligne médiane est figurée en pointillés. Les noyaux des MNs des colonnes latérales apparaissent en vert (marquage anti-FoxP1/FITc). (B) Le MN injecté apparaît en rouge (complexe neurobiotine/streptavidine-Cy3). (C) Double marquage du neurone injecté et des MNs des colonnes latérales. L'image projetée de 65 coupes optiques (épaisseur 0,15µm) permet de visualiser le MN injecté dans sa quasi-totalité.

Les pipettes de patch-clamp sont fabriquées à partir de tubes de verre (GC150TF-10 - 1,5mm de diamètre externe - 1,17mm de diamètre interne - Harvard Apparatus, France) avec une étireuse verticale à 2 temps (PP-830, Narishige, Japon). Une fois remplies de liquide intracellulaire filtré (voir composition page suivante), elles sont fixées sur le holder. Elles sont ensuite positionnées sous contrôle visuel (microscope Olympus BX51 WI équipé d'une caméra SPOT RT-SE6, Diagnostic Instruments, Streling Heights, MI USA) sur la membrane cytoplasmique d'un MN (au niveau du corps cellulaire) à l'aide de micromanipulateurs

motorisés (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany). La résistance de pipette est comprise entre 3 et 5 M Ω . Une pression positive est appliquée avant que la pipette ne soit introduite dans le tissu nerveux afin que celle-ci ne se bouche pas au cours de la descente. Lorsque la pipette se trouve accolée à la membrane du MN, la pression positive est relâchée et une légère aspiration est effectuée afin d'établir un "gigaseal" (accolement de la pipette à la membrane ayant une résistance comprise entre 1 et 16 G Ω). Une brève aspiration est ensuite effectuée afin de casser le morceau de membrane délimité par la pointe de la pipette. Ainsi, le milieu contenu dans la pipette se retrouve instantanément en communication directe avec l'intérieur de la pipette (Figure 8B).

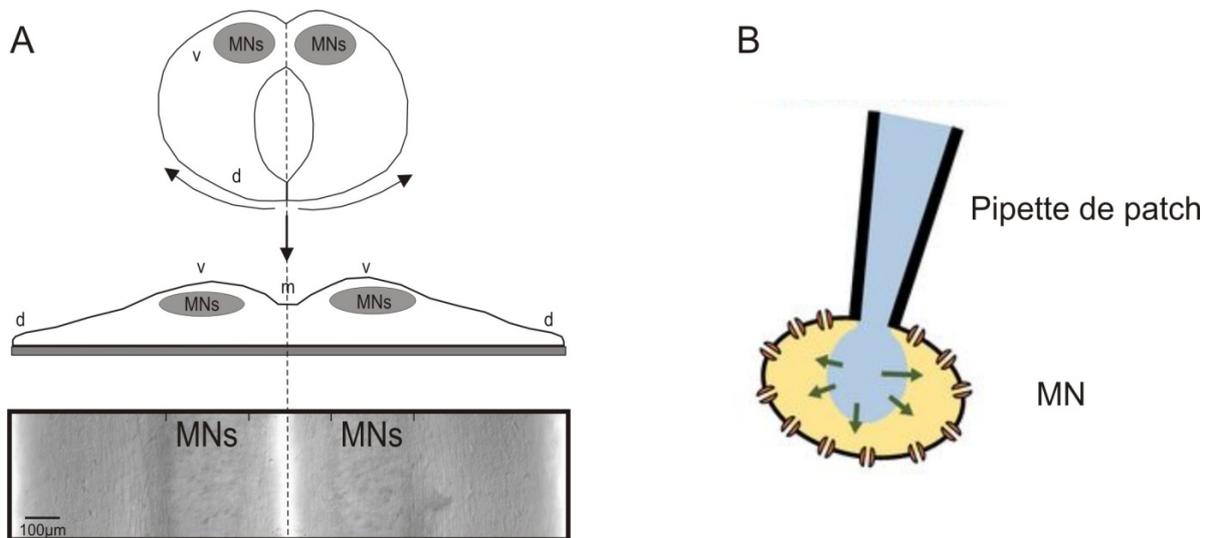


Figure 8 : Représentation schématique de la préparation *in vitro* de la ME (A) et configuration patch-clamp cellule entière (B). Après avoir sorti délicatement la ME de l'embryon, celle-ci est ouverte en position dorsal (d), les méninges sont retirés puis elle est disposée dans la chambre d'enregistrement en configuration "livre ouvert". Les MNs ainsi accessibles et facilement reconnaissable grâce à leur organisation en colonne dans la partie ventrale (v) (A). Sous contrôle visuel, la pipette de patch est approchée au plus près du MN que l'on souhaite enregistrer. Les MNs sont patchés en configuration cellule entière avec du liquide intracellulaire comprenant du K Gluconate (B).

i. Caractéristiques des motoneurones et excitabilité

Cette technique, appelée patch-clamp configuration cellule entière ou « whole-cell » décrite précédemment, va nous permettre d'étudier les propriétés des MNs. Le milieu extracellulaire utilisé (artificial Cerebro Spinal Fluid, aCSF) est composé des éléments suivant en mM : NaCl 111,5 ; KCl 6 ; CaCl₂ 2H₂O 2 ; MgCl₂ 6H₂O 1 ; NaHCO₃ 25 ; NaH₂PO₄ H₂O 1 et D-Glucose 11. Le milieu intracellulaire appelé potassium gluconate contient en mM : K Gluconate 130 ; NaCl 5 ; CaCl₂ 2H₂O 1 ; HEPES 10 ; ATP Mg²⁺ 2 et EGTA 10. ATP et EGTA sont ajoutés extemporanément aux aliquots décongelés le jour de l'expérience (le milieu est stocké à -20°C dans l'attente des expériences). Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 1M.

Les enregistrements sont effectués avec un amplificateur AXON Multiclamp 700B (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA). Les données sont filtrées à 2kHz (filtre passe bas) et numérisées grâce à un convertisseur analogue numérique (Digidata 1322A, Molecular Device) (fréquence d'acquisition 20kHz) et traitées par un logiciel d'analyse de données (Clampex 10.3, Molecular Devices). Elles sont enfin stockées sur un ordinateur. Du fait de la composition ionique (et donc électrique) différente entre la solution de patch et celle du liquide physiologique, il se crée un potentiel appelé potentiel de jonction. Le calcul de ce potentiel de jonction est réalisé grâce à l'outil Tool du logiciel Clampex. La valeur de 13,7mV calculée est corrigée pour chaque mesure de potentiel.

Toutes les analyses des données ont été réalisées *a posteriori* grâce au logiciel Clampfit 10.3 (Axon Instruments). La résistance d'entrée des MNs a été déterminée en mode current-clamp par l'injection de créneaux de courant de durée 1,5s à différentes intensités (*I*) à travers la pipette d'enregistrement. La réponse du MN aux différents voltages a été mesurée (*V*) et des courbes voltage-courant *V/I* ont été réalisées. La résistance de membrane a été mesurée comme la valeur de la pente de la courbe *V/I*. Pour les valeurs positives de pulses

évoquant un train de potentiels d'action (PAs), les fréquences de décharge instantanées ont été mesurées (F) dans le but de construire les courbes F/I et une corrélation avec l'intensité du courant. La valeur de capacitance du MN (c_m) a été collectée dès que la cellule s'est trouvée en configuration cellule entière. La rhéobase du courant a été définie comme l'intensité minimum de courant devant être injecté dans le MN pour évoquer un potentiel d'action (PA). Les caractéristiques du PA [temps nécessaire pour atteindre le pic, durée du PA à mi-hauteur, amplitude et AHP (after-hyperpolarisation)] ont été déterminées à partir du premier PA évoqué.

ii. Injection des motoneurones

Lors de l'enregistrement des propriétés membranaires, certains MNs ont été injectés avec de la Neurobiotine (4%, CliniSciences, Montrouge, France) diluée dans le milieu intracellulaire. Pour confirmer que tous les neurones injectés appartiennent bien à la catégorie des MNs, nous avons réalisé un immunomarquage permettant de révéler les MNs Islet 1/2 positifs (1/100, DSH Bank) (Figure 9) ou FoxP1 positifs (1/500, Millipore) (Figure 7).

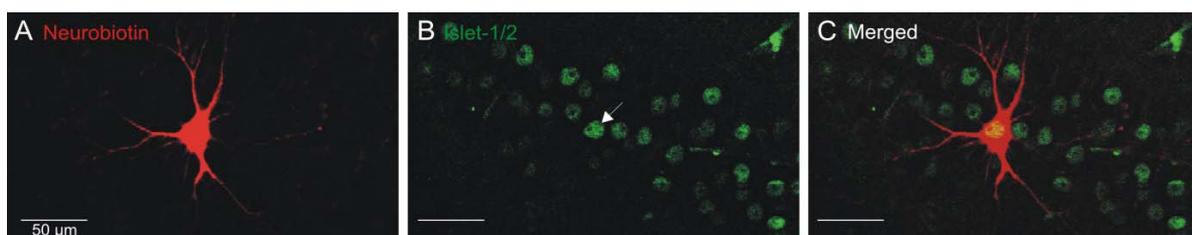


Figure 9 : Les neurones enregistrés en patch-clamp sont Islet 1/2 positifs. (A) La Neurobiotine (en rouge) révèle l'architecture du neurone enregistré. (B) Les facteurs de transcription Islet-1/2 (en vert) sont localisés dans le noyau des MNs organisés en colonne. La flèche met en évidence le noyau du MN enregistré. (C) La superposition des 2 images confirme que le neurone enregistré est bien un MN. Ces illustrations représentent une simple section optique (0,6 μ m en Z), au grossissement x20.

iii. Etude des évènements synaptiques GABA/Glycine et Glutamate

Afin d'enregistrer les événements synaptiques GABA/Glycine et Glutamate, les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment : milieu intracellulaire K-Gluconate, milieu extracellulaire K^+ 6mM et MNs enregistrés en patch-clamp (configuration cellule entière). Le voltage est imposé à -45 mV afin d'observer les événements Glutamatergiques vers le bas et les événements GABAergiques/Glycinergiques vers les haut. L'analyse est réalisée sur une période de 5 minutes à l'aide d'un script développé dans l'équipe par M. Daniel CATTART sous le logiciel Spike 2 (Cambridge Electronic Design, UK). La fréquence et l'amplitude des événements Glutamate et Glycine sont ainsi comparées entre les MNs WT et SOD1^{G93A} de la même portée.

iv. Mesure de l'efficacité du co-transporteur KCC2

Afin de mesurer l'efficacité du co-transporteur KCC2, les MNs spinaux sont enregistrés en configuration cellule entière. La pipette d'enregistrement est remplie du milieu intra-pipette suivant en mM : K-gluconate 120; KCl 13; CaCl₂ 2H₂O 1; HEPES 10; CsCl 5; TEACl 1; Verapamil 10 μ M; ATP Mg⁺ 2; EGTA 10. ATP et EGTA sont toujours ajoutés extemporanément aux aliquots décongelés le jour de l'expérience. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 1M. Le potentiel de jonction est de 14 mV. Les concentrations en ion chlorure intracellulaire et extracellulaire étant connus (21 mM et 139 mM respectivement), l'équation de Nernst permet de calculer une valeur du potentiel d'équilibre théorique de l'ion chlorure (ECl⁻) de -49 mV. Une pipette remplie d'isoguvacine (50 μ M) permet d'administrer par pression des « puffs » de durée contrôlée (20 ms): l'application de l'agoniste isoguvacine permet d'ouvrir spécifiquement les récepteurs ionotropiques GABA_A perméables aux ions chlorure, ceci pendant une durée contrôlée (Figure 10).

Après une période de stabilisation de la cellule enregistrée, le milieu de perfusion (aCSF) est supplémenté en acide kynurénique (2 mM) qui bloque l'ensemble des récepteurs glutamatergiques, et en Tétródotoxine (TTX) (0,2 μ M) qui supprime l'activité réseau dépendant des PAs. Cette configuration permet d'observer spécifiquement les courants dépendants des récepteurs GABA_A (GABA_AR). Par ailleurs, afin que seul KCC2 agisse sur la concentration intracellulaire en chlorure, le milieu extracellulaire contient également de la bumétanide (10 μ M) qui bloque spécifiquement le co-transporteur NKCC1 (Na/K/Cl), responsable de l'entrée de chlorure dans la cellule. Enfin, l'oxygénation sans CO₂ empêche la formation d'HCO₃⁻, bloquant le co-transporteur AE3 (échangeur anion chlorure/bicarbonate) qui augmente [Cl⁻]_i en faisant entrer le chlorure en échange de HCO₃⁻ (Figure 10). Par la suite, l'ajout de la drogue VU0240551 (10 μ M, R&D Systems Europe) bloque spécifiquement le co-transporteur KCC2, afin de confirmer que les effets observés sont KCC2-dépendants.

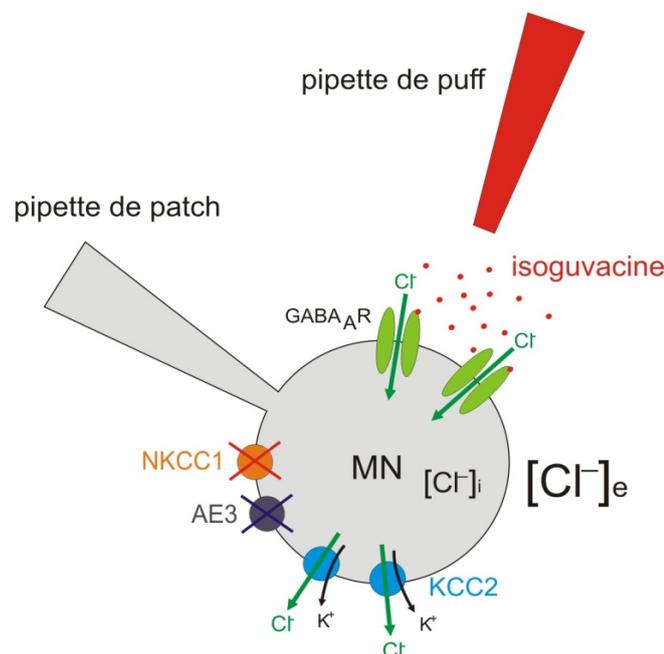


Figure 10 : Schéma expérimental permettant de mesurer l'efficacité de KCC2. Le MN est enregistré en configuration cellule entière. L'isoguvacine est appliquée par pression, ce qui ouvre les récepteurs GABA_A perméable aux ions chlorure. Le co-transporteur KCC2 utilise le gradient de concentration de l'ion K⁺ pour faire sortir le Cl⁻ contre son gradient chimique. Le co-transporteur NKCC1 est bloqué par la bumétanide alors que l'absence de HCO₃⁻ permet d'éliminer le fonctionnement d'AE3.

L'expérience vise à évaluer la capacité de KCC2 à s'opposer à une dépolarisation artificielle de ECl induite par le maintien du potentiel de membrane à une valeur très dépolarisée (-20 mV) concomitante à l'ouverture permanente des GABA_AR. Ainsi, le ECl est artificiellement dépolarisé par une application prolongée d'isoguvacine qui ouvre les GABA_AR alors que la membrane est clampée à -20mV (V_h -20 mV) (Figure 11A). L'ouverture prolongée des GABA_AR (40 secondes) entraîne une entrée massive d'ions chlorure. La concentration intracellulaire en chlorure [Cl⁻]_i augmente, de même que ECl qui tend alors vers -20 mV. KCC2, qui extrude les ions chlorure, s'oppose à la dépolarisation de ECl, donc plus KCC2 est actif et moins ECl augmente rapidement.

ECl est mesuré par un protocole de rampe durant lequel le potentiel de membrane est rapidement imposé de -100 mV à +10 mV en une seconde. Cette rampe est réalisée en condition contrôle puis lors de l'application d'isoguvacine. La soustraction du courant contrôle (Figure 11C) au courant sous isoguvacine permet de mesurer le potentiel d'inversion du courant GABA_AR. Nos conditions expérimentales garantissant un courant GABA_AR exclusivement chlorure, ce potentiel d'inversion est assimilable à ECl. Ainsi chaque protocole de rampe permet de mesure ECl à cet instant et donc de suivre son évolution au cours de l'application prolongée d'isoguvacine (40 s) (Figure 11B). La repolarisation du ECl est mesurée pendant un lavage de 4 minutes (clairance de l'isoguvacine). Puis un antagoniste spécifique de KCC2, le VU0240551 (10 μM, R&D Systems Europe), est appliqué durant 15 minutes afin de bloquer KCC2. Le même protocole de 40 secondes suivi des 4 minutes de lavage est effectué en présence du bloqueur de KCC2.

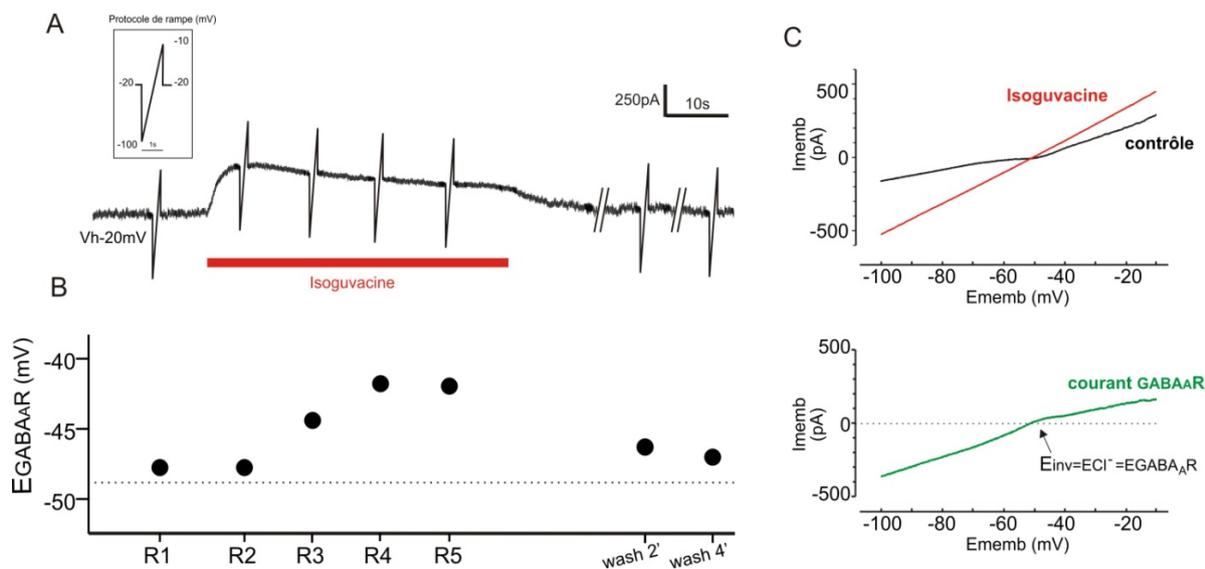


Figure 11 : Protocole de mesure du ECl. (A) Courant enregistré à $V_h = -20$ mV (potentiel de jonction non corrigé). L'application d'isoguvacine induit un courant positif qui correspond au courant entrant d'ions chlorure. Il s'estompe légèrement au cours des 40 secondes car des récepteurs GABA_AR se désensibilisent. (B) Protocole de rampe. Chaque protocole (R1 à R5) permet de mesurer ECl avant l'application (contrôle), pendant l'application (2'', 12'', 22'' et 32''), puis après un lavage de 2 minutes puis 4 minutes (wash 2', wash 4'). (C) La soustraction du courant enregistré pendant la rampe d'isoguvacine au courant contrôle (rampe effectuée avant l'application) permet d'obtenir le courant GABA_AR qui s'inverse au potentiel ECl.

b. Electrophysiologie : Patch-Clamp en configuration perforée

Le début de la technique du patch-clamp en configuration perforée est identique à celui du patch-clamp en configuration cellule-entière. La suite diffère puisque lorsque la pipette est collée à la membrane du MN, le seal n'est pas cassé. Le milieu intracellulaire de la pipette utilisé est composé en mM : KCl 130, HEPES 10, EGTA 10 et ATP Mg²⁺ 2. ATP et EGTA sont ajoutés extemporanément au milieu décongelé le jour de l'expérience (milieu stocké à -20°C). Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 1M. Le milieu extracellulaire utilisé est du milieu K⁺ 6 mM dont la composition a été décrite précédemment. Afin d'obtenir une configuration perforée, un antibiotique, la gramicidine (20 µg/mL Sigma Aldrich), est dilué dans le milieu intracellulaire de patch perforé KCl 130 mM et filtré (filtre 0,22 µm). Des associations de 2 molécules de gramicidine forment des pores à la pointe de la pipette, au niveau de la bicouche lipidique du fait de la structure en hélice de la gramicidine dimérique

(action α_2 type porine) (Figure 12). Les pores ainsi formés par la gramicidine sont exclusivement perméables aux cations, laissant la concentration du chlorure intracellulaire physiologique intacte. Il est aussi possible de déterminer cette concentration physiologique.

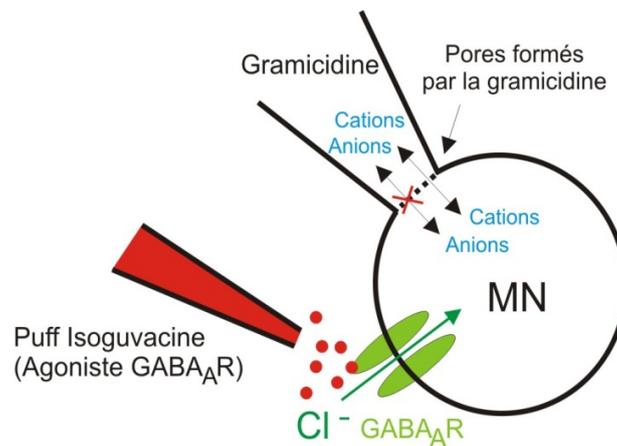


Figure 12 : Représentation schématique du patch clamp en configuration perforée et mode d'action de l'isoguvacine. Lorsque la pipette de patch est accolée à la membrane du corps cellulaire du MN, la gramicidine va faire des trous dans la membrane laissant passer les cations mais pas les anions. L'isoguvacine va se fixer sur son récepteur GABA_A (GABA_AR) permettant ainsi son ouverture et donc la mesure du ECl.

La gramicidine met environ 30 minutes pour perméabiliser la membrane mais ce temps est variable selon les cellules. Lorsque l'antibiotique a permis d'accéder au milieu intracellulaire (configuration intracellulaire perforée), un courant positif est injecté en configuration current-clamp afin de voir si le MN est capable d'émettre un PA de taille correcte. L'application brève d'isoguvacine va ouvrir les récepteurs canaux GABA_A permettant de mesurer le potentiel d'inversion des courants GABA_AR induits. Il est alors possible de déterminer le ECl et donc la concentration intracellulaire en ions chlorure, ceci grâce à l'équation de Nernst. Si une rupture de la membrane survient, ECl sera proche de 0mV (voir calcul ci-après).

Equation de Nernst

$$E_{ion} = 2,3 (RT)/ZF * \log ([ion]_{intra}/[ion]_{extra})$$

Où E_{ion} est le potentiel d'équilibre de l'ion (en Volt).

R est la constante des gaz parfaits ($8,3145 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

T est la température (en Kelvin).

Z est la valence ou la charge de l'ion.

F est la constante de Faraday (96485 C.mol^{-1}).

$[ion]_{intra}$ est la concentration de l'ion à l'intérieur de la cellule (en mole.L^{-1}).

$[ion]_{extra}$ est la concentration de l'ion à l'extérieur de la cellule soit celle du liquide physiologique (en mole.L^{-1}).

Dans notre cas, lors du passage en configuration cellule entière, nous avons pour l'ion chlorure les valeurs suivantes:

$$[Cl^-]_{intra} = 130 \text{ mM}$$

$$[Cl^-]_{extra} = 123,5 \text{ mM}$$

$$Z = -1$$

$$T = 293 \text{ K}$$

$$E_{Cl} = 2,3 (8,3145*293)/(-1*96485)*\log(130*10^{-3})/(123,5*10^{-3}) = 1,5*10^{-3} \text{ V} = 1,5 \text{ mV}$$

Les cellules, dont le seal s'est cassé, ne sont donc pas prises en compte dans les résultats.

Pour mesurer le E_{Cl} , nous imposons des valeurs de voltage allant de -80 mV à 0 mV par palier de 10 mV . Une application d'isoguvacine (Tocris Bioscience, GB) est réalisée à l'aide d'une pipette positionnée à proximité du corps cellulaire du MN et d'un PicoSpritzer III (Parker Hannifin Corp, NJ, USA) (3 psi , 20 ms). L'isoguvacine est dissoute au préalable dans le milieu extracellulaire et est appliquée à la concentration de $100 \mu\text{M}$.

Des mesures du ECl sont réalisées en conditions contrôles puis lorsque le MN est isolé du réseau. Pour isoler le MN du réseau, de la Tetrodotoxine (TTX, 0,2 μ M, Latoxan ref L85 03), bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendants, de la D-Tuboccurarine (10 μ M, Sigma Aldrich), antagoniste des récepteurs nicotinique, de la strychnine hemisulfate salt (3 μ M, Sigma Aldrich), antagoniste des récepteurs glycinergiques, et de l'acide kynurénique, antagoniste des récepteurs glutamatergiques (2 mM, Sigma Aldrich) sont ajoutés au milieu extracellulaire.

Ce même milieu est utilisé pendant tout le reste de l'expérience : lors de l'application de 5-HT (10 μ M, Sigma Aldrich) (application 12 min), lors de l'application d'un cocktail composé de 5-HT (10 μ M, Sigma Aldrich), de Méthysergide (10 μ M, R&D Systems Europe) (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}) et de Kétansérine (10 μ M, R&D Systems Europe) (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}) (application 16 min) ou lors de l'application d'un cocktail composé de 5-HT (10 μ M) et de VU0240551 (bloqueur du co-transporteur KCC2) (10 μ M, R&D Systems Europe).

Le potentiel d'équilibre de l'ion est calculé à l'aide du logiciel GraphPad Prism par l'utilisation de la régression linéaire. Le potentiel de jonction, calculé à partir de la composition des milieux intracellulaire et extracellulaire, est de 3,4 mV. Ce potentiel de jonction étant négligeable, il n'a pas été corrigé.

3. Enregistrement extracellulaire: Locomotion fictive induite pharmacologiquement

La ME est prélevée (comme décrit précédemment) et les racines sont conservées afin d'enregistrer l'activité locomotrice. Pour cela, la ME n'est pas ouverte et les méninges sont conservées. Elle est placée face ventrale vers le haut afin d'avoir un accès aux racines L3 droite et gauche (Figure 13A). Du liquide physiologique K⁺ 6 mM bullé (95% O₂ et 5% CO₂) est continuellement perfusé tout au long de l'expérimentation. Des pipettes en verre (Clark

Electromedical Instruments, Reading, UK) sont préparées à l'aide d'une étireuse horizontale (Brown-Flaming P80, Sutter Instruments). La pointe de la pipette est cassée et rodée à l'aide d'une microforge (MF-830, Narishige Japon) afin d'avoir un diamètre à la pointe adapté au diamètre des racines ventrales lombaires. Grâce à ces pipettes ajustées, les racines L3 droite et L3 gauche sont succionnées afin d'enregistrer les PAs au niveau des axones moteurs. Différentes conditions pharmacologiques ont été testées afin d'induire de la locomotion fictive: application de 5-HT (5 μ M) pendant 5 minutes et application de 5-HT (10 μ M, Sigma Aldrich), NMDA (10 μ M, Sigma Aldrich) et DA (100 μ M, Sigma Aldrich) pendant 5 minutes.

L'alternance entre les racines L3 droite et gauche, correspondant aux fléchisseurs, est ensuite analysée à l'aide d'un script développé au laboratoire par M. Daniel CATTART (Figures 13B3, 13B4 et 13C) sous le logiciel Spike 2. Ce script effectue, dans un premier temps, une identification des PAs enregistrés sur les racines L3 droite et L3 gauche grâce à un seuillage automatique. Puis les fréquences instantanées de ces PAs sont calculées au cours du temps. Un filtre passe bas flottant permet de lisser ces activités sans décalage temporaire (Figure 13B3) et de repérer les pics d'activités au sein de chaque bouffée (Figure 13B4). Enfin la relation de phase moyenne entre les activités L3d et L3g est calculée par une méthode de statistiques circulaires (Figure 13C).

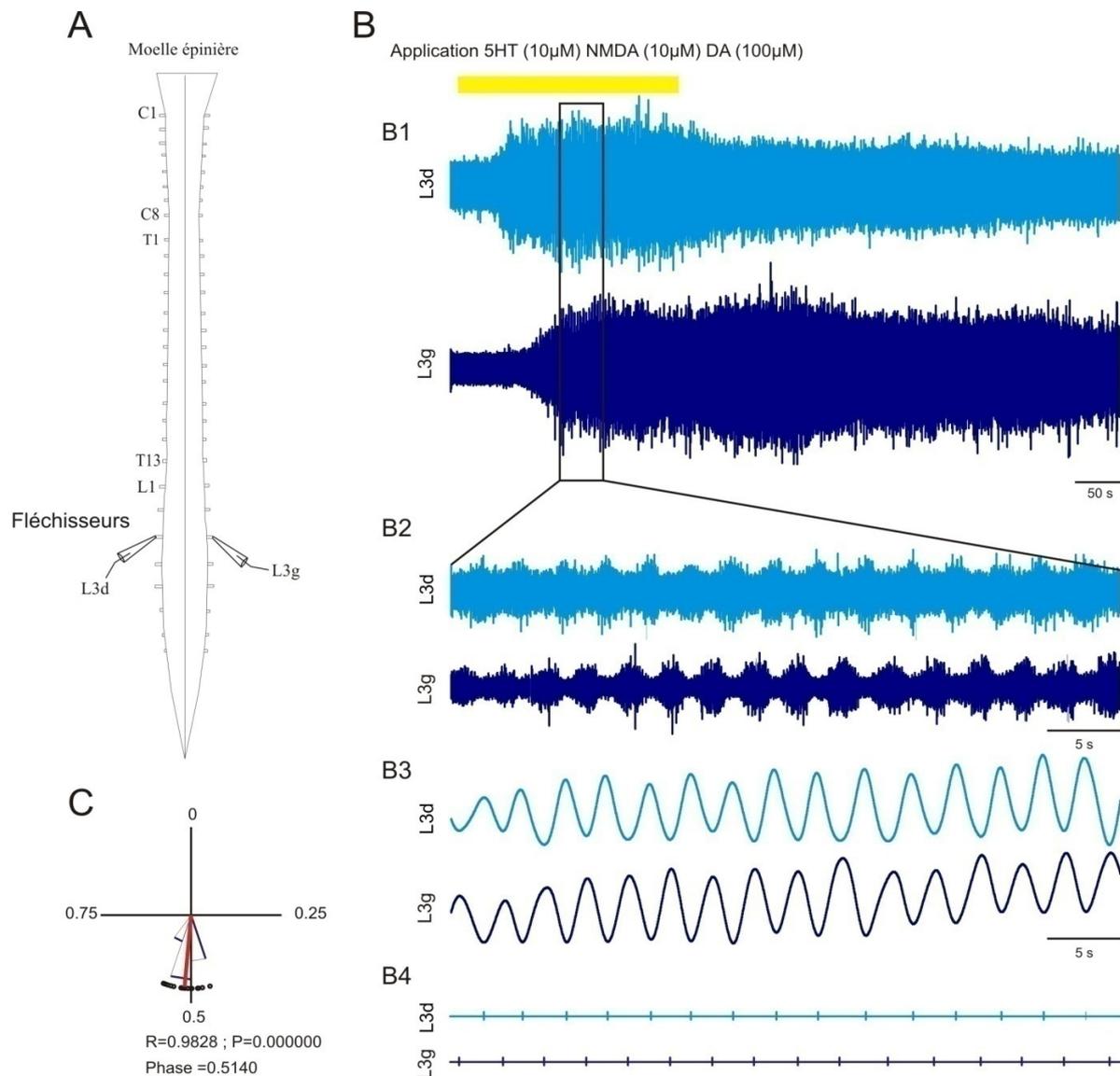


Figure 13 : Locomotion fictive induite pharmacologiquement. (A) La moelle épinière est prélevée délicatement de l'embryon en prenant soin de ne pas abîmer les racines. Les racines L3 droite et gauche sont ensuite succionnées à l'aide de pipette. (B) La locomotion fictive est induite à l'aide d'un cocktail composé de 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et dopamine (DA) (100 μ M) (B1-B2). Un script développé sous Spike 2 permet de détecter les bouffées induite par le cocktail (B3). Brièvement, la fréquence de décharge des racines L3d et L3g est calculée et filtrée afin de détecter les pics d'activité au sein de chaque bouffée au cours du temps (B4). La relation de phase moyenne est alors calculée par une méthode de statistiques circulaires (C).

V. Immunomarquages

1. Protocole

Des marquages immunohistologiques/immunohistochimiques ont été effectués sur des ME ouvertes ou sur des coupes frontales. Pour cela, la ME entière, prélevée de l'embryon puis ouverte ou non le long du sillon dorsal, est fixée pendant 2 heures à température ambiante avec du ParaFormaldéhyde (PFA) 4% puis rincée trois fois avec du PBS 0,1M. Pour les marquages immunohistochimiques réalisés sur ME, l'incubation des anticorps primaires peut se faire après ce rinçage. Pour les coupes frontales, les ME non ouvertes sont cryoprotégées par des bains successifs de sucrose 15% puis 30% à 4°C pendant 24h pour chaque étape. La partie lombaire, reconnaissable par ses renflements, est isolée et incluse dans une capsule de gélatine (Gelatin capsule, size 000, ref 70101, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) contenant une résine (OCT Compound ref 4583, Sakura Finetek, Alphen aan de Rijn, Pays-Bas) qui durcit au contact de l'isopentane refroidi à l'azote liquide (-196°C). Des coupes frontales de 25 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat (CM3050 S, Leica Microsystem, Nanterre, France) et déposées sur des lames gélatinées. Pour le gélatinage, les lames sont immergées 10 minutes dans une solution de gélatine 2% et d'alun de chrome 0,1%, égouttées et séchées pendant 48h dans une étuve à 40°C. Une fois déposées sur les lames, les coupes frontales sont séchées à température ambiante pendant quelques heures puis conservées au congélateur (-20°C) en attendant la réalisation des immunomarquages. Pour cette dernière étape, les coupes frontales de ME sont réhydratées dans du PBS 0,1M pendant 20 minutes à température ambiante avant le début de l'expérience.

La ME entière (ouverte) ou les lames contenant les coupes frontales sont alors incubées pendant 48 heures à 4°C avec un anticorps primaire dilué dans une solution de PBS

0,1M avec 2% de BSA (Bovine Serum Albumin) et 0,5% de Triton X-100. Les ME ou les coupes sont ensuite rincées avec du PBS (3 fois 5 minutes) puis incubées pendant 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière avec une solution d'anticorps secondaire fluorescent approprié. Après 3 rinçages de 5 minutes, les ME ou les coupes sont montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Fluoromount G (FP-483331, Interchim). Après polymérisation du milieu de montage, les marquages peuvent être observés au microscope confocal.

La liste et la provenance des anticorps primaires sont indiquées dans la table 2. Les anticorps secondaires fluorescents proviennent de chez Molecular Probes Ils sont produits chez la chèvre et sont couplés avec des sondes fluorescentes Alexa 488 (FITC, vert), Alexa 546 (TRITC, rouge) et Alexa 647 (Cy5, rouge lointain, couleur restituée bleue).

Pour les marquages de KCC2 sur la membrane, nous avons utilisé une lignée de souris Hb9-eGFP-SOD1^{G93A} afin de travailler sur des MNs identifiés (GFP) SOD1^{G93A} ou WT de la même portée. Ceci nous a permis de localiser le co-transporteur KCC2 situé au niveau de la membrane cytoplasmique du corps cellulaire du MN.

Anticorps primaire, Fournisseur	Dilution	Anticorps secondaire	Cible étudiée
FoxP1, Millipore	1/500	anti-lapin	MNs colonne latérale (marquage nucléaire)
GABA, A2052, Sigma Aldrich	1/200	anti-lapin	INs GABA
Glycine, IG1001, ImmunoSolution, Jesmond New South Wales, Australia	1/3000	anti-rat	INs Glycine
Islet 1a, 39.4D5, DSH Bank, Iowa	1/100	anti-souris	MNs (marquage nucléaire)
Islet 2b, 40.2D6, DSH Bank, Iowa	1/100	anti-souris	MNs (marquage nucléaire)
KCC2, Upstate, Millipore	1/400	anti-lapin	Cotransporteurs KCC2
NeuN, MAB377, Millipore	1/500	anti-souris	Neurones (marquage nucléaire)
NKCC1-phosphorylé, Biff Forbush	1/3000	anti-lapin	Forme phosphorylée du cotransporteur NKCC1
5-HT, Tramu	1/5000	anti-lapin	Fibres

Table 2 : Liste des anticorps utilisés en marquages immunohistochimiques. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS contenant du Triton (1%), de la BSA (2%). L'incubation est réalisée à 4°C en chambre humide pendant 48h. Les anticorps secondaires sont dilués à différentes concentrations selon l'anticorps utilisé dans du PBS et incubés pendant 2h à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité. *INs* = interneurones, *MNs* = motoneurones.

2. Acquisition des images en microscopie confocale

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal BX51 Olympus Fluoview équipé d'un laser argon (émission à 488 nm, marquage FITC Alexa 488), d'un laser hélium néon vert (émission à 543 nm, marquage TRITC Alexa 546) et d'un laser hélium néon rouge (émission à 633 nm, marquage Cy5 Alexa 647). Des coupes optiques sériées ont été réalisées avec des épaisseurs différentes en fonction de l'objectif utilisé : 1,2 µm à l'objectif x10 ; 0,6 µm au x20 ; 0,3 µm au x40 et au x60.

Pour les observations FoxP1 et KCC2 sur la membrane, nous avons utilisé un microscope confocal Leica SP5 situé au BIC (Bordeaux Imaging Center) donc le principe est le même que pour le microscope précédent excepté l'objectif x60 qui est remplacé par un objectif x63 (Figure 14).

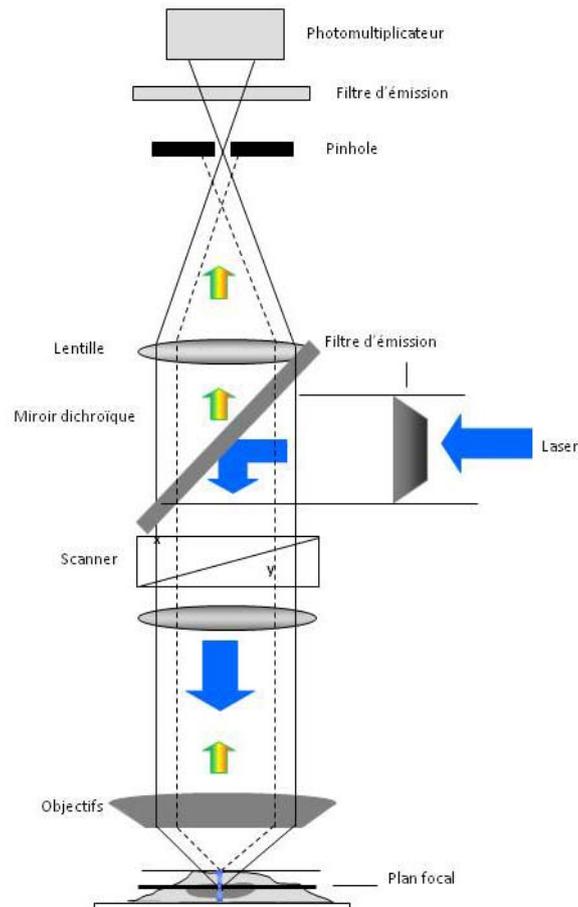


Figure 14 : Schéma du principe du confocal. Un laser envoie des rayons lumineux (flèches bleues) de longueur d'onde donnée sur tout le tissu. Cette lumière est sélectionnée par un filtre d'émission selon la longueur d'onde utilisée. En réponse, les fluorochromes fluorescents (flèches multicolores) vont être excités en un point de l'échantillon. Un photomultiplicateur permet d'amplifier les rayons émis par un point focal précis du tissu.

3. Analyse des images et quantifications

L'analyse des images est réalisée avec le logiciel ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Pour les quantifications du co-transporteur NCCC1 phosphorylé, du GABA et de la Glycine, des acquisitions sont réalisées à l'objectif x40. L'intensité moyenne des pixels est mesurée sur une projection de 4 coupes dans la zone dorsale, ventrale ou au niveau du canal central selon les conditions, et le bruit de fond moyen est déduit de cette valeur.

Pour les quantifications du co-transporteur KCC2, des acquisitions sont réalisées à l'objectif x63. L'intensité moyenne des pixels est mesurée sur une coupe dont l'acquisition a été réalisée au niveau ventral et le bruit de fond moyen est déduit de cette valeur. Pour la quantification du co-transporteur KCC2 au niveau de la membrane cytoplasmique (zone du corps cellulaire) du MN, une macro sous ImageJ a été développée par M. Sébastien MARAIS au BIC. Cette macro permet de mesurer l'intensité moyenne de fluorescence dans une zone comprenant la bordure du MN (aux alentours de la membrane cytoplasmique) et 5 pixels à l'intérieur et 5 pixels à l'extérieur de cette bordure.

VI. Reconstruction 3D des MNS

Pour la reconstruction des MNs, les coupes optiques de 0,2µm sont réalisées au grossissement x60 avec une ouverture numérique de 1,0.

Le "shrinkage", qui correspond à une déformation du tissu due à la fixation, a été estimé grâce à l'acquisition d'images d'un MN injecté avec de la Rhodamine-Dextran (0,5%, Molecular Probes) diluée dans du milieu intracellulaire, avant et après fixation avec le PFA. Le diamètre du corps cellulaire de ce MN a été mesuré dans les 3 dimensions. Un facteur de shrinkage de 0,3 a été estimé dans l'axe Z et une correction des valeurs dans cette dimension a systématiquement été appliquée pour chaque MN. Aucun shrinkage n'a été observé dans les axes X-Y, comme décrit au préalable dans la littérature (Li et al., 2005).

Les reconstructions 3D des MNs WT et SOD1^{G93A} ont été réalisées grâce au logiciel *NeuroLucida* (MBF Bioscience Inc, Williston, VT, USA). Les paramètres morphométriques et les caractéristiques morphologiques et topologiques de l'arborisation dendritiques sont obtenus grâce au logiciel *NeuroLucida explorer* (MBF Bioscience Inc).

VII. Simulations informatiques

1. Morphologie du MN simulé

A partir des données obtenues par les reconstitutions 3D des MNs, des simulations ont été réalisées grâce au logiciel NEURON 7.1 afin d'observer les effets du raccourcissement des segments terminaux sur l'excitabilité du MN. Pour cela, 2 MNs simulés ont été construits : un MN WT et un MN SOD1^{G93A}-like. Ces deux MNs sont identiques avec le même équipement en canaux et la même topologie (mêmes corps cellulaires, mêmes dendrites et axones, excepté les segments dendritiques terminaux qui sont réduits de 60% chez le MN SOD1^{G93A}-like par rapport au MN WT comme il a été observé au niveau des reconstitutions 3D). Les données utilisées pour le MN WT sont celles collectées à partir d'un MN reconstruit. Ce MN est composé d'un corps cellulaire (11 µm de diamètre), de 15 dendrites et d'un axone (longueur 200 µm et diamètre 1 µm). Le diamètre de chaque segment dendritique est identique pour le MN réel. L'axone est composé de 20 compartiments. Les dendrites sont composées d'un nombre de compartiments dépendant de leur longueur et leur diamètre (pour chaque compartiment, le rapport diamètre/longueur est $\leq 1/10$). L'axone est composé d'un segment initial (longueur 35 µm) et d'un axone (longueur 165 µm). Les propriétés de chaque compartiment peuvent être définies indépendamment.

2. Propriétés passives de tous les compartiments

Dans chaque compartiment, la capacitance c_m (µF) a été calculée à partir de l'équation :

$$c_m = C_m \times area$$

où l'aire correspond à la surface de membrane du compartiment (cm²) et C_m la capacitance membranaire spécifique (1 µF.cm⁻²). De plus, un courant de fuite a été calculé dans chaque compartiment par l'équation :

$$I_{leak} = (E_{leak} - E) \times G_{leak}$$

où E_{leak} est le potentiel d'équilibre, G_{leak} la conductance leak et E le potentiel de membrane. Dans les simulations réalisées, $E_{leak} = -73$ mV et $G_{leak} = 1/R_m$, avec R_m la résistance de membrane spécifique. Dans le but d'obtenir une valeur d'input résistance de 120 M Ω , la valeur de la R_m a été fixée à 18500 Ω cm². Pour tous les compartiments, la résistance spécifique de l'axolème (R_a) a été fixée à 100 Ω cm.

3. Les propriétés actives de l'axone et du segment initial

En plus des propriétés passives, chaque compartiment de l'axone possède des propriétés actives dues aux canaux potassiques (K) et sodiques (Na) simulés selon le formalisme d'Hodgkin et Huxley (HH). Leur densité a été adaptée dans le but d'obtenir un seuil de PA de -47.3 mV comme observé au niveau du réel MN WT

$gNa_{hh}Max = 0.80$ S.cm⁻² et $gK_{hh}Max = 0.12$ S.cm⁻² dans le segment initial

$gNa_{hh}Max = 0.12$ S.cm⁻² et $gK_{hh}Max = 0.036$ S.cm⁻² dans l'axone. Le formalisme des canaux Na et K était conforme aux équations standards de HH.

Pour les canaux sodiques: $gNa_{hh} = gNa_{hh}Max \times m \times m \times m \times h$

Activation: $m' = \alpha_m \times (1 - m) - \beta_m \times m$

$$\alpha_m = A_{\alpha_m} \times (k_{\alpha_m} \times (E - d_{\alpha_m})) / (1 - \exp(-k_{\alpha_m} \times (E - d_{\alpha_m}))); A_{\alpha_m} = 1 \text{ (ms}^{-1}\text{)}; k_{\alpha_m} = 0.1 \text{ (mV}^{-1}\text{)};$$

$$d_{\alpha_m} = -40 \text{ (mV)}$$

$$\beta_m = A_{\beta_m} \times \exp(k_{\beta_m} \times (E - d_{\beta_m})); A_{\beta_m} = 4 \text{ (ms}^{-1}\text{)}; k_{\beta_m} = -0.055556 \text{ (mV}^{-1}\text{)}; d_{\beta_m} = -65 \text{ (mV)}$$

Inactivation: $h' = \alpha_h \times (1 - h) - \beta_h \times h$

$$\alpha_h = A_{\alpha_h} \times \exp(k_{\alpha_h} \times (E - d_{\alpha_h})); A_{\alpha_h} = 0.07 \text{ (ms}^{-1}\text{)}; k_{\alpha_h} = -0.05 \text{ (mV}^{-1}\text{)}; d_{\alpha_h} = -65 \text{ (mV)}$$

$$\beta_h = A_{\beta_h} / (1 + \exp(k_{\beta_h} \times (E - d_{\beta_h}))); A_{\beta_h} = 1 \text{ (ms}^{-1}\text{)}; k_{\beta_h} = -0.1 \text{ (mV}^{-1}\text{)}; d_{\beta_h} = -35 \text{ (mV)}$$

Pour les canaux potassiques: $g_{K_{hh}} = g_{K_{hh}}^{Max} \times n \times n \times n \times n$

Activation: $n' = \alpha_n \times (1 - n) - \beta_n \times n$

$$\alpha_n = A_{\alpha_n} \times (k \times (E - d_{\alpha_n})) / (1 - \exp(-k_{\alpha_n} \times (E - d_{\alpha_n}))); A_{\alpha_n} = 0.1 \text{ (ms}^{-1}\text{)}; k_{\alpha_n} = 0.1 \text{ (mV}^{-1}\text{)}; d_{\alpha_n} = -55 \text{ (mV)}$$

$$\beta_n = A_{\beta_n} \times \exp(k \times (E - d_{\beta_n})); A_{\beta_n} = 0.125 \text{ (ms}^{-1}\text{)}; k_{\beta_n} = -0.0125 \text{ (mV}^{-1}\text{)}; d_{\beta_n} = -65 \text{ (mV)}$$

4. Adaptation à la décharge

Afin de mimer l'adaptation de la fréquence de décharge observée chez les MNs WT réels, des canaux potassium voltage-dépendants du calcium (K_{Ca}), les canaux calciques de type L et la dynamique calcique intracellulaire ont été ajoutés dans le soma.

