

Université de Montréal

Les mécanismes synaptiques et intrinsèques qui sous-tendent l'activité des cellules réticulospinales (RS) en réponse à une stimulation sensorielle de type cutané chez la lamproie

Par
Karine Fénelon

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor*
en sciences neurologiques

7 novembre, 2008

© Karine Fénelon 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Les mécanismes synaptiques et intrinsèques qui sous-tendent l'activité des cellules réticulospinales (RS) en réponse à une stimulation sensorielle de type cutané chez la lamproie

Présentée par :
Karine Fénelon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Vincent Castellucci, président-rapporteur
M. Réjean Dubuc, directeur de recherche
Mme Arlette Kolta, membre du jury
M. Jean-Marie Cabelguen, examinateur externe
M. Jean-Pierre Gossard, Représentant du doyen de la FES

RESUME

Chez diverses espèces animales, les informations sensorielles peuvent déclencher la locomotion. Ceci nécessite l'intégration des informations sensorielles par le système nerveux central. Chez la lamproie, les réseaux locomoteurs spinaux sont activés et contrôlés par les cellules réticulospinales (RS), système descendant le plus important. Ces cellules reçoivent des informations variées provenant notamment de la périphérie. Une fois activées par une brève stimulation cutanée d'intensité suffisante, les cellules RS produisent des dépolarisations soutenues de durées variées impliquant des propriétés intrinsèques calcium-dépendantes et associées à l'induction de la nage de fuite. Au cours de ce doctorat, nous avons voulu savoir si les afférences synaptiques ont une influence sur la durée des dépolarisations soutenues et si l'ensemble des cellules RS partagent des propriétés d'intégration similaires, impliquant possiblement les réserves de calcium internes. Dans un premier temps, nous montrons pour la première fois qu'en plus de dépendre des propriétés intrinsèques des cellules réticulospinales, les dépolarisations soutenues dépendent des afférences excitatrices glutamatergiques, incluant les afférences spinales, pour perdurer pendant de longues périodes de temps. Les afférences cutanées ne participent pas au maintien des dépolarisations soutenues et les afférences inhibitrices glycinergique et GABAergiques ne sont pas suffisantes pour les arrêter. Dans un deuxième temps, nous montrons que suite à une stimulation cutanée, l'ensemble des cellules RS localisées dans les quatre noyaux réticulés possèdent un patron d'activation similaire et elles peuvent toutes produire des dépolarisations soutenues dont le maintien ne dépend pas des réserves de calcium internes. Enfin, les résultats

obtenus durant ce doctorat ont permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires par lesquels l'ensemble des cellules RS intègrent une brève information sensorielle et la transforment en une réponse soutenue associée à une commande motrice.

Mots clés en français

intégration sensorimotrice, locomotion, cellules réticulospinales, dépolarisation soutenue, potentiel de plateau, stimulation cutanée, tronc cérébral, nerf trijumeau, cellules sensorielles de relais, glutamate, CNQX, AP-5, glycine, strychnine, caféine, ryanodine, imagerie calcique, lamproie.

ABSTRACT

In various animal species, sensory information can initiate locomotion. This relies on the integration of sensory inputs by the central nervous system. In lampreys, the spinal locomotor networks are activated and controlled by the reticulospinal cells (RS) which constitute the main descending system. In turn, RS cells receive information coming from various synaptic inputs such as the sensory afferents. Once activated by a brief cutaneous stimulation of sufficient strength, RS cells display sustained depolarizations of various durations that rely on calcium-dependant intrinsic properties and lead to the onset of escape swimming. During the course of this Ph.D, we aimed at determining whether synaptic inputs can modulate the duration of the sustained depolarizations and if the different populations of RS cells share the same integrative properties, possibly involving the internal calcium stores. First, our results show for the first time that excitatory glutamatergic inputs, including ascending spinal feedback, contribute to prolong the sustained depolarizations for long periods of time. Cutaneous inputs do not contribute to maintain the sustained depolarizations and inhibitory glycinergic and GABAergic inputs are not sufficient to stop them. Second, we show that in response to cutaneous stimulation, the RS located in the four reticular nuclei display a similar activation pattern and can all produce sustained depolarizations which do not depend on internal calcium release to be maintained. Finally, the results obtained during this Ph.D allowed us to better understand the cellular mechanisms by which the RS cells integrate and transform a brief sensory information into a sustained response associated with a motor command.

English keywords

sensorimotor integration, locomotion, reticulospinal cells, sensory relay cells, brainstem, cutaneous stimulation, trigeminal nerve, sustained depolarization, plateau potential, glutamate, CNQX, AP-5, glycine, strychnine, caffeine, ryanodine, calcium imaging, lamprey.

« Patience et longueur de temps font plus que force ni que rage. »

Jean de La Fontaine, Le Lion et le Rat

« À vaincre sans péril, on triomphe sans gloire. »

Pierre Corneille, Le Cid

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
MOTS CLÉS EN FRANÇAIS	V
ABSTRACT	VI
ENGLISH KEY WORDS	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES	XVIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
DEDICACE.....	XXI
REMERCIEMENTS	XXII
PREAMBULE	1
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	6
1. MECANISME CENTRAUX ET PERIPHERIQUES DE LA LOCOMOTION...7	
1.1. Le cycle locomoteur chez différents vertébrés	8
1.2. Organisation de la locomotion : niveau central et information sensorielles	9
1.2.1. Le niveau central : les motoneurones, les réseaux locomoteurs spinaux, et les structures supraspinales	11
1.2.1.1. Les motoneurones.....	11
1.2.1.2. Les réseaux locomoteurs spinaux.....	12
1.2.1.3. Les structures supraspinales.....	12
a) La formation réticulée et les voies de projections descendantes.....	12

b) Les centres locomoteurs supraspinaux : la région locomotrice sous-thalamique et la région locomotrice du mésencéphale.....	15
c) Les ganglions de la base.....	18
d) Le cortex.....	19
e) Le cervelet.....	19
1.2.2. Informations sensorielles : l'influence des afférences sensorielles de type cutané.....	21
1.2.2.1. Amorçe de la locomotion par les afférences cutanées.....	22
1.2.2.2. Modulation de la locomotion par les afférences cutanées.....	23
1.2.2.3. Arrêt de la locomotion par les afférences cutanées.....	24
2. LA LAMPROIE : UN MODELE EXPERIMENTAL SIMPLE.....	26
2.1. Présentation de la lamproie.....	26
2.1.1. Les avantages du modèle.....	27
2.1.2. Le cycle locomoteur de la lamproie.....	28
2.2. Organisation de la locomotion chez la lamproie : niveau central et informations sensorielles.....	29
2.2.1. Niveau central : les motoneurones, les réseaux locomoteurs spinaux, et les structures supraspinales.....	29
2.2.1.1. Les motoneurones.....	30

2.2.1.2. Les réseaux locomoteurs spinaux.....	31
a) Les interneurones excitateurs du CGP sont responsables du rythme locomoteur.....	32
b) Les interneurones inhibiteurs du CGP sont impliqués dans le rythme locomoteur et sont responsables de l’alternance gauche- droite.....	33
c) Les cellules en bordure : neurones sensoriels sensibles à l’étirement du corps.....	35
2.2.1.3. Les structures supraspinales.....	36
a) La formation réticulée et les voies de projection descendantes.....	36
b) Les centres locomoteurs supraspinaux : la région locomotrice diencephalique et la région locomotrice du mésencéphale.....	41
c) Le pallium et les ganglions de la base.....	43
d) Le cervelet.....	44
2.2.2. Informations sensorielles de types cutanées acheminées aux cellules RS.....	45
2.2.2.1. Les récepteurs cutanés.....	45
 3. L’INTEGRATION SENSORIMOTRICE : LES PROPRIETES SYNAPTIQUES ET INTRINSEQUES DES CELLULES RS ASSOCIEES AU DECLENCHEMENT DU COMPORTEMENT DE FUITE.....	48

3.1. L'intégration de l'information sensorielle par les cellules RS	
de la lamproie.....	48
3.1.1. La locomotion de fuite déclenchée par les afférences sensorielles.....	48
3.1.2. Les cellules RS : neurones de commande.....	49
3.1.3. Activation des cellules RS par les afférences sensorielles d'origine	
cutanée.....	51
3.2. Mise en évidence des propriétés de plateau.....	54
3.2.1. Le plateau.....	54
3.2.2. La bistabilité.....	55
3.3. Le déclenchement des dépolarisations soutenues des cellules du MRRN chez la	
lamproie.....	57
3.3.1. Rôle des afférences synaptiques dans l'induction des dépolarisations	
soutenues.....	57
3.3.2. Les propriétés intrinsèques responsables de l'apparition des	
dépolarisations soutenues	59
3.3.2.1. Le courant cationique non sélectif activé par le Ca^{2+} : I_{CAN}	59
3.4. Les réserves internes de calcium du réticulum endoplasmique	
lisse.....	62
3.4.1. Les canaux de libération de calcium (RyR) des réserves	
internes.....	62
3.4.2. La contribution des RyR dans les plateaux de différentes	
espèces.....	63

3.4.3. La libération du calcium induite par le calcium.....	64
4. MODULATION DE L'ACTIVITE DES CELLULES DE LA FORMATION RETICULEE PAR LES AFFERENCES SYNAPTIQUES.....	66
4.1. La contribution des afférences spinales.....	67
4.2. La contribution de la région locomotrice mésencéphalique (RLM).....	68
4.3. L'influence du système sérotoninergique	69
5. BUT DE L'ETUDE.....	70
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE.....	73
1. LES TYPES DE PRÉPARATIONS.....	74
1.1. La préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolés.....	74
1.2. La préparation semi-intacte.....	74
2. L'IMAGERIE CALCIQUE.....	75
3. LES ENREGISTREMENTS INTRACELLULAIRES.....	76
4. LE DECLENCHEMENT ET L'ENREGISTREMENT DE LA LOCOMOTION CHEZ LA LAMPROIE.....	76
5. L'APPLICATION D'AGENTS PHARMACOLOGIQUES.....	77
6. LES STATISTIQUES.....	79
CHAPITRE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	80

PUBLICATION 1.....	81
THE CONTRIBUTION OF SYNAPTIC INPUTS TO SUSTAINED DEPOLARIZATIONS IN RETICULOSPINAL NEURONS.....	81
1. ABSTRACT.....	85
2. INTRODUCTION.....	86
3. METHODS.....	88
3.1. Semi-intact lamprey preparation.....	88
3.2. Recordings and stimulation.....	89
3.3. Drug application.....	91
3.4. Data analysis.....	92
4. RESULTS.....	95
4.1. The contribution of spinal inputs to sustained depolarizations elicited in RS cells.....	95
4.2. The effects of blocking excitatory glutamatergic inputs on sustained depolarisations.....	97
4.3. The effects of glycine receptor agonist and antagonist on sustained depolarisations.....	100
5. DISCUSSION.....	103
5.1. Cooperation between intrinsic and synaptic properties.....	103
5.2. Contribution of spinal cord inputs.....	104
5.3. Glutamatergic and glycinergic synaptic inputs.....	106
6. REFERENCES.....	110

7. FIGURES AND LEGENDS.....	118
PUBLICATION 2.....	134
CA ²⁺ DYNAMICS UNDERLYING THE SENSORIMOTOR INTEGRATION OF RETICULOSPINAL NEURONS IN LAMPREYS.....	134
1. ABSTRACT.....	137
2. INTRODUCTION.....	138
3. METHODS.....	141
3.1. Animal preparation.....	141
3.2. Calcium imaging.....	142
3.3. Intracellular recordings.....	143
3.4. Sensory stimulation.....	144
3.5. Drug application.....	145
3.6. Data analysis.....	146
4. RESULTS.....	148
4.1. RS cell response to cutaneous stimulation.....	148
4.2. Summation of Ca ²⁺ responses to high frequency stimulation.....	148
4.3. Activation pattern of RS cells in response to trigeminal stimulation.....	149
4.4. RS cell depolarizing responses in the four reticular nuclei.....	150
4.5. Sensory-evoked responses in small versus large RS cells.....	151
4.6. Responses of RS to skin and trigeminal nerve stimulation.....	153

4.7. Internal Ca ²⁺ Sources are present in RS cells.....	153
4.8. Contribution of internal stores to the sustained depolarizations.....	155
5. DISCUSSION.....	157
5.1. The activation pattern of RS cells.....	157
5.2. The activity of small vs. large RS cells to trigeminal nerve stimulation.....	160
5.3. The role of internal calcium stores during sustained depolarizations.....	161
5.4. Functional implication.....	162
6. ACKNOWLEDGEMENTS.....	164
7. REFERENCES.....	165
8. FIGURES AND LEGENDS.....	171

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE/CONCLUSION.....184

1. Les plateaux et les dépolarisations soutenues: deux terminologies, un phénomène.....	187
2. Les mécanismes impliqués dans les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS.....	190
2.1. Les afférences glutamatergiques excitatrices des cellules RS provenant de diverses structures chez la lamproie.....	198
2.2. Est-ce que les récepteurs glutamatergiques ionotropiques contribuent à prolonger la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS?.....	200
2.3. Est-ce que le calcium provenant des réserves internes contribue à maintenir les dépolarisations soutenues des cellules RS?.....	205