La dynamique calcique utilisée pour contraindre la décroissance de la concentration intracellulaire de calcium étant basée sur une pompe à calcium (Destexhe et al., 1993) et un effet tampon avec une décroissance exponentielle du 1^{er} ordre:

$$\text{Pompe : } dCa_i/dt = -K_t \times Ca_i / (Ca_i + K_d)$$

Où K_t est le constante de temps de la pompe et K_d la constante de dissociation.

$$\text{Tampon : } dCa_i/dt = (Ca_{inf} - Ca_i) / \tau_{a,r}$$

où Ca_{inf} est la valeur de l'équilibre intracellulaire calcique (environ 200-300 nM) et τ_r est la constante de temps de la pompe calcique.

La dynamique calcique submembranaire est relativement rapide, de l'ordre de 1-10 ms (Blaustein, 1988). La densité des canaux calciques de type L et des canaux K_{Ca} est respectivement de $0.00006 \text{ S.cm}^{-2}$ et 0.0065 S.cm^{-2} .

L'alimentation du pool calcique par les canaux L est :

$$dCa_i/dt = (-10000 \times iCa) / (2 \times F \times \text{depth})$$

où F est la constante de Faraday

Les paramètres utilisés pour la dynamique calcique intracellulaire est :

$$\text{depth} = 0.5 \text{ } \mu\text{m}, \tau_r = 1.10^{10} \text{ ms}, Ca_{inf} = 0.0002 \text{ mM}, Kt = 0.00006 \text{ mM.ms}^{-1}, Kd = 0.0001 \text{ mM}, Ca_i = 0.00024 \text{ mM} \text{ et } Ca_o = 3 \text{ mM}.$$

L'équation qui règle Ca_i est la somme :

$$dCa_i/dt = dCa_i/dt (\text{pompe}) + dCa_i/dt (\text{tampon}) + dCa_i/dt (\text{canaux calcique})$$

VIII. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

1. Principe

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en phase inverse, couplée à une détection électrochimique, permet de séparer et d'identifier différentes monoamines comme la 5-HT. Cette technique utilise une phase mobile composée d'eau déionisée, de triéthylamine (100 $\mu\text{L/L}$), de NaH_2PO_4 (70 mM), d'EDTA (0,1 mM), de sodium octyl sulfate (100 mg/L) et de méthanol (7%) à pH 4,2 (Figure 15). Cette phase est délivrée à un débit de 1 mL/min grâce à une pompe (Beckman 128, système GOLD). Les échantillons sont incorporés à la phase mobile au niveau d'un injecteur manuel (Vanne 7725i, Rheodyne) dans un volume de 10 μL . L'ensemble passe dans une pré-colonne (Brownlee–Newgard, RP-8, 15 x 3,2 mm, 7

mm) puis dans une colonne (Stability-C8, 150 mm de long x 4,6 mm de diamètre) permettant la séparation. Cette colonne est remplie de grains de silice (granulométrie 5 μm), auxquels sont greffés des chaînes aliphatiques hydrophobes C8. Les composés sont entraînés par la phase mobile plus ou moins rapidement dans l'ordre de leur hydrophobicité. Les solutés arrivent séparés au niveau du détecteur (modèle 5011, ESA, France) muni de deux électrodes: une électrode de réduction (potentiel fixé à -270 mV) et une électrode d'oxydation (potentiel fixé à $+350\text{ mV}$). Ces électrodes sont sous le contrôle d'un coulomètre (CoulochemII, ESA, Paris) qui détecte les électrons libérés par des réactions d'oxydo-réduction. Un composé donné est donc caractérisé par son temps de rétention dans la colonne, mais aussi par ses réactions d'oxydo-réduction sur les 2 électrodes. Compte tenu des quantités de solutés détectées, le gain pour les courants mesurés a été fixé pour la réduction et l'oxydation à respectivement 50 et 100 nA. L'acquisition numérique est réalisée par une interface 1401plus (CED). La visualisation et l'analyse des chromatogrammes se fait *via* le logiciel Spike 2 (version 7.01, CED). Un script Spike2 a été développé au laboratoire par M. Daniel CATTART dans le but d'estimer les pics de nos échantillons à partir des courbes étalons, établie sur une gamme allant de 0 à 400 pg effectuée pour la 5-HT. L'ensemble des résultats est exprimé en quantité d'amines par poids frais de tissu broyé (pg/mg).

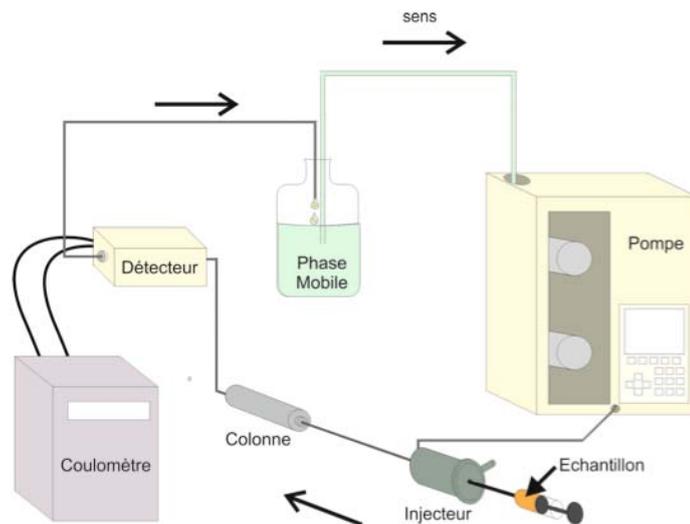


Figure 15 : Principe de l'analyse HPLC isocratique par coulométrie La phase mobile est pompée pour être mise sous haute pression dans le système. L'échantillon est injecté par l'injecteur, ce qui permet de l'incorporer à la phase mobile pour passer dans la colonne de séparation. Après passage dans cette colonne, les amines sont séparées en fonction de leur hydrophobicité et détectées par un système de coulométrie relié à un ordinateur

2. Protocole

Après dissection, la partie lombaire des ME est aussitôt stockée à -80°C pour éviter toute dégradation des amines. Pour doser les bioamines, les ME sont pesées dès leur sortie du -80°C , 200 μL d'acide perchlorique (0,1N, 4°C) sont ajoutés puis une sonication des tissus est réalisée afin de broyer le tissu. Une centrifugation à 13000g pendant 30 minutes à 4°C est réalisée, le surnageant est prélevé et 10 μL de ce surnageant sont injectés dans l'appareillage de chromatographie.

IX. Western-Blot

Les ME sont tout d'abord extraites de l'embryon et seule la partie lombaire qui nous intéresse est congelée à -80°C dans l'attente de l'expérience. Afin de réaliser l'extraction des protéines totales, les ME sont décongelées dans du milieu d'extraction (Qiagen, Qproteome

Mammalian protein prep kit) puis elles sont broyées à l'aide de micro-poters. Les protéines récupérées après centrifugation sont congelées à -80°C. Afin de déposer la même quantité de protéines lors de l'étape de migration, tous les échantillons sont dosés grâce à la technique de Bradford (dosage colorimétrique). Les échantillons sont déposés sur un gel (mini protean TGX stain free gels 10% Bio-Rad, permettant de visualiser les protéines totales du gel) et sont ensuite soumis à une migration à 250V dans une cuve Bio-Rad (Mini-Protean tetra cell) dans un tampon de migration contenant Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad). Les protéines totales sont ensuite activées avec un Trans-Blot turbo blotting system (Bio-Rad). Pour cela, le gel contient du trihalo, qui lorsqu'il est exposé aux UVs, active une réaction covalente entre le composé trihalo et les résidus de tryptophane des protéines contenues dans le gel. Il y a alors émission de fluorescence permettant la visualisation des protéines totales de chaque échantillon. Un transfert des protéines est réalisé à l'aide d'un trans-blot turbo transfert pack contenant une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) pendant 10 minutes à 25V et 1,3 A. Une saturation est réalisée pendant 1h dans du tampon TBS tween (TBST) (tween 20 0,1%) contenant 5% de lait. Les anticorps primaires dilués dans du TBST + 2% lait (KCC2 et NKCC1 T4 1/1000) sont incubés toute la nuit à 4°C. Cinq rinçages de 5 minutes sont ensuite réalisés à l'aide de TBST puis les anticorps secondaires (Goat anti-rabbit FITC pour KCC2 ou Goat anti-mouse FITC pour NKCC1 T4 dilution 1/1000) sont incubés pendant 2h à température ambiante dans du TBS triton et 0,01% SDS 20%. Trois rinçages de 5 minutes sont réalisés dans du TBST puis 2 rinçages de 5 minutes dans du TBS. Une visualisation simultanée des protéines totales et de la protéine d'intérêt est réalisée à l'aide du Trans-Blot turbo blotting system (Bio-Rad). Enfin, une quantification est réalisée avec Image Lab Software 4.1 (Bio-Rad) en normalisant les résultats de la protéine d'intérêt par rapport aux protéines totales.

X. PCR

Les ME sont extraites de l'embryon et seule la partie lombaire qui nous intéresse est congelée à -80°C dans l'attente de l'expérience. Afin de réaliser l'extraction des ARN totaux (ARN_t), les ME sont décongelées dans du milieu d'extraction (RNeasy[®] Mini Kit Qiagen) puis elles sont broyées à l'aide de micro-poters et traitées à l'aide d'un kit (Quantifast SyB®Green PCR kit, Qiagen) afin de n'extraire que les ARNt. Un dosage des ARNt est ensuite réalisé à l'aide de l'expérior (Biorad) Une reverse transcriptase (Reverse Transcription System ImProm II, Proméga) permet d'obtenir l'ADN complémentaire (ADN_c) à partir des ARN totaux.

Sur une même plaque de 96 puits, une PCR quantitative est réalisée à l'aide d'un kit sur les échantillons résultant de la reverse transcriptase. Des contrôles négatifs sont également réalisés sans enzyme afin de confirmer qu'il n'y a pas d'amplification. Dans le cas contraire, cela signifie que les échantillons sont contaminés et seront donc exclus des résultats.

Une gamme est réalisée à partir des échantillons résultant de la reverse transcriptase. Différentes dilutions sont ainsi réalisées (1/10, 1/20, 1/40 et 1/80). Les échantillons sont dilués au $1/40^{\text{ème}}$ correspondant au milieu de la gamme. Le gène de référence utilisé est la β -actin et chaque échantillon est testé en duplicat. Chaque puits contient 10 μL de Master Mix (SyB®Green PCR kit, Qiagen), 2 μL d'amorces (actine, KCC2 ou NKCC1), 6 μl d' H_2O et enfin 2 μL de chaque échantillon. Pour le témoin négatif, l'échantillon est remplacé par de l'eau ultra pure. Les résultats sont ensuite visualisés à l'aide d'une PCR quantitative CFX96 (Bio-Rad) et analysés à l'aide du logiciel de statistiques REST 2009 (Qiagen).

XI. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type de la moyenne (standard error of the mean ou sem). Le nombre d'échantillons (n) et le seuil de significativité (p) sont indiqués

dans chaque graphique ou tableau de résultats. Le logiciel Prism 5 (GraphPad Software) est utilisé pour effectuer les analyses statistiques. Lorsque la distribution des échantillons est normale (sous forme d'une courbe de Gauss) et que les variances ne sont pas différentes, des tests paramétriques sont réalisés pour évaluer la significativité statistique des différences observées (Test t de Student). Cependant, pour la grande majorité des paramètres comparés, nous avons travaillé avec des petits échantillons ($n < 30$) dont la normalité des distributions ne peut pas être vérifiée. Dans ce cas là, des tests non paramétriques sont utilisés (Mann et Whitney, two-way Anova). La différence entre les deux valeurs est significative lorsque $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$).

PARTIE 1

**Une modification de la morphologie des
MNs SOD1^{G93A} embryonnaires E17,5 induit
une hyperexcitabilité**

La première partie de cette thèse de doctorat a consisté en l'étude des propriétés des MNs WT et SOD1^{G93A}. Pour cela, nous avons comparé des embryons WT et SOD1^{G93A} E17,5 provenant des mêmes mères et nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie en enregistrant les MNs en configuration cellule entière. Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique (Martin et al., 2013).

I. Etude des propriétés des MNs

Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés des MNs (Table 3). Nos résultats montrent que la capacitance membranaire (c_m) des MNs WT et celle des MNs SOD1^{G93A} ($170,4 \pm 7$ pF et $145,9 \pm 12,2$ pF, respectivement) est significativement différente (* $p < 0,05$, Mann et Whitney) alors qu'il n'y a pas de différence significative au niveau de leur potentiel de membrane (V_{rest}) ($-65,7 \pm 1,4$ mV et $-63,7 \pm 2,9$ mV, respectivement) ($p > 0,05$, Mann et Whitney). Dans le but de calculer la résistance de membrane des MNs (R_{in}), des créneaux similaires de courants ont été appliqués aux MNs WT et SOD1^{G93A} en mode current-clamp. Ces créneaux de courant variaient de -300 pA à +420 pA avec des pas de 30 pA (Figure 16). Une expérience représentative est présentée en figure 16A1 avec des impulsions de courant variant de -180 à +90 pA. Pour chaque expérience, R_{in} a été calculée comme étant la pente de la région linéaire de la courbe voltage/courant (V/I). Sur toutes les expériences, R_{in} est significativement plus important (* $p < 0,05$, Mann et Whitney) pour les MNs SOD1^{G93A} ($154,9 \pm 10,7$ M Ω) que pour les MNs WT ($119,8 \pm 5,3$ M Ω) (Table 3).

La moyenne de la courbe V/I, calculée à partir de chaque expérience (Figure 16A2) pour les WT et les SOD1^{G93A}, est significativement différente (*** $p < 0,001$, two-way ANOVA). De plus, nous pouvons voir, d'après notre exemple (Figure 16A1), que pour un même courant injecté, le MN SOD1^{G93A} produit un potentiel d'action (PA) contrairement au MN WT.

	WT	SOD1 ^{G93A}	p	Sign
<i>n</i>	32	10		
<u>Propriétés des MNs</u>				
<i>c_m</i> (pF)	170,4 ± 7	145,9 ± 12,2	0,035	*
<i>R_{in}</i> (MΩ)	119,8 ± 5,3	154,9 ± 10,7	0,012	*
<i>τ</i> (ms)	19,9 ± 0,6	22,7 ± 1,3	0,136	ns
<i>V_{rest}</i> (mV)	-65,7 ± 1,4	-63,7 ± 2,9	0,524	ns
Rhéobase (pA)	149,1 ± 12,6	96 ± 23,1	0,024	*
<u>Caractéristiques du PA</u>				
Seuil (mV)	-47,5 ± 0,8	-48,7 ± 1,4	0,304	ns
Temps au pic (ms)	2,15 ± 0,1	2,57 ± 0,2	0,048	*
Durée ½ PA (ms)	2,65 ± 0,2	3,05 ± 0,3	0,189	ns
Amplitude (mV)	51,1 ± 2	44,5 ± 3,8	0,161	ns
Amplitude AHP (mV)	8,1 ± 0,7	7,1 ± 1,1	0,469	ns
Durée AHP (ms)	31,8 ± 2,9	33,5 ± 4,2	0,712	ns
<u>Relation f-I</u>				
Pente (Hz.pA ⁻¹)	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,232	ns
<i>I_{max}</i> (pA)	299,1 ± 14	219 ± 35,2	0,027	*
<i>f_{max}</i> (Hz)	20,9 ± 0,7	20,9 ± 1,6	0,836	ns

Table 3 : Caractéristiques électrophysiologiques des MNs WT et SOD1^{G93A}. *c_m*=capacitance membranaire ; *R_{in}*=Résistance de membrane ; *τ*=constante de temps membranaire; *V_{rest}*=potentiel de membrane ; AHP=AfterHyperPolarisation ; *I_{max}*=Intensité maximale ; *f_{max}*=fréquence maximale ; p=probabilité ; sign=significativité ; ns=non significatif. * p<0,05, Mann et Whitney.

Cette augmentation d'excitabilité observée au niveau des MNs SOD1^{G93A} est également confirmée par comparaison des courbes fréquences/courant (F/I) (Figure 16B2). Les mêmes pulses de courant de 30 à 420 pA ont été injectés au niveau du corps cellulaire des MNs. La figure 16B1 illustre des exemples représentatifs dans lesquels les MNs WT déchargent moins pour de faibles courants injectés (voir le 2^{ème} pulse dans la figure 16B1). Cependant, pour les créneaux de courant les plus importants, la fréquence de décharge atteint un plateau de valeur identique pour les MNs WT et SOD1^{G93A} (voir le dernier pulse de courant dans la figure 16B1). L'augmentation d'excitabilité entre les MNs WT et SOD1^{G93A} pour de faibles pulses de courant et le plateau est confirmée par la moyenne des courbes F/I (Figure 16B2), qui sont significativement différentes (* p<0,05, two-way ANOVA). La moyenne de la rhéobase, correspondant au courant minimum permettant de déclencher un PA,

a été calculée à partir de chaque courbe F/I. Cette valeur est significativement différente entre les MNs SOD1^{G93A} (96,0 ± 23,1 pA) et les MNs WT (149,1 ± 12,6 pA) (* p<0,05, Mann et Whitney) (Table 3).

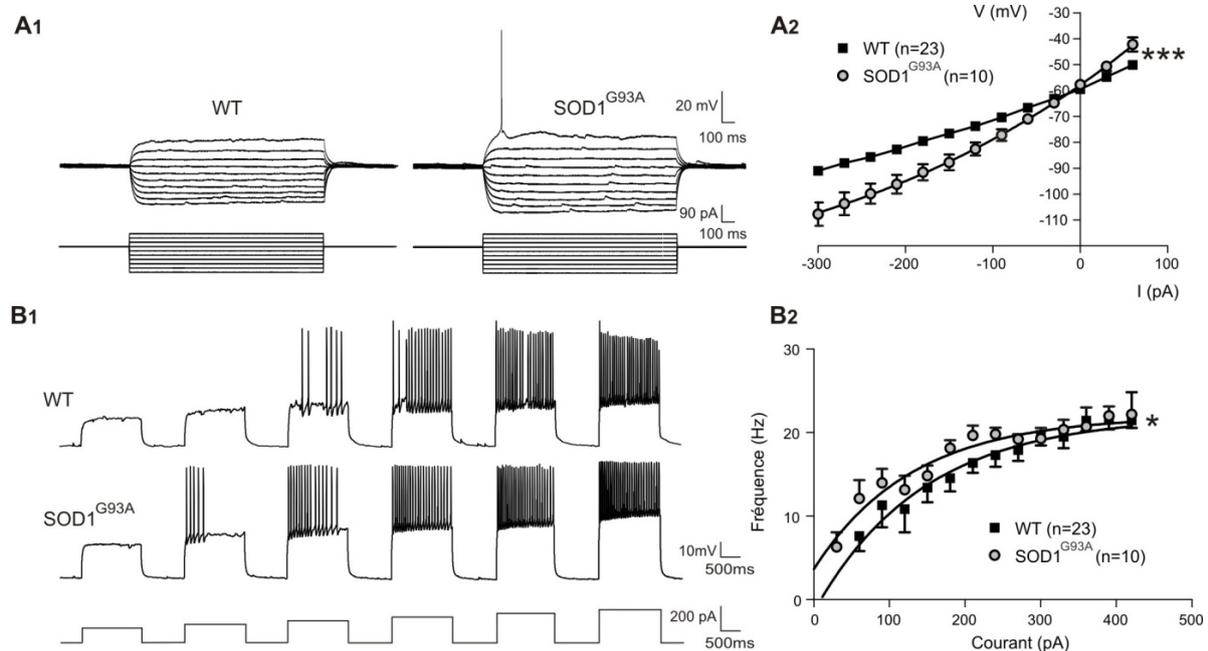


Figure 16 : Hyperexcitabilité des MNs SOD1^{G93A} au stade de développement E17.5. (A1) Réponses du potentiel de membrane à des créneaux de courants négatifs puis positifs injectés au niveau des MNs WT et SOD1^{G93A}. En réponse à un créneau de courant positif liminaire, le MN SOD1^{G93A} émet un PA contrairement au MN WT. (A2) La moyenne des courbes voltage-courant (V/I) obtenues au niveau des MNs WT (carrés noirs) et des MNs SOD1^{G93A} (ronds gris) met en évidence une augmentation de résistance de membrane chez les MNs SOD1^{G93A}. (B1) Figure représentative de la réponse membranaire d'un MN WT (trace du haut) et d'un MN SOD1^{G93A} (trace du milieu) à l'injection croissante de courants positifs (trace du bas). On remarque que le MN SOD1^{G93A} émet des PAs en réponse au 2^{ème} créneau de courant contrairement au MN WT. (B2) La fréquence moyenne des PAs en fonction du courant révèle une hyperexcitabilité des MNs SOD1^{G93A} (carrés noirs pour les MNs WT et cercles gris pour les MNs SOD1^{G93A}). * p<0,05, *** p<0,001, two-way ANOVA.

Suite à la mise en évidence de l'hyperexcitabilité observée au niveau des MNs SOD1^{G93A}, les caractéristiques des PAs ont été étudiées et les mesures réalisées ont été schématisées dans la figure 17. Pour cela, nous avons analysé le premier PA produit par le MN lors de l'injection de courant. Nous avons ainsi montré que le temps au pic des PAs est significativement plus long (* p<0,05, Mann et Whitney) au niveau des MNs SOD1^{G93A} (2,57

$\pm 0,2$ ms) comparé aux MNs WT ($2,15 \pm 0,1$ ms) (Table 3). Cependant, le seuil des PAs des MNs WT et SOD1^{G93A} ($-47,5 \pm 0,8$ mV et $-48,7 \pm 1,4$ mV, respectivement) n'est pas significativement différent ($p > 0,05$, Mann et Whitney). De même, aucune différence entre les MNs WT et SOD1^{G93A} n'a été observée au niveau de la durée à mi-pic ($2,65 \pm 0,2$ ms et $3,05 \pm 0,3$ ms, respectivement), de l'amplitude du PA ($51,1 \pm 2$ mV et $44,5 \pm 3,8$ mV, respectivement), de l'amplitude de l'AHP ($8,1 \pm 0,7$ mV et $7,1 \pm 1,1$ mV, respectivement) et de la durée de l'AHP ($31,8 \pm 2,9$ ms et $33,5 \pm 4,2$ ms, respectivement) ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Table 3).

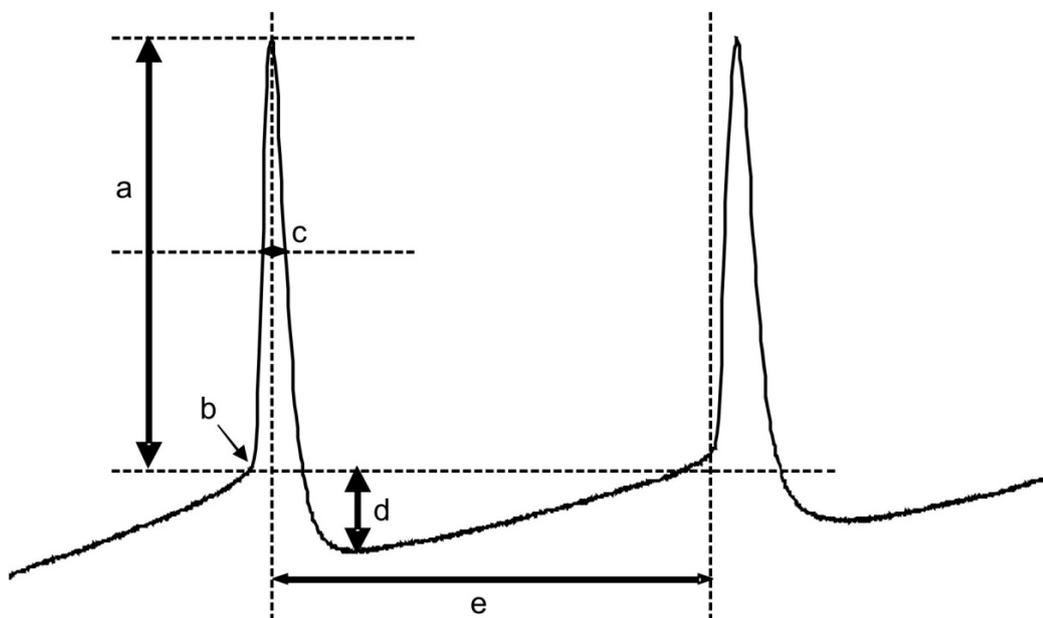


Figure 17 : Schéma des différentes caractéristiques du potentiel d'action (PA) a=Amplitude du PA (mV) ; b=Seuil de déclenchement (mV) ; c=Durée à mi-pic (ms) ; d=Amplitude AHP (mV) ; e=Durée AHP (ms).

Nous avons ensuite voulu savoir si l'hyperexcitabilité observée était due à une modification de la morphologie. Nous avons pour cela réalisé des reconstructions 3D des MNs.

II. Reconstructions 3D des MNs

Lors de l'étude des caractéristiques des MNs, certains MNs ont été injectés avec de la Neurobiotine afin d'étudier leur morphologie complète. Dans cette analyse, nous avons reconstruit 6 MNs WT et 6 MNs SOD1^{G93A} pour lesquels l'identité motoneuronale a été vérifiée par un immunomarquage anti-Islet1/2, facteur de transcription spécifique des MNs (Ericson et al., 1992) (Figure 9). Grâce au logiciel Neurolucida, nous avons reconstruit l'arborisation complète ainsi que la morphologie du corps cellulaire pour chaque MN à partir d'acquisitions réalisées en microscopie confocale. (Figure 18A-18B).

	P _{soma} (μm)	A _{trans} (μm^2)	V _{soma} (μm^3)	A _{soma} (μm^2)
WT				
MN1	99,4	524,8	6875,8	1568,6
MN 2	113,3	648,6	6760,7	1539,5
MN 3	75,8	276,1	3997,9	1298,3
MN4	106,5	528,4	4660,5	1143
MN5	93,1	380,3	4414,6	1132,8
MN6	78,6	271,9	2643,8	829,9
Mean WT	94,4	438,4	4892	1252
SEM	6,1	62,5	672,4	113,9
SOD1^{G93A}				
MN1	88,5	410,4	5890,2	1510,8
MN2	85	356,8	3907,6	1093,3
MN3	88,4	321,5	3739,8	1100,3
MN4	110,1	449,3	4215,4	1187,9
MN5	70,5	285	3308,2	1019,9
MN6	92,7	356	4934,2	1438
Mean SOD1^{G93A}	89,2	363,2	4333	1225
SEM	5,2	24,2	382,2	82,3
P	0,485	0,589	0,485	0,589
Sign	ns	ns	ns	ns

Table 4 : Paramètres du corps cellulaire des MNs WT et SOD1^{G93A}. P_{soma}=Périmètre du soma ; A_{trans}=Aire transversale ; V_{soma}=Volume du soma ; A_{soma}=Aire soma ; ns=non significatif.

A partir du logiciel *NeuroLucida explorer*, qui permet d'obtenir toutes les valeurs chiffrées des MNs reconstruits à l'aide du logiciel *NeuroLucida*, nous n'avons pas trouvé de différence au niveau du soma (Table 4) entre les MNs WT et SOD1^{G93A}, que ce soit au niveau du périmètre du soma des MNs WT ($94,4 \pm 6,1 \mu\text{m}$) et des MNs SOD1^{G93A} ($89,2 \pm 5,2 \mu\text{m}$) ou au niveau de la surface du soma des MNs WT ($1252 \pm 113,9 \mu\text{m}^2$) et des MNs SOD1^{G93A} ($1225 \pm 82,3 \mu\text{m}^2$) ($p > 0,05$, Mann et Whitney).

Si nos résultats ne montrent pas de différences au niveau du corps cellulaire, l'arborisation des MNs WT et SOD1^{G93A} présente des différences notables (Table 5). En particulier, leurs paramètres morphométriques sont différents : ainsi la longueur totale des segments intermédiaires par branche est significativement plus grande dans les MNs WT ($147,4 \pm 17,1 \mu\text{m}$) que dans les MNs SOD1^{G93A} ($102,1 \pm 15,6 \mu\text{m}$) (* $p < 0,05$, Mann et Whitney.), tout comme la longueur totale des segments terminaux ($244,4 \pm 31,3 \mu\text{m}$ et $156,4 \pm 20,3 \mu\text{m}$, respectivement ; * $p < 0,05$, Mann et Whitney.), soit une réduction à 60% de la longueur des segments terminaux observée chez les MNs SOD1^{G93A} par rapport aux MNs WT. Par contre, tous les paramètres topologiques (nombre de dendrites primaires, nombre de nœuds, nombre de terminaisons, ordre centrifuge maximal et ordre centrifuge le plus fréquent) sont identiques entre les MNs WT et SOD1^{G93A} : nous avons trouvé en moyenne $11,67 \pm 0,88$ et $11,67 \pm 1,2$ dendrites primaires, $48,17 \pm 5,79$ et $35,17 \pm 5,78$ nœuds et $61,33 \pm 6,19$ et $47,67 \pm 7,14$ segments terminaux (*Trms*), respectivement pour les MNs WT et pour les MNs SOD1^{G93A} ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Table 5). En conséquence de la réduction à 60% des segments terminaux observée chez les MNs SOD1^{G93A}, la longueur dendritique totale (Σ_{len}) est significativement diminuée au niveau des MNs SOD1^{G93A} ($2641 \pm 313 \mu\text{m}$) par rapport aux MNs WT ($4194 \pm 645 \mu\text{m}$) (* $p < 0,05$, Mann et Whitney) (Table 5). Cette différence morphométrique est illustrée dans la figure 18 présentant les reconstructions d'un MN WT (Figure 18B1) et d'un MN SOD1^{G93A} (Figure 18B2). Dans chaque dendrogramme

représentatif (Figures 18C1 et 18C2), tous les segments terminaux sont colorés en bleu et les segments intermédiaires en noir.

	Nombre de dendrites primaires	Noeuds	Trms	BrOrd _{max}	BrOrd _{frq}	Σ_{Lon} (μm)	Σ_{aire} (μm)	My _{diamètre} (μm)	Assymétrie
WT									
MN1	15	58	76	8	3	5119	16052	1,32	0,605
MN2	10	67	78	7	6	6974	20506	1,29	0,661
MN3	13	34	48	6	3	3197	9335	1,22	0,693
MN4	12	57	71	9	4	3759	12754	1,26	0,6
MN5	9	38	49	7	4	3310	11930	1,42	0,644
MN6	11	35	46	7	3	2806	8403	1,22	0,686
Mean WT	11,67	48,17	61,33	7,33	3,83	4194	13163	1,29	0,648
SEM	0,88	5,79	6,19	0,42	0,48	645	1837	0,031	0,016
SOD1^{G93A}									
MN1	11	34	45	8	3	2403	7487	1,23	0,576
MN2	15	47	65	11	5	3100	8713	1,1	0,648
MN3	13	50	63	9	6	3304	10513	1,22	0,606
MN4	14	42	57	8	4	2792	7734	1,2	0,652
MN5	7	13	20	5	4	1210	3890	1,33	0,713
MN6	10	25	36	6	4	3039	9706	1,29	0,593
Mean SOD1^{G93A}	11,67	35,17	47,67	7,83	4,33	2641	8007	1,23	0,631
SEM	1,20	5,78	7,14	0,87	0,42	313	948	0,03	0,02
p	0,936	0,199	0,180	0,684	0,351	0,026	0,041	0,332	0,589
Sign	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	Ns

Table 5 : Paramètres morphologiques des MNs WT et SOD1^{G93A}. Noeuds=Nombre de noeuds ; Trms=Nombre de terminaisons ; BrOrd_{max}=Ordre centrifuge maximal ; BrOrd_{frq}=Ordre centrifuge le plus fréquent ; Σ_{Lon} =Somme des longueurs des dendrites ; Σ_{aire} =Somme des aires des dendrites ; My_{diameter}=Moyenne des diamètres des dendrites ; ns=non significatif. * p<0,05, Mann Whitney.

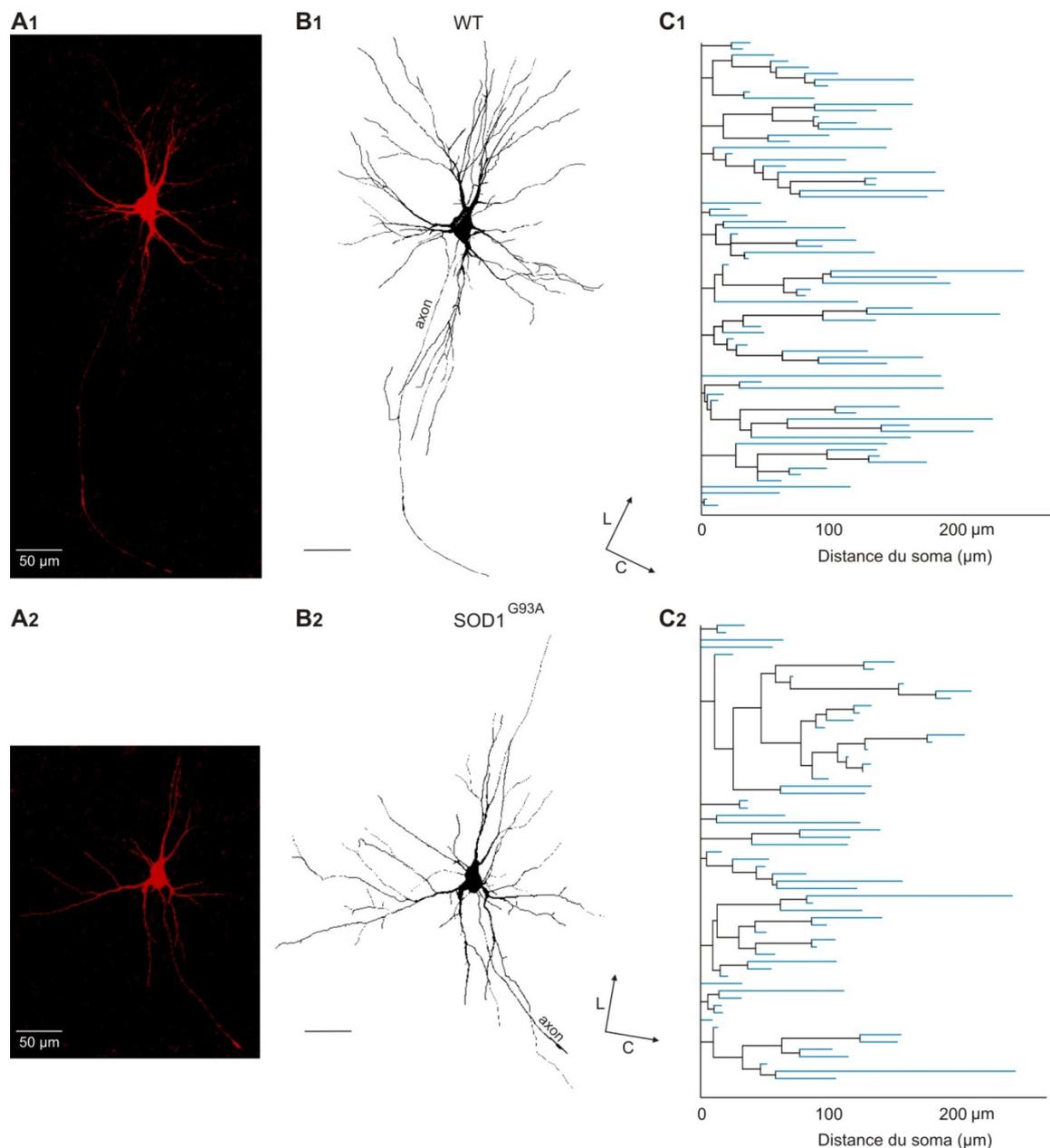


Figure 18 : Anomalies morphologiques des MNs SOD1^{G93A}. (A1-A2) MN WT (MN1 dans les Tables 3 et 4) et MN SOD1^{G93A} (MN3 dans les Tables 3 et 4) représentatifs injectés avec de la Neurobiotine. Les illustrations correspondent à des projections de 54 coupes optiques (0.6 μm en Z) pour le MN WT et de 61 coupes optiques pour le MN SOD1^{G93A} (au grossissement x20). (B1-B2) Reconstruction 3D des arbres dendritiques complets des MNs WT et SOD1^{G93A} illustrés en (A). Ces reconstructions ont été réalisées à partir d'acquisitions en microscopie confocale (grossissement x60, 0.2 μm en Z). (C1-C2) Représentations en 2D de l'arborisation dendritique (dendrogrammes) obtenues à partir des reconstructions 3D illustrées en (B1-B2). Les segments intermédiaires sont illustrés en noir et segments terminaux en bleu. L = latéral et C = caudal.

Dans le but de mettre en évidence des différences au niveau morphologique entre les MNs WT et SOD1^{G93A}, nous avons analysé l'arbre dendritique individuel (Figure 19). Nous avons montré que les distributions de fréquence du nombre de nœuds (Figure 19A) et des segments terminaux (Figure 19B) ne sont pas significativement différentes entre les MNs WT et SOD1^{G93A} ($p > 0,05$, Test du chi carré). Cependant, la distribution de fréquence de la longueur des segments terminaux (Figure 19C) est significativement différente entre les MNs WT et SOD1^{G93A} (** $p < 0,01$, Test du chi carré) tout comme la distribution de fréquence de la longueur des segments intermédiaires (* $p < 0,05$, Test du chi carré). En conséquent, nous observons moins de petites branches dendritiques au niveau des MNs WT qu'au niveau des MNs SOD1^{G93A} (Figure 19E) (* $p < 0,05$, Test du chi carré).

Le rôle des arbres dendritiques étant de collecter et de transmettre les informations synaptiques afférentes au corps cellulaire, le diamètre des dendrites peut-être considéré comme un paramètre essentiel, déterminant la quantité de signal transportée vers le soma. Nous montrons que les MNs au stade de développement E17.5 présentent d'importants diamètres dendritiques qui ne sont pas significativement différents entre les MNs WT ($1,29 \pm 0,03 \mu\text{m}$) et les MNs SOD1^{G93A} ($1,23 \pm 0,03$) ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Table 5). Nous avons donc analysé la distribution des diamètres en fonction de l'ordre centrifuge (Figure 19F) et nous n'avons trouvé aucune différence entre les MNs WT et SOD1^{G93A} ($p > 0,05$, Test du chi carré). De plus, bien que le diamètre dendritique soit diminué avec l'ordre centrifuge comme observé classiquement au niveau des MNs spinaux (Li et al., 2005), il garde une valeur constante de $0,8 \mu\text{m}$ de l'ordre 5 à l'ordre 9 (Figure 19F). En conclusion, les MNs SOD1^{G93A} présentent des branches intermédiaires et terminales plus courtes par rapport aux MNs WT mais le diamètre des branches et le corps cellulaire sont identiques (Figure 19E).

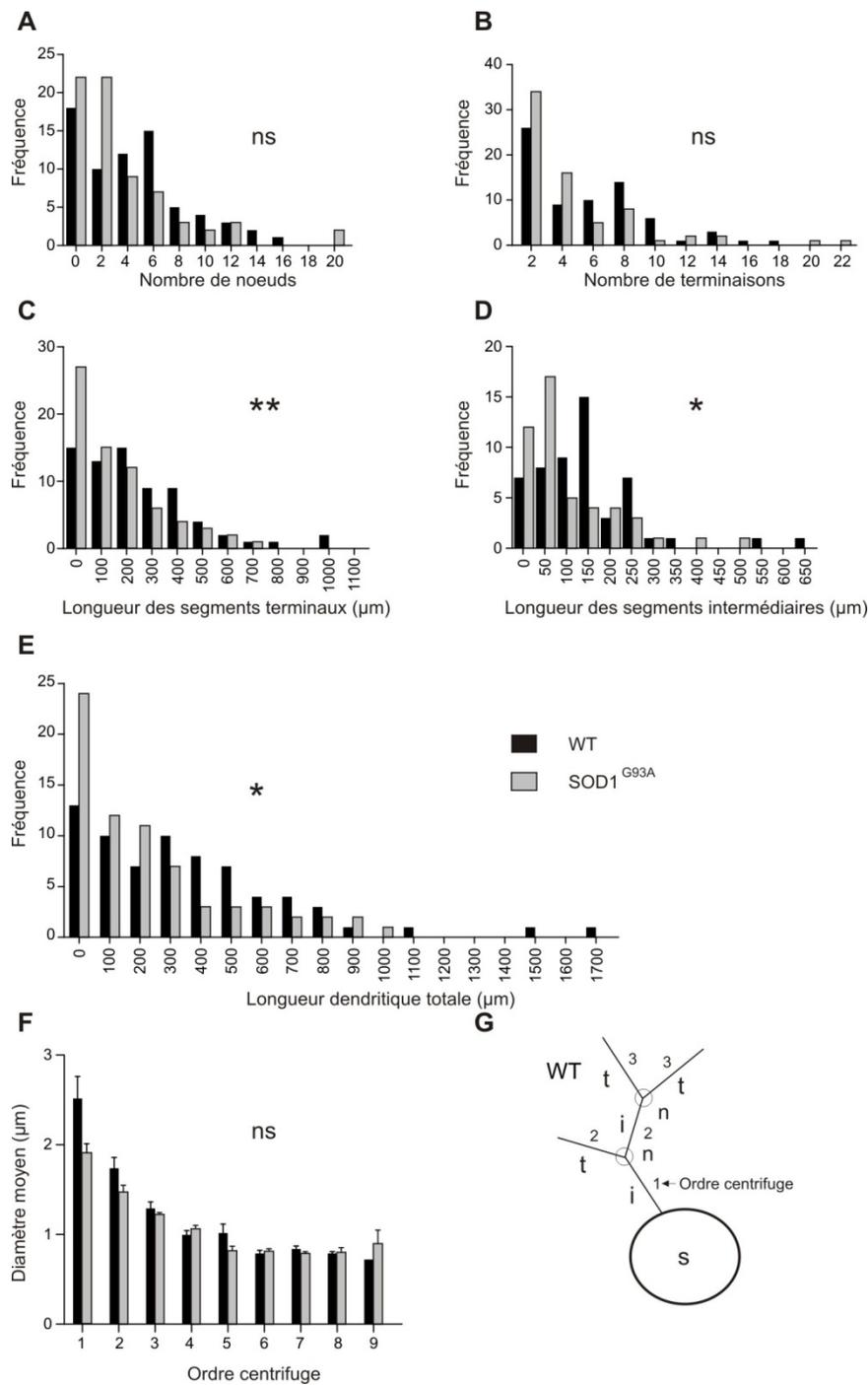


Figure 19 : Analyses topologiques et morphologiques des arbres dendritiques individuels. Les histogrammes de distributions de fréquence du nombre de noeuds (A), du nombre de terminaisons (B), de la longueur des segments terminaux (C), de la longueur des segments intermédiaires (D) et de la longueur dendritique totale (E) et la distribution du diamètre moyen en fonction de l'ordre centrifuge (F) sont réalisés à partir des dendrogrammes des MNs WT (en noir) et des MNs SOD1^{G93A} (en gris). Une représentation schématique de l'arbre dendritique (G) illustre la nomenclature des divers éléments dendritiques (n = nodes, t = segment terminal, i = segment intermédiaire). Le nombre indiqué correspond à l'ordre centrifuge. ns = non significatif. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Test du chi carré.

III. Simulations informatiques

Dans le but d'évaluer l'impact des segments terminaux sur l'excitabilité intrinsèque, deux MNs types ont été générés en utilisant le logiciel de simulation *Neuron*, à partir des paramètres topologiques et morphométriques d'un MN WT réel reconstruit (MN1 dans la Table 4 et 5). Le MN WT type (Figure 20A1) et le MN SOD1^{G93A}-like (Figure 20A2) sont identiques au niveau de leur équipement en canaux ioniques (voir méthodes) et au niveau de leurs paramètres topologiques et morphométriques, excepté au niveau de la longueur des segments terminaux qui a été réduite de 60% dans le MN SOD1^{G93A}-like comme cela a été observé au niveau des résultats expérimentaux (voir reconstructions et figures 20A1 et 20A2). Au niveau de ces deux MNs artificiels, nous avons appliqué le même protocole que celui utilisé pour l'étude de l'excitabilité lors de nos expériences d'électrophysiologie (Figure 16). Nous montrons ainsi que la réduction de la longueur des segments terminaux induit un changement des propriétés passives des MNs. En effet, nous observons que la résistance d'entrée R_{in} passe de 120 M Ω pour le MN WT à 146 M Ω pour le MN SOD1^{G93A}-like, que τ augmente également de 18,45 ms à 18,53 ms et que la capacitance c_m diminue de 150 pF à 120 pF (Table 6). Ces changements sont très similaires aux changements observés entre le MN WT réel et le MN SOD1^{G93A} (Table 3).