2.3.1. Considérations pharmacologiques.....	209
2.4. Est-ce que les récepteurs glycinergiques participent à arrêter les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS ?.....	210
2.5. La coopération entre les afférences synaptiques et les propriétés intrinsèques..	214
3. Les aspects fonctionnels.....	217
3.1. Est-ce que les cellules localisées dans les quatre noyaux de la formation réticulée peuvent produire des réponses soutenues suite à une stimulation cutanée ?.....	217
3.2. Est-ce que les différents groupes de cellules RS sont recrutés de façon similaire par une stimulation cutanée?.....	221
4. Conclusions.....	227
REFERENCES.....	229
CHAPITRE 5 : ANNEXE.....	308

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Organisation générale de la locomotion.....	2
Figure 2.	Structures centrales et périphériques du système nerveux central impliquées dans la locomotion.....	10
Figure 3.	Les cellules RS de la lamproie.....	38
Figure 4.	L'activation des cellules RS par les informations sensorielles d'origine cutanée.	46
Figure 5.	La courbe stimulation-réponse des cellules RS.....	53
Figure 6	Schéma illustrant les mécanismes synaptiques et intrinsèques qui seraient impliqués dans la transformation d'une brève stimulation sensorielle en commande motrice par les cellules RS	58
Figure 7	Schéma illustrant la cascade d'événements cellulaires impliqués dans les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS de la lamproie.....	216

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HT:	5-hydroxytryptamine
AINS :	anti-inflammatoire non-stéroïdienne
AMPA:	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionate
AP-5:	2-amino-5-phosphonopentanoate
ARRN:	noyau réticulé rhombencéphalique antérieur
Ca^{2+} :	calcium
CIN:	interneurone inhibiteur commissural
CNQX :	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPG:	<i>Central Pattern Generators</i>
DPC:	diphenylamine-2-carboxylate
EMG:	électromyographique
FFA:	acide flufenamique
FRM:	formation réticulée médullaire
GABA:	Acide gamma-aminobutyrique
HRP:	<i>horse radish peroxidase</i>
I_{CAN} :	courant cationic non spécifique activé par le calcium
IIN:	interneurone inhibiteur
LIN:	interneurone inhibiteur latéral
MRN:	noyau réticulé mésencéphalique
MRRN:	noyau réticulé rhombencéphalique moyen
MPTP:	1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine

NMDA:	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
PPSE:	potentiel postsynaptique excitateur
PRRN:	noyau réticulé rhombencéphalique postérieur
REL:	réticulum endoplasmique lisse
RLD:	région locomotrice du diencéphale
RLM:	région locomotrice du mésencéphale
RLS:	région locomotrice sous-thalamique
RS:	réticulospinal
RyR:	canal de libération de calcium sensible à la Ryanodine
SNC:	système nerveux central
TTX:	tétradotoxine

A ma famille Haitiano-Marocaine

A coco...

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de ce jury de thèse : M Vincent Castellucci de l'Université de Montréal, Mme Arlette Kolta de l'Université de Montréal ainsi que M Jean-Marie Cabelguen de l'Université Bordeaux I (France) qui, en plus d'avoir pris le temps de lire cette thèse, a dû parcourir environ 6000 km pour assister à la soutenance !

Je remercie également profondément mon directeur de recherche, M Réjean Dubuc, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Avec son esprit scientifique hors pair et son souci inconditionnel du détail sur le plan professionnel, doublés d'une grande générosité sur le plan personnel, il a contribué à développer ma rigueur scientifique et mon esprit critique tout le long de mon doctorat. De plus, il a été le premier professeur à me faire bénéficier de quelques secondes de gloire sur les chaînes de télévision canadienne et française ! De ce laboratoire, je garderai de très bons souvenirs...

J'ai aussi eu la chance côtoyer de brillants futurs directeurs de recherche, à mi-chemin entre la vie étudiante et la vie de professeur et communément appelés post-doctorants, avec lesquels j'ai développé une sincère amitié. Ainsi, M Frédéric Brocard, Mme Myriam Antri, M Laurent Juvin et Mme Aude Panatier ont tous participé, de façon très significative, à ma formation doctorale, soit par la réalisation d'articles scientifiques en collaboration, soit par des discussions scientifiques très

intéressantes, soit par des précieux conseils prodigués durant la rédaction de la thèse. Par leur bagage incalculable de connaissances, leur expérience professionnelle, leur patience, leur dévouement et leur passion pour la science, ils ont su m'encadrer, me conseiller, m'encourager et aussi m'inspirer. Autant sur le plan personnel que sur le plan professionnel, ils ont été présents à différents moments importants de ma vie qui seront pour longtemps gravés dans ma mémoire...

Je ne peux pas passer sous silence l'importance de notre technicienne de laboratoire, Mme Danielle Veilleux. Grâce à sa douce personnalité, elle a toujours harmonisé les caractères hétérogènes des membres du laboratoire ! En plus d'être un correcteur d'orthographe « version améliorée », sa disponibilité, son écoute, ses conseils et ses solutions ont toujours été incontestablement appréciés. De même acabit, M François Auclair, assistant de recherche et maître anatomiste, m'a montré les techniques d'injections qui m'ont permis de réaliser de très jolis marquages en imagerie calcique. M Dominique Derjean, assistant de recherche et encyclopédie ambulante, expert des conductances et des propriétés cellulaires, ses discussions et ses conseils ont été cruciaux durant la rédaction de la thèse. M Frédéric Bernard, technicien-dessinateur, avec sa formation de design d'intérieur a su faire des merveilles de mes figures d'un esthétisme douteux et des animations dignes de plus talentueux en la matière. Je remercie également M Christian Valiquette pour tout ce qui concerne les soucis informatiques.

L'ambiance du laboratoire n'aurait pas été complète sans la présence de mes nombreux collègues de laboratoire (anciens et nouveaux). Jean-Charles Guimond qui m'a montré les techniques de dissections et avec qui j'ai affectué des escapades de plongée sous-marine et de camping. Jean-François Gariépy, toujours «du côté obscur de la force» !!!, et qui m'a offert un cadeau (qui m'a vraiment touchée) à l'image de sa passion pour l'informatique et la technologie. Mélissa St-Pierre qui me disait toujours que les «belles couleurs sur les figures, c'est très important» ! De plus, j'ai passé de très bons moments en compagnie de M James Einum, Mme Stéphanie Chevalier, M. Tanguy Boutin, Mme Joannie Gravel, M. Bruno Martel et des nombreux stagiaires d'été.

Il ne faudrait pas oublier le personnel de soutien: M Denis Sasseville, aide technique de laboratoire, qui a su me faire sourire avec le sobriquet : « merveille des antilles », ainsi que M Claude Gauthier, technicien-graphiste-photographe, avec qui j'ai longuement philosophé à propos des chances du Canadien de Montréal de se rendre à la Coupe Stanley ! De plus, Mme Joanne Payette, technicienne en gestion des dossiers étudiants, ainsi que Mme Annabelle Côté, agente de secrétariat, sont selon moi deux anges descendus du Ciel à la rescousse des étudiants, pour tout ce qui concerne les dossiers académiques !

Enfin, rien de ceci n'aurait pu être possible sans ma très précieuse famille, en commençant par mon père et ma mère : Villard et Mireille Fénelon. Ils ont été des béquilles solides qui ne m'ont jamais laissée tomber, des parents extraordinaires ! De

ce fait, ils m'ont aussi offert le plus magnifique des cadeaux : ma sœur aînée, Béatrice Fénelon, sans qui exister perdrait toute sa signification. De plus, il y a six ans, j'ai été éblouie par un rayon de soleil magrébin, qui, avec sa douceur, a fortement contribué à équilibrer ma vie. Je remercie donc Rachid Skouta (« coco ») pour sa gentillesse, son écoute, sa patience, ses encouragements et sa compréhension inconditionnelle. Je ne voudrais pas oublier mes tantes Tati Maryse, Tati Nicou, Tati Joujou, mes cousins Phil et Régis, Tonton David et ma famille au Maroc (la famille Skouta) pour leur support, même à distance. Enfin, j'éprouve de la reconnaissance envers tous mes amis, qui ont toujours été là pour moi : Pablo Lopez, Soraya Kébir, Guernica Marc, Jean-François Bussièrès, Anne-Marie Huyhn...

PREAMBULE

Problématique et présentation de la thèse

Que ce soit pour la quête de nourriture, la migration ou la fuite devant un prédateur, les animaux ont besoin de se déplacer d'un endroit à un autre, tout au long de leur vie. L'organisation générale du système responsable de la locomotion est semblable chez l'ensemble des vertébrés (figure 1). De façon générale, les mouvements de propulsion sont générés par des réseaux de neurones localisés dans la moelle épinière. Ces réseaux de neurones, connus sous le nom de « Générateurs Centraux de Patrons » ou CPG (de l'angl., « *Central Pattern Generators* »), sont sous l'influence des informations sensorielles provenant du corps ou des membres en mouvement (revues Grillner et Wallén, 1985; Rossignol, 1996; Rossignol et al., 2006). Les CPG sont activés et contrôlés par des structures nerveuses supraspinales spécialisées (Armstrong, 1986; Jordan, 1986; Grillner et Dubuc, 1988). Parmi ces structures, on compte les cellules de la formation réticulée (cellules réticulospinales, RS) qui, regroupées dans différents noyaux, représentent une des voies descendantes supraspinales. Les cellules RS reçoivent des informations synaptiques de nombreuses sources, et notamment, des informations sensorielles. Une fois activées par des informations sensorielles, les cellules RS permettent le déclenchement d'un comportement de fuite.

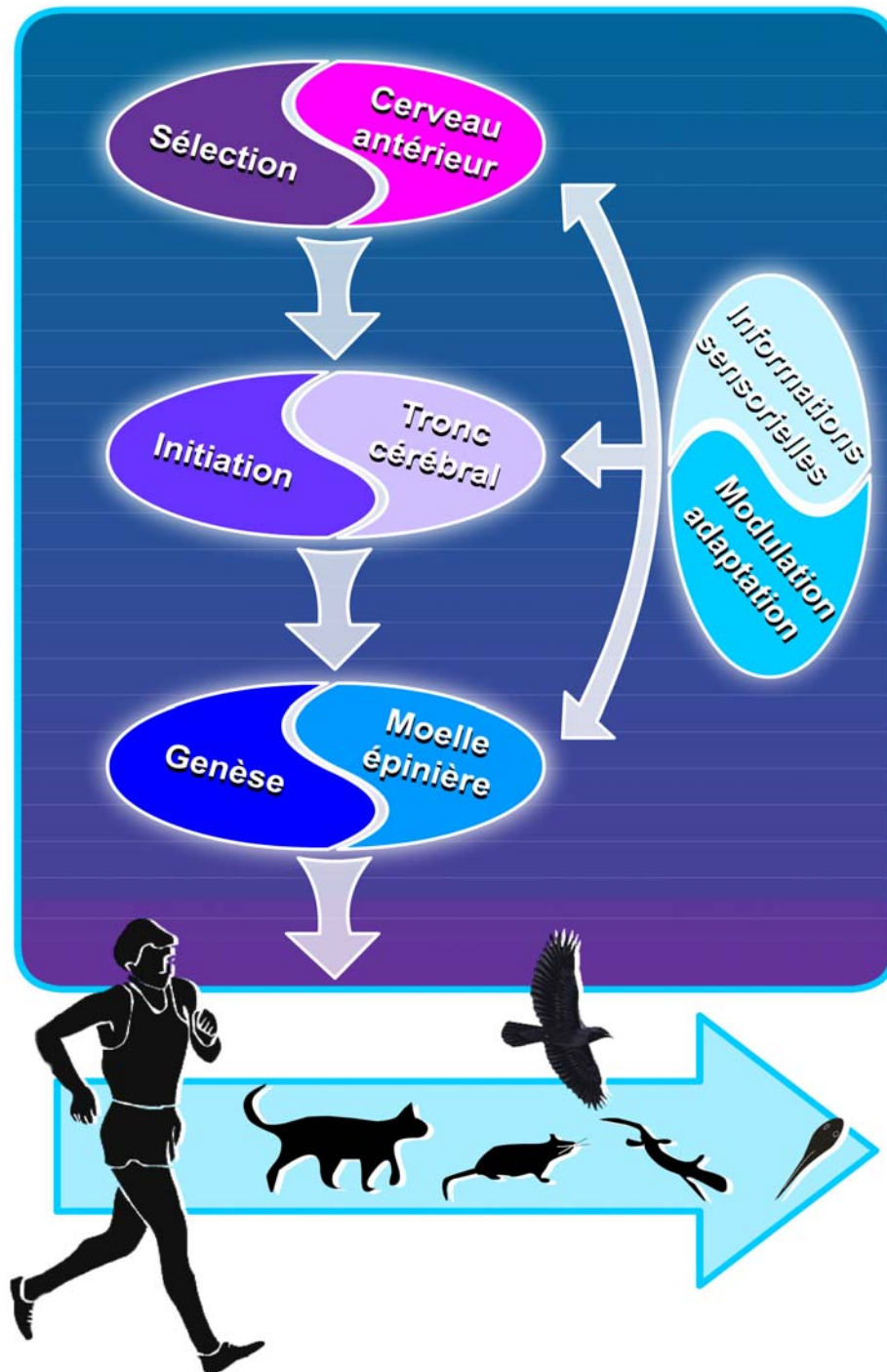


Figure 1. **Organisation générale de la locomotion.** Chez l'ensemble des vertébrés, les mouvements sont générés par des neurones spinaux sous l'influence des informations sensorielles et activés par les structures locomotrices du tronc cérébral. Les structures du cerveau antérieur permettent de sélectionner et de contrôler l'acte moteur à accomplir. Puis, les informations sensorielles agissent à tous les niveaux du système nerveux central pour initier, moduler ou arrêter la locomotion, en réponse à diverses conditions environnementales.