	WT	SOD1 ^{G93A} -like
c_m (pF)	153,7	126,9
R_{in} (M Ω)	120	146,6
τ (ms)	18,45	18,53
Rheobase (pA)	155,1	123,6
V_{rest} (mV)	-73	-73
Seuil (mV)	-47,3	-47,8

Table 6 : Caractéristiques électrophysiologiques des MNs WT et SOD1^{G93A} fictifs. c_m =capacitance membranaire ; R_{in} =Résistance membranaire ; τ =constante de temps membranaire; V_{rest} =Potentiel de membrane

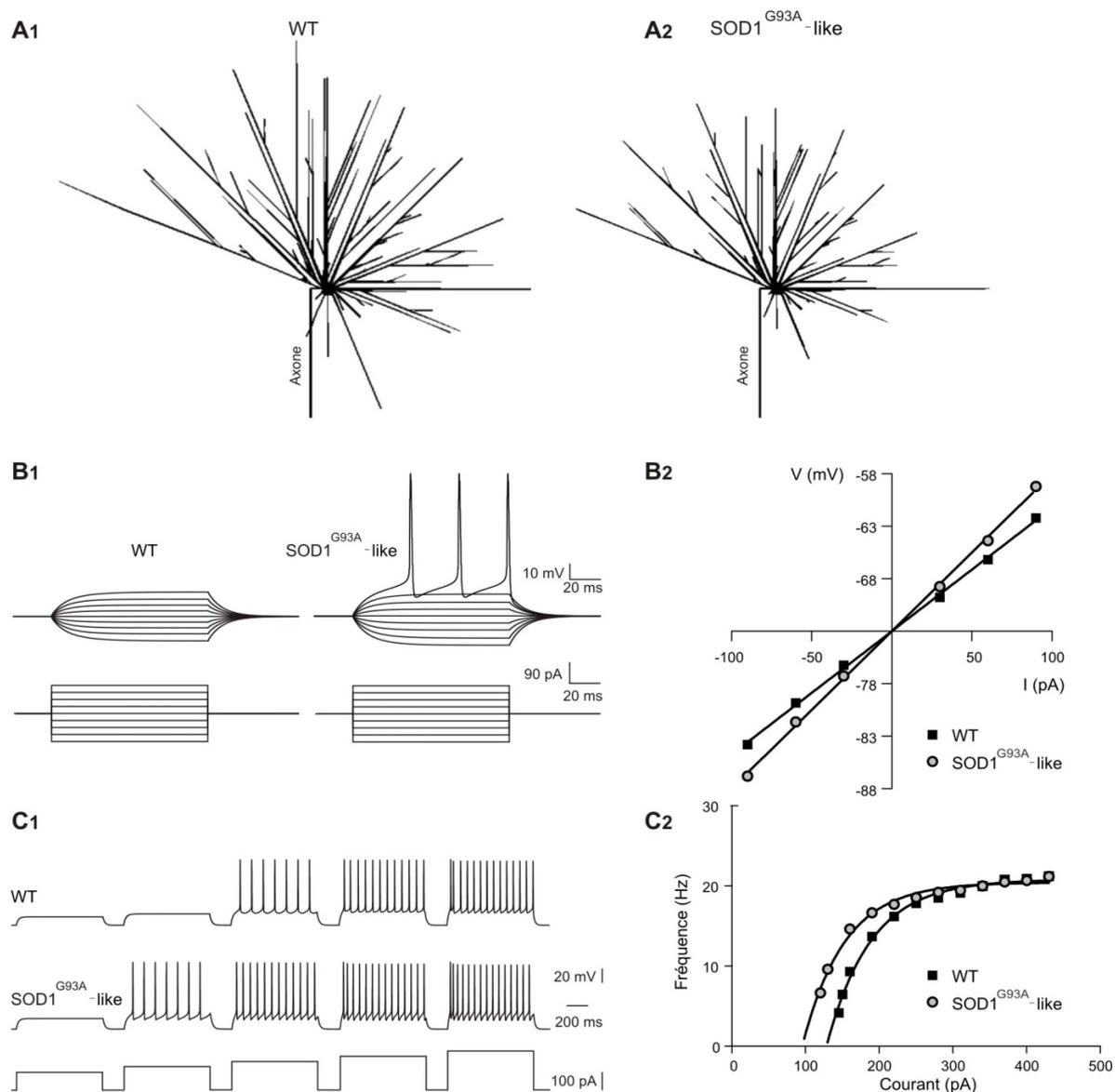


Figure 20 : MNs WT et SOD1^{G93A}-like en simulation informatique. (A1-A2) Géométrie du MN WT (A1) et du MN SOD1^{G93A}-like (A2) utilisés dans les simulations. La géométrie du MN WT a été construite à partir du MN1 représentatif (Tables 2 et 3). Le MN SOD1^{G93A}-like a été construit à partir du MN WT en réduisant les branches terminales de 60%. (B1) Réponses du potentiel de membrane à des créneaux de courants injectés au niveau du MN WT et SOD1^{G93A}-like (créneaux similaires entre les MNs WT et SOD1^{G93A}-like). Nous pouvons constater que le seuil de courant nécessaire à l'émission de PA est plus faible pour le MN SOD1^{G93A}-like que pour le MN WT. (B2) La relation voltage-courant (V/I) au niveau des MNs WT (carrés noirs) et des MNs SOD1^{G93A}-like (cercles gris) met en évidence une augmentation de résistance d'entrée des MNs SOD1^{G93A}-like. (C1) Caractéristiques des réponses membranaires du MN WT (trace du haut) et du MN SOD1^{G93A}-like (trace du milieu) en réponse à des injections de courant croissantes (trace du bas). Nous pouvons constater que le MN SOD1^{G93A}-like émet des PAs pour le second créneau de courant contrairement au MN WT. (C2) Fréquences moyennes des PAs obtenus en fonction de l'intensité des créneaux de courant. Ce tracé met en évidence l'hyperexcitabilité des MNs SOD1^{G93A} (MN WT en carrés noirs et MN SOD1^{G93A}-like en cercles gris).

Cette augmentation de résistance d'entrée R_{in} observée au niveau du MN SOD1^{G93A}-like artificiels, est illustrée dans la figure 20B2. Le MN WT et le MN SOD1^{G93A}-like ont été soumis aux mêmes créneaux de courant (Figure 20B1). Nous pouvons remarquer que les déflexions de voltage pour le MN SOD1^{G93A}-like fictif sont plus larges que pour le MN WT, ceci étant en accord avec l'augmentation de résistance d'entrée R_{in} observée au niveau du MN SOD1^{G93A}-like (Figure 20B2). Ces différences de propriétés passives ont pour conséquence une augmentation de l'excitabilité du MN SOD1^{G93A}-like comme cela a été observé dans le MN réel correspondant. En effet, le MN SOD1^{G93A}-like émet un PA pour un créneau de courant à 120 pA contrairement au MN WT qui reste silencieux pour le même courant injecté (Figure 20C1). Les courbes F/I construites à partir des deux MNs fictifs présentent les mêmes différences observées au niveau des réels MN WT et SOD1^{G93A} (Figure 20C2). Ainsi, le MN SOD1^{G93A}-like décharge plus de PAs que le MN WT pour des valeurs d'intensités de courant au dessous de 250 pA. Il est à noter que dans cette modélisation, un mécanisme d'adaptation a été introduit afin de mimer le plateau de fréquence observé dans les MNs réels pour des courants d'intensité supérieure à 250 pA. Ce mécanisme, en limitant la fréquence de décharge pour les forts courants, masque l'augmentation d'excitabilité pour les courants de forte intensité (comme cela été observé dans les MNS réels).

En conclusion, les changements physiologiques observés au niveau du MN SOD1^{G93A} réels peuvent simplement s'expliquer par la seule réduction de la longueur des segments terminaux.

PARTIE 2

Dysfonctionnement de l'homéostasie chlorure lié à une dérégulation de KCC2

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, chez les souris SOD1^{G93A}, l'équilibre entre les deux co-transporteurs NKCC1 et KCC2 est perturbé dès les stades prénataux de développement.

I. Mesure du potentiel d'équilibre des ions chlorure

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences en patch-clamp, configuration perforée, afin de comparer le potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl) des MNs WT et SOD SOD1^{G93A} provenant des mêmes portées.

Nos résultats montrent que le potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl) des MNs WT est en moyenne de $-52,8 \pm 2,4$ mV (n=25) alors que les MNs SOD1^{G93A} ont une valeur moyenne de $-43,4 \pm 1,9$ mV (n=33) (** p<0,01, test t de student) (Figure 21B). Le ECl est donc plus dépolarisé au niveau des MNs SOD1^{G93A} par rapport aux MNs WT. La concentration chlorure intracellulaire [Cl]_i a été calculée à partir de l'équation de Nernst. Ce calcul montre que la [Cl]_i est plus élevée au niveau des MNs SOD1^{G93A} ($24,5 \pm 1,7$ mM) (n=25) qu'au niveau des MNs WT ($17,25 \pm 1,7$ mM) (n=33) (** p<0,01, test t de student) (Figure 21C).

Nous avons donc cherché à savoir à quoi pouvait être dues ces modifications de ECl (et donc [Cl]_i) au niveau des MNs spinaux embryonnaires SOD1^{G93A}. Deux principaux co-transporteurs sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie chlorure : NKCC1 (co-transporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻ isoforme 1) qui fait rentrer le chlorure dans le neurone et KCC2 (co-transporteur K⁺/Cl⁻ isoforme 2) qui l'extrude. Nous nous sommes intéressés au co-transporteur KCC2 dont le rôle est prédominant par rapport à NKCC1 au stade de développement E17,5 (Delpy et al., 2008).

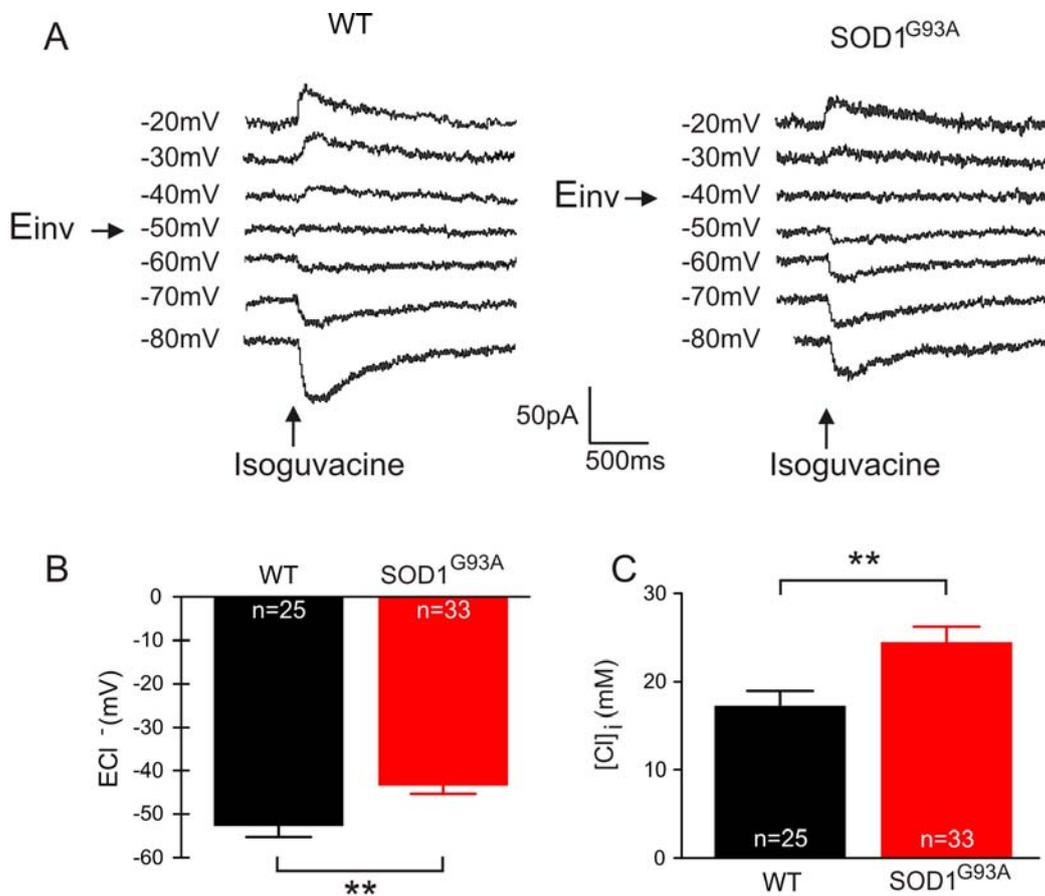


Figure 21 : Le potentiel d'équilibre des ions chlorure est plus dépolarisé au niveau des MNs $SOD1^{G93A}$ que des MNs WT. (A) Exemples représentatifs de la mesure du potentiel d'inversion des ions chlorure (E_{Cl}). Le E_{Cl} est mesuré en patch-clamp configuration perforée. Des valeurs de voltage allant de -80 mV à -20 mV par palier de 10 mV sont imposées à des MNs WT et $SOD1^{G93A}$. Un puff d'isoguvacine est appliqué à chaque changement de voltage afin d'observer une inversion. (B) Histogrammes de la moyenne des E_{Cl} chez les MNs WT (n=25) et $SOD1^{G93A}$ (n=33). Le E_{Cl} est moins élevé chez les MNs WT que chez les MNs $SOD1^{G93A}$. ** p<0,01, test t de student. (C) La concentration en ions chlorure intracellulaire $[Cl]_i$ a été mesurée à partir de l'équation de Nernst pour les MNs WT (n=25) et $SOD1^{G93A}$ (n=33). A noter la plus forte concentration intracellulaire en chlorure $[Cl]_i$ au niveau des MNs $SOD1^{G93A}$ par rapport aux MNs WT. ** p<0,01, test t de student.

II. Implication du cotransporteur KCC2 dans l'altération du ECl des MNs SOD1^{G93A}

1. Estimation de la quantité de co-transporteurs KCC2

Nous avons réalisé des expériences d'immunohistochimies sur coupes afin de quantifier dans un premier temps, la quantité globale de KCC2 au niveau de la zone des MNs (Figure 22A2 et 22B2) puis, dans un second temps, la densité de protéines KCC2 au niveau de la membrane des MNs (Figure 22A3 et 22B3). Pour cela, nous avons utilisé des embryons Hb9-eGFP SOD1^{G93A} surexprimant la Green Fluorescence Protein (GFP) dans les MNs (Figure 22A1 et 22B1). Nous pouvons ainsi voir que l'intensité moyenne de fluorescence, mesurée dans la zone des MNs, est moins importante au niveau des ME SOD1^{G93A} ($181,5 \pm 16,2$ UA) (n=43) qu'au niveau des ME WT ($395 \pm 20,3$ UA) (n=42) (***) $p < 0,001$, test t de student) (Figure 22C). En quantification globale, il y a donc moins de KCC2 au niveau de la zone des MNs chez les embryons SOD1^{G93A} par rapport aux embryons WT. Une quantification plus spécifique au niveau de la membrane des MNs a ensuite été réalisée à l'aide d'une macro développée par M.Sébastien MARAIS, responsable de l'analyse d'images au BIC (Bordeaux Imaging Center) de Bordeaux. La densité intégrée, correspondant au produit de l'intensité de niveau de gris moyen par l'aire de la surface mesurée, est moins importante au niveau de la membrane des MNs SOD1^{G93A} ($5,8 \times 10^6 \pm 663581$ UA) (n=81) qu'au niveau de celle des MNs WT ($8,5 \times 10^6 \pm 616203$ UA) (n=116) (** $p < 0,01$, test t de student) (Figure 22D). Nous pouvons donc en déduire que les MNs spinaux SOD1^{G93A} sont moins enrichis en co-transporteurs KCC2 que les MNs WT, au niveau de la membrane cytoplasmique de leur corps cellulaire.

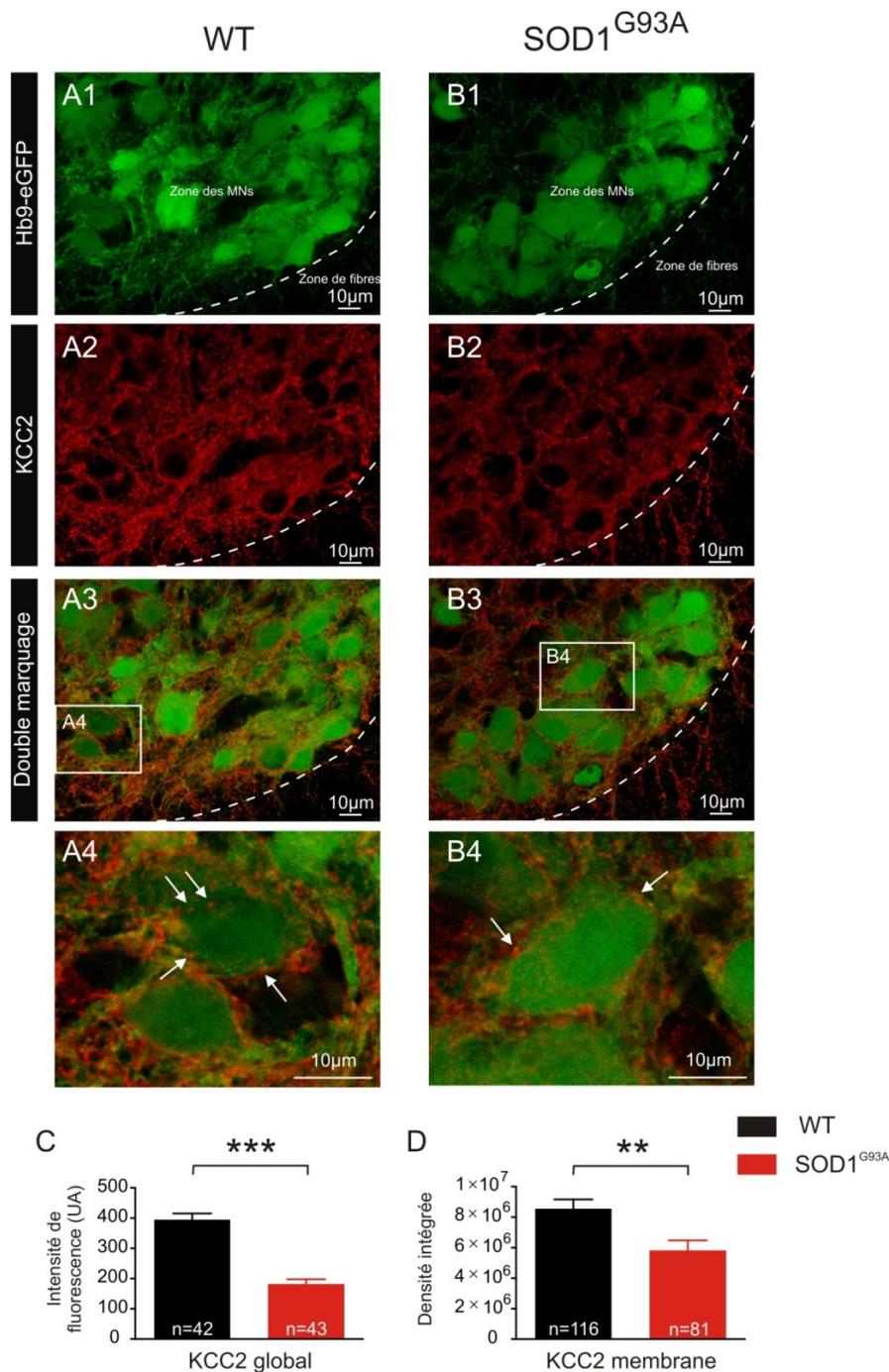


Figure 22 : Détection du co-transporteur KCC2. Sur des coupes (épaisseur 0,25 μ m) réalisées au niveau de la ME lombaire, les MNs Hb9 sont détectés en FITC (vert) chez les embryons WT (A1) et SOD1^{G93A} (B1) alors que le co-transporteur KCC2 est détecté en TRITC (rouge) au niveau des embryons WT (A2) et SOD1^{G93A} (B2). Le double marquage est représenté figure A3 et B3 (grossissement x63). Un agrandissement a été réalisé au niveau des MNs WT (A4) et SOD1^{G93A} (B3) montrant plus spécifiquement le marquage ponctiforme KCC2 (flèche) au niveau de la membrane du MN (grossissement x63). (C) Une quantification globale de KCC2 au niveau des MNs a été réalisée sous ImageJ à partir des marquages TRITC seuls. (D) Une quantification de la densité de KCC2 sur la membrane des MNs est réalisée à l'aide d'une macro développée sous ImageJ. ** p<0,01, ***p<0,001, test t de student.

Nos données neuro-anatomiques démontrent que le co-transporteur KCC2 est moins exprimé au niveau de la membrane des MNs SOD1^{G93A} ce qui peut expliquer la différence de ECl observée précédemment. Cependant, une diminution du marquage KCC2 à la membrane plasmique n'implique pas obligatoirement que l'efficacité globale (capacité à extruder les ions chlorure) de KCC2 soit réduite. Nous avons donc voulu évaluer cette efficacité au niveau des MNs WT et SOD1^{G93A}.

2. Mesure de l'efficacité globale du co-transporteur KCC2

Afin de mesurer l'efficacité globale de KCC2, l'aptitude du MN à s'opposer à une dépolarisation artificielle du ECl a été quantifiée. Pour cela, une application par pression prolongée (40 secondes) d'isoguvacine (agonistes des récepteurs GABA_A) a été effectuée au niveau du corps cellulaire du MN. Toutes les expériences ont été réalisées en présence de bumétanide (bloqueur NKCC1) et sans CO₂ afin d'inactiver l'échangeur anionique AE3 (Gonzalez-Islas et al., 2009). Avant et pendant cette application d'isoguvacine et également lors de la clairance de l'agoniste des récepteurs GABA_A (GABA_AR), la valeur de ECl a été mesurée à l'aide de rampes (Figure 23A). Comme illustré sur la figure 23B, cette application entraîne une dépolarisation du ECl suivie d'un retour (après 4 minutes) vers la valeur contrôle lors de la clairance de l'isoguvacine. Nos résultats montrent que la valeur de ECl mesurée au niveau des MNs SOD1^{G93A} est significativement plus positive que celle mesurée au niveau des MNs WT (two-way ANOVA, **p<0,01) et ceci tout au long de l'expérience (Figure 23B).

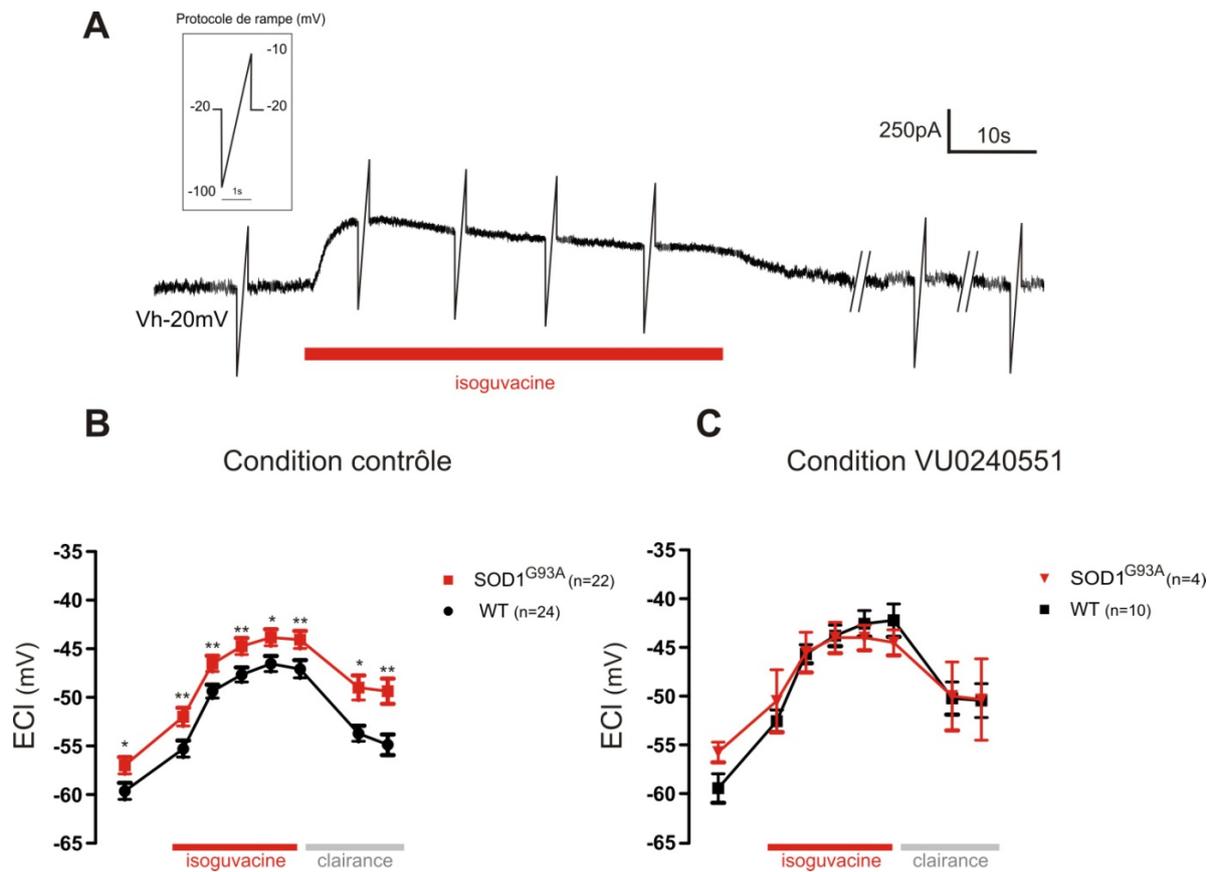


Figure 23 : Evolution du potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl) pendant l'ouverture des canaux GABA_AR, chez les embryons WT et SOD1^{G93A}. (A) Les valeurs de ECl sont mesurées avant et pendant une application de 40 s d'isoguvacine et après 2 et 4 minutes de lavage (clairance) à l'aide de rampes durant lequel le potentiel de membrane est rapidement imposé de -100 mV à + 10 mV en une seconde. Le protocole est réalisé en condition contrôle (B) puis après 15 minutes en présence de bloqueur KCC2, le VU0240551 (10µM) (C). *p<0,05 et **p<0,01, Mann et Whitney.

En comparant les deux derniers points SOD1^{G93A} vs WT sur la figure 23B, la différence semble s'accroître après clairance de l'isoguvacine en périphérie du MN. Nous avons donc évalué le retour à l'état initial chez les deux groupes. Pour mesurer cette récupération, nous avons calculé la différence (ΔECl) entre le pic de dépolarisation de ECl (à 32 secondes d'application) et la fin de la clairance (4 minutes) (Figure 24A). Cette différence est significativement plus importante (** p<0,01, Mann et Whitney) chez les souris WT que chez les souris SOD1^{G93A} (Figure 24B). Les MNs WT récupèrent donc plus facilement leur ECl initial que les souris SOD1^{G93A} après application d'isoguvacine.

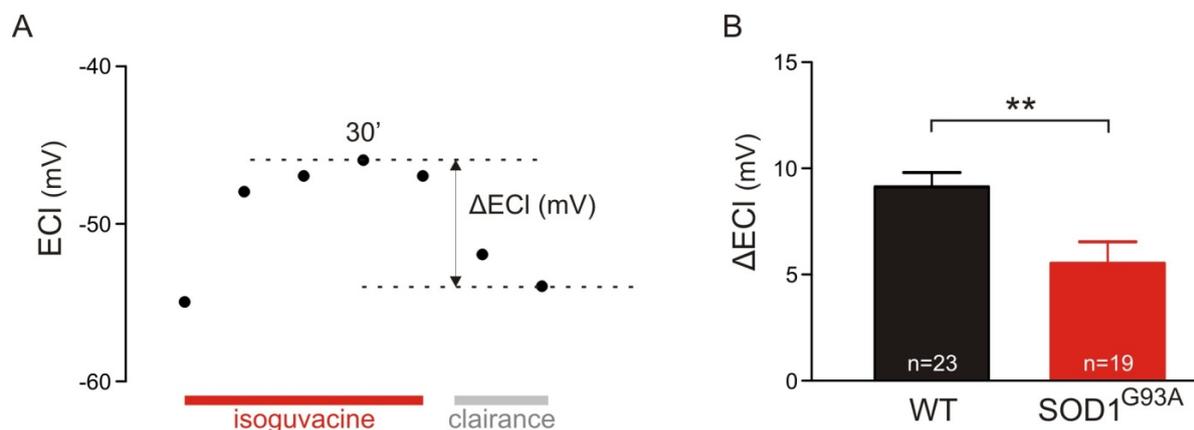


Figure 24 : Capacité de récupération du ECI de départ après 4 minutes de clairance de l’isoguvacine chez les embryons WT et SOD1^{G93A}. (A) La récupération est évaluée par la soustraction du ECI à la fin du lavage au ECI maximum atteint (à 30 secondes). (B) ΔECI est significativement plus important chez les embryons WT ($9,13 \pm 0,67$ mV) que chez les embryons SOD1^{G93A} ($5,526 \pm 1,021$ mV). ** $p < 0,01$, Mann et Whitney.

Afin de vérifier si la différence de comportement du ECI mise en évidence au niveau des MNs SOD1G93A est bien liée à KCC2, des expériences identiques ont été réalisées en présence du bloqueur spécifique de KCC2, le VU 02405521. Lorsque le co-transporteur KCC2 est bloqué en présence de VU0240551 (10 μ M), nos données montrent que les deux groupes (WT et SOD1^{G93A}) se comportent de la même façon et atteignent rapidement un plateau comparable ($p > 0,05$, two-way ANOVA) (Figure 23C). La différence observée en condition contrôle s’efface donc lorsque le co-transporteur KCC2 est bloqué, démontrant que ce co-transporteur neuronal est bien responsable du comportement différent des MNs WT et SOD1^{G93A}. Nous pouvons donc en déduire que le co-transporteur KCC2 est globalement moins efficace au niveau des MNs SOD1^{G93A} qu’au niveau des MNs WT.

3. Implication de NKCC1 dans la dépolarisation ECl au niveau des MNs SOD1^{G93A} ?

Nous avons ainsi vu que KCC2 joue un rôle prédominant dans la modification du ECl chez les souris SOD1^{G93A}. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une action de NKCC1 qui augmente la concentration intracellulaire en ions chlorure en fonction du gradient sodium. Nous avons donc réalisé des marquages immunohistochimiques afin de visualiser la forme phosphorylée de NKCC1 (NKCC1P), qui correspond à sa forme active (Darman and Forbush, 2002) (Flemmer et al., 2002). Nos marquages montrent au niveau de la substance grise dorsale (Figure 25A1 et 25A2) comme ventrale (Figure 25A3 et 25A4), que le co-transporteur NKCC1P est détecté sous forme ponctiforme, comme attendu pour ce co-transporteur. Une quantification globale a été réalisée dans la zone des MNs et nous montrons qu'il y a plus de co-transporteurs NKCC1P au niveau de la ME lombaire d'embryons SOD1^{G93A} par rapport aux embryons WT au stade de développement E17,5, que ce soit au niveau dorsal ($4,09 \pm 0,20$ UA et $3,33 \pm 0,16$ UA respectivement) comme au niveau ventral ($4,97 \pm 0,24$ UA et $4,17 \pm 0,20$ UA respectivement) (Figure 25B) (* $p < 0,05$, Mann et Whitney). En conclusion, même si KCC2 explique largement la valeur plus dépolarisée du ECl au niveau des MNs spinaux lombaires SOD1^{G93A}, l'augmentation globale de NKCC1 phosphorylé accentue probablement cet effet.

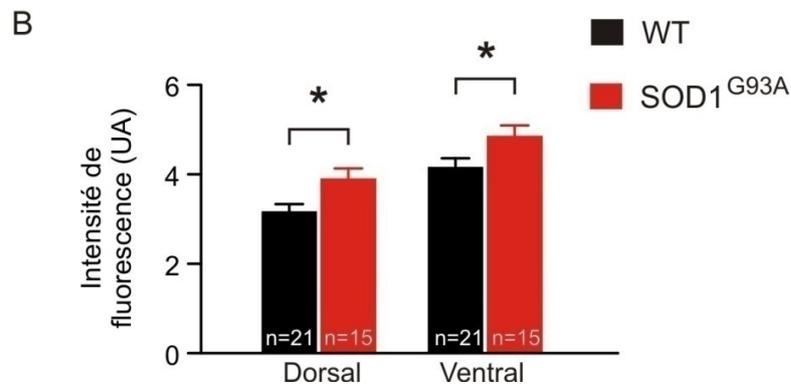
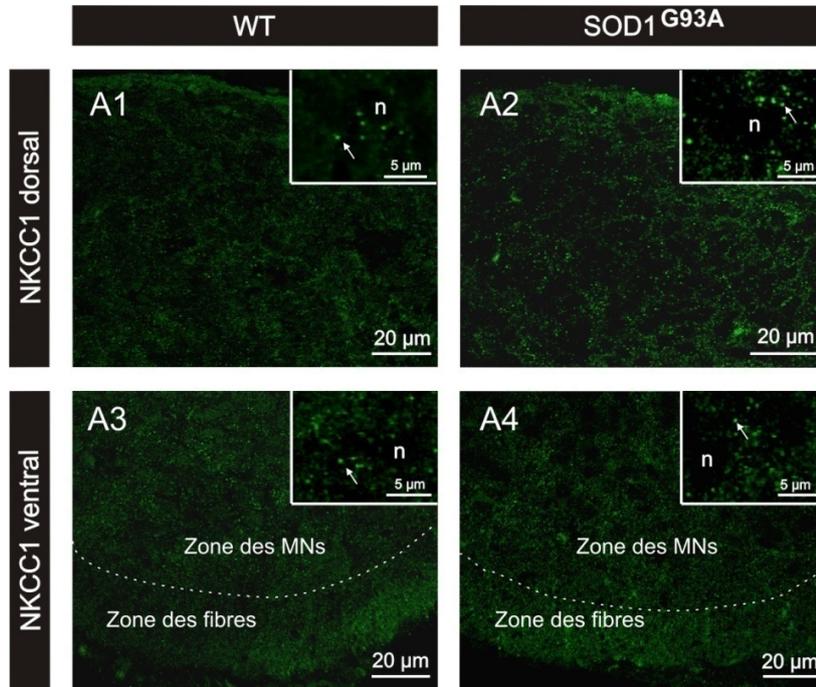


Figure 25 : Détection de la forme active phosphorylée du co-transporteur NKCC1 au niveau de la moelle épinière lombaire des embryons WT et SOD1^{G93A}. (A) Des marquages du co-transporteur NKCC1 phosphorylé sont réalisés sur des coupes transversales de ME lombaires (épaisseur 0,25μm) sur des embryons WT (A1-A3) et embryons SOD1^{G93A} (A2-A4). NKCC1 phosphorylé est détecté sous forme de marquage ponctiforme (n=noyau ; flèche) (grossissement x60). (B) Les représentations de l'intensité moyenne de fluorescence montrent que NKCC1 phosphorylé est plus présent au niveau des ME d'embryons SOD1^{G93A} comparée à des ME d'embryons WT, au niveau ventral comme au niveau dorsal (* p<0,05, Mann et Whitney).

Des expériences biochimiques (Western-Blot) ont ensuite été réalisées afin de quantifier la quantité de protéines NKCC1 et KCC2 au niveau lombaire de moelle épinière.

4. Mesure de la quantité de protéines KCC2 et NKCC1

Après extraction des protéines totales sur des extraits des ME lombaires d'embryons WT et SOD1^{G93A} au stade de développement E17,5, des expériences de Western-Blot ont été réalisées par Mlle Anne-Emilie ALLAIN afin d'évaluer la quantité de protéines KCC2 et NKCC1-T4 totale (membranaires et cytoplasmiques). Nos résultats montrent que pour KCC2, une bande est détectée à environ 140 kDa (Figure 26A1 et 26A3), correspondant aux monomères de protéines (une seconde bande à 200 kDa étant parfois détectée correspondant aux oligomères) (Blaesse et al., 2006). Pour le co-transporteur NKCC1 (Figure 26A2 et 26A4), nous observons une bande à environ 200 kDa comme décrit par Flemmer et al (Flemmer et al., 2002). L'intensité de fluorescence est mesurée pour les protéines totales et pour les protéines d'intérêt. Une quantification est réalisée avec Image Lab Software 4.1 (Bio-Rad) en normalisant les résultats de la protéine d'intérêt par rapport aux protéines totales. On remarque que l'intensité de fluorescence correspondant à la bande d'environ 140 kDa et donc la quantité de KCC2 totale est moins importante au niveau des ME lombaire d'embryons SOD1^{G93A} (600357 ± 192277 UA) par rapport aux ME WT (1147254 ± 172400 UA) (* $p < 0,05$, Mann Whitney) (Figure 26B). De plus, nous pouvons constater que la quantité de protéines totales NKCC1 est plus importante au niveau de la partie lombaire des ME des embryons SOD1^{G93A} (800363 ± 137160 UA) que des embryons WT (445880 ± 90814 UA) (Figure 26C). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en immunohistochimie à savoir qu'il y a moins de protéines KCC2 et plus de protéines NKCC1 chez les embryons SOD1^{G93A} que chez les embryons WT. Nous pouvons ainsi en déduire qu'un dysfonctionnement de la balance KCC2/NKCC1 est probablement responsable de la

différence de ECI observée au niveau des MNs embryonnaires $SOD1^{G93A}$ au stade de développement E17,5.

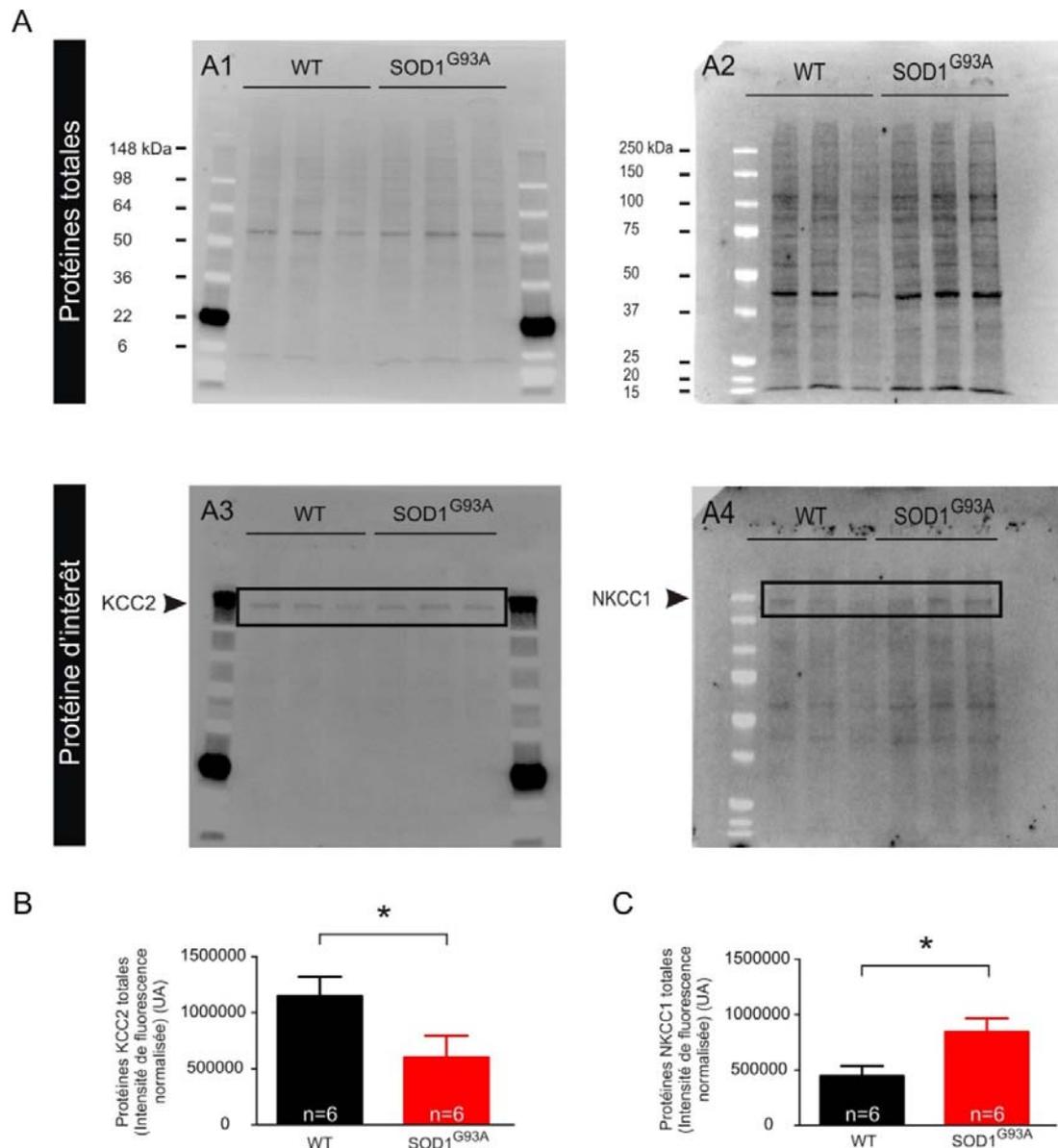


Figure 26 : Mesure de l'expression des protéines KCC2 et NKCC1 chez les embryons E17,5 WT et $SOD1^{G93A}$ au niveau lombaire de la moelle épinière. (A) Une bande à environ 140 kDa est obtenue pour KCC2 (A3) et à environ 200 kDa pour NKCC1-T4. L'intensité de fluorescence de ces bandes, représentant la quantité de protéines, est relativisée par rapport aux protéines totales pour KCC2 (A1) et pour NKCC1 (A2). **(B)** Quantification de la quantité totale de protéines KCC2 (n=6 expériences avec 5 moelles épinières lombaires utilisées pour chaque expérience). L'intensité de fluorescence est moins importante chez les embryons $SOD1^{G93A}$ que WT (* p<0,05, Mann et Whitney). **(C)** Histogrammes de la quantité totale de protéines NKCC1 (n=6 expériences avec 5 moelles épinières lombaires utilisées pour chaque expérience). L'intensité de fluorescence est plus importante chez les embryons $SOD1^{G93A}$ que WT (* p<0,05, Mann et Whitney).

5. Mesure de l'expression relative du gène codant pour KCC2 et NKCC1

L'expression relative du gène codant pour les co-transporteurs KCC2 et NKCC1 a été mesurée par des PCR quantitatives réalisées par M. William CAZENAVE à partir des ARN totaux extraits de la partie lombaire de ME d'embryons WT et SOD1^{G93A} au stade de développement E17,5. Nos résultats montrent que NKCC1 est régulé positivement chez les embryons SOD1^{G93A} par rapport aux embryons WT par un facteur moyen de 1,602 (60,2% d'augmentation, $p=0,001$) contrairement au co-transporteur KCC2 où il n'y a pas de différence significative (facteur moyen de 1,086) entre les embryons WT et SOD1^{G93A} ($p=0,634$) (Figure 27). Ce résultat suggère que le gène NKCC1 s'exprime de façon supérieure chez les embryons SOD1G93A par rapport aux embryons WT comme nous l'avons montré précédemment au niveau de la quantité de protéines en immunomarquage et en Western-Blot. Cependant, nous montrons que le gène KCC2 semble s'exprimer de la même manière chez les embryons WT et SOD1^{G93A} alors qu'une quantité de protéines moins importante de KCC2 a été mise en évidence en immunomarquage et Western-Blot. Nous pouvons alors émettre deux hypothèses pour expliquer la diminution de la quantité de protéines KCC2 soit : 1) il se produit un dysfonctionnement post-traductionnel, comme un problème d'adressage du co-transporteur KCC2 à la membrane ou 2) une dégradation de la protéine.

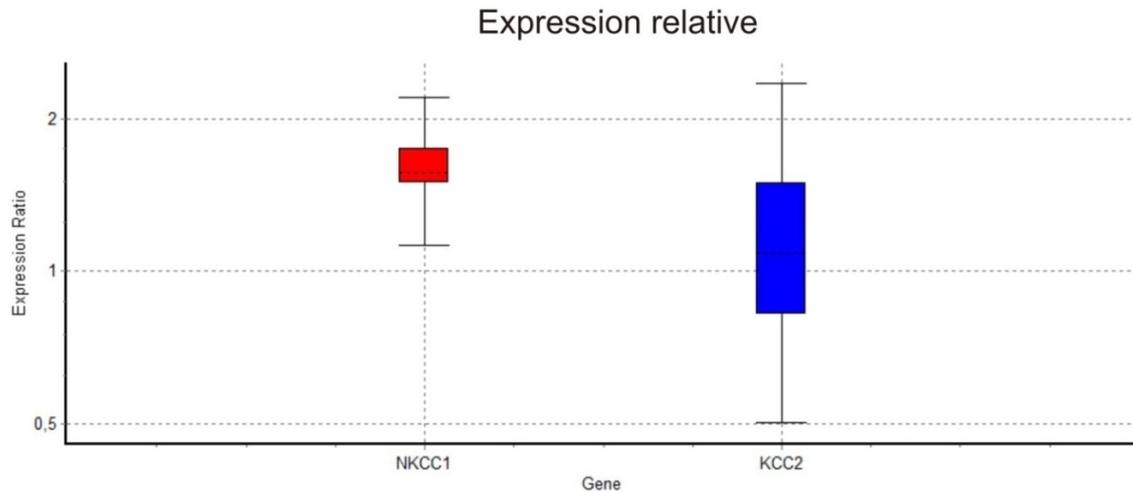


Figure 27 : Expression relative des gènes codant pour les co-transporteurs KCC2 et NKCC1. Le gène NKCC1 s'exprime de façon supérieure (en rouge) chez les embryons SOD1^{G93A} par rapport aux embryons WT (p=0,001) contrairement à KCC2 (en bleu) où aucune différence d'expression du gène n'est mise en évidence (p=0,634).

III. Rôle de la sérotonine dans la régulation du ECl

Nous avons montré précédemment que le potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl) est plus dépolarisé chez les embryons SOD1^{G93A} que chez les embryons WT et que cette différence de ECl peut être expliquée par un dysfonctionnement des co-transporteurs KCC2 (et NKCC1, voir les résultats immunohistochimiques réalisées précédemment). Une étude montre que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} "up-régule" KCC2 (Bos et al., 2013). Nous avons donc émis l'hypothèse que la 5-HT module KCC2 au niveau des MNs embryonnaires E17,5 WT et SOD1^{G93A}. Pour vérifier cela, nous avons tout d'abord étudié par immunomarquages les voies descendantes sérotoninergiques sur ME au stade de développement E17,5 et sur coupes réalisées au niveau cervical et lombaire de ME au stade de développement E17,5 puis nous avons évalué la quantité de 5-HT par HPLC (High Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide à Haute Performance).

1. Voies descendantes sérotoninergiques dans la moelle épinière au stade de développement E17,5

Il a été démontré au laboratoire que les fibres descendantes 5-HT issues du raphé caudal envahissent la ME pendant les stades de développement embryonnaire (Ballion et al., 2002). Au stade E17,5, la substance grise lombaire est déjà très enrichie en axones 5-HT descendants. Basés sur l'utilisation du même anticorps anti-5-HT (Tramu et al., 1983), nos résultats montrent qu'il y a autant de fibres 5-HT au niveau de la ME cervicale des souris WT et SOD1^{G93A}, ceci au niveau de la corne ventrale, de la substance grise centrale ou de la zone intermédiaire ($p > 0,05$, test t de student) (Figure 28C). Cependant, des marquages réalisés au niveau lombaire montrent qu'il y a moins de fibres 5-HT chez les embryons SOD1^{G93A} au niveau de la corne ventrale, de la substance grise centrale et de la zone intermédiaire (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$, test t de student) (Figure 28C).

Cette différence peut-être résumée sur la figure 29 sur laquelle nous pouvons voir que les fibres 5-HT envahissent moins la partie lombaire de la ME chez les embryons E17,5 SOD1^{G93A} par rapport aux embryons WT.