Vu la complexité du système nerveux des mammifères, l'utilisation de modèles « simples » comme la lamproie est requise. Ce modèle a notamment permis de décrire, dans un des quatre noyaux réticulés, les mécanismes cellulaires impliqués dans l'amorce de la locomotion déclenchée par des informations cutanées. Ainsi, dans ce noyau, il a été montré qu'une brève stimulation cutanée peut déclencher une activité cellulaire soutenue dans les cellules RS. Cette activité soutenue est associée à l'activation des réseaux locomoteurs spinaux et à l'amorce de la locomotion de fuite. Il a aussi été montré que cette activité soutenue dépend de propriétés membranaires intrinsèques, calcium-dépendantes. Or, en plus des afférences sensorielles, les cellules RS reçoivent également des informations synaptiques provenant de la moelle épinière et des régions locomotrices supraspinales, entre autre. Ainsi, nous nous sommes demandés si l'activité soutenue des cellules RS dépend uniquement des propriétés intrinsèques ou si elle dépend aussi, des informations synaptiques que reçoivent ces cellules. Ensuite, nous voulions déterminer si le comportement de fuite serait soutenu par l'activité des cellules RS localisées dans les quatre noyaux réticulés.

En utilisant la lamproie ainsi que diverses approches expérimentales, nous avons caractérisé les mécanismes synaptiques et intrinsèques impliqués dans l'émergence de l'activité soutenue des cellules RS à la base de la locomotion de fuite. Les résultats montrent que les afférences synaptiques, en plus de pouvoir déclencher l'activité soutenue des cellules RS, jouent un rôle fondamental dans le maintien de cette activité de longue durée, sous-tendue par des mécanismes intrinsèques. D'un côté, les afférences excitatrices glutamatergiques provenant notamment de la moelle épinière contribuent à prolonger l'activité soutenue des cellules RS. D'un autre côté,

les afférences inhibitrices de type glycinergique, issues notamment de la moelle épinière, ne sont pas suffisantes pour l'arrêter. De plus, les réserves internes de calcium interviennent dans cette réponse cellulaire soutenue sans toutefois être impliquées dans son maintien. Enfin, les données expérimentales montrent que l'ensemble des cellules RS possède un patron d'activation similaire en réponse à une stimulation cutanée, et ces cellules peuvent toutes exprimer une activité soutenue, susceptible d'activer les réseaux locomoteurs spinaux et de déclencher la nage de fuite.

Ces résultats sont d'une importance considérable dans le domaine de la motricité, car ils montrent que les propriétés intrinsèques agissent de concert avec les propriétés synaptiques dans l'activité soutenue des cellules RS qui sous-tendent le déclenchement des mouvements.

J'ai divisé cet ouvrage en cinq grands chapitres: une introduction générale, une section méthodologique, une section comprenant l'ensemble des résultats, une discussion générale, et une annexe.

Succinctement, dans **l'introduction**, les structures et les mécanismes nerveux impliqués dans l'organisation de la locomotion sont revus chez différents types de vertébrés, incluant la lamproie. Un accent particulier est porté sur les propriétés intrinsèques et synaptiques des cellules RS.

Puis, **la section méthodologique** porte sur les préparations de lamproie et les techniques expérimentales employées dans l'ensemble de mes travaux.

La présentation des résultats est exposée dans **le troisième chapitre**. Dans deux sections indépendantes, les objectifs majeurs sont d'abord introduits, et résumés puis les données expérimentales sont exposées sous la forme d'articles soumis.

Le quatrième chapitre consiste en une synthèse des résultats suivie d'une discussion générale orientée sur les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activité des cellules RS. Puis, les données expérimentales sont replacées dans le contexte plus large de la fonction locomotrice, suivi d'une conclusion.

En **annexe**, un article réalisé en collaboration est inséré sous forme soumise.

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

1. MÉCANISMES CENTRAUX ET PÉRIPHÉRIQUES DE LA LOCOMOTION

La locomotion permet aux animaux de se déplacer au sein de leur environnement afin d'exprimer divers comportements (alimentaires et sexuels, par exemple) (revue Grillner et al., 2000). Définie comme étant une activité motrice rythmique impliquant plusieurs muscles activés et contrôlés par le Système Nerveux Central (SNC), la locomotion permet "le déplacement du centre de gravité le long d'une voie minimisant la perte d'énergie" (revue Vaughan, 2003). Au début du 20^e siècle, les expériences menées sur le chat *in vivo* ont notamment permis de décrire l'organisation générale de la locomotion, c'est-à-dire, comment les patrons locomoteurs sont déclenchés, modulés et arrêtés par une interaction entre des structures supraspinales, les réseaux locomoteurs spinaux et des systèmes sensoriels (Grillner, 1981; Orlovski et al., 1999; Shik et Orlovsky, 1976; revue Grillner, 2003). Bien que les études utilisant ce modèle animal aient longtemps dominé dans le domaine des neurosciences, d'autres modèles animaux plus simples tels que le rat nouveau-né, le têtard de grenouille, la tortue, la salamandre et la lamproie ont été développés depuis environ 40 ans et ont permis de décrire les mécanismes cellulaires impliqués dans l'amorce, la modulation et l'arrêt de la locomotion (revue Grillner et Wallén, 1999).

Dans cette section, le cycle locomoteur de plusieurs vertébrés sera d'abord décrit. Puis, les notions générales de l'organisation et du contrôle de la locomotion par le SNC seront revues. La section suivante sera dédiée aux structures du SNC

impliquées dans la fonction locomotrice de la lamproie, modèle expérimental que j'ai utilisé tout au long de mon travail doctoral

1.1. Le cycle locomoteur chez différents vertébrés

Chez les quadrupèdes (chien, chat, lapin, rat, salamandre) et les bipèdes (oiseau et homme), le cycle locomoteur implique l'activation alternée des muscles fléchisseurs et extenseurs (Borelli, 1680 ; Philippon, 1905; Viala et Buser, 1969; Atsuta et al., 1990; Gatesy et Biewener, 1991; Goudard et al., 1992; Rossignol, 1996; Navarette et al., 2002; revues Rossignol et al., 2004a,b; revue Clarac, 2008). Divisé en phases d'appui (membre posé au sol) et de transfert (débutant lorsque le membre quitte le sol et se terminant au moment de son contact avec le sol), le cycle locomoteur permet la réalisation d'un pas, en deux temps. Chez certains animaux comme l'oiseau et la salamandre, une locomotion bimodale peut être observée. Dans ce cas, la marche coexiste avec un autre type de locomotion tel que le vol (Gatesy et Biewener, 1991) ou la nage (Frolich et Biewener, 1992; Delvolvé et al., 1997). Chez les vertébrés aquatiques au corps anguilliforme, incluant certains amphibiens embryonnaires (le têtard de grenouille) ou adultes (la salamandre), le cycle de nage implique la contraction alternée des muscles (myotomes) homologues localisés de chaque côté du corps (Grillner, 1974; Blight, 1976, 1977; Frolich et Biewener, 1992; Delvolvé et al., 1997). L'activation séquentielle de ces muscles de la tête vers la queue produit une courbure latérale du corps et un mouvement ondulatoire qui propulse l'animal vers l'avant (Gray, 1933).

1.2. Organisation de la locomotion : niveau central et informations sensorielles

Malgré l'existence de divers patron locomoteurs, la locomotion est organisée de façon similaire chez l'ensemble des vertébrés. Elle résulte d'une interaction constante et dynamique entre un **niveau central**, comprenant des structures spinales et supraspinales, et des **informations sensorielles**, provenant de diverses afférences (figure 2).

Le **niveau central** comprend : **1)** les corps cellulaires de groupes de motoneurones spinaux responsables de la contraction des muscles squelettiques et activés par **2)** des réseaux de neurones spinaux responsables du rythme et du patron locomoteurs, activés et contrôlés par **3)** des structures supraspinales qui reçoivent, en retour, des informations concernant l'activité locomotrice générée au niveau spinal, par le biais de voies de projections spinales ascendantes. Les **informations sensorielles** sont issues **1)** des afférences sensorielles provenant des muscles, de la peau et des organes sensoriels ainsi que **2)** des axones des motoneurones. Ces afférences périphériques agissent au niveau spinal et/ou supraspinal pour déclencher, réguler ou terminer l'acte moteur. Ces afférences périphériques transmettent des informations au niveau central concernant les conditions externes (position d'une proie, dangers, obstacles) et/ou internes (position du corps dans l'espace, contraction des muscles) de l'animal. Organisée de cette façon, la locomotion peut être modulée à différents niveaux afin d'être adaptée à diverses conditions.

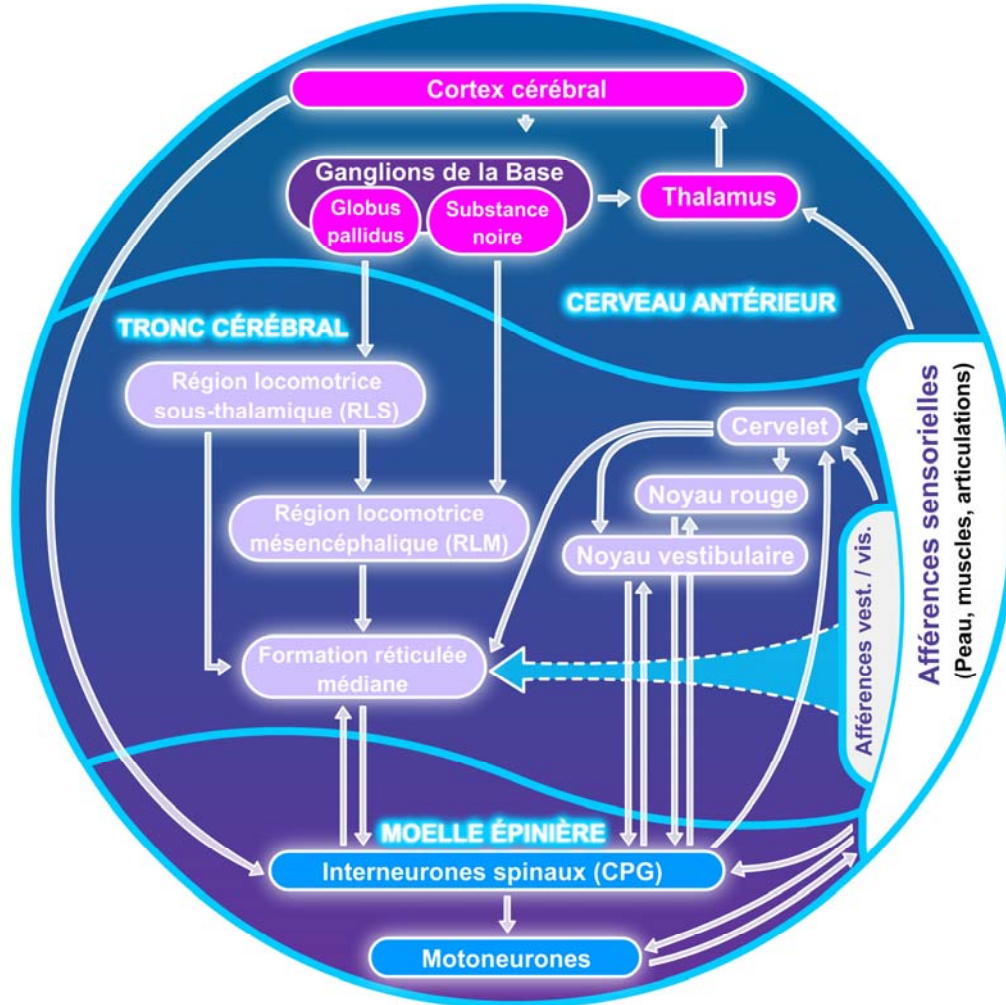


Figure 2. **Structures centrales et périphériques du système nerveux central, impliquées dans la locomotion.** Les structures spinales (interneurones spinaux et corps cellulaires des motoneurones) et supraspinales (localisées dans le tronc cérébral et le cerveau antérieur) sont en constante interaction avec des informations sensorielles provenant de nombreuses sources (muscles, peau, et organes sensoriels, collatérales de motoneurones). Vest. : vestibulaires; vis. : visuelles.

1.2.1. Le niveau central : les motoneurones, les réseaux locomoteurs spinaux et les structures supraspinales

Bien que les structures supraspinales ainsi que les voies descendantes soient responsables de l'amorce et du contrôle de la locomotion, ce sont toutefois les motoneurones et les réseaux de neurones spinaux qui sont essentiels à l'exécution des commandes motrices.