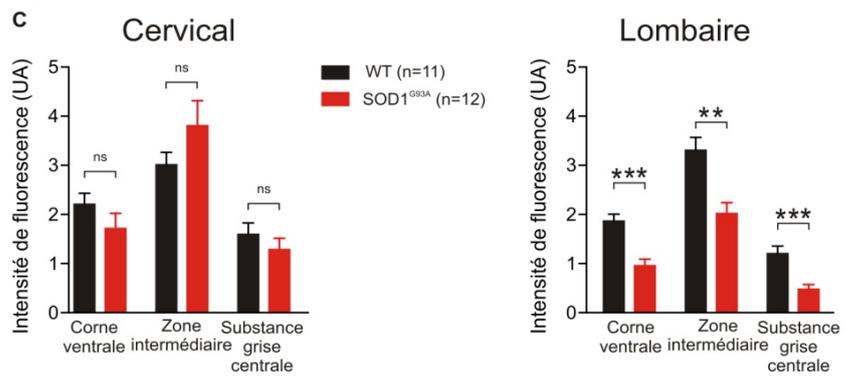
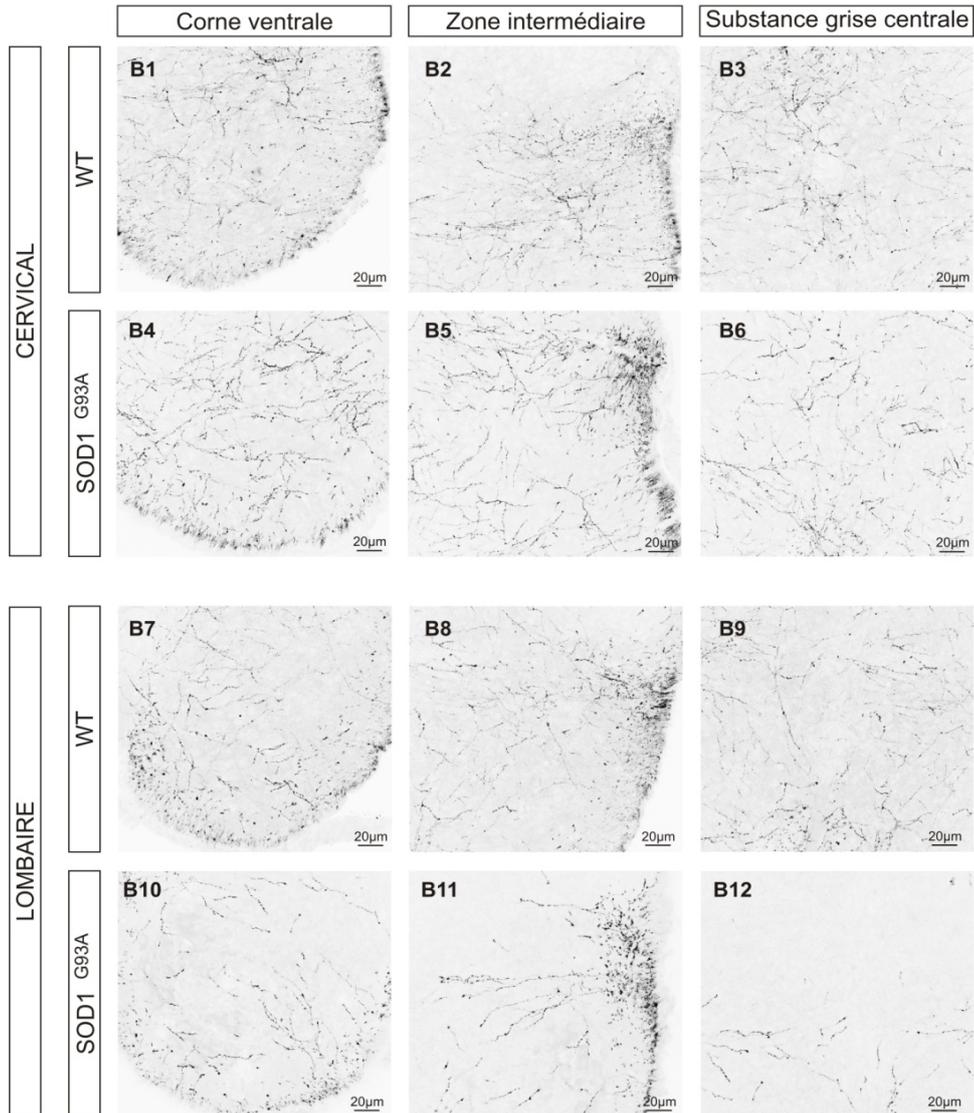
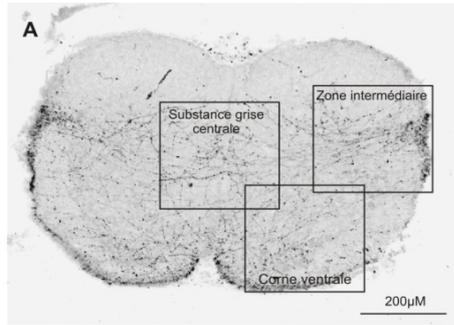


Figure 28 : Etude des voies descendantes sérotonergiques au stade E17,5. Coupe frontale représentative montrant la localisation des acquisitions confocales réalisées (A). (B) Marquages immunohistochimiques réalisés sur des coupes frontales de moelles épinières au stade E17,5 (épaisseur 0,25µm) au niveau cervical chez les embryons WT (B1 à B3) et SOD1^{G93A} (B4 à B6) ainsi qu'au niveau lombaire chez les embryons WT (B7 à B9) et SOD1^{G93A} (B10 à B12). Nous pouvons voir que les fibres au niveau cervical chez les WT comme chez les SOD1^{G93A} envahissent la substance grise centrale. Par contre, au niveau lombaire, si les fibres chez les embryons WT ont envahi la substance grise centrale, on observe très peu de fibres immunoréactives pour la 5-HT chez les SOD1^{G93A} à ce même niveau (grossissement x40). (C) Représentation de l'intensité de fluorescence moyenne observée au niveau de la moelle épinière cervicale et lombaire WT et SOD1^{G93A}. Nous pouvons constater qu'il n'y a pas de différence significative d'intensité moyenne de fluorescence au niveau cervical entre les WT et SOD1^{G93A} ($p > 0,05$, Mann et Whitney) alors que l'intensité moyenne de fluorescence est moins importante au niveau lombaire des embryons SOD1^{G93A} qu'au niveau des embryons WT (ns=non significatif, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$, Mann et Whitney).

Après avoir montré une différence au niveau de la densité de fibres descendantes immunoréactives pour la 5-HT au niveau de la ME lombaire chez les embryons SOD1^{G93A}, nous avons réalisé un dosage de la 5-HT à ce même niveau afin de confirmer les résultats obtenus en immunomarquage.

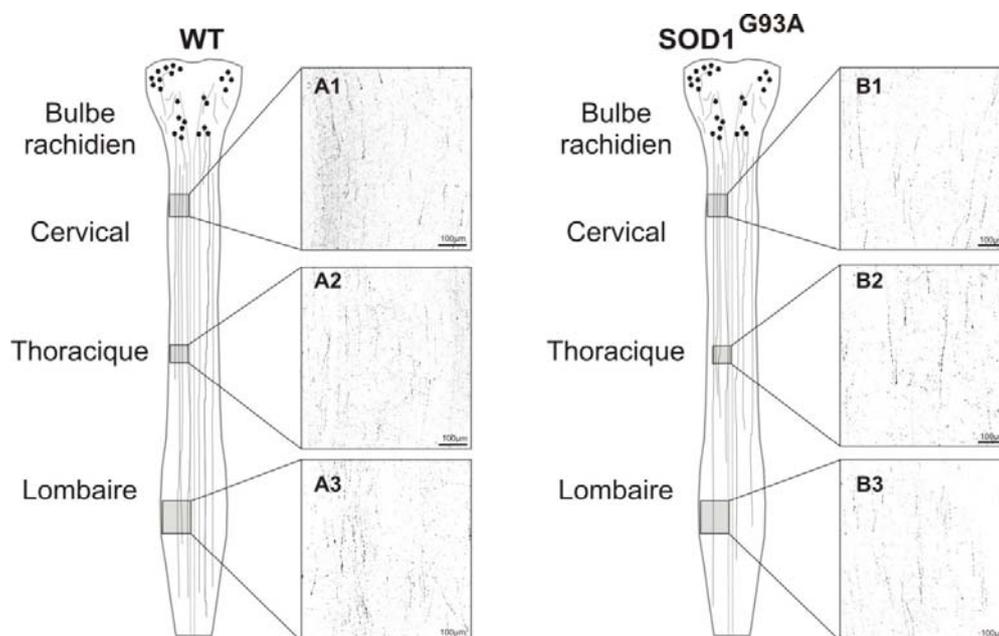


Figure 29 : Etude des voies descendantes sérotonergiques bulbo-spinales. Au niveau des ME WT (A) on constate qu'il y a plus de fibres 5-HT au niveau lombaire comparé à des ME SOD1^{G93A} (B) (grossissement x20). A gauche des photographies, une représentation schématique des voies descendantes 5-HT est illustrée : les ronds noirs correspondent aux corps cellulaires.

2. Dosages de la quantité de 5-HT au stade E17,5

Un dosage de la 5-HT a été effectué au niveau lombaire de ME d'embryons E17,5 WT (n=16) et SOD1^{G93A} (n=24) (Figure 30). Nos résultats montrent que la quantité de 5-HT est plus importante au niveau de la ME lombaire des embryons WT (875,6 ± 84,9 pg/μL) qu'au niveau de la ME lombaire des embryons SOD1^{G93A} (664,2 ± 53,7 pg/μL) (* p<0,05, Mann Whitney). Ce résultat est en accord avec les expériences réalisées précédemment en immunohistochimie décrivant une réduction du nombre de fibres 5-HT au niveau lombaire des ME SOD1^{G93A}. Ainsi, la réduction de la quantité d'axones descendants bulbo-spinaux immunopositifs à la 5-HT s'accompagne probablement d'une réduction de la libération de 5-HT au sein du neuropile, au niveau lombaire.

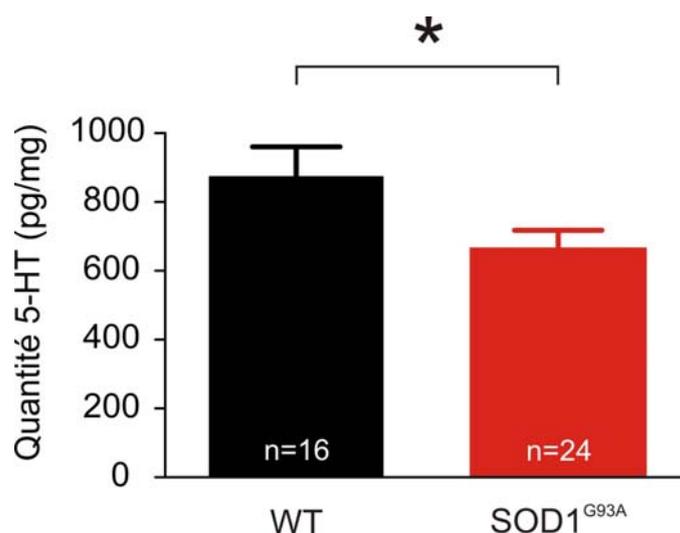


Figure 30 : Dosage de la 5-HT au niveau lombaire de ME E17,5 WT et SOD1^{G93A}. Les barres montrent que la quantité de 5-HT est moins importante au niveau des ME lombaires SOD1^{G93A} que WT (* p<0,05, Mann et Whitney).

3. Rôle de la 5-HT dans la modification du ECI

Nous avons vu précédemment que : 1) le ECI est plus dépolarisé au niveau des MNs lombaires E17,5 SOD1^{G93A}, 2) il se produit un dysfonctionnement de l'équilibre des co-transporteurs KCC2 et NKCC1 et 3) il y a moins de 5-HT de la ME SOD1^{G93A} lombaire. Une

étude récente montre que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} module ECl au niveau des MNs spinaux P7 en agissant sur la quantité de KCC2 adressée à la membrane cytoplasmique du MN (Bos et al., 2013). Nous avons donc réalisé des expériences afin de vérifier si le ECl des MNs embryonnaires est également sensible à la 5-HT et si cette sensibilité peut expliquer les modifications de ECl observées chez les embryons SOD1^{G93A}. Pour cela, des mesures du ECl ont été réalisées en configuration Patch-Clamp configuration perforée et des applications exogènes de 5-HT ont été effectuées. Lors de l'application de la 5-HT (10 µM), on remarque le développement d'un courant entrant traduisant une dépolarisation du potentiel de membrane du MN (Figure 31A1). Les mesures de ECl réalisées sur des MNs spinaux E17,5 montrent que chez l'embryon WT, l'application de 5-HT induit une hyperpolarisation significative du ECl chez les embryons WT (*** p<0,001, test de Wilcoxon) (Figure 31A2) comme chez les embryons SOD1^{G93A} (** p<0,01, test de Wilcoxon) (Figure 31A3). Cependant, aucune différence significative des valeurs de ECl lors de l'application de la 5-HT n'est observée entre les embryons WT et SOD1^{G93A} (p>0,05, Mann et Whitney). Les effets de la 5-HT sur le courant et sur le ECl ont été mesurés et aucune différence significative entre les embryons WT et SOD1^{G93A} n'a également été observée (données non montrées, p>0,05, Mann et Whitney).

Afin de confirmer que le phénomène que nous observons est dû à l'activation des récepteurs 5-HT sur le MN (expériences réalisées en présence de TTX), nous avons réalisé les mêmes expériences en présence de 5-HT et des antagonistes méthysergide (bloqueur des récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}) et kétansérine (bloqueur des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}). Nous pouvons voir sur le tracé type (Figure 31B1), que le ECl s'hyperpolarise lors de l'application de la 5-HT et que sa valeur revient au niveau contrôle lors de l'application des antagonistes de la 5-HT (toujours en présence de 5-HT) chez les embryons WT (*p<0,05, test de Wilcoxon) (Figure 31B2) et chez les embryons SOD1^{G93A} (** p<0,01, test de Wilcoxon)

(Figure 31B3). Nous pouvons donc en déduire que la 5-HT joue donc un rôle important sur la modulation de la concentration chlorure intracellulaire au niveau des MNs embryonnaires E17,5.

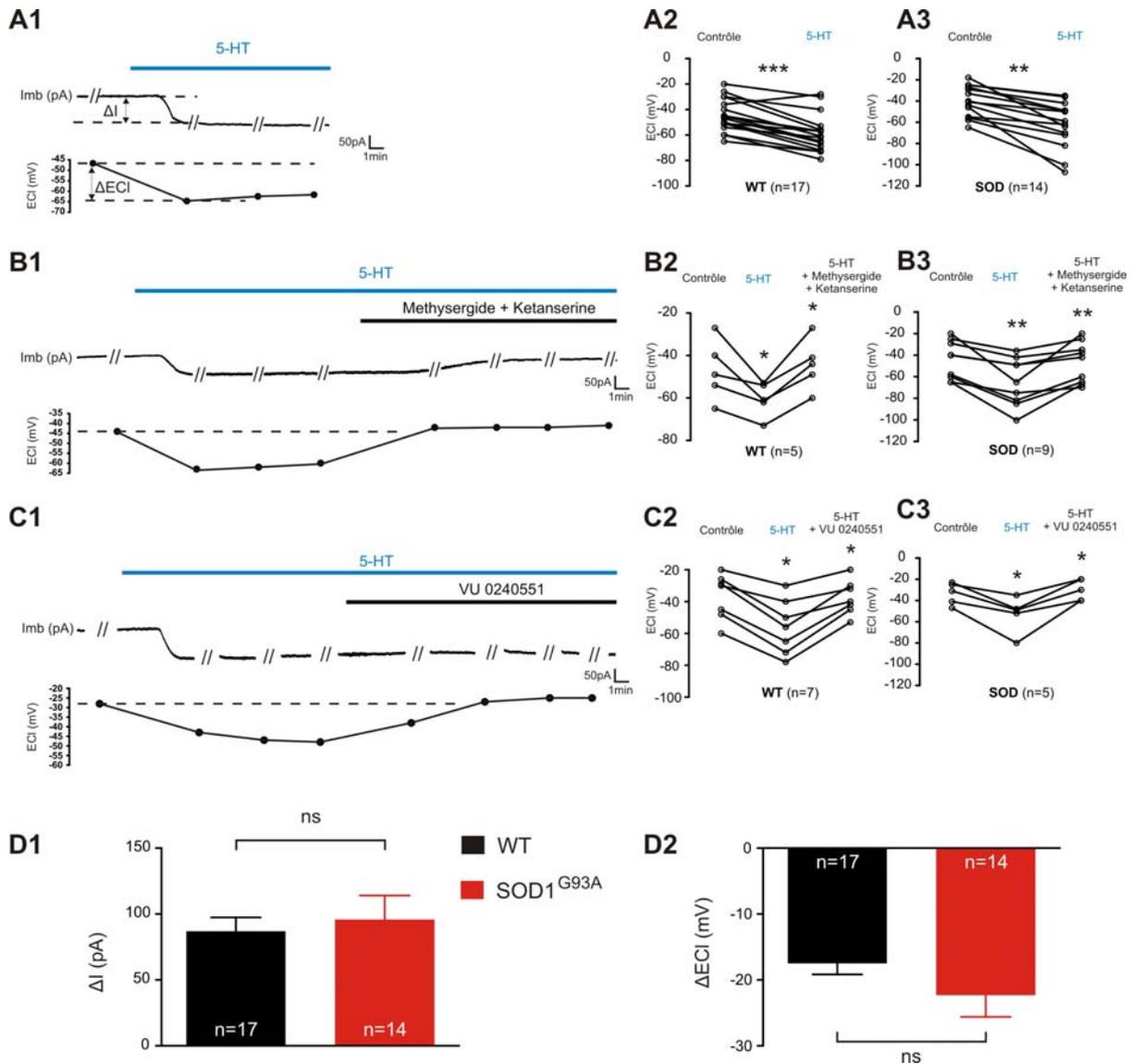


Figure 31 : Mesure du ECI lors de l'application de 5-HT, 5-HT et antagonistes 5-HT ou 5-HT et inhibiteur KCC2. L'application de 5-HT (A1) induit une hyperpolarisation du MN. Les mesures de ECI sont représentées par le symbole // sont réalisées au cours du temps. Une comparaison des ECI est effectuée lors de l'application de 5-HT (A2-A3), d'un cocktail composé de 5-HT, Méthysergide et Kétanserine (antagonistes 5-HT) (B2-B3) et de 5-HT et VU 0240551 (inhibiteur KCC2) (C2-C3) (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Test de Wilcoxon). L'effet de la 5-HT sur le courant (ΔI) (D1) et l'effet de la 5-HT sur le ECI (D2) est représenté sous forme d'histogrammes (p > 0,05, Mann et Whitney).

Les mêmes expériences ont été réalisées en présence de 5-HT et de VU 0240551, inhibiteur de KCC2 afin de voir si l'effet de la 5-HT sur le ECl implique une modulation de KCC2 (Figure 31C1). Nous montrons comme avec les antagonistes de la 5-HT, que le ECl s'hyperpolarise lors de l'application de 5-HT et que cet effet est réversible (retour à un niveau contrôle) lors de l'application de 5HT et de VU chez les embryons WT (Figure 31C2) et SOD1^{G93A} (Figure 31C3) (* p<0,05, test de Wilcoxon). On peut donc en déduire que 5-HT joue un rôle dans la modulation du ECl *via* KCC2.

PARTIE 3

**Activité locomotrice-like préservée chez les
souris SOD1^{G93A}**

Nous avons vu précédemment qu'il se produisait une modification de l'homéostasie chlorure conduisant à un ECl plus dépolarisé au niveau des MNs SOD1^{G93A} au stade de développement embryonnaire E17,5. Dans cette 3^{ème} partie, nous avons voulu étudier si cette modification de ECl pouvait avoir une conséquence fonctionnelle et entraîner des altérations au niveau de l'activité locomotrice générée au niveau des réseaux neuronaux spinaux lombaires.

I. Etude de l'activité locomotrice fictive induite pharmacologiquement

1. Activité locomotrice induite par la 5-HT

Nous avons tout d'abord réalisé des expériences de locomotion fictive induite par la bioamine 5-HT seule (5 μ M) afin d'activer les générateurs de la locomotion dans des conditions minimales permettant de mettre en défaut le système. Puis dans un second temps nous avons utilisé un cocktail composé de 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et DA (100 μ M) pour évoquer *in vitro* une activité locomotrice-like plus robuste.

Pour étudier cette activité, des enregistrements extracellulaires des racines lombaires L3 droite et L3 gauche ont été réalisés. L'activité locomotrice-like est définie par deux critères : le rythme et le patron. La génération du rythme est dépendante de neurones excitateurs glutamatergiques et la génération du patron implique des circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs contrôlant l'alternance droite/gauche.

L'alternance des activités électriques produites par les racines L3 droite et gauche (L3d-L3g) (Figure 33A1 et 33B1) a été analysée à l'aide d'un script développé au laboratoire par M. Daniel CATTART sous le logiciel Spike 2. Ce script effectue, dans un premier temps, une identification des PAs enregistrés sur les racines L3d et L3g grâce à un seuillage

automatique. Puis les fréquences instantanées de ces PAs sont calculées au cours du temps. Un filtre passe-bas flottant permet de lisser ces activités sans décalage temporel (Figure 33A3 et 33B3) et de repérer les pics d'activités au sein de chaque bouffée (Figure 33A4 et 33B4). Enfin la relation de phase moyenne entre les activités L3d et L3g est calculée par une méthode de statistiques circulaires (Figure 33A5 et 33B5).

Pour chaque moelle épinière, des critères de locomotion ont été déterminés à partir de

- 1) la distribution des valeurs de relation de phase (R), donnant une indication sur le patron et
- 2) du coefficient de variation des périodes (CV_{per}) entre chaque burst donnant une indication sur la stabilité du rythme d'autre part. Les CV_{per} présentent une distribution bimodale (Figure 32A) qui nous a permis de séparer les rythmes stables ($CV_{per} < 0,3$) des rythmes instables ($CV_{per} > 0,3$). De même, l'histogramme de distribution des valeurs de relation de phase R (Figure 32B) nous a permis d'identifier des activités de type locomotion stable ($R > 0,5$), locomotion instable ($0,3 < R < 0,5$) et absence de locomotion ($R < 0,3$). En résumé, on parlera de locomotion fictive stable lorsque le rythme est stable c'est-à-dire que le coefficient de variation des périodes est inférieur à 0,3 et lorsque la relation de phase (R) supérieure à 0,5. Au sein du rythme instable, on retrouve : 1) la locomotion fictive instable définie par un coefficient de variation des périodes supérieur à 0,3 et une valeur de R comprise entre 0,3 et 0,5 et 2) l'absence de locomotion fictive lorsque le coefficient de variation des périodes est supérieur à 0,3 et la valeur de R est inférieure à 0,3 (Figure 32).

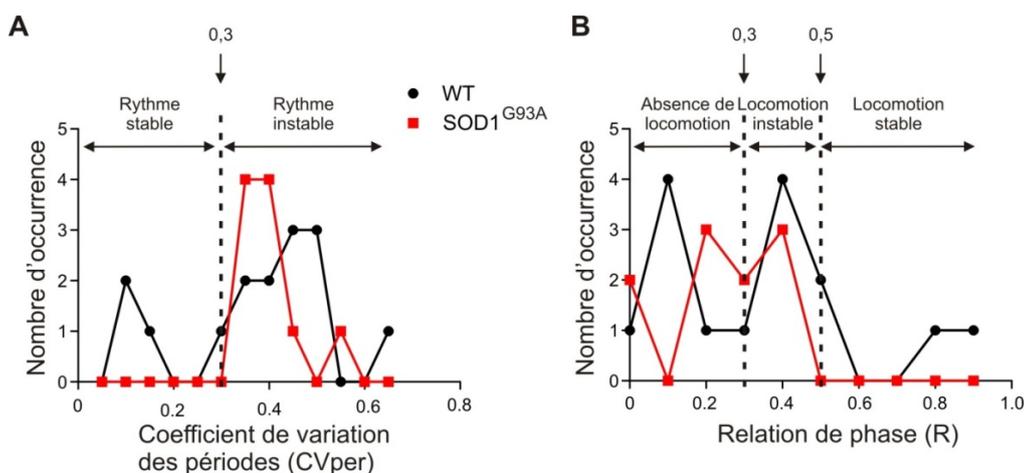


Figure 32 : Critères de caractérisation de la locomotion fictive. (A) Les coefficients de variation des périodes (CVper) présentent une distribution bimodale permettant de séparer les rythmes stables (CVper < 0,3) des rythmes instables (CVper > 0,3). (B) L'histogramme de distributions des valeurs de R nous permet la locomotion stable (R > 0,5), la locomotion instable (0,3 < R < 0,5) et l'absence de locomotion (R < 0,3).

D'après ces critères, lors de l'application de 5-HT, nous pouvons constater que les ME WT sont capables de produire des activités locomotrices-like dans 54% des cas (n=8) (Figure 33C). Cette locomotion est, dans 27% des cas, une locomotion dite stable (n=4) et dans 27% des cas, une locomotion dite instable (n=4). Les ME E17,5 SOD1^{G93A} sont capables, dans 40% des cas (n=4), d'exprimer une activité locomotrice-like 5-HT-induite de type instable. Aucune ME n'est capable de faire de la locomotion stable (Figure 33C). La locomotion fictive stable n'étant pas présente chez les souris SOD1^{G93A}, notre analyse de la locomotion fictive ne prendra pas en compte ces données chez les souris WT.

Dans notre analyse, la moyenne des amplitudes de variation des fréquences par cycle est calculée de la manière suivante : moyenne = Σ (fréquence maximale-fréquence minimale)/n où n représente le nombre de bouffée d'activité.

L'analyse de la locomotion fictive induite par l'application de 5-HT révèle que la moyenne des amplitudes de variation de fréquences par cycle est différente entre les embryons WT et SOD1^{G93A} (17,90 ± 1,65 Hz et 26,75 ± 2,63 Hz, respectivement) (* p<0,05,

Mann et Whitney) (Figure 35A). Ce résultat peut-être interprété comme un déficit d'inhibition au niveau des MNS SOD1^{G93A}. Cependant, aucune différence significative n'est observée au niveau de la période entre chaque bouffée entre les embryons WT et SOD1^{G93A} ($3,96 \pm 0,29$ s et $3,45 \pm 0,17$ s, respectivement) ($p > 0,05$, Mann et Whitney). De plus, aucune différence significative n'est observée au niveau des coefficients de variation des fréquences et des périodes ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Figure 35A).

En conclusion, ces expériences ayant pour but de tester la capacité des réseaux spinaux à générer des patrons moteurs rythmiques après application de la monoamine 5-HT montrent que les ME E17,5 SOD1^{G93A} ne sont pas capables de réaliser de la locomotion fictive stable contrairement aux ME WT. Ce résultat est en accord avec nos données collectées à l'échelle cellulaire au niveau des MNs montrant un déficit des inhibitions chlorure-dépendantes observé chez les souris SOD1^{G93A}.

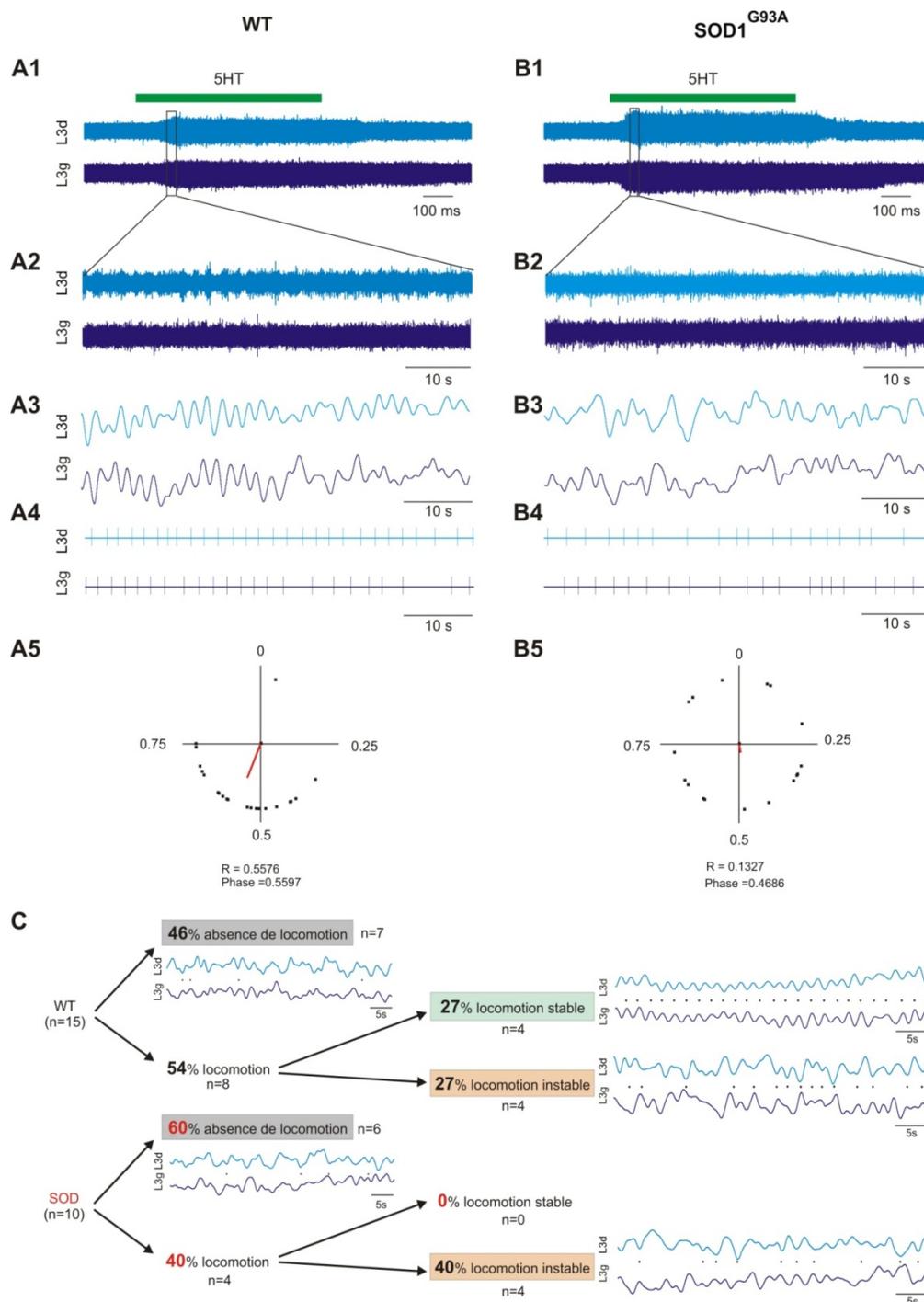


Figure 33 : Etude de la locomotion fictive induite pharmacologiquement chez les embryons WT (A) et SOD1^{G93A} par l'application de 5-HT. Les enregistrements sont réalisés en configuration extracellulaire au niveau des racines L3 et la locomotion fictive est induite à l'aide de 5-HT (5 μ M) (A1-B1). Un script développé sous le logiciel Spike 2 permet de détecter des épisodes d'activité rythmique induite par la 5-HT (A2-B2). Brièvement, la fréquence de décharge de PAs au niveau des racines L3d et L3g est calculée et filtrée afin de détecter les pics d'activité au sein de chaque bouffée d'activité au cours du temps (A4-B4). La relation de phase moyenne est alors calculée par une méthode de statistiques circulaires (A5-B5). Le pourcentage de ME capables d'exprimer des épisodes de locomotion fictive est représenté en (C). (R =moyenne géométrique de tous les vecteurs de phase).

2. Activité locomotrice induite par un cocktail de 5-HT, NMDA et DA

Les mêmes expériences électrophysiologiques ont été réalisées en présence d'un cocktail composé de 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et DA (100 μ M) afin d'activer d'une manière supra-maximale les CPGs dans le but d'obtenir des épisodes stables de locomotion fictive (Figure 34). Cette condition expérimentale a montré que dans 100% des cas, les ME WT et SOD1^{G93A} expriment une activité locomotrice-like régulière. L'analyse de cette locomotion fictive révèle que la moyenne des amplitudes de variation des fréquences par cycle n'est pas différente entre les embryons WT et SOD1^{G93A} ($71,07 \pm 11,92$ Hz et $61,02 \pm 8,91$ Hz, respectivement), de même que la période entre chaque burst ($2,02 \pm 0,20$ s et $1,95 \pm 0,16$ s, respectivement) ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Figure 35B). De plus, aucune différence au niveau des coefficients de variation des fréquences et des périodes n'est observée ($p > 0,05$, Mann et Whitney). Étonnamment, bien que les MNs SOD1^{G93A} présentent un ECI plus dépolarisé d'environ 9 mV par rapport aux MNs WT ($-43,4 \pm 1,9$ mV et $-52,8 \pm 2,4$ mV, respectivement, ** $p < 0,01$, test t de student) (Figure 21B), la locomotion fictive induite pharmacologiquement par le cocktail composé de 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et DA (100 μ M) ne semble pas altérée. En effet, nous pouvons penser que si le MN SOD1^{G93A} présente un ECI plus dépolarisé, les contacts synaptiques inhibiteurs qu'il recevra seront moins efficaces. Or, l'alternance droite/gauche est due à des interneurons commissuraux inhibiteurs ($V0_D$) et excitateurs ($V0_V$ et $V3$) (Kiehn et al., 2010). Un déficit d'inhibition induirait donc une modification des patrons locomoteurs (augmentation des bouffées synchrones entre les côtés droit et gauche). Lorsqu'on applique la 5-HT seule, la locomotion fictive est altérée mais lorsqu'on applique le cocktail de 5-HT, NMDA et DA, la locomotion fictive fonctionne correctement. Le déficit d'alternance stable chez les embryons SOD1^{G93A} semble donc compensé lorsque le générateur est fortement activé. On peut donc penser que ce déficit disparaît avec l'augmentation de la "drive" (commande interneuronale) produite par les

générateurs. Si l'augmentation de la partie excitatrice de la "drive" (glutamate) peut conduire à des bouffées plus nettes sur le MN, l'augmentation de la drive inhibitrice pose problème chez les $SOD1^{G93A}$ puisque le GABA est dépolarisant (ECI -43 mV chez les embryons $SOD1^{G93A}$).

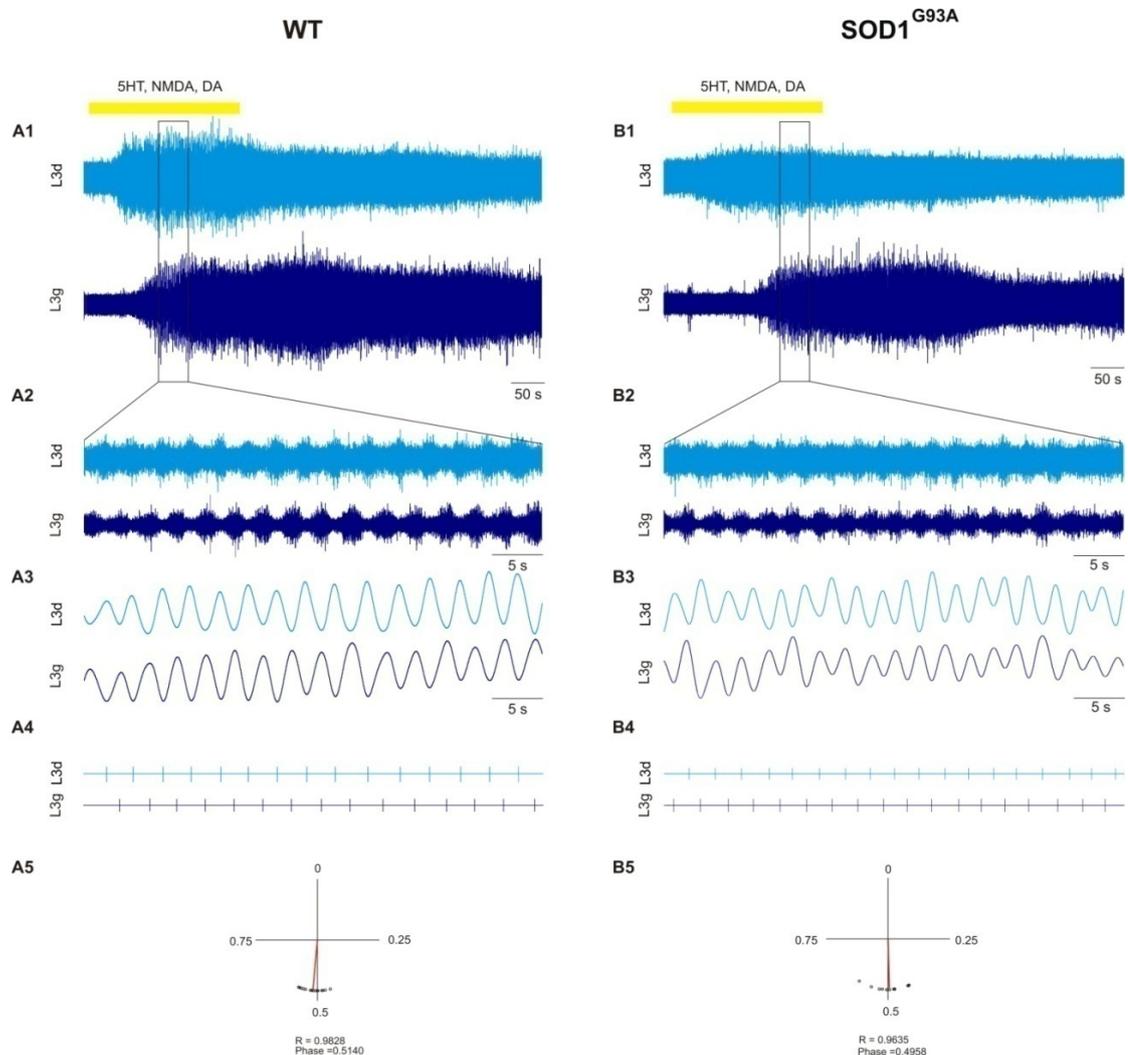
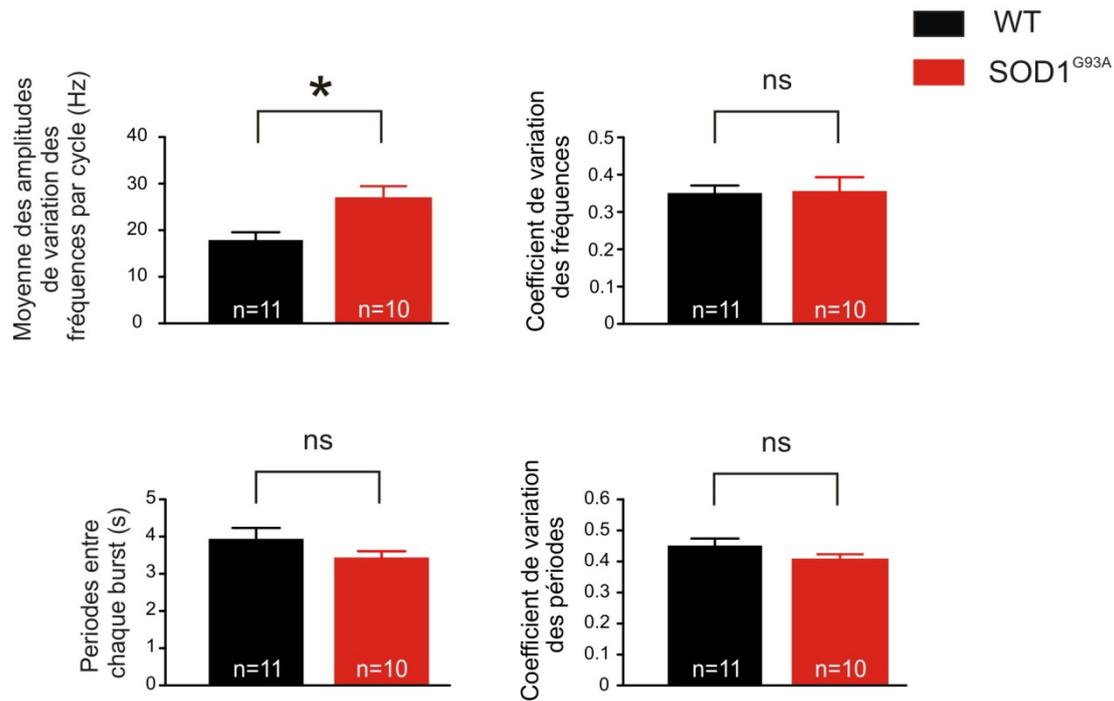


Figure 34 : Etude de la locomotion fictive induite pharmacologiquement chez les embryons WT (A) et $SOD1^{G93A}$ (B) par un cocktail composé de 5-HT, NMDA et DA. Le logiciel Spike 2 nous permet de visualiser l'activité des racines L3 droite (L3d, bleu clair) et L3 gauche (L3g, bleu foncé) (A1-B1) et un agrandissement (A2-B2) nous permet de voir des épisodes d'activité rythmique lors de l'application du cocktail composé de 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et DA (100 μ M). Le logiciel spike 2 nous permet de repérer les variations d'amplitudes des bouffées de PAS (A3-B3) et de détecter les pics d'activités (A4-B4). A partir de ces pics, une relation de phase est établie par la construction d'un plot circulaire (R =moyenne géométrique de tous les vecteurs de phase) (A5-B5). Lorsque qu'il se produit une alternance, la phase se situe autour de 0,5 et la moyenne géométrique de tous les vecteurs de phase (R) autour de 1.

A-Locomotion fictive instable ou activité non locomotrice-like induite par la 5-HT (5 μ M)



B-Locomotion fictive stable induite par la 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et DA (100 μ M)

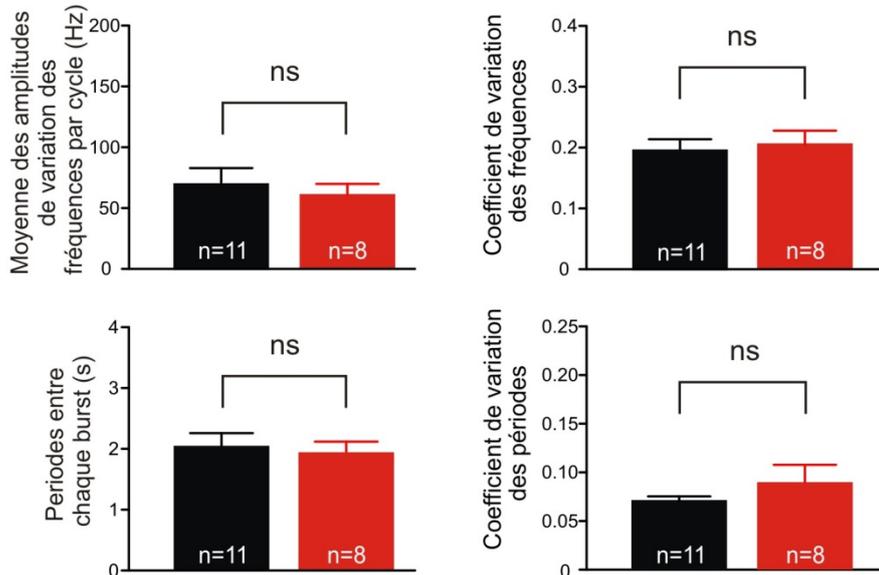


Figure 35 : Quantification de la locomotion fictive enregistrée au niveau des ME E17,5 WT et SOD1^{G93A}. (A) Analyse quantitative de la locomotion induite pharmacologiquement par la 5-HT (5 μ M). Les fréquences entre les bursts, les périodes entre chaque burst ainsi que les coefficients de variation des fréquences et des périodes ont été analysés. (* $p < 0,05$, Mann et Whitney). (B) Données quantitatives obtenues lors d'épisodes de locomotion induite pharmacologiquement par un cocktail composé de 5-HT (10 μ M), NMDA (10 μ M) et DA (100 μ M). Il n'y a pas de différence significative au niveau des fréquences à l'intérieur des bursts, des périodes entre les bursts, des coefficients de variation des fréquences et des périodes (ns=non significatif, $p > 0,05$, Mann et Whitney).

En effet, nous pouvons nous demander ce que devient une inhibition dépolarisante lorsque la fréquence des évènements augmente avec la "drive". Une étude de simulation récente réalisée au sein de l'équipe a montré que l'excitation produite par une synapse GABA/Glycine (ECl -43 mV comme observé chez les embryons SOD1^{G93A}) devient inhibitrice lorsque la fréquence des évènements GABA/Glycine augmente (données non publiées). Il était donc important d'analyser les fréquences de décharge des évènements GABA/Glycine.

II. Etude de l'activité synaptique GABA/Glycine et Glutamate

Nous avons pour cela réalisé des expériences en patch-clamp configuration cellule-entière afin de quantifier la fréquence et l'amplitude des évènements GABA/Glycine et Glutamate. En conditions contrôles, lorsque le MN est maintenu à une valeur de potentiel de membrane de -50 mV, on observe des évènements synaptiques vers le haut et vers le bas (Figure 36A). Lorsqu'on applique dans le bain de perfusion du CNQX (20 μ M) un antagoniste des récepteurs AMPA glutamatergiques, on constate qu'il y a disparition des évènements vers le bas indiquant que ces évènements synaptiques sont des évènements glutamate mettant en jeu les récepteurs de type AMPA. Après rinçage du CNQX, lorsqu'on applique de la Gabazine (2 μ M), antagoniste des récepteurs GABA_A (GABA_AR) et la strychnine (5 μ M), antagoniste des récepteurs Glycine (GlyR), on remarque qu'il y a cette fois-ci disparition des évènements synaptiques vers le haut indiquant que ces évènements sont bien des évènements synaptiques impliquant les récepteurs GABAergiques GABA_A(GABA_AR) et Glycinergiques (GlyR) (Figure 36B2).

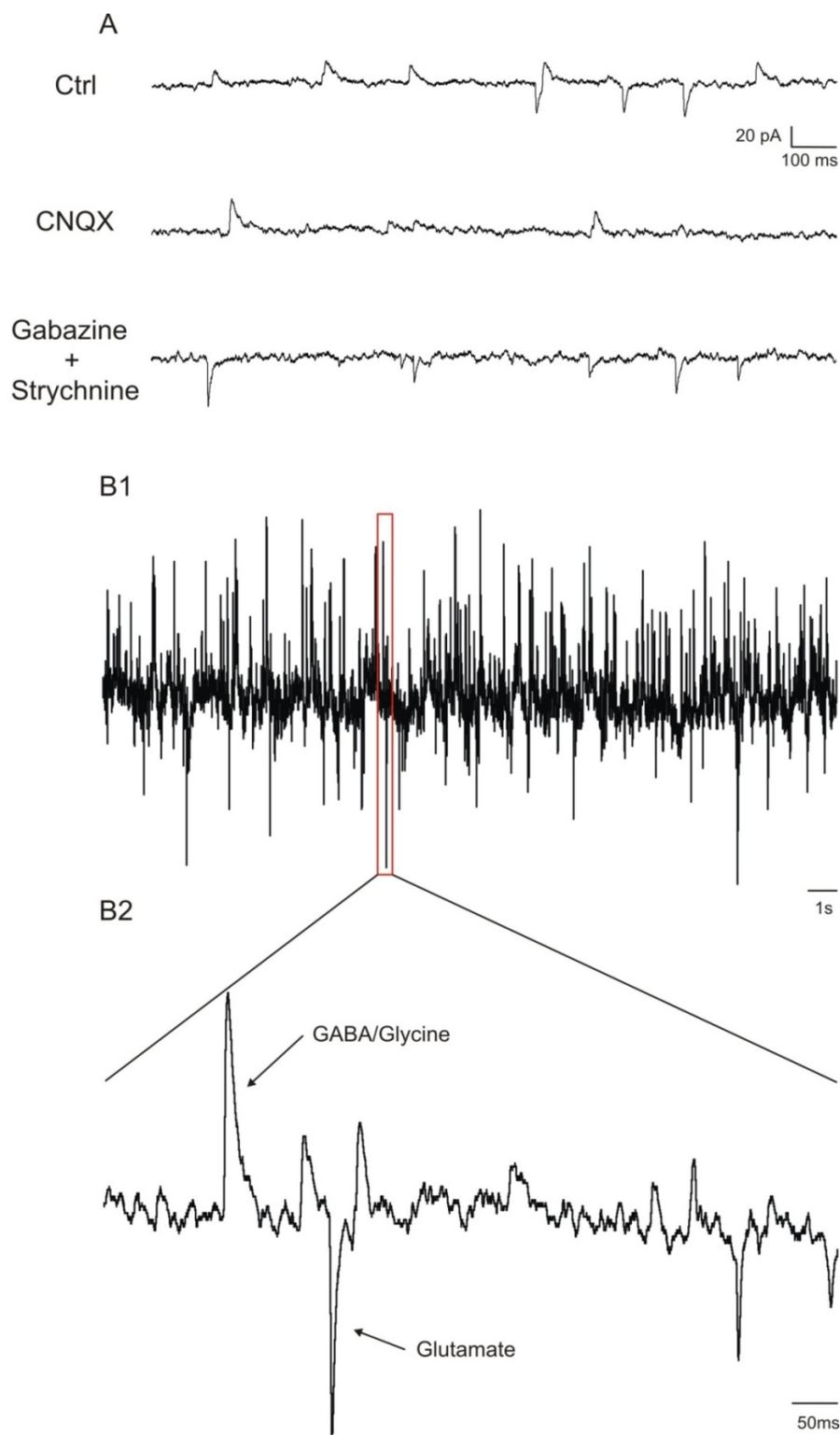


Figure 36 : Identification de la nature des courants synaptiques lors de l'enregistrement en configuration voltage-clamp. Le MN enregistré en configuration patch-clamp cellule-entière est maintenu à une valeur de potentiel de -50 mV. Les différentes drogues appliquées, CNQX (20 μ M), Gabazine (2 μ M) ou strychnine (5 μ M) permettent d'identifier la nature des évènements synaptiques (A). Activités synaptiques globales (B1) avec un agrandissement (B2) montrant la discrimination entre les évènements GABA et Glycine vers le haut et les évènements glutamate vers le bas.