1.2.1.1. Les motoneurones

Les motoneurones activent les fibres musculaires extrafusales et intrafusales (fibres β et γ) pour déclencher la contraction complexe des muscles squelettiques (Dale et al., 1936). Certains considèrent que les motoneurones ne font pas partie des groupes de neurones spinaux (voir section « **1.2.1.2. Les réseaux locomoteurs spinaux** » plus bas) qui sont responsables de générer le patron locomoteur. Des travaux ont toutefois montré que la stimulation électrique des axones des motoneurones lombaires peut déclencher une locomotion fictive (en absence de mouvements des membres) sur une préparation *in vitro* de moelle épinière isolée, chez la souris nouveau-née (Mentis et al., 2005). De façon intéressante, en plus de pouvoir déclencher la locomotion, les motoneurones seraient aussi impliqués dans la modulation de la locomotion, selon des données antérieures obtenues chez les vertébrés aquatiques. Dans ces préparations, les collatérales d'axones des motoneurones induisent une excitation récurrente dans d'autres motoneurones et dans des interneurones excitateurs spinaux (Perrins et Roberts, 1995a, b).

1.2.1.2. Les réseaux locomoteurs spinaux

Au niveau spinal, il existe des réseaux de neurones qui sont capables de produire un patron locomoteur rythmique qui sera transmis aux motoneurones et ce, même en absence d'entrées sensorielles. Ces réseaux de neurones, appelés **CPG** ou **générateurs centraux de patrons** sont composés d'**interneurones excitateurs et inhibiteurs** responsables du rythme et du patron locomoteurs, c'est-à-dire, l'alternance gauche/droite et la coordination fléchisseur/extenseur (revue Kiehn, 2006). Ces interneurones ont été amplement décrits aussi bien chez les mammifères (revue Kiehn, 2006) que chez les modèles de vertébrés inférieurs (Stein et al., 1995; Yoshida et al., 1998; Soffe et al., 2001; revue Grillner, 2003; revues Roberts et al., 2008 a, b).

1.2.1.3. Les structures supraspinales

a) La formation réticulée et les voies de projections descendantes

Les réseaux de neurones spinaux et les motoneurones sont activés par des commandes motrices provenant de voies descendantes. Au niveau du tronc cérébral, les voies de projections descendantes sont impliquées dans **1)** l'amorce des mouvements mais aussi dans **2)** le maintien de l'équilibre et de la posture au cours de la locomotion.

Tout d'abord, le faisceau ventrolatéral fait partie des voies de projections descendantes qui projettent jusqu'aux segments lombaires de la moelle épinière et qui sont impliquées dans l'amorce des mouvements (Nyberg-Hansen, 1965; Peterson et al., 1975). En effet, chez le chat décérébré, l'intégrité du faisceau ventrolatéral est

essentiel au déclenchement de la locomotion (Afelt, 1974; Steeves et Jordan, 1980; Eidelberg et al., 1981). Le faisceau ventrolatéral a été amplement décrit chez le chat ainsi que chez plusieurs autres espèces animales comme étant issu de la formation réticulée (Steeves et al., 1987; Webster et Steeves, 1991; Garcia-Rill et al., 1990; Eidelberg et al., 1981; Magnuson et al., 1995). Par exemple, chez le têtard de grenouille (*Xenopus*), il existe une voie de projection ventrale descendante issue de la formation réticulée (Roberts et Alford, 1986; Li et al., 2006; revue Roberts et al., 2008a) qui excite les neurones spinaux normalement actifs durant la nage (Dale et Roberts, 1985; Li et al., 2006; revue Roberts, 2000). La formation réticulée médullaire (FRM) constitue donc l'origine d'une voie de projection descendante impliquée dans l'amorce des mouvements volontaires et complexes ainsi que dans le contrôle de la posture et des réflexes médullaires. Selon des travaux antérieurs, la stimulation électrique ou pharmacologique de cette région induit de la locomotion, bien qu'irrégulière, chez le chat décérébré (Jordan, 1986). La formation réticulée est formée de plusieurs groupes de neurones regroupés en noyaux qui s'étendent en colonnes, du mésencéphale au bulbe rachidien (Newman, 1985a, b). Elle a été décrite chez de nombreuses espèces animales telles que le chat (Orlovski, 1970; Kuypers et Maisky, 1977; Drew et al., 1986; Drew, 1991), le rat (Leichnetz et al., 1978; Kinjo et al., 1990), le lapin (Blessing et al., 1981), l'oiseau (Steeves et al., 1987; Sholomenko et al., 1991a,b), la salamandre (Iwahori et al., 1992), le têtard de grenouille (ten Donkelaar et de Boer-van Huizen, 1982; Roberts et Alford, 1986), la raie (Livingston et Léonard, 1990; Bernau et al., 1991), et la lamproie (Rovainen, 1967a, 1974a, 1979; Nieuwenhuys, 1972; Swain, et al., 1993; Bussièrès, 1994; revue Brodin et al., 1988).

Le pouvoir intégrateur de la formation réticulée a été mis en évidence par des études anatomiques décrivant les nombreuses afférences que reçoit cette région. Chez les mammifères, la formation réticulée reçoit des afférences spinales et diverses afférences sensorielles, en plus de pouvoir être activée par des structures supraspinales, tels que les centres locomoteurs (voir plus bas : « b) Les centres locomoteurs supraspinaux : la région locomotrice sous-thalamique et la région locomotrice du mésencéphale ») (Peterson et al., 1974; Armstrong, 1986). D'un côté, chez plusieurs espèces de vertébrés, l'activation de la formation réticulée par des afférences sensorielles permet le déclenchement d'une locomotion dite « de fuite » (McClellan, 1986; revue Jordan, 1986). Ce comportement permettrait à l'animal de s'éloigner rapidement de la source de la stimulation. D'un autre côté, il a été proposé que l'activation de la formation réticulée par les centres supérieurs peut produire une locomotion ayant pour but de répondre aux besoins internes de l'animal suivant divers contextes comportementaux (Sinnamon, 1993; revue Jordan, 1998).

Parallèlement au faisceau ventrolatéral, le faisceau dorsolatéral constitue une autre voie de projection descendante, issu de la région locomotrice bulbo-pontique. Selon certains, la région locomotrice bulbo-pontique ferait partie d'un système sensoriel de type cutané (le système trigéminal), capable d'activer les réseaux locomoteurs spinaux (Garcia-Rill, 1986 ; Jordan, 1986 ; Noga et al., 1988). Bien que la stimulation du faisceau dorsolatéral puisse produire des bouffées locomotrices (Noga et al., 1988), cette région du tronc cérébral ne serait pas essentielle au déclenchement de la locomotion (Noga et al., 1991). Le faisceau dorsolatéral serait

plutôt impliqué dans la coordination interpendiculaire chez les animaux intacts (Bem et al., 1995 ; Górska et al., 1993).