Nous avons analysé l'activité synaptique enregistrée au niveau de MNs E17,5 WT et SOD1^{G93A} en conditions contrôle, lors de l'application de 5-HT (Figure 36A1) et lors de l'application du cocktail composé de 5-HT, NMDA et DA (Figure 36A2). Nous pouvons ainsi voir que l'application de ces drogues induit un courant entrant synonyme de dépolarisation du potentiel de membrane du MN et une augmentation de la fréquence des évènements synaptiques (activité réseau). La fréquence et l'amplitude des évènements synaptiques GABA_AR/GlyR et glutamate AMPAR ont été quantifiées à l'aide d'un script développé au laboratoire par M. Daniel CATTART avec le logiciel Spike 2. Nous pouvons voir que l'amplitude et la fréquence des évènements synaptiques glutamate AMPA ne sont pas significativement différentes entre les embryons WT et SOD1^{G93A} en condition contrôle (Figure 37B) comme en présence de 5-HT (5 µM) (Figure 37C) et en présence du cocktail de 5-HT (10 µM), NMDA (10 µM) et DA (100 µM) (Figure 37D) ($p > 0,05$, Mann et Whitney). Les mêmes résultats sont obtenus au niveau de l'amplitude et la fréquence des évènements GABA_AR/GlyR. Lorsque nous comparons les conditions entre elles, nous pouvons voir que la fréquence de décharge des évènements glutamate AMPA chez les souris WT et SOD1^{G93A} augmente significativement en présence de 5-HT ($29,80 \pm 6,67$ Hz et $36,41 \pm 5,25$ Hz, respectivement) par rapport à la condition contrôle ($6,49 \pm 1,24$ Hz et $4,38 \pm 0,70$ Hz, respectivement) (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$, respectivement, Mann et Whitney) (Figure 38A). Aucune différence significative n'est observée entre la fréquence de décharge des évènements glutamate AMPA chez les souris WT et SOD1^{G93A} en présence de 5-HT ($29,80 \pm 6,67$ Hz et $36,41 \pm 5,25$ Hz, respectivement) et en présence de 5-HT, NMDA et DA ($48,37 \pm 6,56$ Hz et $41,78 \pm 4,22$ Hz, respectivement) ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Figure 38A).

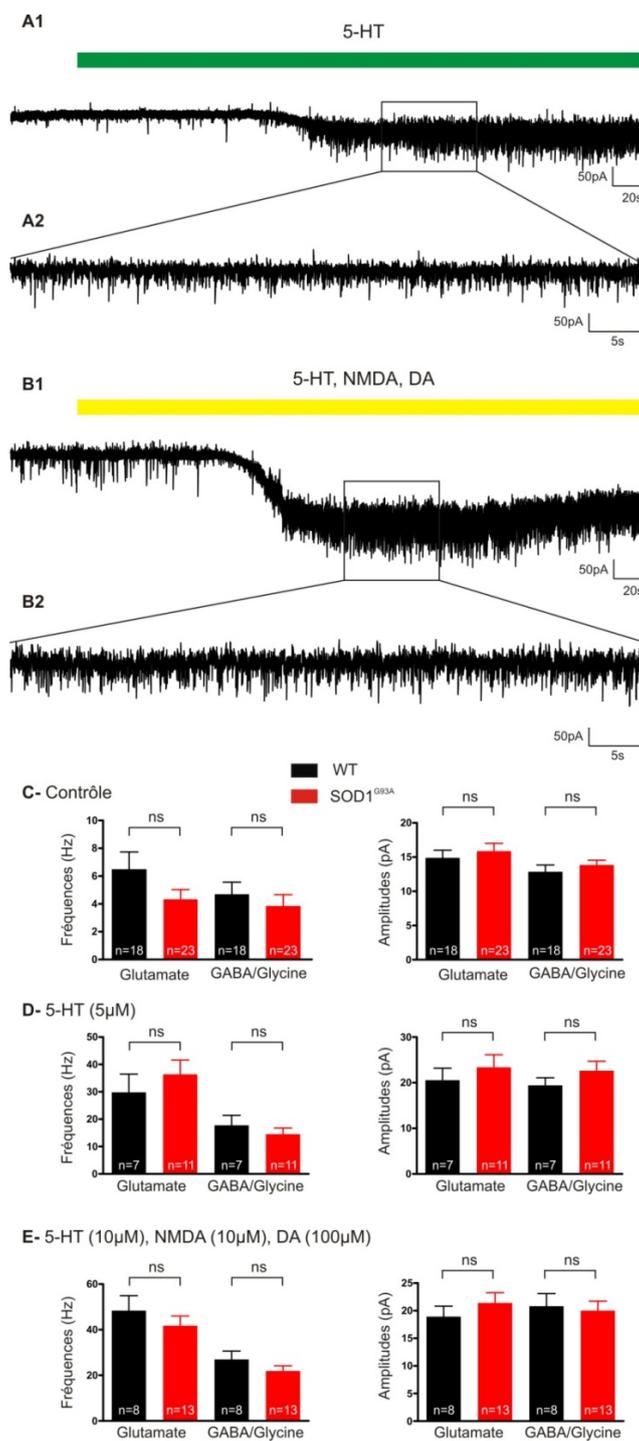


Figure 37 : Activités synaptiques GABA/Glycine et Glutamate chez les embryons WT et SOD1^{G93A}. Effet de la 5-HT (5 μM) (A1) et du cocktail composé de 5-HT (10 μM), NMDA (10 μM) et DA (100 μM) (B1) sur l'activité synaptique. Un agrandissement est réalisé lors de l'application de 5-HT (A2) et du cocktail (B2). Une script développé sous Spike 2 nous permet de détecter automatiquement les évènements synaptiques GABA/Glycine et Glutamate AMPA discernables par leur différence de polarité et de calculer leurs fréquences et leurs amplitudes. Ces expériences ont été réalisées en conditions contrôles (C), en présence de 5-HT (5 μM) (D) ou en présence de 5-HT (10 μM), NMDA (10 μM) et DA (100 μM) (E). Aucune différence significative de fréquences et d'amplitudes n'est observée au niveau des évènements GABA/Glycine et Glutamate chez les embryons WT et SOD1^{G93A} (ns=non significatif p>0,05, Mann et Whitney).

De plus, la fréquence de décharge des évènements GABA/Glycine chez les souris WT et SOD1^{G93A} augmente significativement en présence de 5-HT (17,75 ± 3,66 Hz et 14,51 ± 2,28 Hz, respectivement) par rapport à la condition contrôle (4,69 ± 0,87 Hz et 3,85 ± 0,81 Hz, respectivement) (***) p<0,001, Mann et Whitney) (Figure 38B). Alors qu'aucune différence significative n'est observée chez les souris WT au niveau de la fréquence de décharge des évènements GABA/Glycine entre les conditions 5-HT (17,75 ± 3,66 Hz) et cocktail (26,97 ± 3,63 Hz) (p>0,05, Mann et Whitney), une augmentation est observée chez les souris SOD1^{G93A} en présence de 5-HT, NMDA et DA (21,93 ± 2,26 Hz) par rapport à la condition 5-HT (14,51 ± 2,28 Hz) (* p<0,05, Mann et Whitney) (Figure 38B).

Ces résultats sont donc cohérent avec les simulations informatiques et compatible avec l'hypothèse d'un basculement excitation/inhibition des évènements GABA/Glycine avec l'augmentation de la fréquence pouvant ainsi expliquer la restauration de la locomotion fictive stable en présence de cocktail.

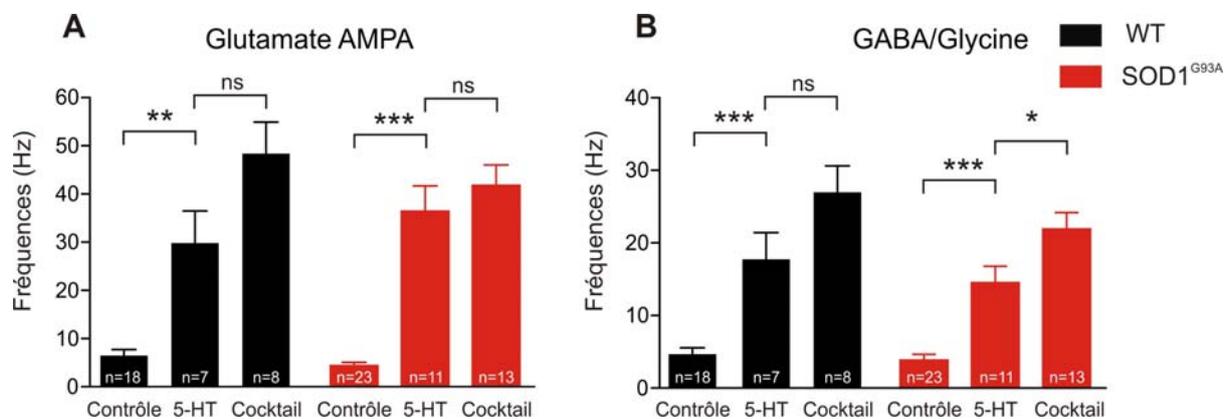


Figure 38 : Comparaison de la fréquence de décharge des évènements Glutamate AMPA (A) et GABA/Glycine (B) entre les différentes conditions chez les embryons WT et SOD1^{G93A}. (ns=non significatif p>0,05, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, Mann et Whitney).

III. Etude immunohistochimique des acides aminés GABA et Glycine

L'absence de différences entre les embryons WT et SOD1^{G93A} E17,5 pour les évènements GABA/Glycine et glutamate a été confortée par des études immunohistochimiques dans lesquelles les densités de marquage des acides aminés GABA et Glycine ont été quantifiées sur des coupes de moelles épinières lombaire d'embryon WT (Figure 39A1) et SOD1^{G93A} (Figure 39A2) au stade de développement E17,5. L'intensité de fluorescence a été mesurée à l'aide d'ImageJ au niveau de la substance grise ventrale. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre l'intensité de marquage du GABA détectée chez les embryons WT et SOD1^{G93A} ($8,29 \pm 0,78$ UA et $8,72 \pm 0,82$ UA, respectivement) et également au niveau de l'intensité de marquage de la glycine ($10,39 \pm 0,91$ UA et $10,53 \pm 0,97$ UA, respectivement) ($p > 0,05$, Mann et Whitney) (Figure 39B).

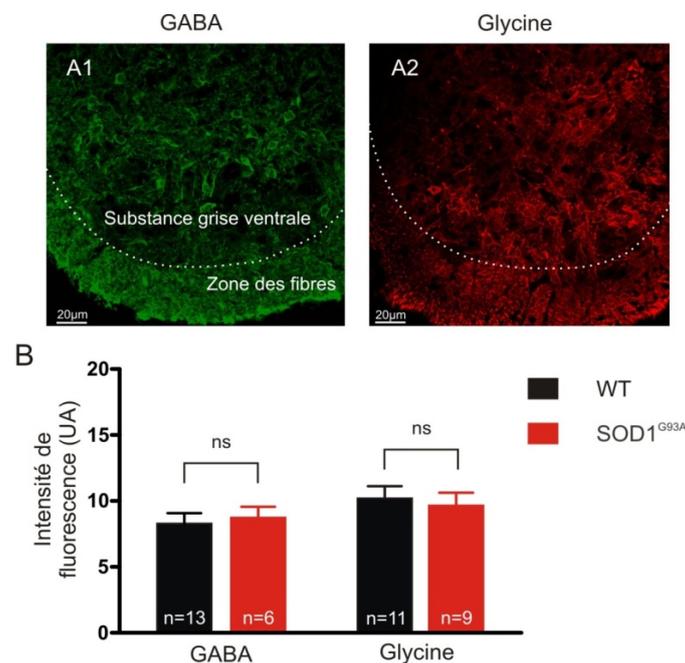


Figure 39 : Etudes des populations GABA/Glycine dans les ME WT et SOD1^{G93A} au niveau lombaire. (A) Immunohistochimies sur coupes transversales de moelles épinières lombaires WT (E17,5) des populations GABA en vert (A1) et Glycine en rouge (A2) (grossissement x40, épaisseur 0,25 μm). (B) Histogrammes de l'intensité de fluorescence moyenne mesurée au niveau de la substance grise ventrale chez les embryons WT et SOD1^{G93A}. On remarque qu'il n'y a pas de différence significative d'intensité de fluorescence pour le GABA et pour la Glycine (ns=non significatif) (ns=non significatif $p > 0.05$, Mann Whitney).

En conclusion, nous montrons que la 5-HT seule est capable d'induire de la locomotion stable seulement au niveau des ME E17,5 WT et que celle-ci s'avère inefficace au niveau des ME E17,5 SOD1^{G93A}. De plus, en présence de cocktail, les ME SOD1^{G93A} sont capables de générer des activités locomotrices fictives très stables comme les ME WT. Étonnamment, nos résultats ne montrent pas de différence significative en conditions contrôle, en présence de 5-HT ou de cocktail entre les MNs WT et SOD1^{G93A}.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La SLA est une maladie neurodégénérative touchant les neurones du cortex moteur, les MNs du tronc cérébral et de la ME. La perte progressive de ces neurones entraîne une atrophie musculaire conduisant au décès des patients par insuffisance respiratoire 1 à 5 ans après diagnostic. Aucun traitement curatif n'est connu à ce jour, et les causes de cette mort cellulaire restent mal élucidées. Les études, basées sur l'utilisation de modèles murins de la SLA portent très souvent sur des stades pré-symptomatiques. Des données existent cependant montrant que la SLA pourrait être une maladie neurodéveloppementale. Nous avons donc cherché à savoir si dès le développement des réseaux moteurs, des perturbations existaient. En effet, nous pensons qu'une mauvaise construction du réseau pendant la vie embryonnaire serait la cause de tous les dysfonctionnements observés en post-natal et pré-symptomatique. Le groupe de M. Pascal BRANCHEREAU a débuté ses investigations sur la SLA lors de mon arrivée en thèse de Doctorat. Nos données mettent en évidence que la morphologie des MNs est modifiée chez les souris SOD1^{G93A} par rapport aux souris WT et que cette modification de morphologie induit une hyperexcitabilité. De plus, nous montrons une altération du potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl), conduisant à un déficit au niveau des inhibitions reçues par le MN SOD1^{G93A}. Enfin, nous avons étudié si une modification du ECl avait une conséquence fonctionnelle au niveau de la mise en place de l'activité locomotrice exprimée par le réseau spinal lombaire.

Dans cette partie de discussion générale et perspectives, nous récapitulerons et discuterons les différents points abordés dans les résultats. Cette discussion comprendra 3 parties : la partie 1 qui fait l'objet d'un article déjà publié et les parties 2 et 3 nécessitant des expériences complémentaires pour être publiées (partie 2 et 3).

I. Partie 1 : Une modification de la morphologie des MNs SOD1^{G93A} embryonnaires E17,5 induit une hyperexcitabilité

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré un dysfonctionnement précoce des réseaux neuronaux spinaux du modèle murin de la SLA, la souris SOD1^{G93A}. Nos données anatomiques de la ME SOD1^{G93A} montrent pour la première fois que les MNs présentent des paramètres morphométriques anormaux. En effet, nos données montrent que les MNs SOD1^{G93A} présentent une morphologie altérée à savoir des branches intermédiaires et terminales réduites et que ces MNs sont hyperexcitables. De façon intéressante, nous démontrons par l'utilisation de simulation informatique, que les changements morphométriques peuvent expliquer à eux seuls l'hyperexcitabilité observées au niveau des MNs SOD1^{G93A}. Cette partie a fait l'objet d'une publication dans *Neurobiology of Disease* (Martin et al., 2013).

1. Hyperexcitabilité précoce liée à des changements morphologiques

Plusieurs études montrent une hyperexcitabilité des MNs issus du modèle murin SOD1^{G93A}, qu'ils soient étudiés en cultures primaires à partir des stades embryonnaires E12-E14 (MNs spinaux) (Kuo et al., 2004) ou qu'ils soient analysés sur coupe au stade P4-P10 (MNs hypoglosse) (van Zundert et al., 2008). L'hyperexcitabilité, décrite dans ces études, est attribuée à une augmentation de courant sodique (Na⁺) persistants. Des changements au niveau des densités de courant Na⁺ peuvent donc contribuer à l'hyperexcitabilité observée au niveau des MNs SOD1^{G93A}. En conséquence, dans notre étude réalisée au stade E17,5, nous avons mesuré le temps au pic du potentiel d'action (PA) qui reflète la densité totale des canaux Na⁺ au niveau des MNs spinaux individuels SOD1^{G93A}. Un allongement du temps au pic est détecté au niveau des MNs SOD1^{G93A} suggérant une diminution de la densité des canaux Na⁺. Dans notre étude, nous montrons également que la réduction des dendrites terminales s'accompagne d'une hyperexcitabilité. Nous ne pouvons donc pas exclure une

participation des courants Na^+ persistants dans les changements d'excitabilité trouvés au niveau des MNs $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ mais notre étude démontre que leur contribution reste négligeable par rapport aux altérations de la morphologie. Ces observations semblent être en contradiction avec l'importance des courants Na^+ persistants observés dans les autres modèles de SLA.

2. Causes présumées des changements morphologiques

Nous pouvons nous demander quelles pourraient être les causes responsables des changements de morphologie ? Comme la plupart des réseaux neuronaux en développement, les circuits moteurs de la ME subissent un remodelage dépendant de l'activité électrique, qui agit en synergie avec les modifications ontogéniques (Spitzer, 2006). Des changements développementaux tels que la maturation de la morphologie neuronale, le phénotype cellulaire, la connectivité synaptique, les récepteurs, ainsi que les propriétés de la membrane peuvent se produire au sein d'une fenêtre de temps limitée aussi appelée "période critique". Il a été montré que l'augmentation de la densité des sites de libération synaptique induit une diminution de l'extension de l'arbre dendritique des neurones post-synaptiques (Tripodi et al., 2008). Nous pouvons ainsi faire l'hypothèse que la réduction des segments terminaux dendritiques observée pendant ma thèse, indique une augmentation de l'activité synaptique dans les réseaux spinaux $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$. De plus, il a été montré une augmentation de l'activité synaptique spontanée excitatrice glutamate AMPA/NMDA et inhibitrice GABA au niveau de l'hypoglosse sur des MNs $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ qui induit une rétractation dendritique (van Zundert et al., 2008). Les activités synaptiques ont ainsi été étudiées au cours de cette thèse (partie 3) et seront discutées par la suite. Enfin, une autre possibilité serait que, en raison d'un dysfonctionnement métabolique, les MNs $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ développent une morphologie anormale de leurs dendrites conduisant à des mécanismes de compensation plus tard dans le développement.

3. Modifications morphologiques au cours du développement

Une réduction dendritique au niveau des MNs SOD1^{G93A} E17,5 a donc été mise en évidence. D'autres études montrent des différences de morphologie entre les MNs spinaux lombaires WT et SOD1^{G93A} à des stades post-nataux. Cependant, contrairement à nos résultats, ces études révèlent une prolifération des branches dendritiques au niveau des MNs lombaires spinaux aux stades P4-P5 (Amendola and Durand, 2008). De plus, une étude montre une élongation excessive dès les stades P3-P4 suivie d'une ramification pathologique aux stades P4-P8 (Filipchuk and Durand, 2012). Même si ces données postnatales ont été recueillies à partir d'un modèle de souris SLA avec une autre mutation que celle que nous utilisons (SOD1^{G85R}), nous pouvons les mettre en relation avec nos données recueillies sur le modèle murin de SLA SOD1^{G93A}. Nous pouvons alors émettre deux hypothèses pouvant expliquer la contradiction entre l'hypomorphologie dendritique des MNs que nous décrivons au stade embryonnaire et l'hypermorphologie décrite aux stades post-nataux. L'hypothèse la plus simple est que les réseaux neuronaux spinaux subissent un retard de développement chez la souris SOD1^{G93A}. A la naissance, comme le nouveau-né a des besoins locomoteurs pour se nourrir et se mouvoir, on peut imaginer que des phénomènes de compensation réajustent la morphologie des MNs afin qu'ils soient fonctionnels.

Une autre hypothèse est que l'arbre dendritique des MNs SOD1^{G93A} lombaires passe d'une réduction dendritique pendant la vie embryonnaire à une augmentation anormale au cours des stades post-nataux. Le réseau neuronal serait donc en constante compensation. Cela laisse supposer qu'entre les stades E17,5 et P4, les MNs WT et SOD1^{G93A} pourrait avoir une morphologie identique. Il serait intéressant de réaliser des reconstructions de MNs au stade post-natal P1 afin de montrer que les MNs WT et SOD1^{G93A} ne présentent plus de différences morphologiques.

4. MNs vulnérables vs MNs résistants

Les différents types de MNs (alpha FF, alpha FR, alpha s et gamma) sont localisés aléatoirement dans la colonne latérale des MNs (Kanning et al., 2010). De plus, les critères permettant d'identifier ces différents types de MNs sont basés sur l'activité des fibres musculaires qu'ils innervent (voir introduction). Ainsi, il est impossible à l'heure actuelle de travailler spécifiquement sur un sous-type de MN aux stades néo-nataux. Si il est possible de distinguer les MNs alpha des MNs gamma par la présence ou non du facteur de transcription Err3 pendant les deux premières semaines post-natales (Frieze et al., 2009), distinguer les 3 types de MNs alpha reste impossible. Pourtant, il est admis que la SLA impacte tout d'abord les MNs alpha FF qui présentent les plus gros corps cellulaires et une faible résistance d'entrée (Pun et al., 2006). Nos reconstructions de MNs ne montrent pas de différence au niveau des paramètres du corps cellulaire, ce qui laisse supposer que nous travaillons sur la même population de MNs (qui reste encore à identifier). Il est fort probable que les MNs qui ont fait l'objet de notre étude soient des MNs alpha étant donné la complexité de leur arborisation dendritique et que les MNs gamma présentent une morphologie plus simple que les MNS alpha (Westbury, 1982). De plus, nos MNs présentent un diamètre moyen de 30 µm ce qui les classent parmi les MNs vulnérables si on considère la classification de Chang et Martin (2011) (Chang and Martin, 2009) qui travaillent sur des MNs embryonnaires (E12-E14) en cultures primaires.

II. Partie 2 : Dysfonctionnement de l'homéostasie chlorure lié à une dérégulation de KCC2

1. Implication des co-transporteurs KCC2 et NKCC1 dans le ECl dépolarisé chez les souris SOD1^{G93A}

La mise en place des inhibitions chlorure-dépendantes est un phénomène

développemental essentiel au bon fonctionnement des réseaux de neurones. Deux principaux co-transporteurs sont impliqués dans l'homéostasie chlorure : NKCC1 qui fait rentrer du chlorure dans les cellules et KCC2 qui extrude le chlorure des neurones. Un dysfonctionnement des inhibitions peut entraîner des pathologies incluant des lésions neuronales (Nabekura et al., 2002) (Vinay and Jean-Xavier, 2008), de la douleur et hyperalgésie (Price et al., 2005) (Ferrini et al., 2013), de l'inflammation (Morales-Aza et al., 2004), des crises d'épilepsie (Jin et al., 2005) (Ben-Ari and Holmes, 2005) et un excès de stress (Wake et al., 2007). Peu d'études questionnent le rôle de l'homéostasie chlorure dans le cadre de la SLA. Un dysfonctionnement de la balance KCC2/NKCC1, en faveur de NKCC1 et donc probablement un déficit d'inhibition a cependant été mis en évidence au stade 120 jours dans la ME de la souris SOD1^{G93A} (Fuchs et al., 2010). Il a été montré qu'au sein des réseaux moteurs, les inhibitions chlorure-dépendantes se mettent en place pendant la vie embryonnaire (Delpy et al., 2008), (Branchereau et al., 2000a) (Alvarez and Fyffe, 2007). C'est la raison pour laquelle nous avons émis l'hypothèse qu'un dysfonctionnement de la balance KCC2/NKCC1 pouvait exister dès la mise en place des réseaux moteurs spinaux. Nos travaux se sont axés au stade de développement E17,5 et nous avons montré que le ECI est plus dépolarisé d'environ 9 mV au niveau des MNs SOD1^{G93A} par rapport aux MNs WT (-43,4 ± 1,9 mV et -52,8 ± 2,4 mV, respectivement, ** p<0,01, test t de student). Il est à noter que la valeur observée chez les embryons WT E17,5 est en accord avec la valeur mesurée sur des embryons OF1 E17,5 soit -58,9 ± 2,4 mV (Delpy et al., 2008).

De plus, nous avons montré en immunohistochimie et western-blot, toujours au stade de développement E17,5, qu'il y a moins de protéines KCC2 et plus de protéines NKCC1. Il est à noter que la quantification de KCC2 a été réalisée au niveau de la membrane plasmique contrairement à l'analyse réalisée pour NKCC1 qui est une quantification globale au niveau de la zone des MNs. Il serait donc intéressant de quantifier spécifiquement au niveau de la

membrane cytoplasmique des MNs la quantité de NKCC1 comme cela a été réalisé pour KCC2. De plus, il serait instructif de regarder spécifiquement les 2 isoformes de KCC2, KCC2a et KCC2b (Uvarov et al., 2009) au niveau de la membrane plasmique des MNs. Nous montrons également en évidence que l'efficacité du co-transporteur KCC2 est diminuée au niveau du MN E17,5 SOD1^{G93A}. Le dysfonctionnement de la balance KCC2/NKCC1 en faveur de NKCC1 combiné à la moindre efficacité de KCC2 peut donc expliquer le ECl plus dépolarisé au niveau des MNs SOD1^{G93A}. Toutes ces données montrent que les MNs E17,5 SOD1^{G93A}, outre leurs altérations morphologiques, présentent un système KCC2 moins actif le rendant moins capable de répondre aux afférences inhibitrices. Ce MN est donc hyperexcitable pour ces deux raisons. Nous pouvons alors nous demander si l'homéostasie chlorure est toujours affectée aux stades post-nataux. Il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences de mesure de ECl au stade P1 (au même stade que les expériences morphologiques complémentaires envisagées).

2. Autres causes possibles d'un ECl dépolarisé

Plusieurs molécules sont connues pour moduler l'homéostasie chlorure comme le BDNF, produit par le parenchyme spinal, qui up-régule KCC2 au cours du développement (Ludwig et al., 2011) (Aguado et al., 2003) et chez l'adulte dans la corne dorsale de la ME (Coull et al., 2005) ou encore la serotonine qui a été récemment décrite comme up-régulant KCC2 *via* les récepteurs 5-HT_{2A} (Bos et al., 2013).

Nous avons décidé de tester l'hypothèse de la bioamine 5-HT dont les fibres, issues des centres supra-spinaux, envahissent la ME au cours du développement embryonnaire (Ballion et al., 2002). Nos résultats montrent un déficit des fibres descendantes 5-HT et une quantité réduite de cette monoamine au niveau des segments lombaires des ME E17,5 SOD1^{G93A}. Il serait intéressant de quantifier les afférences 5-HT sur des MNs reconstruits comme il a été fait par Alvarez et al. (Alvarez et al., 1998). Il est donc possible que cette

réduction de 5-HT explique l'altération de l'homéostasie chlorure chez les souris SOD1^{G93A} puisque la 5-HT s'avère un puissant modulateur du ECl : une application de 5-HT (10 µM) exogène hyperpolarise d'environ 20 mV le ECl des MNs WT et SOD1^{G93A}. Nos résultats sont en accord avec les données de Bos et al (Bos et al., 2013) montrant sur des MNs spinaux post-nataux (P7) que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} up-régule la quantité de KCC2 au niveau de la membrane plasmique et hyperpolarise le ECl. Dans nos expériences, l'effet de la 5-HT sur le ECl est entièrement bloqué lors de l'ajout du bloqueur KCC2 (VU 0240551), ce qui montre bien que l'étroit lien entre 5-HT, KCC2 et ECl. Cependant, il reste à déterminer si ce trio est défectueux dans le cas de nos MNs SOD1^{G93A} puisque nous n'avons pas à ce jour de données prouvant un dysfonctionnement du système 5-HT chez la souris SOD1^{G93A}, si ce n'est une diminution de la 5-HT endogène intraspinale. Pour cela, deux approches peuvent être utilisées. Tout d'abord, il est envisagé de pré-traiter *in vitro* (30 min) des ME (E17,5) avec de la 5-HT (10µM) afin de vérifier si la quantité de KCC2 au niveau de la membrane cytoplasmique est restaurée (analyses immunohistochimiques et western-blot). Ensuite, une approche *in vivo* est prévue dans laquelle des souris gestantes seront traitées de manière chronique 2 fois par jour entre E10,5 et E17,5 par le précurseur de la 5-HT, la 5-HTP (50 mg/kg) afin de tenter de restaurer l'altération du ECl au niveau des MNs SOD1^{G93A}. La quantité de 5-HT sera mesurée par HPLC au niveau de la ME lombaire des embryons WT et SOD1^{G93A}. Le ECl sera analysé en électrophysiologie et enfin la survie des animaux issus des portées traitées sera quantifiée (courbe de survie Kaplan Meyer). Nous émettons l'hypothèse que le traitement *in utero* (*via* la mère) des embryons par le 5-HTP restaurera le niveau de 5-HT, rétablira le dysfonctionnement de l'homéostasie chlorure et permettra une meilleure survie des souris SOD1^{G93A}.

III. Partie 3 : Activité locomotrice-like préservée chez les souris SOD1^{G93A}

Les réseaux spinaux sont le siège d'activités rythmiques générées par les CPGs localisés principalement au niveau lombaire pour les membres postérieurs (Butt et al., 2002). Ces activités rythmiques sont engagées lors d'épisodes moteurs tels que la locomotion ou le grattage. Au cours de la locomotion, une alternance est observée entre les réseaux moteurs commandant les membres droit et gauche. Cette alternance repose principalement sur des connections commissurales inhibitrices influençant les MNs (Kiehn, 2011). On peut donc penser que si ECI est modifié au niveau des MNs SOD1^{G93A} et que ces mêmes MNs sont hyperexcitables de part leur morphologie, l'efficacité des informations commissurales inhibitrices sera diminuée et la relation de phase des épisodes locomoteurs sera altérée. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie consistant à enregistrer des épisodes de locomotion fictive afin d'analyser la relation de phase au niveau des ME d'embryons WT et SOD1^{G93A} au stade de développement E17,5.

1. Locomotion fictive induite par la 5-HT

Dans un premier temps, la locomotion fictive a été induite pharmacologiquement par application de 5-HT (5 μ M) connue pour activer les réseaux locomoteurs pendant la vie néonatale (Branchereau et al., 2000b) (Nishimaru and Kudo, 2000). Nous montrons que si la 5-HT est capable d'induire de la locomotion fictive stable au niveau de certaines ME E17,5 WT, elle s'avère inefficace au niveau des ME E17,5 SOD1^{G93A} qui ne présentent que des épisodes de locomotion instable (alternance précaire). Il est intéressant de noter que les épisodes rythmiques ont une amplitude plus importante chez les embryons SOD1^{G93A} que chez les embryons WT. Ces deux observations sont en accord avec un déficit dans les inhibitions commissurales et une hyperexcitabilité des MNs SOD1^{G93A}. De plus, parmi les embryons SOD1^{G93A} réalisant de la locomotion instable, un des embryons présente une relation de phase est en phase (activité de type synchrone) contrairement aux autres embryons

qui présentent une relation de phase en anti-phase. Cela pourrait s'expliquer par un problème d'activité inhibitrice qui n'existe plus, entraînant un excès d'informations excitatrices commissurales.

2. Locomotion fictive induite par un cocktail composé de 5-HT, NMDA et DA

Le souriceau ne présente pas de phénotype apparent ce qui laisse penser que ces activités locomotrices sont normales. Afin de mieux révéler les capacités locomotrices des réseaux spinaux chez l'embryon SOD1^{G93A} E17,5, nous avons utilisé un cocktail (5-HT, NMDA, DA) connu dans la littérature comme ayant une efficacité maximale pour activer les CPGs à des stades post-nataux chez la souris (Whelan et al., 2000). En présence de ce cocktail, les ME SOD1^{G93A} sont capables de générer des activités locomotrices fictives très stables comme les ME WT. Ce résultat est en accord avec l'absence de phénotype observé chez le souriceau SOD1^{G93A} et permet de penser que des phénomènes de compensation puissants contrebalancent le déficit en inhibition et l'hyperexcitabilité.

3. Modification de la balance excitation/inhibition ?

La balance excitation/inhibition des informations que reçoit le MN peut être affectée au profit des inhibitions, pour compenser le manque d'efficacité des inhibitions au niveau des MNs. Une modification de cette balance est ainsi décrite à P90 chez la souris SOD1^{G93A} au niveau de MNs de l'hypoglosse (MNs vulnérables) (Sunico et al., 2011). Afin de vérifier si les informations synaptiques excitatrices/inhibitrices sont altérées, nous avons enregistré les courants synaptiques excitateurs AMPA/Glutamate et inhibiteurs GABA/Glycine au niveau des MNs. Étonnamment, nos résultats ne montrent pas de différence significative en condition contrôle, en présence de 5-HT ou de cocktail entre les MNs WT et SOD1^{G93A}. Ce résultat laisse à penser que si il existe un phénomène de compensation, ce n'est pas au niveau de la balance informations excitatrice/inhibitrice qu'il opère. Nos analyses des évènements

synaptiques ont été réalisées en absence d'activités rythmiques puisque la préparation *in vitro* utilisée (préparation ouverte sans méninge) est différente de celle permettant d'obtenir des activités locomotrices fictives (préparation intacte avec racines). Il est nécessaire de répéter cette analyse des évènements synaptiques lors d'épisodes rythmiques afin de mettre en évidence une compensation qui expliquerait la présence de locomotion fictive chez la souris SOD1^{G93A}. Des expériences de simulations informatiques réalisées au laboratoire par Daniel Cattaert montrent qu'il est possible d'inhiber un MN spinal fictif présentant un ECI plus dépolarisé que la valeur standard si on augmente la fréquence des informations inhibitrices (correspondant aux informations GABA/Glycine) (Figure 40). De plus, nous avons montré qu'il y a une augmentation significative de décharge des évènements GABA/Glycine chez les embryons SOD1^{G93A} en présence de 5-HT, NMDA et DA par rapport à la condition 5-HT (* p<0,05, Mann et Whitney) ce qui est en accord avec l'hypothèse que le MN ipsi-latéral reçoit un excès d'inhibition GABA/Glycine lorsque le MN controlatéral est activé, ceci pendant des épisodes de locomotion fictive.

Le MN SOD1^{G93A} recevrait une densité de fibres GABA/Glycine identique au MN WT puisque les fréquences moyennes sont identiques (voir résultats). Le phénomène de compensation que nous envisageons serait plus lié à la modulation de la fréquence des informations inhibitrices (augmentation de la fréquence chez les souris SOD1^{G93A}). Des marquages immunohistochimiques sont nécessaires pour quantifier la densité des afférences GABA/Glycine au niveau de la membrane cytoplasmique des MNs SOD1^{G93A}. Ces marquages pourront être réalisés en combinaison avec des marquages de synapses sur des MNs Hb9-SOD1^{G93A}. La densité des récepteurs GABA/Glycine devra aussi être analysée au niveau des MNs E17,5 ainsi que la densité des courants évoqués par des applications par pression de GABA et Glycine en électrophysiologie. Il a été en effet décrit que la densité des courants évoqués Glycine est réduite au niveau de MNs vulnérables SOD (gros MNs

diamètres $> 28 \mu\text{M}$) étudiés en cultures dissociées ce résultat n'étant pas retrouvé au niveau de MNs qualifiés de résistants (petits MNs diamètres $< 28 \mu\text{M}$) (Chang and Martin, 2011).

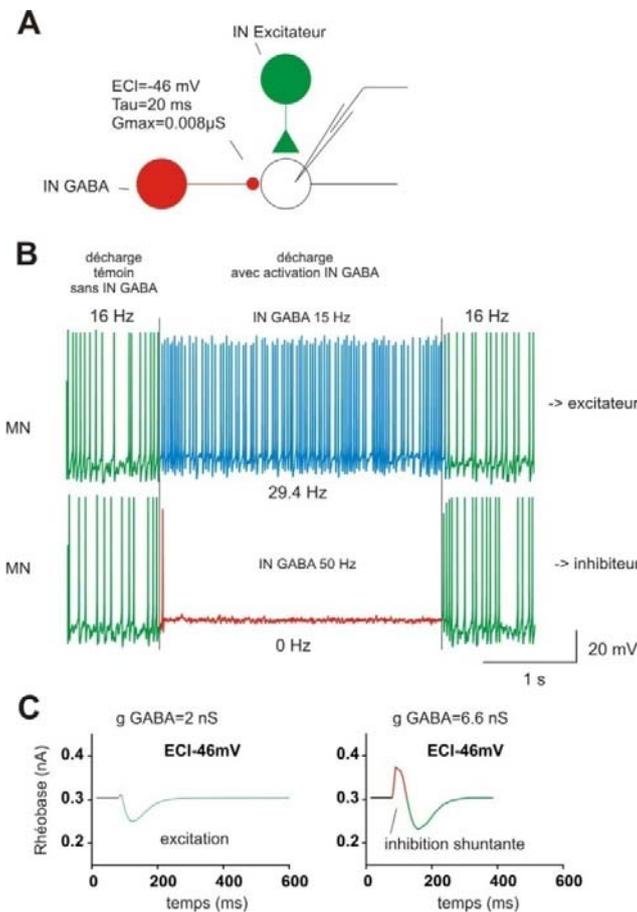


Figure 40 : Simulation de l'effet de la fréquence de décharge des interneurones GABA sur la bascule Excitation/Inhibition. (A) Schéma des neurones simulés. Le neurone enregistré reçoit en permanence des PPSEs excitateurs en provenance d'un interneurone exciteur. Cette commande excitatrice produit une décharge du neurone enregistré (16Hz en moyenne). Après une seconde d'enregistrement, un interneurone GABA est activé soit à fréquence basse (15 Hz) soit à fréquence haute (50 Hz). A part la fréquence de décharge, les caractéristiques de la synapse GABA sont les mêmes dans les deux situations (ECI : -46 mV ; Tau de la synapse alpha : 20 ms ; gGABAm_{ax} : 8 nS). (B) Enregistrements (simulés) obtenus avec les deux conditions de décharge des interneurones GABA (basse fréquence (en haut) et haute fréquence (en bas)). Alors qu'à basse fréquence, la synapse GABA est excitatrice (la décharge du neurone passe de 16 à 29,4 Hz), l'effet de la synapse GABA devient inhibiteur à haute fréquence (arrêt de la décharge du neurone enregistré). (C) Simulation de l'évolution de la dualité Excitation/Inhibition d'une synapse GABA en fonction de la conductance gGABAm_{ax}. Cette fois seule une synapse GABA est simulée sur un motoneurone de type E17,5 avec les caractéristiques suivantes : ECI : -46 mV ; tau synapse alpha : 20 ms ; potentiel de repos : -65 mV. La rhéobase (intensité minimale pour induire un PA) est mesurée tout au long de l'événement synaptique GABA. Lorsque la conductance gGABAm_{ax} est de 2 nS, la synapse GABA a surtout un effet excitateur (tracé de gauche) et seule une petite fraction de l'événement est inhibiteur (augmentation légère de la rhéobase, en rouge). Par contre lorsque gGABAm_{ax} est augmenté à 6,6 nS, une forte inhibition apparaît en début du PPS (en rouge sur l'enregistrement de droite).

IV. Schéma récapitulatif

A partir de nos observations expérimentales et de nos hypothèses collectées sur le modèle murin $SOD1^{G93A}$, nous avons établi le schéma récapitulatif présenté sur la Figure 41.

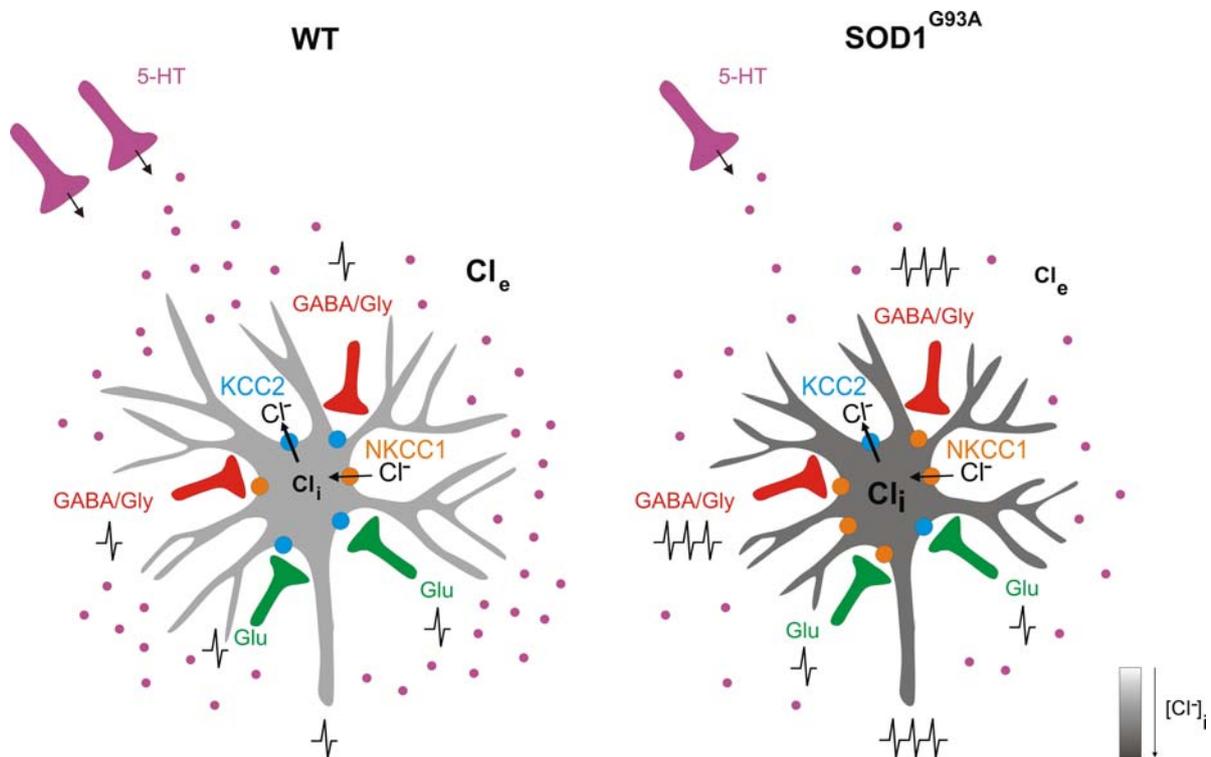


Figure 41 : Schéma récapitulatif. Le MN E17,5 est représenté en couleur grise, le niveau de gris étant représentatif de la concentration intracellulaire en ions chlorure $[Cl^-]_i$. Pour une raison de simplification, seules les afférences GABA/Glycines (rouge) et Glutamate (vert) présentes au niveau du corps cellulaire du MN sont représentées. Les afférences sérotonergiques (mauve) sont positionnées dans l'environnement motoneuronal même si en réalité on les retrouve proche de la membrane cytoplasmique du MN. Les molécules de 5-HT sont représentées par des ronds mauves. Les co-transporteurs KCC2 et NKCC1 sont représentés respectivement en bleu et orange. L'intensité des flux entrant ou sortant de chlorure est symbolisée par l'épaisseur des flèches noires.

Sur la figure 41, on peut donc voir que le MN $SOD1^{G93A}$ présente des branches terminales plus courtes que celles du MN WT au stade de développement E17,5. Ces modifications morphologiques conduisent à une hyperexcitabilité du MN $SOD1^{G93A}$. L'homéostasie chlorure est affectée au niveau des MNs $SOD1^{G93A}$, la concentration intracellulaire en ions chlorure étant plus importante au niveau de ces MNs. Le

dysfonctionnement de la balance KCC2/NKCC1 pourrait expliquer l'altération de l'homéostasie chlorure. Nos résultats laissent à penser que la diminution de l'innervation 5-HT, observée au niveau lombaire de la ME des embryons SOD1^{G93A} E17,5, explique l'altération de la balance des co-transporteurs chlorure. Toutes ces modifications décrites au niveau du MN SOD1^{G93A} E17,5 conduisent à un ECl plus dépolarisé par rapport au MN WT au même stade de développement. Le MN SOD1^{G93A} est donc moins apte à intégrer les afférences inhibitrices GABA/Glycine. Ceci pourrait être compensé par une fréquence accrue de ces mêmes afférences inhibitrices permettant l'expression d'activités motoneuronales "normales" au cours de la locomotion.

Les travaux de cette thèse de doctorat démontrent donc pour la première fois un déficit développemental au niveau du modèle murin SOD1^{G93A} de la SLA et ouvre des perspectives sur la recherche des mécanismes de compensation opérant jusqu'à la survenue du phénotype de la maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibanez CF, Soriano E (2003) BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130:1267-1280.
- Allain AE, Le Corrionc H, Delpy A, Cazenave W, Meyrand P, Legendre P, Branchereau P (2011) Maturation of the GABAergic transmission in normal and pathologic motoneurons. *Neural Plast* 2011:905624.
- Alvarez FJ, Fyffe RE (2007) The continuing case for the Renshaw cell. *J Physiol* 584:31-45.
- Alvarez FJ, Pearson JC, Harrington D, Dewey D, Torbeck L, Fyffe RE (1998) Distribution of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive boutons on alpha-motoneurons in the lumbar spinal cord of adult cats. *J Comp Neurol* 393:69-83.
- Amendola J, Durand J (2008) Morphological differences between wild-type and transgenic superoxide dismutase 1 lumbar motoneurons in postnatal mice. *J Comp Neurol* 511:329-341.
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S (1999) Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23:659-674.
- Ballion B, Branchereau P, Chapron J, Viala D (2002) Ontogeny of descending serotonergic innervation and evidence for intraspinal 5-HT neurons in the mouse spinal cord. *Dev Brain Res* 137:81-88.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.
- Ben-Ari Y, Holmes GL (2005) The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Curr Opin Neurol* 18:141-145.
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61:820-838.
- Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci* 26:10407-10419.
- Blaustein MP (1988) Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci* 11:438-443.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Bories C, Amendola J, Lamotte d'Incamps B, Durand J (2007) Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 25:451-459.
- Bos R, Sadlaoud K, Boulenguez P, Buttigieg D, Liabeuf S, Brocard C, Haase G, Bras H, Vinay L (2013) Activation of 5-HT_{2A} receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:348-353.
- Branchereau P, Chapron J, Meyrand P (2002) Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci* 22:2598-2606.
- Branchereau P, Rodriguez JJ, Delvolvé I, Abrous DN, Le Moal M, Cabelguyen JM (2000a) Serotonergic systems in the spinal cord of the amphibian urodele *Pleurodeles waltl*. *Journal of Comparative Neurology* 419:49-60.
- Branchereau P, Morin D, Bonnot A, Ballion B, Chapron J, Viala D (2000b) Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Res Bull* 53:711-718.
- Briscoe J, Novitsch BG (2008) Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:57-70.

- Brocard F, Vinay L, Clarac F (1999) Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 117:81-89.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-749.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854.
- Butt SJ, Lebret JM, Kiehn O (2002) Organization of left-right coordination in the mammalian locomotor network. *Brain Res Brain Res Rev* 40:107-117.
- Chang Q, Martin LJ (2009) Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: a quantitative confocal analysis. *Am J Pathol* 174:574-585.
- Chang Q, Martin LJ (2011) Glycine receptor channels in spinal motoneurons are abnormal in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 31:2815-2827.
- Clarac F, Brocard F, Vinay L (2004) The maturation of locomotor networks. *Prog Brain Res* 143:57-66.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117.
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819.
- Cluskey S, Ramsden DB (2001) Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol* 54:386-392.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Dal Canto MC, Gurney ME (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145:1271-1279.
- Dal Canto MC, Gurney ME (1997) A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 93:537-550.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Darman RB, Forbush B (2002) A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem* 277:37542-37550.
- De Koninck Y (2007) Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol* 7:93-99.
- Delpy A, Allain AE, Meyrand P, Branchereau P (2008) NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J Physiol* 586:1059-1075.
- Destexhe A, Babloyantz A, Sejnowski TJ (1993) Ionic mechanisms for intrinsic slow oscillations in thalamic relay neurons. *Biophys J* 65:1538-1552.
- Dupree JL, Mason JL, Marcus JR, Stull M, Levinson R, Matsushima GK, Popko B (2004) Oligodendrocytes assist in the maintenance of sodium channel clusters independent of the myelin sheath. *Neuron Glia Biol* 1:179-192.
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Oudart H, de Tapia M, Barbeito L, Loeffler JP (2004) Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neurodegener Dis* 1:245-254.

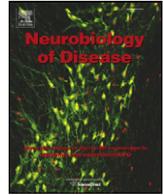
- Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256:1555-1560.
- Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, Laffray S, Del'Guidice T, Lorenzo LE, Castonguay A, Doyon N, Zhang W, Godin AG, Mohr D, Beggs S, Vandal K, Beaulieu JM, Cahill CM, Salter MW, De Koninck Y (2013) Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nat Neurosci* 16:183-192.
- Filipchuk AA, Durand J (2012) Postnatal dendritic development in lumbar motoneurons in mutant superoxide dismutase 1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 209:144-154.
- Flemmer AW, Gimenez I, Dowd BF, Darman RB, Forbush B (2002) Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J Biol Chem* 277:37551-37558.
- Friese A, Kaltschmidt JA, Ladle DR, Sigrist M, Jessell TM, Arber S (2009) Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13588-13593.
- Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, Rojas F, Brown RH, Jr., Madrid R, van Zundert B (2013) Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motoneuron death by inducing hyperexcitability. *J Neurophysiol* 109:2803-2814.
- Fuchs A, Ringer C, Bilkei-Gorzo A, Weihe E, Roeper J, Schutz B (2010) Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:1057-1070.
- Gajdusek DC, Salazar AM (1982) Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology* 32:107-126.
- Gammill LS, Bronner-Fraser M (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4:795-805.
- Garruto RM, Swyt C, Fiori CE, Yanagihara R, Gajdusek DC (1985) Intraneuronal deposition of calcium and aluminium in amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Lancet* 2:1353.
- Gonzalez-Islas C, Chub N, Wenner P (2009) NKCC1 and AE3 appear to accumulate chloride in embryonic motoneurons. *J Neurophysiol* 101:507-518.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME (1998) Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23:249-256.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155.
- Harratz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C, Engelhardt JF (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 118:659-670.
- Harry GJ, Kraft AD (2012) Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 33:191-206.
- Hewett JA (2009) Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem* 110:1717-1736.

- Ip P, Mulligan VK, Chakrabartty A (2011) ALS-causing SOD1 mutations promote production of copper-deficient misfolded species. *J Mol Biol* 409:839-852.
- Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW (2010) Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron* 67:575-587.
- Jaiswal MK, Keller BU (2009) Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca²⁺ homeostasis in SOD1G93A mice. *Mol Pharmacol* 75:478-489.
- Jehle T, Bauer J, Blauth E, Hummel A, Darstein M, Freiman TM, Feuerstein TJ (2000) Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* 130:1227-1234.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Jin X, Huguenard JR, Prince DA (2005) Impaired Cl⁻ extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex. *J Neurophysiol* 93:2117-2126.
- Julien JP, Beaulieu JM (2000) Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects? *J Neurol Sci* 180:7-14.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annual review of Neuroscience* 33:409-440.
- Kiehn O (2011) Development and functional organization of spinal locomotor circuits. *Curr Opin Neurobiol* 21:100-109.
- Kiehn O, Dougherty KJ, Hagglund M, Borgius L, Talpalar A, Restrepo CE (2010) Probing spinal circuits controlling walking in mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 396:11-18.
- Koo SJ, Pfaff SL (2002) Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron* 35:823-826.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ (2005) Increased persistent Na⁽⁺⁾ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563:843-854.
- Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, Bar PR, Anelli R, Heckman CJ, Kroese AB (2004) Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol* 91:571-575.
- Kurland LT, Mulder DW (1954) Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution, with special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 4:355-378.
- Lancelot E, Revaud ML, Boulu RG, Plotkine M, Callebert J (1998) A microdialysis study investigating the mechanisms of hydroxyl radical formation in rat striatum exposed to glutamate. *Brain Res* 809:294-296.
- Le-Corronc H, Rigo JM, Branchereau P, Legendre P (2011) GABA(A) Receptor and Glycine Receptor Activation by Paracrine/Autocrine Release of Endogenous Agonists: More Than a Simple Communication Pathway. *Mol Neurobiol*.
- Lee SK, Pfaff SL (2001) Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1183-1191.
- Legendre P, Forstera B, Juttner R, Meier JC (2009) Glycine Receptors Caught between Genome and Proteome - Functional Implications of RNA Editing and Splicing. *Front Mol Neurosci* 2:23.
- Li Y, Brewer D, Burke RE, Ascoli GA (2005) Developmental changes in spinal motoneuron dendrites in neonatal mice. *J Comp Neurol* 483:304-317.

- Ludwig A, Uvarov P, Soni S, Thomas-Crusells J, Airaksinen MS, Rivera C (2011) Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J Neurosci* 31:644-649.
- Magrane J, Sahawneh MA, Przedborski S, Estevez AG, Manfredi G (2012) Mitochondrial dynamics and bioenergetic dysfunction is associated with synaptic alterations in mutant SOD1 motor neurons. *J Neurosci* 32:229-242.
- Martin E, Cazenave W, Cattaert D, Branchereau P (2013) Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 54:116-126.
- Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ (2002) Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Int* 40:543-551.
- Morales-Aza BM, Chillingworth NL, Payne JA, Donaldson LF (2004) Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol Dis* 17:62-69.
- Morikawa Y, Komori T, Hisaoka T, Senba E (2009) Detailed expression pattern of Foxp1 and its possible roles in neurons of the spinal cord during embryogenesis. *Dev Neurosci* 31:511-522.
- Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T (2013) The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics* 288:207-229.
- Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Akaike N (2002) Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci* 22:4412-4417.
- Nishimaru H, Kudo N (2000) Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Res Bull* 53:661-669.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727.
- Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S, Zona C (2003) Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 351:153-156.
- Price TJ, Cervero F, de Koninck Y (2005) Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem* 5:547-555.
- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408-419.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47.
- Rigato C, Buckinx R, Le-Corronc H, Rigo JM, Legendre P (2011) Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59:675-695.
- Robberecht W, Philips T (2013) The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14:248-264.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Figlewicz D (1996) SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:128-131.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214-222.

- Roy DN, Sabri MI, Kayton RJ, Spencer PS (1996) beta-Cyano-L-alanine toxicity: evidence for the involvement of an excitotoxic mechanism. *Nat Toxins* 4:247-253.
- Roy J, Minotti S, Dong L, Figlewicz DA, Durham HD (1998) Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 18:9673-9684.
- Shaw BF, Valentine JS (2007) How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* 32:78-85.
- Sibilla S, Ballerini L (2009) GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs. *Prog Neurobiol* 89:46-60.
- Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung WY, Bebout J, McKenna-Yasek D, et al. (1991) Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* 324:1381-1384.
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444:707-712.
- Sunico CR, Dominguez G, Garcia-Verdugo JM, Osta R, Montero F, Moreno-Lopez B (2011) Reduction in the motoneuron inhibitory/excitatory synaptic ratio in an early-symptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 21:1-15.
- Tramu G, Pillez A, Leonardelli J (1983) Serotonin axons of the ependyma and circumventricular organs in the forebrain of the guinea pig. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 228:297-311.
- Tripodi M, Evers JF, Mauss A, Bate M, Landgraf M (2008) Structural homeostasis: compensatory adjustments of dendritic arbor geometry in response to variations of synaptic input. *PLoS biology* 6:e260.
- Turner BJ, Baumer D, Parkinson NJ, Scaber J, Ansorge O, Talbot K (2008) TDP-43 expression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. *BMC Neurosci* 9:104.
- Ulloa F, Marti E (2010) Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn* 239:69-76.
- Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Soni S, Hubner CA, Rivera C, Airaksinen MS (2009) Coexpression and heteromerization of two neuronal K-Cl cotransporter isoforms in neonatal brain. *J Biol Chem* 284:13696-13704.
- van Zundert B, Izaurieta P, Fritz E, Alvarez FJ (2012) Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Biochem* 113:3301-3312.
- van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, Brown RH, Jr., Constantine-Paton M, Bellingham MC (2008) Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28:10864-10874.
- Vinay L, Jean-Xavier C (2008) Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain Res Rev* 57:103-110.
- Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J (2007) Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci* 27:1642-1650.
- Westbury DR (1982) A comparison of the structures of alpha and gamma-spinal motoneurons of the cat. *J Physiol* 325:79-91.
- Whelan P, Bonnot A, O'Donovan MJ (2000) Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse. *J Neurophysiol* 84:2821-2833.

ARTICLE 1



Embryonic alteration of motoneuronal morphology induces hyperexcitability in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Elodie Martin, William Cazenave, Daniel Cattaert, Pascal Branchereau *

Univ. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France
CNRS, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2012
Revised 31 January 2013
Accepted 22 February 2013
Available online 4 March 2013

Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis
SOD1 mouse
Embryonic spinal cord
Motoneuron
Hyperexcitability
Morphology
Electrophysiology
3D reconstruction
Computer simulation

ABSTRACT

Although amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an age-dependent fatal neurodegenerative disease in which upper and lower motoneurons (MNs) are targeted for death in adults, increasing lines of evidence indicate that MNs display physiological and morphological abnormalities during postnatal development, long before disease onset. Here, using transgenic mice overexpressing the G93A mutation of the human Cu/Zn superoxide dismutase gene (*SOD1*), we show that *SOD1*^{G93A} embryonic lumbar E17.5 MNs already expressed abnormal morphometric parameters, including a deep reduction of their terminal segments length. Whole-cell patch-clamp recordings from acute spinal cord preparations were made to characterize functional changes in neuronal activity. *SOD1*^{G93A} E17.5 MNs displayed hyperexcitability compared to wild-type MNs. Finally, we performed realistic simulations in order to correlate morphometric and electrophysiological changes observed in embryonic *SOD1*^{G93A} MNs. We found that the reduced dendritic elongation mainly accounted for the hyperexcitability observed in *SOD1*^{G93A} MNs. Altogether, our results emphasize the remarkable early onset of abnormal neural activity in the commonly used animal model for ALS, and suggest that embryonic morphological changes are the primary compensatory mechanisms, the physiological adjustments being only secondary to morphological alterations.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) also known as Lou Gehrig's disease is an age-dependent fatal paralytic disease that results from the degeneration of upper descending cortical neurons and lower motoneurons (MNs) located in the brainstem and spinal cord (Boillee et al., 2006). ALS is the third neurodegenerative cause of adult death after Alzheimer's disease and Parkinson's disease, with an incidence of 1–2 per 100,000 humans that peaks in the sixth decade of life, and a lifetime risk at about 1 in 1000 (Boillee et al., 2006; Pasinelli and Brown, 2006). Usually, respiratory paralysis leads to death 2 to 5 years after onset of the disease. To date, causes of ALS remain elusive. Many hypotheses have been explored to explain ALS pathogenesis including mitochondrial dysfunction (Higgins et al., 2003), axonal transport (De Vos et al., 2007), protein misfolding and endoplasmic reticulum stress (Atkin et al., 2006), and glutamate excitotoxicity (Van Den Bosch et al., 2006).

The majority of the ALS cases are sporadic with unknown etiology, but ~10% of ALS patients suffer from a familial form of ALS. If mutations

in TAR DNA-binding protein (TDP-43, encoded by the *TARDBP* gene) (Kabashi et al., 2008; Sreedharan et al., 2008), fused in sarcoma (encoded by the *FUS/TLS* gene) (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009) and Cu/Zn superoxide dismutase gene (*SOD1*) that encodes an antioxidant enzyme (Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993) account for approximately 30% of classical inherited ALS, *SOD1* mutations represent the most common cases. More than 100 mutations of the *SOD1* gene are known in ALS patients (Boillee et al., 2006).

Among these mutations, *SOD1*^{G93A}, in which glycine is substituted by alanine at residue 93, has been particularly studied, and a transgenic mouse line overexpressing this mutant human *SOD1*^{G93A} has been produced. Interestingly, *SOD1*^{G93A} mouse expresses phenotypic and pathological symptoms resembling ALS in humans (Cleveland and Rothstein, 2001; Gurney et al., 1994).

Because a phenotype becomes apparent at quite late stages in the *SOD1*^{G93A} mouse ALS model, i.e. abnormal gait at P50 (Wooley et al., 2005), most studies performed on this mouse line have focused at late post-natal asymptomatic stages (Kanning et al., 2010). However, in spite of an absence of clear phenotype, it is possible that early changes accompanied by compensatory mechanisms occur in *SOD1* mice as suggested by studies performed during the first two post-natal weeks. Changes include alteration of MN morphology and excitability (Amendola and Durand, 2008; Bories et al., 2007; Pambo-Pambo et al., 2009) as well as transient delays in development of gross locomotor abilities (van Zundert et al., 2008). In addition, data collected from

* Corresponding author at: Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), Université de Bordeaux et CNRS - UMR 5287, Av. des Facultés, 4^{ème} étage Est, 33405 Talence, France. Fax: +33 5 40 00 25 61.

E-mail address: pascal.branchereau@u-bordeaux1.fr (P. Branchereau).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

cultured SOD1^{G93A} embryonic (E13.5) MNs demonstrate defects in axonal transport (De Vos et al., 2007; Kieran et al., 2005), enhanced sensitivity of MNs to Fas- or NO-triggered cell death (Raoul et al., 2002) and impaired mitochondrial dynamics (Magrane et al., 2012), highlighting early developmental pathological features in the SOD1 rodent model (Kanning et al., 2010).

There is increasing evidence that the toxicity of mutant SOD1 is linked to its propensity to misfold and to aggregate (Liu et al., 2012). Based on the use of an antibody (C4F6) specifically recognizing a “toxic” form of the mutant SOD1 protein, a recent study (Brotherton et al., 2012) suggests that a subset of SOD1 protein (misfolded form) accumulates in MNs when they become sick. This study also indicates that C4F6 staining is observed throughout the disease course (presymptomatic through end stage), and even shows staining in certain MNs at early stages (P15). This indicates that toxic form of mutated SOD1 may be present at perinatal stages.

In the present study, by analyzing SOD1^{G93A} MNs at the late embryonic stage E17.5 when they undergo major developmental changes and when motor spinal networks become functional (Branchereau et al., 2000), we show that SOD1^{G93A} MNs are hyperexcitable and exhibit a reduced dendritic arborization. Interestingly, using computer simulations, we show that the reduced growth of embryonic SOD1^{G93A} MNs accounts, for the most part, for their hyperexcitability.

Material and methods

Animals and spinal cord preparation

All procedures were carried out in accordance with the French Directive (87 / 148, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche), the European Communities Council Directive (86 / 609 / EEC), and local French legislation for care and use of laboratory animals. B6SJL-TgN(SOD1-G93A)/1Gur/J mice expressing the human G93A Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutation (glycine substituted for alanine at position 93) were obtained from The Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/strain/002726.html>). These transgenic mice had an abbreviated life span (50% survive at 128.9 ± 9.1 days). Mice were bred in our animal facilities. Hemizygous B6SJL-TgN(SOD1-G93A)/1Gur/J were maintained by crossing transgene-positive male mice with B6SJL F1 hybrid females (Janvier SAS, France). All experiments were carried out on embryos at Embryonic (E) stage 17.5 (E17.5), the embryonic day 0.5 corresponding to the day following the mating night. Embryos were surgically removed from pregnant mice previously killed by cervical dislocation. Embryos were decapitated and the brainstem-spinal cord preparation was dissected out. The spinal cord was dorsally opened and meninges were removed. The preparation was placed in a recording chamber, maintained opened under a nylon mesh, and superfused ($\sim 1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) with an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 111.5 NaCl, 6 KCl, 2 CaCl₂·2H₂O, 1 MgCl₂·6H₂O, 25 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄·H₂O, 11 D-Glucose, pH 7.4 (296 mosmol·l⁻¹), oxygenated with a 95% O₂ and 5% CO₂ mixture. All experiments were carried out at constant room temperature (~ 23 °C). All experiments were blindly performed. Indeed, each embryo was genotyped after electrophysiological experiments by standard PCR from tail biopsies using established primers and protocol as stated by The Jackson Laboratory (http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:3006631337136840::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:523,002726).

Whole-cell patch-clamp recordings and motoneuron injection

We performed whole-cell patch-clamp recordings from MNs identified according to their morphological features (pear-shaped large cell body), their disposition in ventral column (Delpy et al., 2008) and their input resistance (5 to 10 times lower than interneurons). An Olympus BX51 WI microscope equipped with differential interference

contrast (DIC) and a CCD camera (SPOT RT-SE6, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) was used to visualize MNs. Patchclamp electrodes were constructed from thin-walled single-filamented borosilicate glass (1.5 mm outer diameter, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) using a two-stage vertical microelectrode puller (PP-830, Narishige, Tokyo, Japan). Patch electrodes resistances ranging from 3 to 5 M Ω were filled with the following intracellular medium (in mM): 130 potassium gluconate, 10 Hepes, 10 EGTA, 5 NaCl, 2 MgATP and 1 CaCl₂, pH 7.4 (296 mosmol·l⁻¹). Motorized micromanipulators (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) were used to position patch-clamp electrode on a visually identified MN.

For each brainstem-spinal cord preparation, we recorded only 1 to 3 MNs. Hence, 10 SOD1^{G93A} MNs (7 embryos) and 32 WT MNs (15 embryos) were analyzed from a total of 12 pregnant mice. All WT and SOD1^{G93A} embryos were harvested from B6SJL F1 hybrid females crossed with SOD1^{G93A} male mice. Six SOD1^{G93A} and 6 WT MNs were stained during whole-cell recordings with pipettes containing Neurobiotin (0.4%, ClniSciences, Montrouge, France) diluted in the intracellular medium (see above). All recordings were made with an Axon Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data were low-pass filtered (2 kHz) and acquired at 20 kHz on a computer via an analog-to-digital converter (Digidata 1322A, Molecular Devices) and a data acquisition software (Clampex 10.3, Molecular Devices). Measurements were corrected for liquid junction potentials (13.7 mV, calculated using the Clampex tool).

Membrane properties and data analysis

All data analysis were performed off-line using Clampfit 9.0 (Axon Instruments). MN input resistance was determined in current-clamp mode by injecting current pulses of different intensity (*I*) and polarity (duration: 1.5 s) through the recording pipette. MN voltage (*V*) responses were measured and *V/I* curves were constructed. Input resistance R_{in} was measured as the slope of the linear portion of the *V/I* relationship. For positive pulses evoking action potentials (APs), the instantaneous frequency (*F*) was measured and plotted against the current intensity (*I*) in order to build *F/I* curves. The MN capacitance c_m was collected immediately after establishing whole-cell patch-clamp. The rheobase current was defined as the minimal constant current intensity necessary to evoke an AP. Spike characteristics (time to peak, half-width, amplitude and after-hyperpolarisation – AHP) were determined on the first evoked AP during over-threshold current injection.

Immunohistochemistry

After the recording session, during which MNs were injected with Neurobiotin, the entire brainstem-spinal cord preparation was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2 h at room temperature. It was then rinsed three times with 0.1 M Phosphate Buffer Saline (PBS), and incubated with streptavidin-Cy3 (1:400, Invitrogen) overnight at 4 °C in 0.1 M PBS containing 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma, St Louis, MO, USA) and 0.1% Triton X-100 (Sigma). To confirm that injected neurons were MNs, a mouse monoclonal antibody directed against Islet-1/2 (1/100, Developmental Studies Hybridoma Bank), a marker of developing MNs (Ericson et al., 1992), was added to the incubating medium (Fig. 1). Then the preparation was incubated with Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG(H + L) (1/400, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) for 2 h, at room temperature, abundantly rinsed in 0.1 M PBS, and finally mounted with anti-fade reagent (Fluoromount, Electron Microscopy Sciences). Fig. 1 illustrates a representative MN immunopositive for Islet-1/2.

Confocal microscopy

Preparations were imaged with a BX51 Olympus Fluoview 500 confocal microscope. Serial optical sections of 0.2 μm were obtained

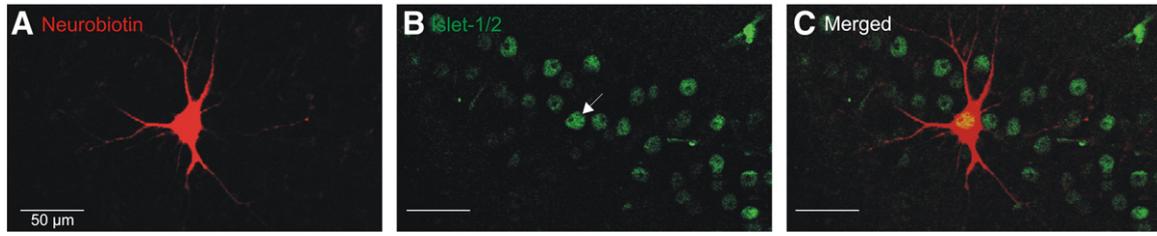


Fig. 1. Islet-1/2 is expressed in neurons recorded using patch-clamp electrode. (A) Neurobiotin (red) reveals the architecture of the recorded neuron. (B) The transcription factors Islet-1/2 (green) are localized in nuclei of MNs organized in columns. The arrow points out the nucleus of the recorded MN. (C) The merged image confirms the motoneuronal identity of the recorded neuron. Illustrations are single optical section (0.6 μm in Z), acquired at $\times 20$ magnification.

using an oil-immersion objective $60\times$, 1.0 numerical aperture. The shrinkage was estimated from confocal images of a MN stained with rhodamine-dextran (0.5%; Molecular Probes) diluted in the intracellular medium, before and after PFA fixation. The diameter of the MN cell body was measured in the three dimensions. A shrinkage factor of 0.3 was estimated in Z-axis and corrections in this dimension were systematically applied for each reconstructed MN. No noticeable shrinkage was observed in the X–Y axis as also reported by others (Li et al., 2005).

Reconstruction procedures and quantitative analysis

Three-dimensional (3D) reconstruction of wild-type (WT) and SOD1^{G93A} MNs were performed with *NeuroLucida* confocal module (MBF Bioscience Inc., Williston, VT, USA). Morphometric parameters, characterizing morphologic and topologic features of MN dendritic arborization, were harvested with the *NeuroLucida Explorer* software package (MBF Bioscience Inc) (see Tables 2–3).

Simulations

The effect of shortening terminal segments on intrinsic excitability was simulated using a compartment model elaborated with the program NEURON 7.1. Two simulated MNs were built: a WT (Fig. 5A₁) and a SOD1^{G93A}-like MN (Fig. 5A₂). Both MNs were identical, with similar channels equipment and morphology, except for the terminal dendritic segments of the SOD1^{G93A}-like MN that were 60% of the WT terminal segments, as observed in real experiments (see results). The WT MN was designed from geometrical data of a real WT MN (MN1 in Tables 2 and 3). It was composed of a cell body (11 μm in diameter),

15 dendrites and an axon (length 200 μm ; diameter 1 μm). The diameter of the WT cell body was calculated to fit the cell body surface of the real MN (1568.6 μm^2 , see Table 2). The diameter of each dendritic segment was identical to the real WT MN. The Axon was made of 20 compartments. The dendrites were made of a variable number of compartments depending on their length and diameter, respecting the rule diameter/length = 1/10. The axon was made of an initial segment (length 35 μm) and an axon (length 165 μm). The properties of each compartment could be defined independently.

Passive properties of all compartments

In each compartment, the capacitance c_m (μF) was calculated in accordance with the equation:

$$c_m = C_m \times \text{area}$$

(*area* is the membrane surface of the compartment in cm^2 , and C_m is the specific membrane capacitance, set to $1 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$).

In addition, a passive leakage current was simulated in each compartment by the equation:

$$I_{\text{leak}} = (E_{\text{leak}} - E) \times G_{\text{leak}}$$

(E_{leak} and G_{leak} are the equilibrium potential and the leak conductance, respectively. In the present simulations, $E_{\text{leak}} = -73 \text{ mV}$, and $G_{\text{leak}} = 1/R_m$, with R_m , the specific membrane resistance was set to $18500 \Omega \cdot \text{cm}^2$, in order to get an input resistance of 120 M Ω in the WT MN. E is the membrane potential).

All computations were carried out assuming a specific axoplasmic resistance, R_a , of $100 \Omega \cdot \text{cm}$.

Active properties of axon and initial segment

In addition to passive properties, each of the axon compartments possessed active properties simulated by Hodgkin and Huxley (HH) Na and K channels. Their densities, adjusted in order to obtain a spike threshold of -47.3 mV for the WT MN, were respectively:

$$gNa_{\text{hh}}\text{Max} = 0.80 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ and } gK_{\text{hh}}\text{Max} = 0.12 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ in the initial segment}$$

$$gNa_{\text{hh}}\text{Max} = 0.12 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ and } gK_{\text{hh}}\text{Max} = 0.036 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ in the axon. The formalism of HH channels were described by standard HH Na and K channels kinetic equations:}$$

$$\text{For Na channels: } gNa_{\text{hh}} = gNa_{\text{hh}}\text{Max} \times m \times m \times m \times h$$

$$\begin{aligned} \text{Activation: } m' &= \alpha_m \times (1-m) - \beta_m \times m \\ \alpha_m &= A_{\alpha m} \times (k_{\alpha m} \times (E - d_{\alpha m})) / (1 - \exp(-k \times (E - d))); \\ A_{\alpha m} &= 1(\text{ms}^{-1}); k_{\alpha m} = 0.1(\text{mV}^{-1}); d_{\alpha m} = -40(\text{mV}) \\ \beta_m &= A_{\beta m} \times \exp(k_{\beta m} \times (E - d_{\beta m})); A_{\beta m} = 4(\text{ms}^{-1}); \\ k_{\beta m} &= -0.055556(\text{mV}^{-1}); d_{\beta m} = -65(\text{mV}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inactivation: } h' &= \alpha_h \times (1-h) - \beta_h \times h \\ \alpha_h &= A_{\alpha h} \times \exp(k_{\alpha h} \times (E-d_{\alpha h})); A_{\alpha h} = 0.07(\text{ms}^{-1}); \\ k_{\alpha h} &= -0.05(\text{mV}^{-1}); d_{\alpha h} = -65(\text{mV}) \\ \beta_h &= A_{\beta h} / (1 + \exp(k_{\beta h} \times (E-d_{\beta h}))); A_{\beta h} = 1(\text{ms}^{-1}); \\ k_{\beta h} &= -0.1(\text{mV}^{-1}); d_{\beta h} = -35(\text{mV}) \end{aligned}$$

For K channels: $gK_{hh} = gK_{hh} \text{Max} \times n \times n \times n \times n$

$$\begin{aligned} \text{Activation: } n' &= \alpha_n \times (1-n) - \beta_n \times n \\ \alpha_n &= A_{\alpha n} \times (k \times (E-d_{\alpha n})) / (1 - \exp(-k_{\alpha n} \times (E-d_{\alpha n}))); \\ A_{\alpha n} &= 0.1(\text{ms}^{-1}); k_{\alpha n} = 0.1(\text{mV}^{-1}); d_{\alpha n} = -55(\text{mV}) \\ \beta_n &= A_{\beta n} \times \exp(k \times (E-d_{\beta n})); A_{\beta n} = 0.125(\text{ms}^{-1}); \\ k_{\beta n} &= -0.0125(\text{mV}^{-1}); d_{\beta n} = -65(\text{mV}) \end{aligned}$$

Adaptation of the firing frequency by Ca-dependent K channel in the soma

In order to mimic the adaptation of the firing frequency observed in real WT MNs, Ca-dependent K channels (K_{Ca}), L-type calcium channels and intracellular calcium dynamics were added in the soma.

The calcium dynamics was used to set the decay of the intracellular concentration of calcium based on a calcium pump (for more details see (Destexhe et al., 1993)) and first-order decay buffering:

$$dCa_i/dt = (Ca_{inf} - Ca_i)/\tau_{ur}$$

where Ca_{inf} is the equilibrium intracellular calcium value (usually in the range of 200–300 nM) and τ_{ur} is the time constant of calcium removal. The dynamics of submembranal calcium is usually thought to be relatively fast, in the 1–10 ms range (Blaustein, 1988).

The densities of L-type calcium channels and K_{Ca} channels were $0.00006 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2}$ and $0.0065 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively.

The parameters used in the intracellular calcium dynamics were:

$$\begin{aligned} \text{depth} &= 0.5 \mu\text{m}, \tau_{ur} = 1.10^{10} \text{ ms}, Ca_{inf} = 0.0002 \text{ mM}, Kt = 0.00006 \text{ mM} \cdot \text{ms}^{-1}, Kd = 0.0001 \text{ mM}, \\ &Ca_i = 0.00024 \text{ mM and } Ca_o = 3 \text{ mM}. \end{aligned}$$

Statistical analysis

For statistical analysis, non-parametric Mann–Whitney U test, two-way ANOVA or Chi-square test for trend were used (GraphPad Prism 5 software, La Jolla, CA, USA). Results are expressed as mean \pm SEM.

Table 1
Electrophysiological characteristics of WT and SOD1^{G93A} MNs.

n	WT	SOD1 ^{G93A}	p	Sign
	32	10		
<i>Motoneuron properties</i>				
c_m (pF)	170.4 \pm 7	145.9 \pm 12.2	0.035	*
R_{in} (M Ω)	119.8 \pm 5.3	154.9 \pm 10.7	0.012	*
τ (ms)	19.9 \pm 0.6	22.7 \pm 1.3	0.136	ns
V_{rest} (mV)	−65.7 \pm 1.4	−63.7 \pm 2.9	0.524	ns
Rheobase (pA)	149.1 \pm 12.6	96 \pm 23.1	0.024	*
<i>Spike characteristics</i>				
Threshold (mV)	−47.5 \pm 0.8	−48.7 \pm 1.4	0.304	ns
Time to peak (ms)	2.15 \pm 0.1	2.57 \pm 0.2	0.048	*
Half-width (ms)	2.65 \pm 0.2	3.05 \pm 0.3	0.189	ns
Amplitude (mV)	51.1 \pm 2	44.5 \pm 3.8	0.161	ns
AHP amplitude (mV)	8.1 \pm 0.7	7.1 \pm 1.1	0.469	ns
AHP duration (ms)	31.8 \pm 2.9	33.5 \pm 4.2	0.712	ns
<i>f–I relation</i>				
Slope (Hz \cdot pA ^{−1})	0.11 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.232	ns
I_{max} (pA)	299.1 \pm 14	219 \pm 35.2	0.027	*
f_{max} (Hz)	20.9 \pm 0.7	20.9 \pm 1.6	0.836	ns

Abbreviations: n = number of MNs, c_m = membrane capacitance, R_{in} = input resistance, τ = time constant, V_{rest} = resting membrane potential, Rheobase = minimum intensity of injected current necessary to evoke a spike, AHP = after-hyperpolarization, I_{max} = maximum intensity of injected current, f_{max} = maximum firing frequency. Sign indicates the level of significance in Mann Whitney test: ns = not significant; * $p < 0.05$.

Results

MN properties: SOD1^{G93A} MNs display higher excitability than WT MNs

The present study has been carried on SOD1^{G93A} embryos and on WT embryos from corresponding littermates. For each embryo, PCR analysis confirmed the presence or absence of the human SOD1^{G93A} transgene. Using whole cell patch-clamp recordings, WT and SOD1^{G93A} MNs properties were analyzed (Table 1). Some of the MNs used for this electrophysiological study were filled with neurobiotin and used for further anatomical analysis. We confirmed their motoneuronal identity using an Islet-1/2 antibody (Fig. 1). The membrane capacitance of WT and SOD1^{G93A} MNs (170.4 \pm 7 pF and 145.9 \pm 12.2 pF respectively) were significantly different (Mann Whitney, $p < 0.05$), whereas their resting membrane potentials (V_{rest}) (−65.7 \pm 1.4 mV and −63.7 \pm 2.9 mV respectively) were not significantly different (Mann Whitney). In order to calculate the input resistance (R_{in}) of MNs, identical sets of current pulses were applied to WT and SOD1^{G93A} MNs in current-clamp mode. Current pulses ranged from −300 pA to +420 pA with 30 pA steps (Fig. 2). A representative experiment is presented in Fig. 2A₁ with a set of currents ranging from −180 to +90 pA. In each experiment, R_{in} was calculated as the slope of the linear region of the voltage-current (V/I) curve. Over all experiments, R_{in} was significantly higher (Mann Whitney, $p < 0.05$) in SOD1^{G93A} MNs (154.9 \pm 10.7 M Ω) than in WT MNs (119.8 \pm 5.3 M Ω) (Table 1). The averaged V/I curve calculated over all experiments (Fig. 2A₂) for SOD1^{G93A} and

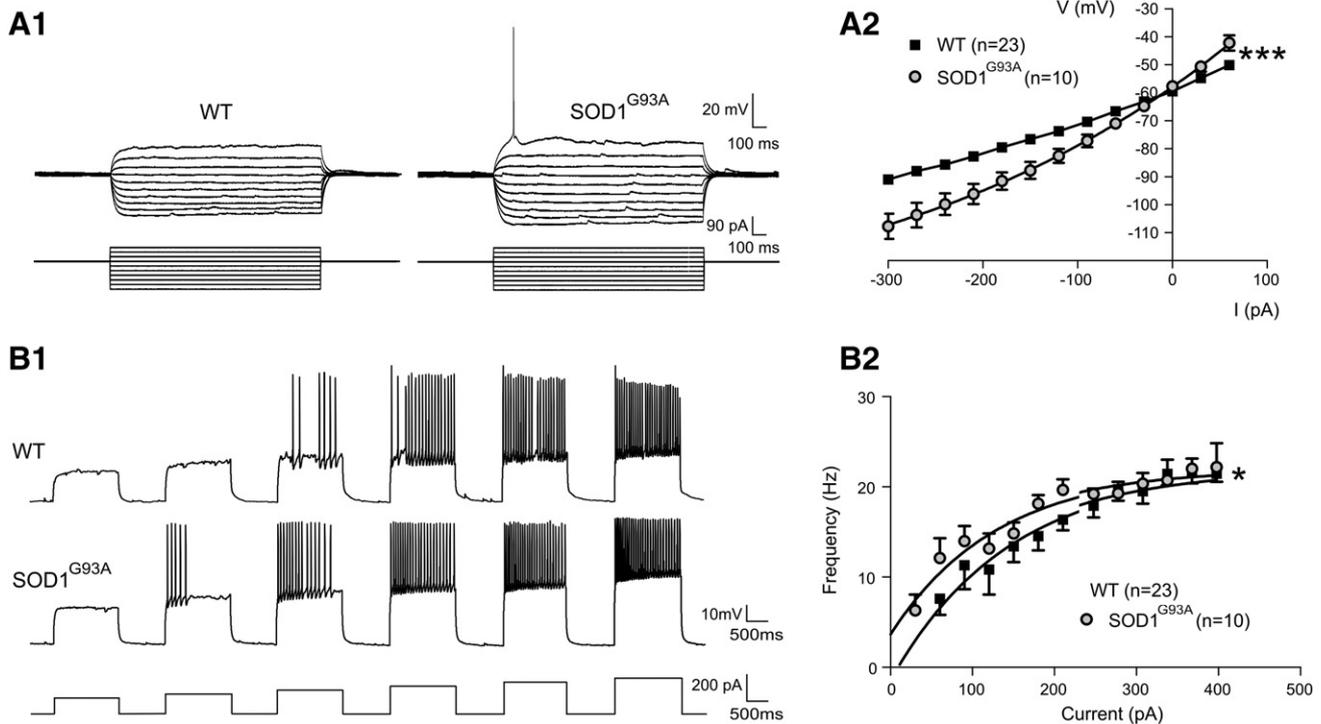


Fig. 2. Hyperexcitability in SOD1^{G93A} MNs at E17.5. (A₁) Membrane potential responses to similar current steps in WT and SOD1^{G93A} MN. Note that, in response to the largest positive current pulse, the SOD1^{G93A} MN fires an action potential (AP) whereas the WT MN remains silent. (A₂) Mean voltage–current (*V/I*) relationship in WT (black squares) and SOD1^{G93A} MNs (gray circles) revealing the increased input resistance in SOD1^{G93A} MNs (steeper slope). (B₁) Characteristic membrane response of a WT MN (top trace) and a SOD1^{G93A} MN (middle trace) to current injection of increasing steps (bottom trace). Note the SOD1^{G93A} MN fires APs in response to the second current step, unlike the WT MN. (B₂) Average AP frequency, plotted against current intensity, revealing the hyperexcitability of SOD1^{G93A} MNs (same symbols as in A₂). **p* < 0.05, ****p* < 0.001, two-way ANOVA.

WT MNs were significantly different (two-way ANOVA, *p* < 0.001). Note that for the larger illustrated current step, the recorded SOD1^{G93A} MN produced an action potential (AP) whereas for the same current intensity, no AP occurred in the recorded WT MN (Fig. 2A₁).

This increased excitability of SOD1^{G93A} MNs was further confirmed by comparing the frequency/current (*F/I*) curves obtained from WT and SOD1^{G93A} MNs (Fig. 2B₂). Current pulses ranging from 30 to 420 pA were injected in MNs. Fig. 2B₁ illustrates representative examples, in which spike discharge occurred in SOD1^{G93A} MNs for smaller current intensities compared to WT MNs (see the second pulse in Fig. 2B₁). However, for larger current values, the discharge frequency of WT and SOD1^{G93A} MNs were comparable (see last current pulse in Fig. 2B₁). The larger excitability of SOD1^{G93A} MNs compared to WT MNs for small currents, and their common maximal frequency (plateau) was confirmed in averaged *F/I* curves (Fig. 2B₂), which were significantly different (two-way ANOVA, *p* < 0.05). The mean rheobase, calculated from each *F/I* curve, was lower in SOD1^{G93A} MNs (96 ± 23.1 pA) than in WT MNs (149.1 ± 12.6 pA) (Table 1).

In addition to the hyperexcitability of SOD1^{G93A} MNs, the time to peak of APs was significantly longer (Mann Whitney, *p* < 0.05) in SOD1^{G93A} MNs (2.57 ± 0.2 ms) compared to WT MNs (2.15 ± 0.1 ms) (Table 1). By contrast, AP threshold of WT and SOD1^{G93A} MNs (−47.5 ± 0.8 mV and −48.7 ± 1.4 mV, respectively) were not significantly different (Mann Whitney). Similarly, no significant difference (Mann Whitney) between WT and SOD1^{G93A} MNs was found in AP half-width (2.65 ± 0.2 ms and 3.05 ± 0.3 ms, respectively), AP amplitude (51.1 ± 2 mV and 44.5 ± 3.8 mV, respectively), AHP amplitude (8.1 ± 0.7 mV and 7.1 ± 1.1 mV, respectively) and AHP duration (31.8 ± 2.9 ms and 33.5 ± 4.2 ms, respectively) (Table 1).

3D reconstructions: SOD1^{G93A} MNs present a less extended arborization

In this analysis, we have reconstructed a total of 12 MNs at E17.5, including 6 WT MNs and 6 SOD1^{G93A} MNs. All MNs were confirmed as

being Islet-1/2 positive, a marker of developing MNs (Ericson et al., 1992) (Fig. 1). Using NeuroLucida software, we reconstructed the full arbor and cell body morphology of each MN from stacks of confocal optical sections (Figs. 3A–B). The analysis of soma shapes, performed using NeuroLucida explorer (Table 2), did not reveal any significant difference (Mann Whitney) between WT and SOD1^{G93A} MNs, including soma perimeters (maximal projection) of WT MNs (94.4 ± 6.1 μm) and SOD1^{G93A} MNs (89.2 ± 5.2 μm) and soma surface of WT MNs (1252 ± 113.9 μm²) and SOD1^{G93A} MNs (1225 ± 82.3 μm²).

By contrast, dendritic arbors of WT and SOD1^{G93A} MNs presented striking differences (Table 3). Although topologic parameters were identical in WT and SOD1^{G93A} MNs, their morphometric parameters were different. Concerning the topology, we found 11.67 ± 0.88 and 11.67 ± 1.20 primary dendrites, 48.17 ± 5.79 and 35.17 ± 5.78 nodes and 61.33 ± 6.19 and 47.67 ± 7.14 terminal segments (*Trms*) in WT and SOD1^{G93A} MNs, respectively (Table 3). On the opposite, the total length of intermediate segments per branch was significantly longer in WT MNs (147.4 ± 17.1 μm) than in SOD1^{G93A} MNs (102.1 ± 15.6 μm) (Mann Whitney, *p* < 0.05), as was the total length of terminal segments (244.4 ± 26.5 μm and 156.4 ± 20.3 μm, respectively; Mann Whitney, *p* < 0.01), leading to a ~60% reduction of the terminal dendritic length. Consequently, the total dendritic length (Σ_{Len}) was significantly increased in WT MNs (4194 ± 645 μm) compared to SOD1^{G93A} MNs (2641 ± 313 μm) (Mann Whitney, *p* < 0.05) (Table 3). This morphometric difference is illustrated in Fig. 3, in which reconstructions of a WT MN (Fig. 3B₁) and a SOD1^{G93A} MN (Fig. 3B₂) are presented. In each respective dendrogram (Figs. 3C₁ and C₂), all terminal segments are colored in blue and intermediate segments in black. In order to further detail the morphometric differences between WT and SOD1^{G93A} MNs, we have analyzed individual dendritic trees (Fig. 4). We found that the frequency distributions of the number of nodes (Fig. 4A) and terminals (Fig. 4B) were not significantly different in WT and SOD1^{G93A} MNs (Chi-square test for trend). By contrast, the frequency distributions of segment length were significantly

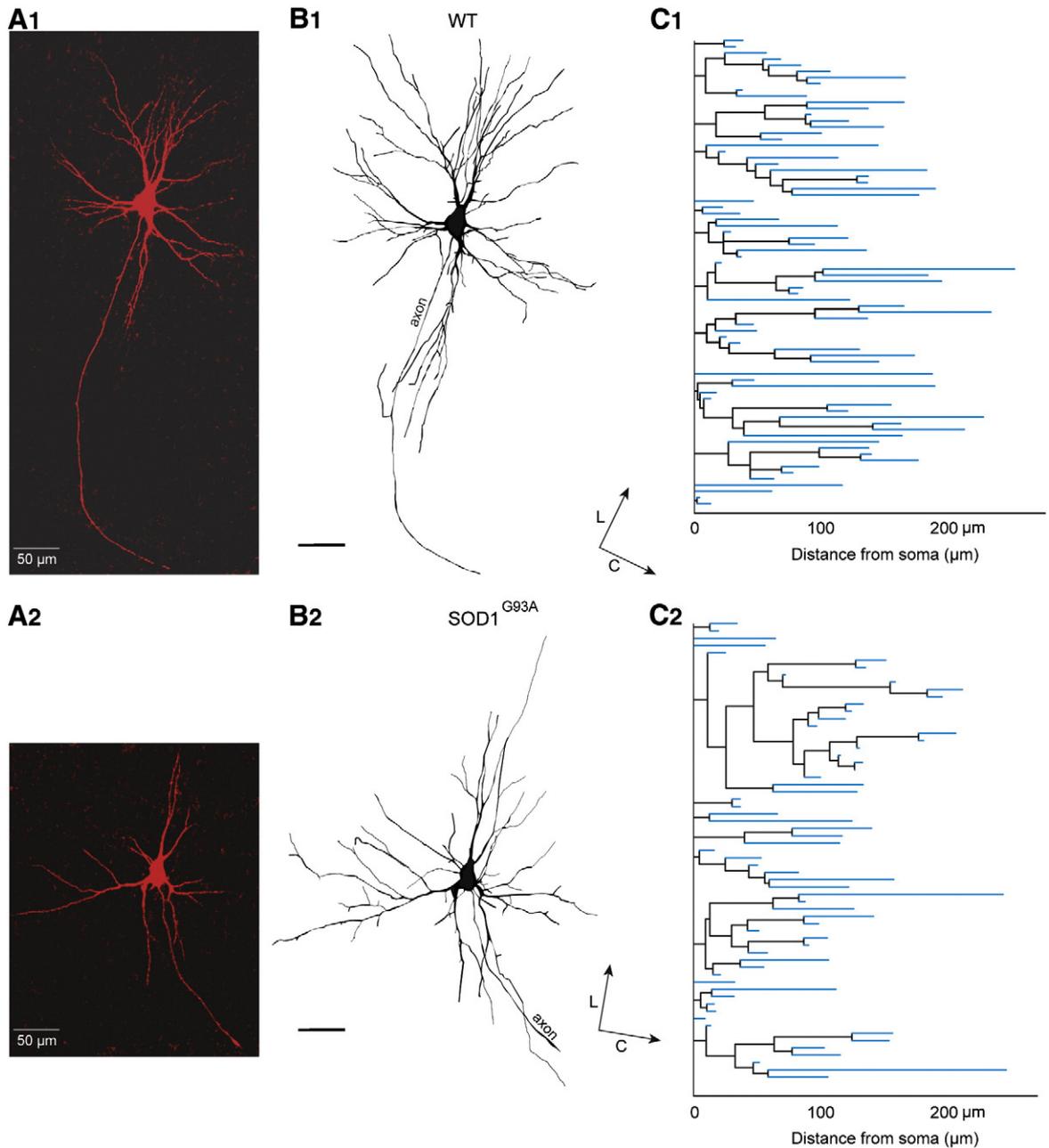


Fig. 3. Embryonic morphological abnormalities in E17.5 $SOD1^{G93A}$ MNs. (A₁–A₂) Representative WT (MN1 in Tables 1 and 2) and $SOD1^{G93A}$ (MN3 in Tables 1 and 2) MNs filled with neurobiotin. Illustrations correspond to projected images of 54 and 61 optical sections stack (0.6 μm in Z) for WT and $SOD1^{G93A}$ MN, respectively ($\times 20$ magnification). (B₁–B₂) 3D reconstructions of complete dendritic trees of the WT and $SOD1^{G93A}$ MNs illustrated in A. Reconstructions were made from $\times 60$ high magnification confocal acquisitions (0.2 μm in Z). (C₁–C₂) Two-dimensional representations of whole dendritic arborization (dendrograms) obtained from the 3D reconstructions illustrated in B₁–B₂. Intermediate segments are shown in black and terminal segments in blue. L = lateral, C = caudal.

different in WT and $SOD1^{G93A}$ MNs: terminal segments (Fig. 4C) (Chi-square test for trend, $p < 0.01$) and intermediate segments (Fig. 4D) (Chi-square test for trend, $p < 0.05$). Consequently, short dendritic trees were less frequent in WT than in $SOD1^{G93A}$ MNs (Fig. 4E) (Chi-square test for trend, $p < 0.05$).

Because the role of dendritic trees is to collect and transmit synaptic inputs to the soma, the diameter of dendrite can be considered as a key parameter determining the amount of signal electrotonically conveyed to the soma. Here, we found that E17.5 MNs exhibited large dendritic diameters that were not significantly different in WT and $SOD1^{G93A}$ MNs ($1.29 \pm 0.03 \mu\text{m}$ and 1.23 ± 0.03 , respectively) (Mann Whitney) (Table 3). We also analyzed the distribution of diameters vs centrifugal order (Fig. 4F) and found no difference between WT and $SOD1^{G93A}$ MNs (Chi-square test for trend). Moreover, although dendritic diameter

decreased with centrifugal order as classically observed in spinal MNs (Li et al., 2005), it remained constant and larger than $0.8 \mu\text{m}$ from order 5 to last order (9) (Fig. 4F).

Simulations: smaller terminal segments explain the increased excitability in $SOD1^{G93A}$ MNs

In order to evaluate the impact of terminal dendritic length on intrinsic excitability (i.e. spike production during somatic current injection), two MNs were simulated based on topologic and morphometric parameters of a real representative WT MN (MN1 in Tables 2 and 3). The simulated WT MN (Fig. 5A₁) and $SOD1^{G93A}$ -like MN (Fig. 5A₂) were identical concerning both their ionic channels equipment (see Methods) and their topologic and morphometric parameters, except

Table 2
Cell body parameters of WT and SOD1^{G93A} MNs.

	P_{soma} (μm)	A_{trans} (μm^2)	V_{soma} (μm^3)	A_{soma} (μm^2)
WT				
MN1	99.4	524.8	6875.8	1568.6
MN 2	113.3	648.6	6760.7	1539.5
MN 3	75.8	276.1	3997.9	1298.3
MN4	106.5	528.4	4660.5	1143
MN5	93.1	380.3	4414.6	1132.8
MN6	78.6	271.9	2643.8	829.9
Mean WT	94.4	438.4	4892	1252
SEM	6.1	62.5	672.4	113.9
SOD1^{G93A}				
MN1	88.5	410.4	5890.2	1510.8
MN2	85	356.8	3907.6	1093.3
MN3	88.4	321.5	3739.8	1100.3
MN4	110.1	449.3	4215.4	1187.9
MN5	70.5	285	3308.2	1019.9
MN6	92.7	356	4934.2	1438
Mean SOD1^{G93A}	89.2	363.2	4333	1225
SEM	5.2	24.2	382.2	82.3
p	0.485	0.589	0.485	0.589
Sign	ns	ns	ns	ns

Abbreviations: P_{soma} = soma perimeter measured in transversal plane, A_{trans} = soma area measured in transversal plane, V_{soma} = soma volume, A_{soma} = soma surface. Sign indicates the level of significance in Mann Whitney test: ns = not significant.

for the length of terminal dendritic segments that were decreased to 60% in the SOD1^{G93A}-like MN (see methods and Figs. 5A₁,A₂). The reduction to 60% of the terminal segments was applied according to the average decrease in terminal segment length of SOD1^{G93A} MNs compared to WT MNs. On these two simulated MNs, we have applied the same protocols as used in real WT and SOD1^{G93A} MNs (see Fig. 2). Interestingly, reducing the length of terminal segments produced series of changes in passive properties of MNs: R_{in} increased from 120 M Ω to 146 M Ω ; τ increased from 18.45 ms to 18.53 ms, and c_{m} dropped from 150 pF to 120 pF (Table 4). These changes were very similar to those observed between real WT and SOD1^{G93A} MNs (see Table 1). The increased R_{in} in simulated SOD1^{G93A}-like MN is illustrated in Fig. 5B₂. WT MN and SOD1^{G93A}-like MN (Fig. 5B₁) received the same sequence of increasing current steps (Fig. 5B₁, lower traces). The

Table 3
Morphological parameters of WT and SOD1^{G93A} MNs.

	Number of primary dendrites	Nodes	Trms	BrOrd _{max}	BrOrd _{freq}	Σ_{Len} (μm)	Σ_{area} (μm^2)	Mean _{diameter} (μm)	Asymmetry
WT									
MN1	15	58	76	8	3	5119	16052	1.32	0.605
MN2	10	67	78	7	6	6974	20506	1.29	0.661
MN3	13	34	48	6	3	3197	9335	1.22	0.693
MN4	12	57	71	9	4	3759	12754	1.26	0.6
MN5	9	38	49	7	4	3310	11930	1.42	0.644
MN6	11	35	46	7	3	2806	8403	1.22	0.686
Mean WT	11.67	48.17	61.33	7.33	3.83	4194	13163	1.29	0.648
SEM	0.88	5.79	6.19	0.42	0.48	645	1837	0.031	0.016
SOD1^{G93A}									
MN1	11	34	45	8	3	2403	7487	1.23	0.576
MN2	15	47	65	11	5	3100	8713	1.1	0.648
MN3	13	50	63	9	6	3304	10513	1.22	0.606
MN4	14	42	57	8	4	2792	7734	1.2	0.652
MN5	7	13	20	5	4	1210	3890	1.33	0.713
MN6	10	25	36	6	4	3039	9706	1.29	0.593
Mean SOD1^{G93A}	11.67	35.17	47.67	7.83	4.33	2641	8007	1.23	0.631
SEM	1.20	5.78	7.14	0.87	0.42	313	948	0.03	0.02
p	0.936	0.199	0.180	0.684	0.351	0.026	0.041	0.332	0.589
Sign	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns

Abbreviations: Nodes = number of branching points per MN, Trms = number of terminal segments for each MN, BrOrd_{max} = maximum branch order for each MN, BrOrd_{freq} = most frequent order for each MN, Σ_{Len} = total dendritic length for each MN, Σ_{area} = total area for each MN, Mean_{diameter} = average diameter of all dendritic branches in each MN, Asymmetry = degree of asymmetry. Sign indicates the level of significance in Mann Whitney test: ns = not significant; * p < 0.05.

voltage step responses of the simulated SOD1^{G93A}-like MN were larger than that of the WT MN, reflecting a larger R_{in} (measured as the slope of the V/I curve) in SOD1^{G93A}-like MNs (Fig. 5B₂). Moreover, differences in active properties of simulated WT and SOD1^{G93A}-like MNs were reminiscent of changes observed in real corresponding MNs. The SOD1^{G93A}-like MN fired for a current step of 120 pA while the WT MN stayed silent for the same current step (Fig. 5C₁). The F/I curves built from the two simulated MNs presented the same differences as observed in real WT and SOD1^{G93A} MNs (Fig. 5C₂). Notably, the SOD1^{G93A}-like MN discharges at higher frequencies than the WT MN for current intensities under 250 pA. In conclusion, physiological changes observed in real SOD1^{G93A} MNs were likely the result of the reduced length of terminal segments.

Discussion

Amyotrophic lateral sclerosis in human patients and murine model is a paralytic disease affecting individuals during late adulthood. ALS is accompanied by degeneration of motor neurons leading to death 3–5 years after symptoms onset as described in an epidemiologic study (Cudkovic et al., 1997). Because 90% of ALS cases are sporadic, identifying earliest symptoms would be very valuable for future potentially curative treatments. Several studies support the hypothesis of an early dysfunction of neural networks in the ALS cases. Our anatomical data from embryonic SOD1^{G93A} spinal MNs provide, for the first time, strong evidence that spinal MNs express abnormal morphometric parameters during their construction. Interestingly, we demonstrate, using computer simulation that these morphometric changes mainly account for the hyperexcitability observed in SOD1^{G93A} MNs.

Early hyperexcitability related to morphological changes

Most studies have reported a hyperexcitability in neuronal networks of SOD ALS mouse models. Using primary cell cultures (2–4 weeks) of embryonic E12–E14 spinal MNs, authors have found that SOD1^{G93A} MNs are hyperexcitable (Kuo et al., 2004). A hyperexcitability has also been reported when examining the electrophysiological characteristics of SOD1^{G93A} hypoglossal MNs recorded from post-natal P4–P10 slices, i.e., 2–3 months before MN degeneration (van Zundert et al., 2008). In

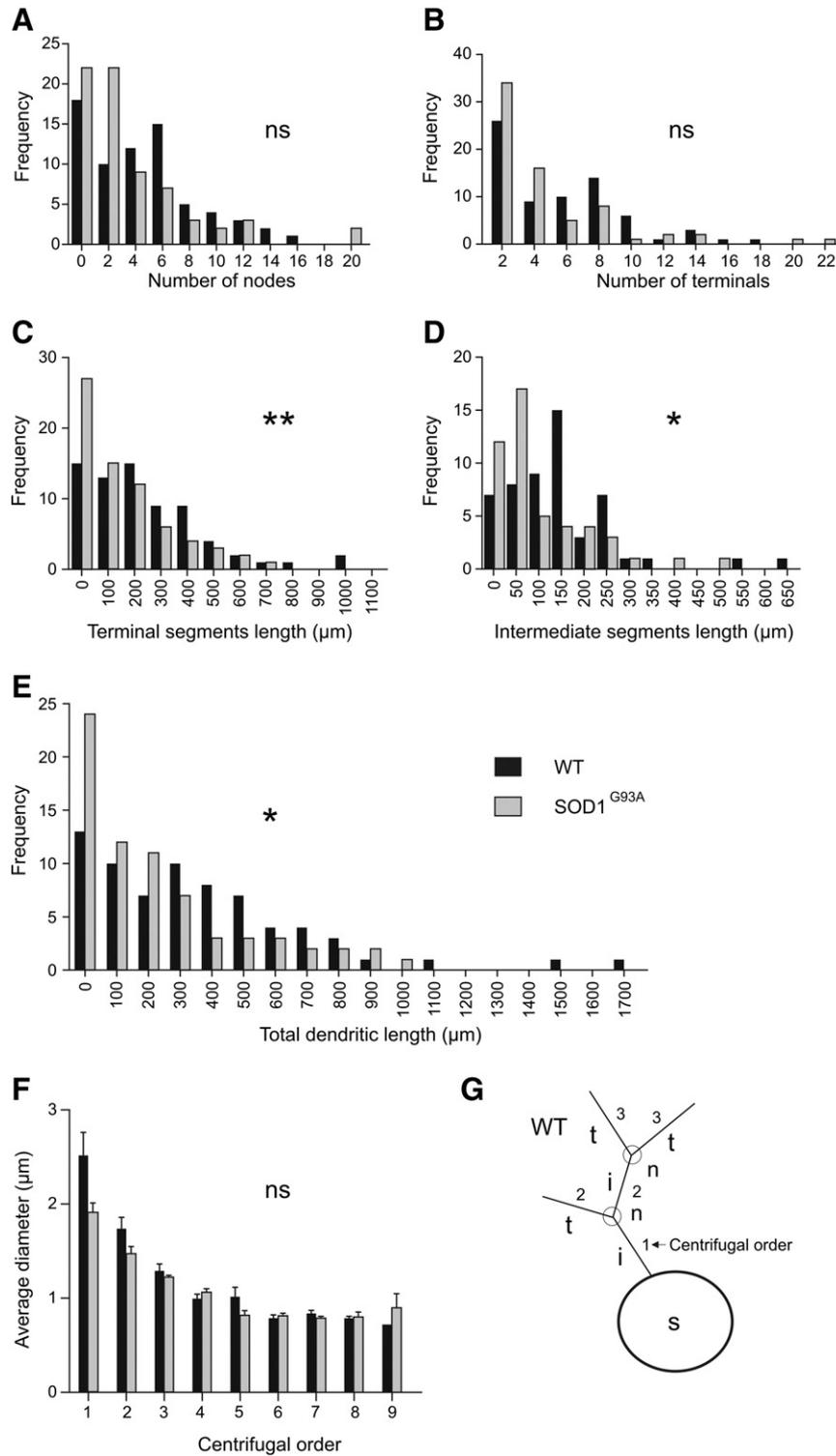


Fig. 4. Topologic and morphologic analysis of individual dendritic trees. Frequency distributions of number of nodes (A), number of terminals (B), terminal segments length (C), intermediate segments length (D) and total dendritic length (E), and distribution of average segment diameter vs centrifugal order (F), achieved from dendrograms of WT (black bars) and SOD1^{G93A} (gray bars) MNs. (G) Schematic representation of a dendritic tree illustrating the nomenclature of dendritic elements (n = nodes, t = terminal segment, i = intermediate segment). Numbers indicate the centrifugal order. ns = not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Chi-square test for trend.

the present study, we report, for the first time, that such hyperexcitability is present in SOD1^{G93A} MNs as early as during embryonic life.

The hyperexcitability described in cultured embryonic E12–E14 spinal SOD1^{G93A} MNs (Kuo et al., 2004) is ascribed to an increased persistent Na⁺ current (Kuo et al., 2005). A persistent Na⁺ current increase is also reported in hyperexcitable postnatal SOD1^{G93A}

hypoglossal MNs (van Zundert et al., 2008) and in hyperexcitable cultured cortical neurons (11–12 days of culture) (Pieri et al., 2009). Changes in Na⁺ channel density may also contribute to hyperexcitability in developing SOD1^{G93A} MNs. Accordingly, we have measured the time to peak that reflects total Na⁺ channels density in individual spinal MNs and we did not find faster time to peak in SOD1^{G93A} MNs that could explain their hyperexcitability. On the

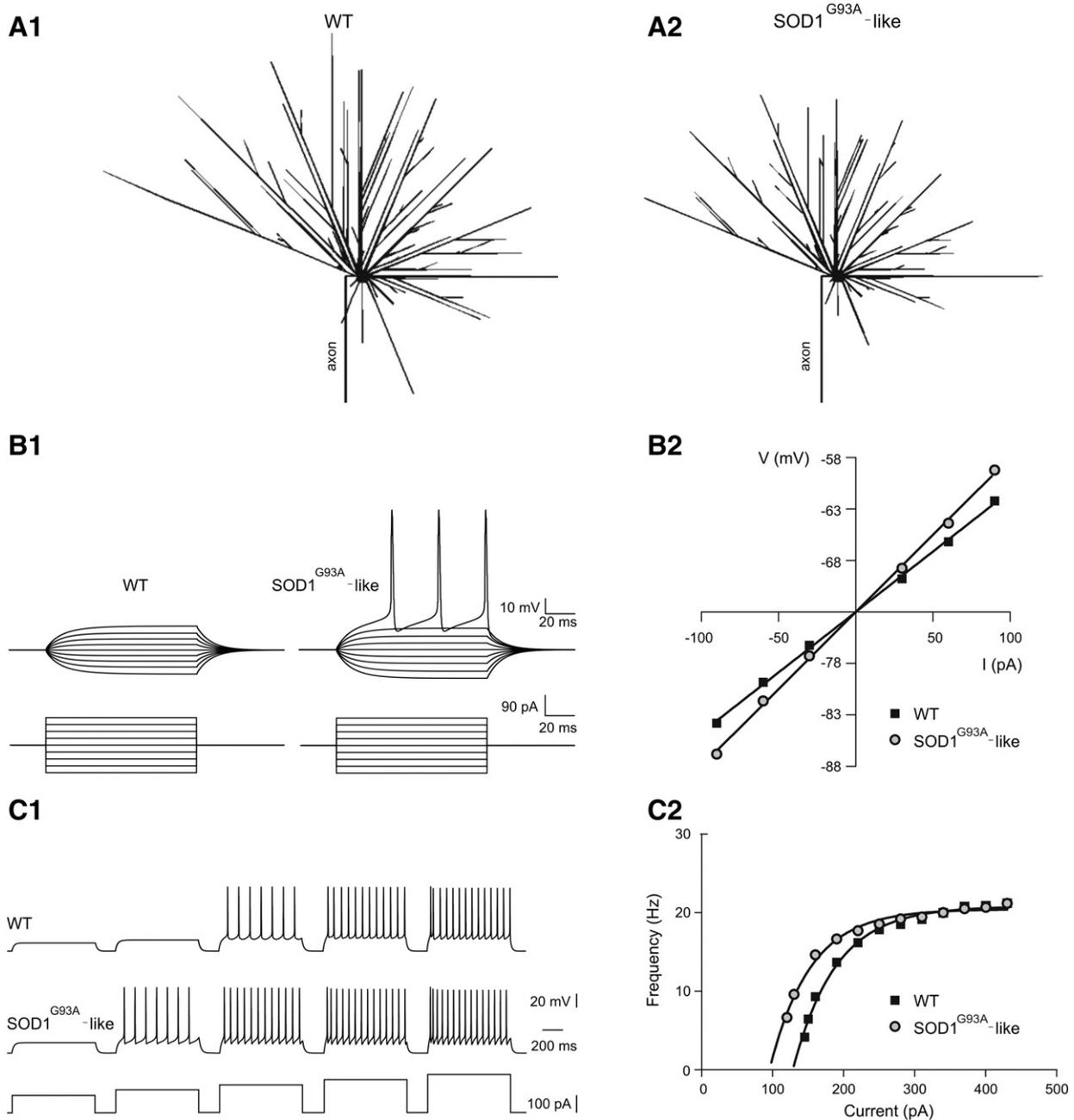


Fig. 5. Computer simulation of WT and SOD1^{G93A}-like MNs. (A₁-A₂) Geometry of the WT (A₁) and the SOD1^{G93A}-like (A₂) MN used in the simulations. The WT MN geometry was built from MN1 in Tables 2 and 3. The SOD1^{G93A}-like MN was built from the WT MN by shortening its terminal branches by 60%. (B₁) Membrane potential responses to similar current steps in WT and SOD1^{G93A}-like MN. Note that, in response to the largest positive current pulse, the SOD1^{G93A}-like MN fires APs whereas the WT MN remains silent. (B₂) Mean voltage-current (V/I) relationship in WT (black squares) and SOD1^{G93A}-like MNs (gray circles) revealing the increased input resistance in SOD1^{G93A}-like MNs (steeper slope). (C₁) Characteristic membrane response of a WT MN (top trace) and a SOD1^{G93A}-like MN (middle trace) to current injection of increasing steps (bottom trace). Note the SOD1^{G93A}-like MN fires APs in response to the second current step, unlike the WT MN. (C₂) Average AP frequency, plotted against current intensity, revealing the hyperexcitability of SOD1^{G93A}-like MNs (same symbols as in B₂).

Table 4

Electrophysiological characteristics of simulated WT and SOD1^{G93A} MNs.

	WT	SOD1 ^{G93A} -like
c_m (pF)	153.7	126.9
R_{in} (M Ω)	120	146.6
τ (ms)	18.45	18.53
Rheobase (pA)	155.1	123.6
V_{rest} (mV)	-73	-73
Threshold (mV)	-47.3	-47.8

Abbreviations: c_m = membrane capacitance, R_{in} = input resistance, τ = time constant, V_{rest} = resting membrane potential, Rheobase = minimum intensity of injected current necessary to evoke a spike.

contrary, a significant lengthening of this parameter was detected in SOD1^{G93A} MNs.

In our study, we show that the reduced terminal dendrite morphology can account for the hyperexcitability of embryonic SOD1^{G93A} spinal MNs. Of course, we cannot exclude a participation of the persistent Na⁺ current in the change in excitability found in SOD1^{G93A} MNs, but our study demonstrates that its contribution would be minor versus the alteration of the morphology. This finding seems to be in contradiction with the key role of persistent Na⁺ current found in other ALS models. This contradiction is only apparent and relates on the fact that embryonic spinal MNs are more electrically compact than postnatal MNs (i.e., better charge transfer between

distal segment and cell body). In fact, E17.5 MNs display large diameter dendrites: the average diameter of all dendritic branches is $1.29 \pm 0.03 \mu\text{m}$ in WT MNs and $1.23 \pm 0.03 \mu\text{m}$ in SOD1^{G93A} MNs. These diameters are larger than the one reported for P3 lumbar mouse spinal MNs ($0.46 \pm 0.13 \mu\text{m}$) (Li et al., 2005). Moreover, E17.5 MNs dendritic diameters remain remarkably large ($>0.8 \mu\text{m}$) up to branch tips, whereas the diameter of P3 spinal MNs is smaller ($<0.5 \mu\text{m}$ above branch order 2) and undergoes a constant reduction along branch order, reaching values $<0.2 \mu\text{m}$ (Li et al., 2005).

In comparison, a computer simulation analysis using realistic P10 WT and SOD1 MNs demonstrated that the increased dendritic arbor length only accounted for 10% of the decrease in R_{in} (Elbasiouny et al., 2010) whereas R_{in} of real MNs decreased to 31% (Bories et al., 2007) at the same age. These results highlight the key role of dendrite diameter that is ~ 4 times smaller at \sim P10 (Li et al., 2005) compared to E17.5.

Hence, because SOD1^{G93A} MNs display shorter terminal length and because diameters are large in embryonic MNs, we made the hypothesis that length reduction is the main mechanism underlying the SOD1^{G93A} MNs hyperexcitability. Our computer simulations confirmed this hypothesis: shortening dendritic terminal segments that were highly significantly reduced in SOD1^{G93A} MNs, accounted for $\sim 80\%$ of the R_{in} increase.

Putative causes of the morphological changes

What could explain the changes in morphology that we observed in SOD1^{G93A} MNs? As most developing neuronal networks, ventral spinal circuits underlie an activity-dependent remodeling, which is a necessary partner with genetic programs (Spitzer, 2006). Developmental changes such as maturation of neuronal morphology, cell phenotype, synaptic connectivity, receptors, as well as membrane properties can occur within a limited time-window also called “critical period”. In the spinal cord, we have shown that spontaneous activity takes place between E11.5 and E15.5 (Branchereau et al., 2002; Yvert et al., 2004). Meanwhile, the synaptic activity develops in spinal ventral networks (Scain et al., 2010). An elegant study has demonstrated that an increase in the density of presynaptic release sites induces a reduction in the extent of the dendritic arbor of postsynaptic neurons (Tripodi et al., 2008). Hence, we may hypothesize that the reduction of the dendritic terminal segments observed in the present study, indicate exacerbated synaptic activity in SOD1^{G93A} spinal networks. Such compensatory hypothesis remains to be verified in further experiments. Interestingly, an enhancement of spontaneous excitatory AMPA/NMDA and inhibitory GABA synaptic activity has been reported in postnatal hypoglossal SOD1^{G93A} MNs which display a dendrite retraction (van Zundert et al., 2008). Another possibility would be that, due to metabolic dysfunction, SOD1^{G93A} MNs develop with abnormal dendrite morphology leading to compensatory mechanisms later in development.

Morphological changes during the time course of development

If compensatory mechanisms occurring during embryonic development explain the reduced dendritic morphology of E17.5 SOD1^{G93A} MNs, how will these changes evolve during postnatal and later pre-symptomatic stages? Morphological differences have been reported between WT and SOD1^{G85R} lumbar spinal MNs at postnatal stages. Surprisingly, a proliferation of dendritic branches, starting at $100 \mu\text{m}$ from the soma, was found in P8–P9 lumbar spinal MNs (Amendola and Durand, 2008). A recent study also demonstrated that this pathological ramification was preceded, at P3–P4, by an excessive elongation (Filipchuk and Durand, 2012). Even though these postnatal data have been collected from a different ALS mouse model (SOD1^{G85R}) than the one we used, we may assume that the dendritic tree of lumbar SOD1^{G93A} MNs may switch from reduced during embryonic life to abnormally grown during postnatal stages.

This may be linked to compensatory mechanisms reacting to changes in spontaneous and/or synaptic activity or to the fact that embryonic ALS MNs exhibit a reduction of their dendritic arbor. Further experiments are needed to analyze the amount of spontaneous activity during early embryonic stages in SOD1^{G93A} spinal lumbar networks, the level of synaptic activity at E17.5 and at postnatal stages and, finally, verify the putative morphological changes occurring postnatally.

Conclusions

In the present study, using the transgenic mice overexpressing the G93A mutation of the human Cu/Zn superoxide dismutase gene (SOD1), we show that SOD1^{G93A} embryonic MNs (E17.5) already expressed abnormal morphometric and physiological parameters. Using realistic computer simulations we demonstrate, for the first time, that morphological changes occurring during the embryonic development of SOD1^{G93A} MNs account for the primary compensatory mechanisms. The physiological alterations are likely only secondary to morphological alterations at prenatal stages.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by ARSLA (Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique et autres maladies du motoneurone). We thank Raphaël Pineau and his team for animal housing facilities.

References

- Amendola, J., Durand, J., 2008. Morphological differences between wild-type and transgenic superoxide dismutase 1 lumbar motoneurons in postnatal mice. *J. Comp. Neurol.* 511, 329–341.
- Atkin, J.D., et al., 2006. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J. Biol. Chem.* 281, 30152–30165.
- Blaustein, M.P., 1988. Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci.* 11, 438–443.
- Boillee, S., et al., 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52, 39–59.
- Bories, C., et al., 2007. Early electrophysiological abnormalities in lumbar motoneurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 451–459.
- Branchereau, P., et al., 2000. Development of lumbar rhythmic networks: from embryonic to neonate locomotor-like patterns in the mouse. *Brain Res. Bull.* 53, 711–718.
- Branchereau, P., et al., 2002. Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J. Neurosci.* 22, 2598–2606.
- Brotherton, T.E., et al., 2012. Localization of a toxic form of superoxide dismutase 1 protein to pathologically affected tissues in familial ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5505–5510.
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806–819.
- Cudkowicz, M.E., et al., 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 41, 210–221.
- De Vos, K.J., et al., 2007. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2720–2728.
- Delpy, A., et al., 2008. NKCC1 cotransporter inactivation underlies embryonic development of chloride-mediated inhibition in mouse spinal motoneuron. *J. Physiol.* 586, 1059–1075.
- Deng, H.X., et al., 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.
- Destexhe, A., et al., 1993. Ionic mechanisms for intrinsic slow oscillations in thalamic relay neurons. *Biophys. J.* 65, 1538–1552.
- Elbasiouny, S.M., et al., 2010. Evidence from computer simulations for alterations in the membrane biophysical properties and dendritic processing of synaptic inputs in mutant superoxide dismutase-1 motoneurons. *J. Neurosci.* 30, 5544–5558.
- Ericson, J., et al., 1992. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256, 1555–1560.
- Filipchuk, A.A., Durand, J., 2012. Postnatal dendritic development in lumbar motoneurons in mutant superoxide dismutase 1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 209, 144–154.

- Gurney, M.E., et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Higgins, C.M., et al., 2003. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* 4, 16.
- Kabashi, E., et al., 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 40, 572–574.
- Kanning, K.C., et al., 2010. Motor neuron diversity in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 409–440.
- Kieran, D., et al., 2005. A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J. Cell Biol.* 169, 561–567.
- Kuo, J.J., et al., 2004. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.* 91, 571–575.
- Kuo, J.J., et al., 2005. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol.* 563, 843–854.
- Kwiatkowski Jr., T.J., et al., 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Li, Y., et al., 2005. Developmental changes in spinal motoneuron dendrites in neonatal mice. *J. Comp. Neurol.* 483, 304–317.
- Liu, H.N., et al., 2012. Targeting of monomer/misfolded SOD1 as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 32, 8791–8799.
- Magrane, J., et al., 2012. Mitochondrial dynamics and bioenergetic dysfunction is associated with synaptic alterations in mutant SOD1 motor neurons. *J. Neurosci.* 32, 229–242.
- Pambo-Pambo, A., et al., 2009. Early excitability changes in lumbar motoneurons of transgenic SOD1G85R and SOD1G(93A-Low) mice. *J. Neurophysiol.* 102, 3627–3642.
- Pasinelli, P., Brown, R.H., 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 710–723.
- Pieri, M., et al., 2009. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 215, 368–379.
- Raoul, C., et al., 2002. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35, 1067–1083.
- Rosen, D.R., et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Scaini, A.L., et al., 2010. Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J. Neurosci.* 30, 390–403.
- Spitzer, N.C., 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444, 707–712.
- Sreedharan, J., et al., 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668–1672.
- Tripodi, M., et al., 2008. Structural homeostasis: compensatory adjustments of dendritic arbor geometry in response to variations of synaptic input. *PLoS Biol.* 6, e260.
- Van Den Bosch, L., et al., 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 1068–1082.
- van Zundert, B., et al., 2008. Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 28, 10864–10874.
- Vance, C., et al., 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208–1211.
- Wooley, C.M., et al., 2005. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32, 43–50.
- Yvert, B., et al., 2004. Multiple spontaneous rhythmic activity patterns generated by the embryonic mouse spinal cord occur within a specific developmental time window. *J. Neurophysiol.* 91, 2101–2109.

ARTICLE 2

Résumé

Mon travail réalisé durant mon stage de Master 2 Biologie Cellulaire et Physiopathologie au sein du Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux (INSERM U1045) sous la direction de M. Thomas Ducret a fait l'objet d'une publication portant sur l'implication des canaux TRPV1 et TRPV4 dans la migration des cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire pulmonaire grave qui se caractérise chez l'Homme par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne qui devient supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'effort alors que chez les sujets sains, elle est comprise entre 10 et 15 mmHg. L'HTAP entraîne le développement d'une hypertrophie ventriculaire droite (pouvant entraîner une insuffisance cardiaque droite), un remodelage fonctionnel et structurel des artères pulmonaires ainsi qu'une hyperréactivité vasculaire. Ce remodelage est très visible au niveau de la média avec une prolifération des cellules musculaires lisses d'artère intrapulmonaire diminuant la lumière du vaisseau. Lors de ce remodelage, des études ont également montré qu'il se produisait une muscularisation de petits vaisseaux non muscularisés impliquant donc une migration des cellules musculaires lisses au niveau de la média. Le calcium est impliqué dans ces phénomènes de prolifération et de migration cellulaires durant lesquels une augmentation du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) se produit. Cette augmentation du calcium est médiée par des canaux au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. Parmi eux, on distingue au niveau de la membrane plasmique des canaux non sélectifs perméables au calcium, les canaux TRP (Transient Receptor Potentiel). Ces derniers sont exprimés dans une large variété de tissus dont le muscle lisse où ils jouent des rôles importants dans plusieurs fonctions physiologiques telles que l'homéostasie calcique et la

prolifération cellulaire. Il s'agit d'une large famille de protéines qui s'associent en homo ou hétérotétramères contenant chacun 6 domaines transmembranaires (S1-S6) avec une boucle hydrophobe entre S5 et S6 qui constitue un pore. Selon leur homologie de structure, ils peuvent être divisés en 7 sous-familles : les TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), TRPA (Ankyrin) et TRPN (No Mechanoreceptor potential channel ou NOMPC). Au sein de ces sous-familles, on distingue entre autre sept isoformes parmi les canaux TRPC (TRPC1-7), six parmi les TRPV (TRPV1-6), huit parmi les TRPM (TRPM1-8). Les canaux TRPV1 et TRPV4 étant les plus abondamment exprimés au niveau des cellules musculaires lisses d'artère intrapulmonaire parmi la sous-famille des canaux TRPV, nous nous sommes donc focalisés sur ces isoformes. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés, au niveau des artères pulmonaires de rat, 1) à l'expression et l'activité fonctionnelle des canaux TRPV1 et TRPV4, 2) à la migration des cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires déclenchée par ces isoformes de canaux TRP et 3) à la réorganisation associée du cytosquelette.

Nos résultats confirment par l'utilisation de RT-PCR et Western-Blot, l'expression de canaux TRPV1 et TRPV4 dans les cellules musculaires lisses d'artère intrapulmonaire de rat. Nous avons ensuite vérifié la fonctionnalité de ces isoformes par mesures des variations de concentration calcique intracellulaire (microspectrofluorimétrie) induites par la capsaïcine et le 4 α -PDD (4 α -phorbol-12,13-didecanoate), agonistes sélectifs des canaux TRPV1 et TRPV4, respectivement, conduisant à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. De plus, nous montrons pour la première fois une preuve directe, au niveau de la cellule unique, que la stimulation des canaux TRPV1 et TRPV4 améliore la migration des cellules musculaires lisses d'artère intrapulmonaire, une étape cruciale dans l'HTAP. Nous mettons également en évidence que cette réponse ne semble pas être attribuée à un effet prolifératif. De plus, ces réponses migratoires dues aux canaux TRPV1 et TRPV4 sont associés à une

réorganisation de l'actine F du cytosquelette, de la tubuline et des réseaux de filaments intermédiaires.

En conclusion, nos données mettent en évidence pour la première fois, l'implication des canaux TRPV1 et TRPV4 dans la migration des cellules musculaires lisses d'artère intrapulmonaire, leur implication dans la physiopathologie de l'HTAP.

Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells

Elodie Martin · Diana Dahan · Guillaume Cardouat ·
Jennifer Gillibert-Duplantier · Roger Marthan ·
Jean-Pierre Savineau · Thomas Ducret

Received: 13 June 2012 / Accepted: 26 June 2012 / Published online: 22 July 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Pulmonary hypertension, the main disease of the pulmonary circulation, is characterized by an increase in pulmonary vascular resistance, involving proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). However, cellular and molecular mechanisms underlying these phenomena remain to be identified. In the present study, we thus investigated in rat intrapulmonary arteries (1) the expression and the functional activity of TRPV1 and TRPV4, (2) the PASMC migration triggered by these TRPV channels, and (3) the associated reorganization of the cytoskeleton. Reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis demonstrated expression of TRPV1 and TRPV4 mRNA in rat intrapulmonary arteries. These results were confirmed at the protein level by western blot. Using microspectrofluorimetry (indo-1), we show that capsaicin and 4 α -phorbol-12,13-didecanoate (4 α -PDD), selective agonists of TRPV1 and TRPV4, respectively, increased the intracellular calcium concentration of PASMC. Furthermore, stimulation of TRPV1 and TRPV4 induced PASMC migratory responses, as assessed

by two different methods (a modified Boyden chamber assay and a wound-healing migration assay). This response cannot seem to be attributed to a proliferative effect as assessed by BrdU and Wst-1 colorimetric methods. Capsaicin- and 4 α -PDD-induced calcium and migratory responses were inhibited by the selective TRPV1 and TRPV4 blockers, capsazepine and HC067047, respectively. Finally, as assessed by immunostaining, these TRPV-induced migratory responses were associated with reorganization of the F-actin cytoskeleton and the tubulin and intermediate filament networks. In conclusion, these data point out, for the first time, the implication of TRPV1 and TRPV4 in rat PASMC migration, suggesting the implication of these TRPV channels in the physiopathology of pulmonary hypertension.

Keywords Calcium · Cell viability · Migration · Proliferation · TRP channels · Vascular smooth muscle

Elodie Martin and Diana Dahan contributed equally to this work.

E. Martin · D. Dahan · G. Cardouat · J. Gillibert-Duplantier ·
R. Marthan · J.-P. Savineau · T. Ducret
Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux,
Univ Bordeaux,
33076 Bordeaux, France

E. Martin · D. Dahan · G. Cardouat · J. Gillibert-Duplantier ·
R. Marthan · J.-P. Savineau · T. Ducret
INSERM, U1045,
33076 Bordeaux, France

T. Ducret (✉)
Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux,
INSERM U1045, Université Bordeaux Segalen,
146 rue Léo-Saignat,
33076 Bordeaux Cédex, France
e-mail: thomas.ducret@u-bordeaux2.fr

Introduction

Pulmonary hypertension (PH) is a disease characterized by a progressive elevation of pulmonary arterial pressure leading to right heart failure and ultimately to death. From a pathological point of view, PH is a multifactorial disease characterized by a progressive increase in pulmonary vascular resistance caused, among others, by vasoconstriction, remodeling of the pulmonary vessel wall, and thrombosis [15]. In particular, sustained pulmonary vasoconstriction and remodeling of small pulmonary arteries (PA) are two key events of this disease [17, 28], both of which implicate pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). Indeed, proliferation and migration of PASMC are involved in hyperreactivity of PA to contractile agonists, thickening of large pulmonary vessel medial wall, as well as in

muscularization of small pulmonary vessels [27]. As recently shown [4], the extension of PASMC into nonmuscularized vessels involves factors, such as serotonin, that stimulate PASMC proliferation and/or migration.

Cell migration plays a pivotal role in many physiological (including angiogenesis, embryonic morphogenesis, immune surveillance, tissue repair and regeneration...) and pathophysiological events (cancer, inflammation, mental retardation, osteoporosis, vascular disease...) (for review, see [29]). At the cellular level, cell migration is a multifactorial and multistep process that requires simultaneous changes in both cell morphology and adhesion [29] that depend on the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) [14, 21]. Indeed, a key step in the initiation of the process is an increase in $[Ca^{2+}]_i$, which results from a release of intracellular stored calcium and/or an influx of extracellular calcium. Intracellular released calcium is essentially originating from the sarcoplasmic reticulum, whereas calcium influx occurs through membrane channels with distinctive Ca^{2+} selectivity. Extracellular calcium ions can enter into smooth muscle cells following the activation of voltage-operated calcium channels (L- and T-type calcium channels), or nonselective cation channels (NSCC) that are permeable to calcium [11]. Part of NSCC belongs to the large family of transient receptor potential (TRP) proteins. TRP channels, that are activated by various chemical and physical stimuli, are characterized by six transmembrane-spanning domains, which form tetramers [25]. Based on structural homology, the TRP superfamily can be subdivided into seven main subfamilies: TRPC (“Canonical”), TRPV (“Vanilloid”), TRPM (“Melastatin”), TRPP (“Polycystin”), TRPML (“Mucolipin”), TRPA (“Ankyrin”), and TRPN (“NOMPC”). In PASMC, TRPC, TRPV, and TRPM are expressed [31, 35], and among the TRPV subfamily, TRPV1, TRPV2, and TRPV4 are the most abundantly expressed [35]. Interestingly, these three isoforms have been demonstrated to be the molecular basis of stretch-activated channels [16, 20, 22, 24, 30], and it was recently demonstrated that the activity of stretch-activated channels in PASMC was increased under chronic hypoxia [6, 37]. Moreover, we previously showed that serotonin, which stimulates bovine PASMC migration [4], activates a TRPV4-like current [5]. Finally, the involvement of TRPV1 in human hepatoblastoma (HepG2) cell migration [33] and in chronic hypoxia-induced proliferation of human PASMC [32] was already described. Thus, TRPV1 and TRPV4 may be required for PASMC migration occurring during PH.

In the present work, we focused our attention on TRPV1 and TRPV4 channels. We sought to identify TRPV1 and TRPV4 mRNA and proteins in rat intrapulmonary arteries using RT-PCR and western blot. Furthermore, we verified their functional activity by recording $[Ca^{2+}]_i$ responses (microspectrofluorimetric assay) elicited by capsaicin and 4α -phorbol-12,13-didecanoate (4α -PDD), selective

agonists of TRPV1 and TRPV4, respectively, in PASMC. Finally, we also explored the role of these isoforms in PASMC migration (modified Boyden chamber and wound-healing assays), proliferation (BrdU incorporation), cell viability (Wst-1 assay), and cytoskeleton reorganization (immunostaining).

Materials and methods

Isolation of intrapulmonary arteries

Intrapulmonary arteries (IPA) were dissected from the lungs of male Wistar rats (250–350 g body weight), according to the animal care and use of our local ethics committee (Comité d'éthique régional d'Aquitaine). Briefly, the entire heart–lung preparation was rapidly removed en bloc. IPA of the first and second orders from the left lung were dissected free from surrounding connective tissues and endothelium (de-endothelialized IPA) under binocular control and sterile conditions.

RNA and cDNA synthesis

De-endothelialized IPA RNA from one rat was extracted using NucleoSpin® RNA XS kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). Briefly, IPA were lysed by incubation in “lysis buffer” solution, in order to inactivate RNases and create appropriate binding conditions which favor adsorption of RNA to the silica membrane. After lysis, homogenization and reduction of viscosity were achieved by filtration with NucleoSpin® filter units. Residual genomic DNA was removed efficiently by time-saving on-column digestion with rDNase provided. Total RNA was eluted in RNase-free water. The concentration of RNA was measured spectrophotometrically by GeneQuant RNA/DNA calculator (Amersham Pharmacia). The total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed into cDNA by using AMV reverse transcriptase (Promega) in the presence of RNase inhibitor and oligo d(T) as a primer at 42 °C for 60 min followed by heating at 94 °C for 3 min.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR was performed with a Rotor-Gene 2000 (Corbett Research) as previously described [2]. cDNA from 10 ng of total RNA was added to 0.2 μ l of 50 \times Titanium Taq DNA Polymerase combined to its buffer (Clontech Laboratories), 1 mM dNTP, each of the appropriate primer (Sigma Genosys; see Table 1 for concentrations and sequences), and 0.5 \times SYBR Green (Molecular Probes). The reaction was initiated at 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 70 °C for 30 s. PCR negative

Table 1 Sequences of the primer pairs (S: sense; AS: antisense) are shown as well as GenBank accession number, product length, product T_m, and concentration for TRPV1 and TRPV4 genes

Gene	Sequence	GenBank accession number	Product length (bp)	Product T _m (°C)	Concentration (nM)
TRPV1	S: AGCGAGTTCAAAGACCCAGA AS: TTCTCCACCAAGAGGGTCAC	NM_031982.1	268	88.2	100
TRPV4	S: GCCACCCTACCCTTACCGTA AS: GGAAGGAGCCATCGACGAAGA	NM_023970.1	158	88.8	100

controls were systematically made by using water instead of cDNA. All specific primers were designed by using the primer analysis software (Oligo 6.6, Molecular Biology Insights). The efficiency of the PCR reactions was always more than 90 %. Specificity of the amplified PCR products was checked with melting curve analysis and by electrophoresis analysis on a 2 % agarose gel containing SYBR Green.

Western blot

De-endothelialized IPA were crushed and homogenized using RIPA buffer [1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) Na deoxycholate, 150 mM NaCl, and 20 mM sodium or potassium phosphate, pH 7.2] with 5 mM EDTA and anti-protease cocktail (P8340; Sigma) for 1 h on ice. After scrapping, any insoluble material was removed by centrifugation at 15,000×g for 10 min at 4 °C, and the amount of proteins was assessed by the Lowry method. After heat denaturation during 6 min at 90 °C, equal amounts of proteins were subjected to electrophoresis on a 8–14 % acrylamide reducing gel. The proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (Immobilon-P, Millipore) using a semi-dry electro-blotter (Bio-Rad) during 50 min. Unspecific sites were saturated using nonfat milk during 1 h and membranes were incubated overnight at 4 °C with diluted primary antibodies: rabbit anti-TRPV1 (1/400, Abcam) or rabbit anti-TRPV4 (1/400, Abcam). The membranes were then washed with a PBS–TWEEN 1 % buffer and treated with the corresponding horse-radish peroxidase-linked secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, Pierce) for 2 h at room temperature. After several washes in PBS–TWEEN 1 % buffer, the membranes were processed for chemiluminescent detection using the Super Signal West Pico or Femto chemiluminescent substrate (Pierce), according to the manufacturer's instructions. Immunoblots were then revealed by enhanced chemiluminescence acquired using Kodak Image Station 4000 MM. Immunoblots were then stripped and revealed with mouse anti-β-actin (1/1,000, Sigma).

PASMC isolation and culture

As previously described [6], after isolation, de-endothelialized IPA were cut in several pieces (1 × 1 mm) and seeded on round

glass coverslips for microspectrofluorimetry experiments or in Petri dishes for in vitro experiments. Explants were cultured in culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)–N-2-hydroxyethyl-piperazine–N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) supplemented with 1 % penicillin–streptomycin, 1 % N-pyruvate, 1 % nonessential amino acids, and 10 % fetal calf serum (FCS)). They were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere gassed with 5 % CO₂ until cells grow out of the explants.

Alternatively, freshly dissociated PASMC were obtained using an enzymatic dissociation method already described [6]. Briefly, IPA pieces were placed successively in different dissociation solutions containing collagenase, papain, and dithioerythritol at 37 °C. Tissues were then gently agitated using a polished wide-bore Pasteur pipette to release the cells. Cells were then seeded on round glass coverslips, stored in serum-free culture medium enriched with 1 % insulin-transferrin-selenium (ITS), maintained at 37 °C in a humidified atmosphere gassed with 5 % CO₂, and used between 14 and 24 h after isolation.

Microspectrofluorimetric assay of cytosolic calcium

Before the experiments, PASMC were growth-arrested during 48 h by using serum-free culture medium supplemented with 1 % ITS. The Ca²⁺-sensitive fluorescent probe indo-1 was used to record changes in [Ca²⁺]_i. The cells plated on glass coverslips were incubated with 5 μM indo-1 penta-acetoxymethyl ester (indo-1/AM) in Krebs–HEPES solution (see composition below) at room temperature for 40 min, then washed and maintained at room temperature in the same saline solution before the fluorescence measurements.

For single cell measurements, the dual emission microspectrofluorimeter was constructed from a Nikon Diaphot inverted microscope fitted with epifluorescence (×40 oil immersion fluorescence objective; numerical aperture, 1.3). For excitation of indo-1, a collimated light beam from a 100-W mercury arc lamp (Nikon) was filtered at 355 nm and reflected from a dichroic mirror (380 nm). The emitted fluorescence signal was passed through a pinhole diaphragm slightly larger than the selected cell and directed onto another dichroic mirror (455 nm). Transmitted light was

filtered at 480 nm, reflected light was filtered at 405 nm, and the intensities were recorded by separate photometers (P100, Nikon). Under these experimental conditions, the fluorescence ratio (F_{405}/F_{480}) was calculated and recorded on-line as a voltage signal. $[Ca^{2+}]_i$ was estimated from the F_{405}/F_{480} using the formula derived by Grynkiewicz et al. [10] after Ca^{2+} calibration for indo-1 determined within cells as previously described [26].

In vitro migration assays

Modified Boyden chamber assay Modified Boyden chambers (BD Biosciences) containing 8 μ m pore size membranes were positioned in 24-well tissue culture plates. After coating of the membranes with collagen, 25×10^3 cells were added to the top chamber in serum-free culture medium. The bottom chamber was filled with serum-free culture medium in the presence or absence of the agonists and the inhibitors. Next, after incubation for 24 h, to quantify migration through the porous membrane, cells were removed from the top side of the membrane mechanically using a cotton-tipped swab, and invading cells from the reverse side were fixed with methanol and stained with hematoxylin for 20 min. For each experiment, 15 representative pictures were taken for each insert, and then, cells were counted.

Wound-healing assay Cells (2×10^5) were seeded in a Petri dish and cultured in culture medium with 10 % FCS until confluence. Next, after incubation for 24 h in serum-free culture medium, a straight scratch was performed in the monolayer of cells using a pipette tip to obtain a wide acellular area. The medium was then replaced with the same medium containing or not the agonists and the inhibitors. After 24 h, cells were fixed with methanol and stained with hematoxylin for 20 min. Imaging of the two wound edges was performed (at four different positions along the scratch) and cells that migrated into the acellular area were counted.

In vitro proliferation assay

Briefly, cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per well in a 96-well tissue culture plate and cultured in complete culture medium containing 10 % FCS. After 24 h, the medium was removed and replaced by a serum-free medium. After an additional period of 24 h at 37 °C, the medium was changed to complete culture medium containing 0.2 % serum in the presence or absence of the agonists. Following 24 h of incubation under these conditions, the media were removed and replaced with medium containing BrdU (10 μ M), and cells were incubated for an additional 2 h at 37 °C. DNA synthesis was then assayed using Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric method (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions.

Newly synthesized BrdU-DNA was determined using an EL808 ultra microplate reader (Bio-Tek Instruments) at a wavelength of 380 nm with a reference wavelength of 490 nm.

In vitro cell viability assay

Cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per well in a standard 96-well tissue culture plate and cultured in complete culture medium containing 10 %. After 24 h, the medium was removed and replaced by a serum-free medium. After an additional period of 24 h at 37 °C, the medium was changed to complete culture medium containing 0.2 % serum in the presence or absence of the agonists. Following 24 h of incubation under these conditions, the water-soluble tetrazolium-1 (Wst-1, Roche Applied Science) was added to the media and cells were incubated for an additional 2 h at 37 °C. Cleavage of tetrazolium salt into formazan was determined, according to the manufacturer's instructions, using an EL808 ultra microplate reader (Bio-Tek Instruments) at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 490 nm.

CML phenotype and TRPV immunostaining

After enzymatic dissociation, cells were seeded on eight-well chamber slides (Becton Dickinson) and grown in full medium containing 10 % FCS until confluence, prior to 24 h serum privation. Cells were washed twice in PBS and then fixed for 10 min in 4 % paraformaldehyde solution (Sigma). After fixation, cells were permeabilized with PBS containing 0.5 % Triton X-100 (Dutscher) for 5 min. Unspecific binding sites were blocked with PBS containing 4 % bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 30 min. In order to validate smooth muscle cell phenotype, cells were labeled with a monoclonal anti- α smooth muscle actin (α -SMA) antibody (clone 1A4, 1:100, Sigma) and polyclonal calponin 1/2/3 (Santa Cruz) for 1 h in PBS–1 % BSA. In order to evaluate TRPV1 and TRPV4 expressions, cells were labeled with a polyclonal anti-TRPV1 antibody (Abcam) or a polyclonal anti-TRPV4 antibody (Abcam) for 1 h in PBS–1 % BSA. Cells were then washed with PBS and labeled with Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse or Alexa-Fluor 568 goat anti-rabbit secondary antibody (1:200, Molecular Probes/Invitrogen) for 1 h in PBS–BSA 1 %. After the PBS wash, cell nuclei were stained with DAPI for 5 min (1:1,000, Sigma). Slides were then mounted with coverslips with an anti-fade Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako) and then observed under a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope using the Nikon Apo Plan \times 60/1.4NA oil immersion objective. Fluorescent images were acquired using the Nikon EZC1 software using the Helium-Blue Laser Diode (405 nm, for DAPI staining), the Helium-Neon Laser

Diode (543 nm, for Alexa-Fluor 568), and the Argon laser line (488 nm, for Alexa-Fluor 488), prior to analysis with the Nikon NIS-Elements software.

Cytoskeleton immunostaining

Briefly, cells were seeded on eight-well chamber slides (Becton Dickinson) and grown in full medium containing 10 % FCS until confluence, prior to 24 h 4 α -PDD or capsaicin treatments in serum-free medium. At the end of the 24-h treatment, cells were washed twice in PBS and then fixed for 10 min in 4 % paraformaldehyde solution (Sigma). After fixation, cells were permeabilized with PBS containing 0.5 % Triton X-100 (Dutscher) for 5 min. Unspecific binding sites were blocked with PBS containing 4 % BSA (Sigma) for 30 min. In order to evaluate microtubule and intermediate filament networks, cells were labeled for 1 h in PBS–1 % BSA with a monoclonal anti-tubulin antibody (clone DM1A, 1:1,000, Sigma) or with a monoclonal anti-vimentin antibody (clone V9, 1:1,000, Sigma), respectively. Cells were then washed with PBS and labeled with Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (1:200, Molecular Probes/Invitrogen) for 1 h in PBS–BSA 1 %. After the PBS wash, cell nuclei were stained with DAPI for 5 min (1:1,000, Sigma). Slides were then mounted and observed as described above. Integrated density of fluorescent signal was determined using ImageJ software. Results were expressed as the percentage of integrated density of the mean of three different random images as compared to control untreated cells.

Recording solutions and application of drugs for microspectrofluorimetry studies

The standard Krebs–HEPES extracellular solution contained (in mM): 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 4 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 6 D-glucose, and 10 HEPES. The osmolality (measured with a cryosmometer type 15 Löser) of the external salt solution was adjusted to 310 mOsm/kg with mannitol, and pH adjusted to 7.4 with NaOH.

The TRPV agonists, capsaicin and 4 α -PDD, were applied to the recorded cell by pressure ejection from a glass pipette located close to the cell for the period indicated on the records. The TRPV antagonists, capsazepine and HC067047, were added to the extracellular solution 20 min before the application of agonists.

Reagents

General salts were from VWR. All other chemicals were purchased from Sigma, except DMEM–HEPES, FCS, and

penicillin–streptomycin which were from Gibco (Invitrogen Corporation), and HC067047 which was from Tocris. 4 α -PDD, capsaicin, capsazepine, and HC067047 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted 1:2,000 into the bath to the final mentioned concentrations. At this dilution, the solvent (DMSO) alone had no effect on channel activity.

Data and statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Each experiment was repeated several times (*n* indicates the number of cells or rats). Mann–Whitney test or χ^2 test was used to determine statistical significance, and differences with *P* < 0.05 were considered significant.

Results

Expression of TRPV1 and TRPV4 mRNA and proteins

To verify the expression of TRPV1 and TRPV4, using specific primers (Table 1) and the RT-PCR technique, we first studied the expression of the mRNA in rat de-endothelialized IPA. PCR products, generated after 40 cycles, of the expected sizes (268 and 158 bp for TRPV1 and TRPV4, respectively) for the two subtypes were obtained consistently in three separate experiments and matched with those of positive controls generated from the brain (Fig. 1A).

As shown in Fig. 1B, western blot revealed expression of TRPV1 and TRPV4 proteins in rat de-endothelialized IPA. Specific anti-TRPV1 and anti-TRPV4 antibodies detected bands at \approx 100 kDa, consistently in six separate experiments. The size of these bands was in agreement with the predicted molecular mass of the two isoforms, 100 and 98 kDa for TRPV1 and TRPV4, respectively.

Functional activity of TRPV1 and TRPV4 channels

In order to investigate TRPV1 and TRPV4 at a functional level, we studied the effect of capsaicin and 4 α -PDD, selective agonists of TRPV1 and TRPV4, respectively, on [Ca²⁺]_i in freshly dissociated (nonproliferating) rat PSMC (Fig. 1C). All the cells analyzed exhibited a stable resting [Ca²⁺]_i. Application of capsaicin (10 μ M) or 4 α -PDD (5 μ M) for 1 min elicited a fast increase in [Ca²⁺]_i (Fig. 1C(a)). As shown in Fig. 1C(b), in 60 % of tested cells (24 of 43 cells), capsaicin induced a [Ca²⁺]_i response in PSMC, the amplitude of which was 118 \pm 19 nM (*n*=24). In 71 % of tested cells (22 of 31 cells), activation of TRPV4 channels with 4 α -PDD elicited a higher calcium response: 166 \pm 19 nM (*n*=22).

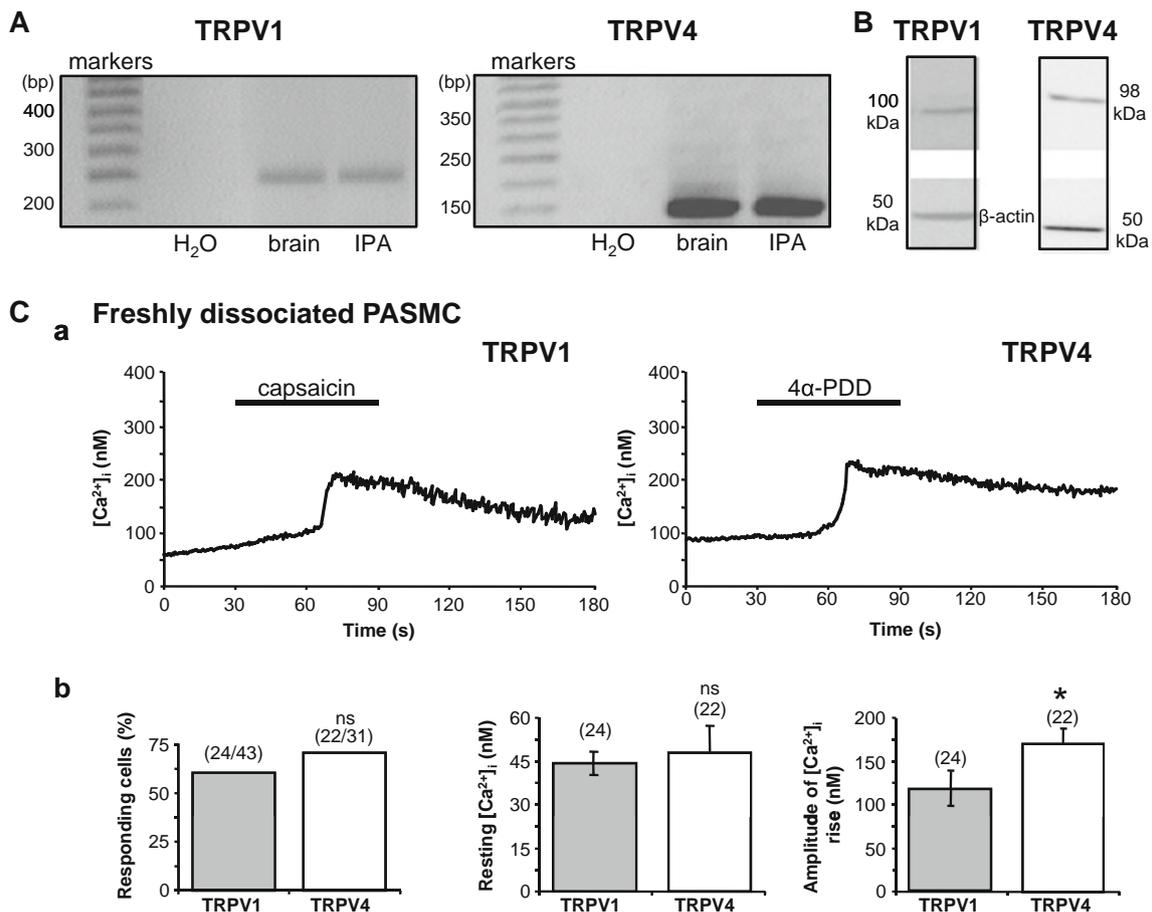


Fig. 1 Expression and functional activity of TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arteries and freshly dissociated PASMC. **A** RT-PCR analysis of TRPV1 and TRPV4 channels in rat de-endothelialized intrapulmonary arteries (IPA) and brain. Brain mRNA was used as positive controls for TRPV1 and TRPV4. Negative controls were made by using water instead of cDNA. Expected lengths of PCR products are 268 and 158 bp for TRPV1 and TRPV4, respectively. **B** Western blot analysis of TRPV1 and TRPV4 channel expression in rat de-endothelialized intrapulmonary arteries. *Upper panels*: expression of proteins of interest. *Lower panels*: expression of β-actin.

Because PASMC can switch from a nonproliferative contractile phenotype to a proliferative “synthetic” phenotype and since this phenotypic transition and subsequent proliferation in pulmonary arteries contribute to PH [19], we assessed the effect of capsaicin and 4α-PDD on [Ca²⁺]_i in cultured (proliferating) rat PASMC (Fig. 2). All the cells analyzed exhibited a stable resting [Ca²⁺]_i. Application of capsaicin (10 μM) or 4α-PDD (5 μM) for 1 min elicited a fast increase in [Ca²⁺]_i (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B(a), in 19 % of tested cells (25 of 133 cells), capsaicin induced a [Ca²⁺]_i response in PASMC, the amplitude of which was 57±6 nM (*n*=25). In the presence of capsazepine (10 μM), reported to specifically block TRPV1, capsaicin-induced [Ca²⁺]_i rise was strongly reduced to an amplitude of 13±5 nM (*n*=4) in the only four responding cells out of 111 (Fig. 2B(a)), thus confirming that the capsaicin-induced calcium response was related to TRPV1

activation. In the same way, in 25 % of tested cells (17 of 68 cells), activation of TRPV4 channels with 4α-PDD elicited a calcium response: 136±17 nM (*n*=17) (Fig. 2B(b)). In the presence of HC067047 (5 μM), a specific inhibitor of TRPV4, the 4α-PDD-induced calcium response was reduced by 80 % (27±11 nM, *n*=4 of 64 cells) (Fig. 2B(b)), thus confirming that the 4α-PDD-induced calcium increase was related to TRPV4 activation. These present findings thus indicate that, whatever their phenotype (nonproliferative contractile or proliferative), PASMC express functional TRPV1 and TRPV4 channels.

Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in PASMC migration

Having shown that rat PASMC express functional TRPV1 and TRPV4 channels allowing [Ca²⁺]_i increase, we therefore

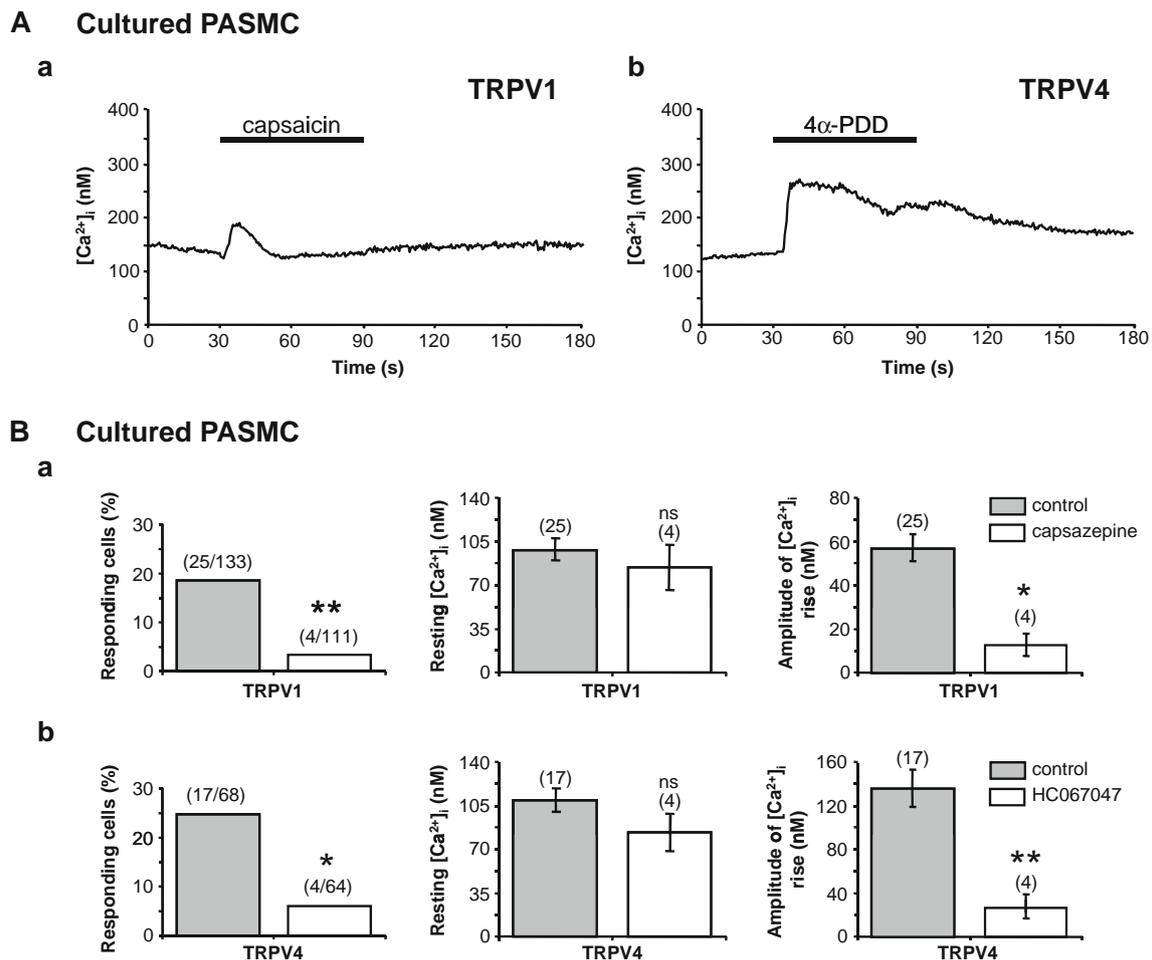


Fig. 2 Functional activity and pharmacological characterization of TRPV1 and TRPV4 channels in rat cultured PASMC. [Ca²⁺]_i determination was carried out on single cultured PASMC using indo-1 as Ca²⁺ probe. Cells were bathed in recording medium containing 2 mM Ca²⁺. **A** Typical recordings are shown when *a* capsaicin (10 μM) or *b* 4α-PDD (5 μM) was applied for the period indicated by the horizontal bar in control conditions. **B** Percentages of responding cells, resting [Ca²⁺]_i

values, and amplitude of the calcium rises in response to *a* capsaicin (TRPV1) or *b* 4α-PDD (TRPV4) in the absence (control conditions) or presence of the specific TRPV1 and TRPV4 inhibitors (capsazepine (10 μM) and HC067047 (5 μM), respectively). Data are mean value ± SEM. The number of cells is indicated in brackets. Significant difference is indicated by one asterisk when $P < 0.05$, two asterisks when $P < 0.001$, and *ns* indicates a nonsignificant difference, χ^2 or Mann–Whitney tests

tested the ability of these channels to induce migration in PASMC. Figure 3A(a) illustrates the effects of capsaicin and 4α-PDD on PASMC migration as determined by the modified Boyden chamber assay. When cells were incubated with 10 μM capsaicin or 5 μM 4α-PDD for 24 h in serum-free DMEM, agonists significantly stimulated migration by 2.1- and 1.3-fold, respectively. As shown in Fig. 3A(b), similar results were obtained when we used the wound-healing assay. Treatment of PASMC with 10 μM capsaicin or 5 μM 4α-PDD for 24 h in serum-free DMEM increased cell migration by 176 and 70 %, respectively. These TRPV1- and TRPV4-induced migratory effects were inhibited by the addition of capsazepine (10 μM) or HC067047 (5 μM), respectively (Fig. 3A), confirming that these observed effects were related to TRPV1 and TRPV4 activation.

In another set of experiments, we verified that the observed change in cell migration was not due to increased cell

growth. Using BrdU and Wst-1 colorimetric methods, we assessed the ability of capsaicin and 4α-PDD to increase cell proliferation and cellular growth/survival. As shown in Fig. 3B, whatever the method used, stimulation of cells with capsaicin (10 μM) or 4α-PDD (5 μM) for 24 h in low serum (0.2 % FCS) DMEM did not significantly increase cell proliferation or cellular viability, whereas the positive control (DMEM with 10 % FCS) did it.

Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in cytoskeleton reorganization

Since cell migration requires simultaneous changes in both cell morphology and adhesion, involving the formation of lamellipodia/pseudopodia, cell body contraction, and tail retraction [29], we investigated the effects of capsaicin and 4α-PDD on the cytoskeleton alteration. First, we confirmed

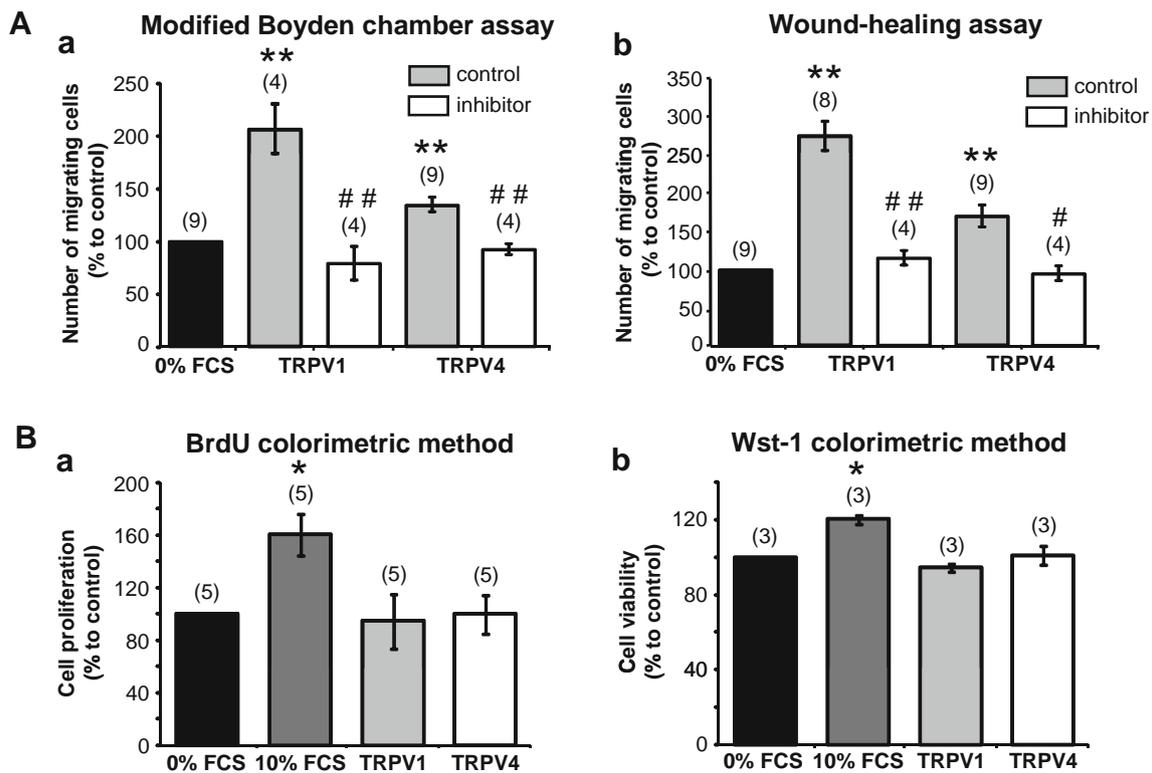


Fig. 3 Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in the migration of rat cultured PASMC. **A** Effects of capsaicin or 4 α -PDD on rat PASMC migration evaluated by modified Boyden chamber (*a*) and wound-healing (*b*) assays. Cells were migrated in serum-free DMEM (control conditions, 0 % FCS), supplemented with 10 μ M capsaicin (TRPV1/control), or 10 μ M capsaicin with 10 μ M capsazepine (TRPV1/inhibitor), or 5 μ M 4 α -PDD (TRPV4/control), or 5 μ M 4 α -PDD with 5 μ M HC067047 (TRPV4/inhibitor) for 24 h. Results are expressed as a percentage of cells migrating in control conditions. Data are mean value \pm SEM. The number of independent experiments is indicated in *brackets*. Significant difference between control conditions without capsaicin or 4 α -PDD (0 % FCS) and control conditions with capsaicin or 4 α -PDD (TRPV1/control and TRPV4/control, respectively) is indicated by *two asterisks* ($P < 0.001$). Significant difference between capsaicin or 4 α -PDD (TRPV1/control and TRPV4/control, respectively) and capsaicin plus capsazepine or 4 α -PDD

plus HC067047 (TRPV1/inhibitor and TRPV4/inhibitor, respectively) is indicated by *simple sharp* ($P < 0.05$) or *double sharp* ($P < 0.001$), Mann–Whitney test. **B** Effects of capsaicin or 4 α -PDD on rat PASMC proliferation (*a*) and viability (*b*) evaluated by BrdU and Wst-1 colorimetric methods, respectively. Cell proliferation was assessed by quantitative determination of DNA synthesis using the Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric method. Cell viability was assessed by the colorimetric water-soluble tetrazolium-1 assay, based on living cells' cleavage of tetrazolium salt into formazan. Cells were incubated for 24 h in DMEM containing 0.2 % FCS (control conditions, 0 % FCS) supplemented with 10 μ M capsaicin (TRPV1) or 5 μ M 4 α -PDD (TRPV4), or DMEM containing 10 % FCS before BrdU or Wst-1 incubation. Data are mean value \pm SEM. The number of independent experiments is indicated in *brackets*. Significant difference from control conditions is indicated by *one asterisk* ($P < 0.05$), Mann–Whitney test

that cultured PASMC were a homogenous cell population. As shown in immunostaining experiments, cells expressed both α -SMA (Fig. 4F–H) and calponin (Fig. 4J), well-known smooth muscle cell markers. In order to determine if cultured PASMC expressed TRPV1 and TRPV4 channels, we performed immunostaining using TRPV1 and TRPV4 antibodies (Fig. 4K, L). Co-immunostaining with α -SMA (Fig. 4G, H) revealed that all PASMC were TRPV1 and TRPV4 positive (Fig. 4O, P).

Second, TRPV1 and TRPV4-induced cytoskeletal changes were investigated using immunostaining experiments. In control cells (Fig. 5A), staining of actin cytoskeleton with an anti- α smooth muscle actin antibody was diffused throughout the cell and cells displayed actin stress fibers generally parallel to the longitudinal axis. The density of the actin filament network increased in the cell periphery.

Stimulation of cells with 10 μ M capsaicin (Fig. 5B) or 5 μ M 4 α -PDD (Fig. 5C) for 24 h significantly increased the intensity of the staining by 2.0- and 3.9-fold, respectively, as compared to control staining (Fig. 5D). These results suggested that TRPV1 and TRPV4 stimulations were associated with changes in the actin architecture. Staining for tubulin showed that the microtubule network was specifically reorganized and increased in the presence of TRPV4 agonist (Fig. 5H). Indeed, in untreated cells (Fig. 5E), the staining was organized in a fine network from punctuate staining. In the presence of 5 μ M 4 α -PDD (Fig. 5G), the staining of the tubulin network was more intense, whereas no significant changes were observed upon capsaicin treatment (Fig. 5F). Finally, staining for vimentin revealed that intermediate filament network was organized in a fine network from perinuclear areas (Fig. 5I). Incubation with

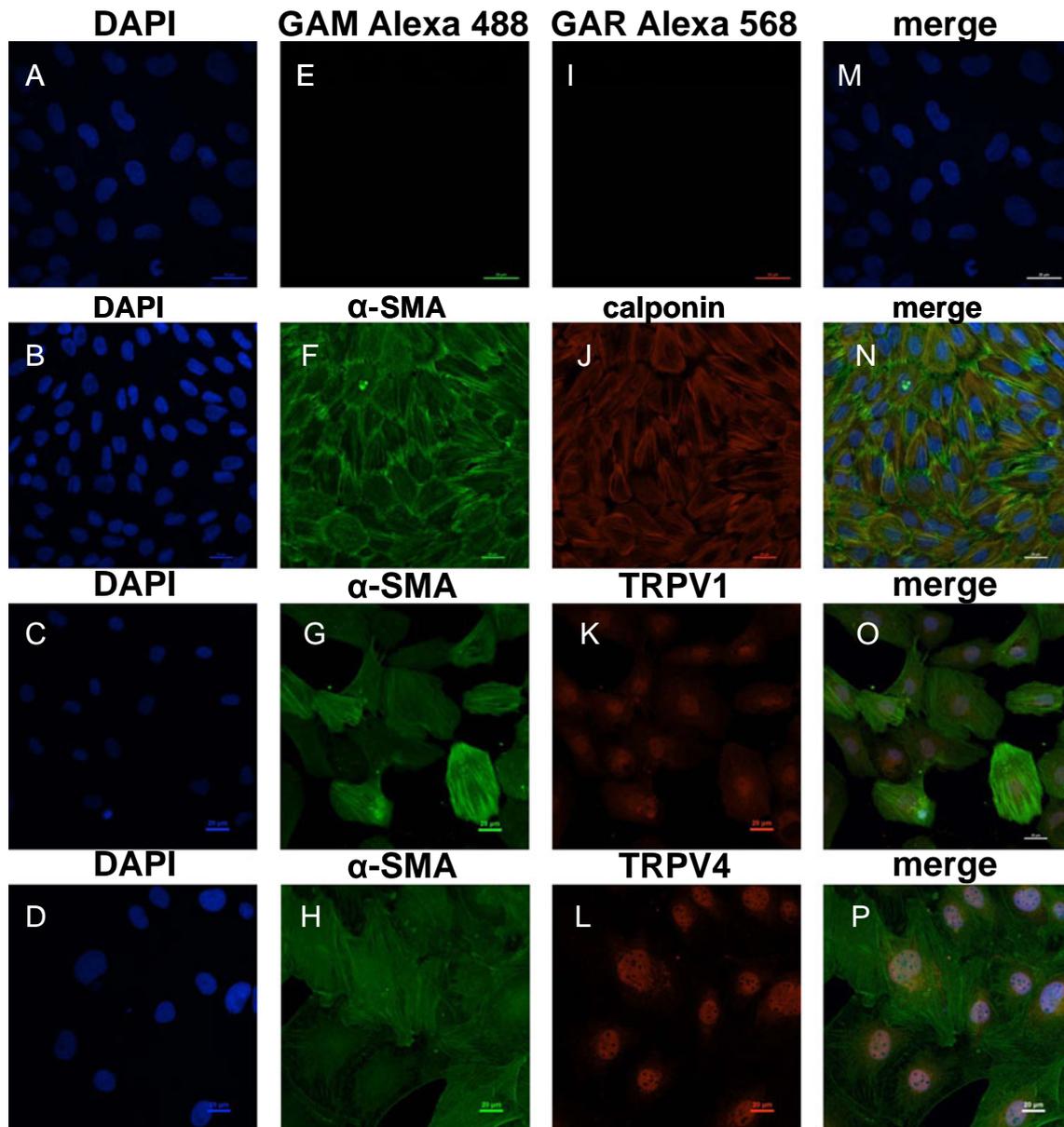


Fig. 4 Expression of smooth muscle cell markers, TRPV1 and TRPV4 channels in rat cultured PASMC. Representative confocal immunofluorescence fields of control cells. **a–D** Cell nuclei were stained with DAPI. **E** Cells were stained with an Alexa-Fluor 488-conjugated antibody. **F–H** Cells were stained with a primary antibody for α smooth muscle actin (α -SMA) and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. **I** Cells were stained with an Alexa-Fluor 568-conjugated antibody. **J** Cells were stained with a primary antibody for

calponin and an Alexa-Fluor 568-conjugated secondary antibody. **K** Cells were stained with a primary antibody for TRPV1 and an Alexa-Fluor 568-conjugated secondary antibody. **L** Cells were stained with a primary antibody for TRPV4 and an Alexa-Fluor 568-conjugated secondary antibody. **M–P** Merging images. All images were taken with the same illumination time. Experiments were performed on four independent cell preparations from four rats. *Scale bar*=20 μ m

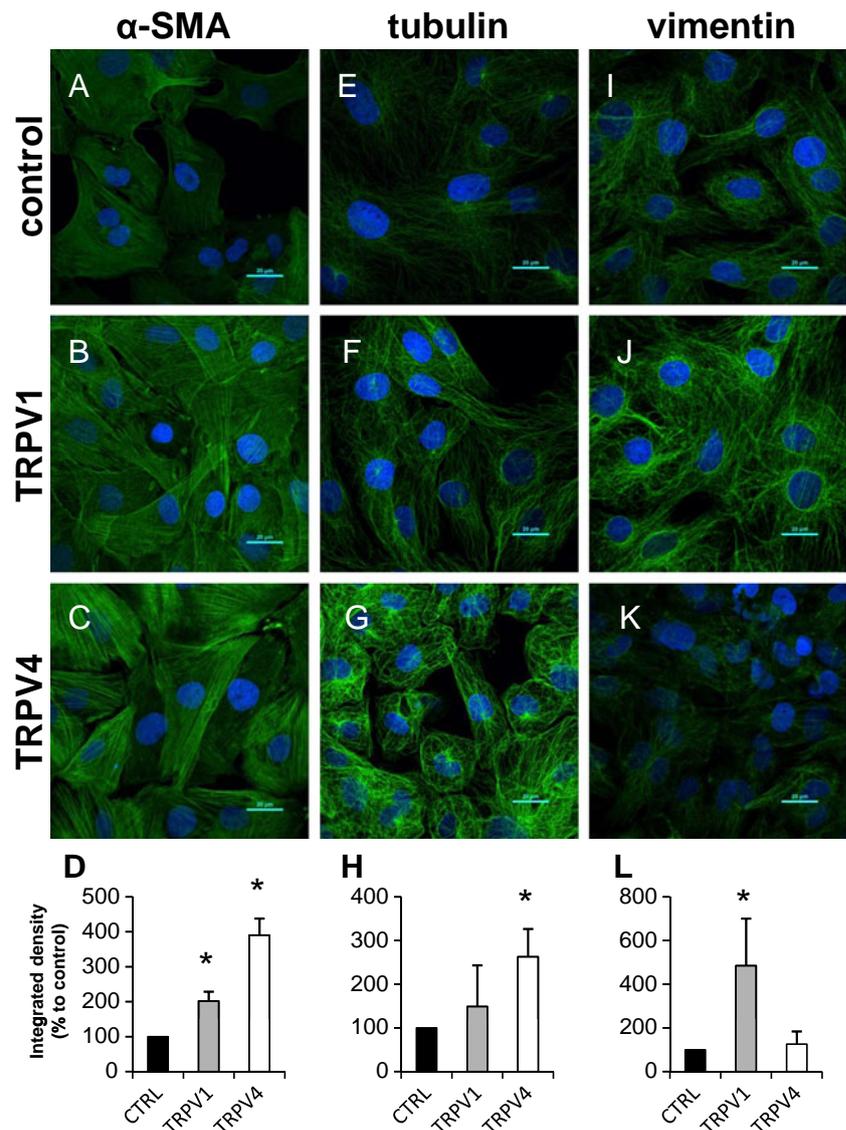
10 μ M capsaicin for 24 h increased the intensity of the staining which was denser in the nuclear periphery (Fig. 5J, L), whereas 4 α -PDD treatment was ineffective (Fig. 5K, L). In conclusion, the present results indicate that TRPV1 and TRPV4 stimulations of PASMC are associated with specific changes in the cytoskeleton architecture, and the intracellular distribution and/or expression of cytoskeletal proteins is visibly altered.

Discussion

In the present work, using reverse transcriptase–polymerase chain reaction and western blot analysis, we confirm the expression of TRPV1 and TRPV4 channels in rat PASMC. We also show that these isoforms can be activated by capsaicin and 4 α -PDD, selective TRPV1 and TRPV4 agonists, respectively, which leads to intracellular Ca^{2+} increase,

Fig. 5 Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in the cytoskeleton reorganization of rat cultured PASM.C.

Representative confocal immunofluorescence fields of control cells (*upper panels*, control) and cells treated with 10 μ M capsaicin (*middle panels*, TRPV1) or 5 μ M 4 α -PDD (*lower panels*, TRPV4) for 24 h on cytoskeleton reorganization. **A–C** Cells were stained with a primary antibody for α smooth muscle actin (α -SMA) and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. **E–G** Microtubule network stained with a primary antibody for tubulin and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. **I–K** Intermediate filament network stained with a primary antibody for vimentin and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. Quantification of fluorescence is expressed as a percentage of integrate density of untreated cells (control cells, CTRL) for α -SMA (**D**), tubulin (**H**), and vimentin (**L**). Cell nuclei were stained with DAPI. All images were taken with the same illumination time. Experiments were performed on four independent cell preparations from four rats. Scale bar=20 μ m



indicating that these channels are functional Ca^{2+} channels. In addition, to the best of our knowledge, we also provide, for the first time, a direct proof, at a single cell level, that stimulation of TRPV1 and TRPV4 channels enhances the migration of PASM.C, a crucial step in the progression of PH [27].

Despite their implication in numerous physiological functions in smooth muscle cells [12], whatever the type of cells, the involvement of TRPV channels in migration is much more elusive. It has been reported that TRPV1 stimulates migration of human hepatoblastoma (HepG2) cells [33], human corneal epithelial cells [36], and mouse dendritic cells [1]. The involvement of TRPV2 in human prostate (LNCaP) cell migration [23] and TRPV4 in endothelial cell migration [7] was also described. Finally, on the contrary, TRPV1 and TRPV4 inhibit migration in urothelial cancer and neuroendocrine cells, respectively [3, 38]. Our data thus indicate that activation of these channels favors migration in PASM.C.

Interestingly, in human and rat PASM.C, chronic hypoxia up-regulates expression levels of the TRPV1 and TRPV4 gene and protein [32, 37]. In the same way, we recently demonstrated that the activity of stretch-activated channels in rat PASM.C was increased under chronic hypoxia [6], an effect that can be ascribed to TRPV1 and TRPV4 activity since they have been demonstrated to exhibit mechanosensitivity [16, 20, 22, 30]. Moreover, we also previously showed that serotonin, whose plasma concentration is increased in PH [13] and which stimulates bovine PASM.C migration [4], activates a TRPV4-like current in rat PASM.C [5]. Based on these findings, we can thus assume that the variation of expression and/or activity of these channels may be an early step leading to cell migration observed in PH.

Most likely, the increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following the Ca^{2+} influx via TRPV channels plays a key role in this process. Indeed, cell migration is a multifactorial and multistep process and many of its components are regulated by the

[Ca²⁺]_i [14, 21]. Moreover, it has been proposed that stretch-activated channels could play a crucial role in mediating localized Ca²⁺ rise needed for migration [18, 34]. Nonetheless, herein, the fact that the migratory response is more important for TRPV1 than for TRPV4, whereas the reverse is true concerning the amplitude of the calcium response, suggests that Ca²⁺ is not the only actor in the signaling cascade. Interestingly, Goswami's group recently provided evidence that TRPV1 and TRPV4 directly interact with microtubules [8, 9]. Activation of these channels results in a selective depolymerization of microtubules, although the mechanism by which this occurs still remains unclear. Moreover, TRPV4 also interacts with actin whereas TRPV1 does not, which could account for the differences in agonist-induced cytoskeleton reorganization observed in our study.

Finally, our results regarding stimulation of migration by TRPV1 and TRPV4 activation cannot be attributed to a proliferative effect in rat PASM. Although a recent study suggests that TRPV1 may be a critical mediator in chronic hypoxia-induced proliferation of human PASM [32], this result was derived from experiments in which TRPV1 was solely inhibited. However, under such conditions, as discussed by the authors, TRPV1 may have induced a proliferative effect via formation of the heterotetrameric channel.

In conclusion, this study demonstrates the expression of TRPV1 and TRPV4 and their role as Ca²⁺ channel involved in the migration of rat PASM. Consequently, these channels may represent a relevant target for the treatment of vascular diseases such as pulmonary hypertension. In particular, these channels may contribute to link stretch-induced effect and vessel remodeling.

Acknowledgments The authors thank Dr. V. Michel and S. Marais for their helpful technical advice. This work was supported by the Fondation de France [2008002719].

References

- Basu S, Srivastava P (2005) Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5120–5
- Billaud M, Marthan R, Savineau JP, Guibert C (2009) Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS One* 4:e6432
- Caprodossi S, Amantini C, Nabissi M, Morelli MB, Farfariello V, Santoni M, Gismondi A, Santoni G (2011) Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. *Carcinogenesis* 32:686–94
- Day RM, Agyeman AS, Segel MJ, Chevere RD, Angelosanto JM, Suzuki YJ, Fanburg BL (2006) Serotonin induces pulmonary artery smooth muscle cell migration. *Biochem Pharmacol* 71:386–97
- Ducret T, Guibert C, Marthan R, Savineau JP (2008) Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* 43:315–23
- Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP (2010) Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium* 48:251–9
- Fiorio Pla A, Ong HL, Cheng KT, Brossa A, Bussolati B, Lockwich T, Paria B, Munaron L, Ambudkar IS (2011) TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene* 31(2):200–12
- Goswami C, Dreger M, Otto H, Schwappach B, Hucho F (2006) Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *J Neurochem* 96:254–66
- Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T (2010) Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS One* 5: e11654
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–50
- Guibert C, Ducret T, Savineau JP (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 98:10–23
- Guibert C, Ducret T, Savineau JP (2011) Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 704:687–706
- Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L (1995) Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 99:249–54
- House SJ, Potier M, Bisailon J, Singer HA, Trebak M (2008) The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch* 456:769–85
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:13S–24S
- Inoue R, Jian Z, Kawarabayashi Y (2009) Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther* 123:371–85
- Jeffery TK, Wanstall JC (2001) Pulmonary vascular remodelling in hypoxic rats: effects of amlodipine, alone and with perindopril. *Eur J Pharmacol* 416:123–31
- Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K (1999) Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400:382–6
- Liang W, Ray JB, He JZ, Backx PH, Ward ME (2009) Regulation of proliferation and membrane potential by chloride currents in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Hypertension* 54:286–93
- Loukin S, Zhou X, Su Z, Saimi Y, Kung C (2010) Wild-type and brachyolmia-causing mutant TRPV4 channels respond directly to stretch force. *J Biol Chem* 285:27176–81
- Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX (2004) Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 68:75–103
- Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biol Chem* 284:21257–64
- Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C, Delcourt P, Rassendren F, Bergerat JP, Ceraline J, Cabon F, Humez S, Prevarskaya N (2010) Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 70:1225–35

24. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93:829–38
25. Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C195–205
26. Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R, Savineau JP (2004) Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L577–83
27. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM (2004) Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:25S–32S
28. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L (1979) Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 236:H818–27
29. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704–9
30. Spencer NJ, Kerrin A, Singer CA, Hennig GW, Gerthoffer WT, McDonnell O (2008) Identification of capsaicin-sensitive rectal mechanoreceptors activated by rectal distension in mice. *Neuroscience* 153:518–34
31. Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT (2004) Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L848–58
32. Wang YX, Wang J, Wang C, Liu J, Shi LP, Xu M, Wang C (2008) Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Membr Biol* 223:151–9
33. Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stuwe L, Mally S, Fabian A, Frippiat C, Nilius B, Schwab A (2007) A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium* 42:17–25
34. Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H (2009) Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457:901–5
35. Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS, Sham JS (2006) Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L1267–76
36. Yang H, Wang Z, Capo-Aponte JE, Zhang F, Pan Z, Reinach PS (2010) Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 91:462–71
37. Yang XR, Lin AH, Hughes JM, Flavahan NA, Cao YN, Liedtke W, Sham JS (2012) Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302:L555–68
38. Zaninetti R, Fornarelli A, Ciarletta M, Lim D, Caldarelli A, Pirali T, Cariboni A, Owsianik G, Nilius B, Canonico PL, Distasi C, Genazzani AA (2011) Activation of TRPV4 channels reduces migration of immortalized neuroendocrine cells. *J Neurochem* 116:606–15

Altérations précoces des réseaux moteurs spinaux chez la souris SOD1, modèle de la Sclérose Latérale Amyotrophique.

Les études basées sur l'utilisation de modèles murins de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) portent très souvent sur des stades symptomatiques ou pré-symptomatiques. Des données existent cependant montrant que des altérations morphologiques des motoneurons existent aux stades post-nataux, suggérant que la SLA pourrait être une maladie neurodéveloppementale. Dans ce travail de thèse basé sur l'utilisation du modèle murin SOD1^{G93A} de la SLA, nous avons cherché à savoir si dès le développement des réseaux moteurs, des perturbations existaient notamment au niveau de la mise en place des inhibitions, c'est-à-dire au niveau de l'homéostasie chlorure. En effet, nous pensons qu'une mauvaise construction du réseau pendant la vie embryonnaire serait la cause des dysfonctionnements observés lors de la survenue de la SLA. Nos données mettent en évidence que la morphologie des motoneurons est modifiée chez les embryons SOD1^{G93A} au stade de développement E17,5 par rapport aux embryons WT et que cette modification de morphologie induit une hyperexcitabilité. De plus, nous montrons une altération du potentiel d'équilibre des ions chlorure (ECl) due à une modification de l'équilibre de la balance des co-transporteurs NKCC1/KCC2. Enfin, nous avons cherché à savoir si une modification du ECl avait une conséquence fonctionnelle au niveau de la mise en place de l'activité locomotrice exprimée par le réseau spinal lombaire. En conclusion, les travaux de cette thèse démontrent pour la première fois un déficit développemental au niveau du modèle murin SOD1^{G93A} et ouvre des perspectives sur la recherche des mécanismes de compensations opérant jusqu'à la survenue du phénotype de la maladie.

Mots clés : Sclérose Latérale Amyotrophique, embryon, moelle épinière, motoneurons, morphologie, excitabilité, homéostasie chlorure, inhibitions, activité locomotrice.

Early alterations of spinal motor networks in the mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Most studies based on the use of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) mouse models focus on symptomatic or presymptomatic periods. However, morphological alterations of ALS motoneurons have been described in post-natal stages, suggesting that ALS could be a neurodevelopmental disease. In this PhD Thesis, based on the use of the SOD1^{G93A} mouse model of ALS, we tried to know if during the embryonic development of the spinal motoneuronal networks, alterations occur particularly at the level of the maturation of GABA/Glycine inhibition, driven by the chloride homeostasis. Indeed, we believe that a wrong construction of the motor network during the embryonic life may be the cause of the troubles observed at the onset of ALS. Our data show that the morphology of motoneurons is altered in E17,5 SOD1^{G93A} embryos compared to WT embryos and that this changes in morphology induced hyperexcitability. In addition, we show an alteration of the equilibrium potential of chloride ions (ECl) due to a modification of the balance of NKCC1/KCC2 chloride co-transporters. Finally, we tried to know if a modification of the ECl had functional consequences in the development of locomotor activity expressed by the lumbar spinal network. In conclusion, the work of this PhD Thesis demonstrates, for the first time, a developmental deficit in the SOD1^{G93A} mouse model and opens new perspectives based on understanding compensatory mechanisms occurring until the appearance of the disease.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, embryo, spinal cord, motoneuron, morphology, excitability, chloride homeostasis, inhibitions, locomotor activity