Enfin, il existe des voies descendantes qui sont responsables de maintenir l'équilibre et la posture au cours de la locomotion en ajustant en permanence la balance entre la contraction des muscles extenseurs et fléchisseurs. Ainsi, les projections provenant du noyau vestibulaire latéral (noyau de Deiters) terminent leur course au niveau spinal où elles induisent une augmentation de l'activité des muscles extenseurs antigravitaires durant la locomotion (Orlovsky, 1972a, b ; Orlovsky et Pavlova, 1972 ; Leblond et al., 2000). A l'inverse, la formation réticulée pontique ainsi que les fibres de la voie rubrospinale, issues des noyaux rouges, activent les muscles fléchisseurs (Orlovsky, 1972a, c ; Lai et Siegel, 1990 ; Lavoie et Drew, 2002). Les noyaux rouges reçoivent des informations sensorielles de la peau et des articulations, ainsi que des informations concernant l'activité des réseaux locomoteurs spinaux, ce qui permet aux noyaux rouges de moduler l'activité motrice (Vinay et Padel, 1990 ; Vinay et al., 1993). En effet, chez le chat, une suppression de l'influence des noyaux rouges au niveau de la moelle épinière (transection intercolliculaire) provoque une rigidité de décérébration (Sherrington, 1906). Ceci abolit la locomotion, dû à une hyperactivité des muscles extenseurs au niveau spinal.

b) Les centres locomoteurs supraspinaux : la région locomotrice sous-thalamique et la région locomotrice du mésencéphale

Comme il a été mentionné ci-dessus, en plus de pouvoir être déclenchée par les afférences sensorielles, la locomotion peut aussi être déclenchée par les besoins

internes de l'animal dans différentes situations comportementales, telles que la quête de nourriture, l'exploration ou la reproduction, mais aussi l'attaque d'une proie et la défense contre un danger (revue Sinnamon, 1993; revue Jordan, 1998). Dans ce contexte, deux régions locomotrices supraspinales activent la formation réticulée et seraient d'une importance considérable dans le déclenchement d'une locomotion dite « avec un but » : la région locomotrice sous-thalamique du diencéphale, et la région locomotrice du mésencéphale.

Le diencéphale est une structure supraspinale impliquée dans le maintien de l'équilibre et exerce un rôle important dans le déclenchement de la locomotion. En effet, des chats ayant subi une ablation du diencéphale présentent une perte du contrôle de l'équilibre et sont initialement incapables de déclencher des mouvements volontaires (Sirota et Shik, 1973; cité dans Shik et Orlovsky, 1976). De plus, au niveau du diencéphale, une région semble particulièrement importante dans le déclenchement de la locomotion contrôlée: la région locomotrice sous-thalamique (RLS) (Orlovsky, 1969; revue Whelan, 1996). En effet, des expériences menées sur des rats et sur des chats intacts ont montré que la stimulation électrique de cette région déclenche la locomotion (Parker et Sinnamon, 1983; Milner et Mogenson, 1988; Mori et al., 1989; revue Sinnamon, 1993). Puisque chez le rat, une projection directe entre la région locomotrice sous-thalamique et la formation réticulée tronc cérébral a été décrite, il a été proposé que la région locomotrice sous-thalamique projette sur différentes régions du tronc cérébral afin de déclencher la locomotion (Schwanzel-Fukuda et al., 1984). Selon une hypothèse, la région locomotrice sous-

thalamique activerait (par désinhibition) une région locomotrice localisée au niveau du mésencéphale (revue Garcia-Rill, 1986).

Au niveau du mésencéphale, la stimulation électrique ou pharmacologique de la région locomotrice mésencéphalique (RLM) déclenche aussi une activité motrice chez des animaux décérébrés. Initialement découverte chez le chat (Shik et al., 1966), la stimulation électrique de cette région induit une activité locomotrice directement proportionnelle à l'intensité de la stimulation. En effet, l'augmentation progressive de l'intensité de la stimulation de la RLM permet de passer de la marche, au trot puis au galop. Cette région, localisée 2 mm sous le collicule inférieur chez le chat, comprend le noyau pedunculo pontin, le noyau cunéiforme caudal et le brachium conjunctivum (revue Whelan, 1996). Depuis sa découverte chez le chat, une région locomotrice similaire et localisée dans le tronc cérébral a été décrite chez différents vertébrés tels que: le rat (Skinner et Garcia-Rill, 1984; Garcia-Rill et al., 1990; Bedford et al., 1992; Coles et al., 1989; Parker et Sinnamon, 1983), le cobaye (Marlinskii et Voitenko, 1992), le lapin (Corio et al., 1993), le singe (Eidelberg et al., 1981; Hultborn et al., 1993), l'oiseau (Steeves et al., 1987; Sholomenko et al., 1991a), la salamandre (Cabelguen et al., 2003), la raie (Bernau et al., 1991), et la lamproie (Sirota et al., 2000; voir aussi Paggett et al., 2004). Certaines données cliniques suggèrent même la présence de la RLM chez l'homme (Caplan et Goodwin, 1982; Masdeu et al., 1994; Zweig et al., 1987; Hanna et Frank, 1995). L'activation de la RLM induit la marche chez les mammifères, le vol chez l'oiseau et la nage chez les cyclostomes et les poissons (revue Dubuc et al., 2008). La RLM sous-tend également la locomotion bimodale de la salamandre et de l'oiseau. Son activation déclenche un patron

locomoteur de marche à une faible intensité de stimulation, à des intensités de stimulation plus élevées, une activité de nage avec les membres repliés vers l'arrière le long du corps chez la salamandre (Cabelguen et al., 2003) ou le battement des ailes chez l'oiseau (Steeves et al., 1987).

Ainsi, les centres locomoteurs activent la formation réticulée pour déclencher la locomotion. Ces centres locomoteurs sont toutefois sous l'influence de structures localisées dans le cerveau antérieur, telles que les ganglions de la base et le cortex. Sans être indispensables au déclenchement de la locomotion, ces structures sont notamment impliquées dans le contrôle et la sélection de l'acte moteur à accomplir.

c) Les ganglions de la base

Structure du cerveau antérieur, les ganglions de la base exercent un rôle très important dans le contrôle et la sélection du comportement locomoteur (revue Takakusaki et al., 2004; revue Grillner et al., 2005). En effet, un dysfonctionnement de l'activité des ganglions de la base peut provoquer une incapacité d'initier des mouvements volontaires (ex. : maladie de Parkinson) ou encore, une motricité excessive et involontaire (ex. : maladie de Huntington). Ils sont responsables de l'inhibition GABAergique des structures locomotrices du diencephale et du mésencéphale. Ainsi, la levée de cette inhibition permettrait le déclenchement de la locomotion.

d) Le cortex

En projetant sur les ganglions de la base et au niveau spinal, le cortex exerce une grande influence à la fois sur la programmation des mouvements et sur la posture, sans toutefois être indispensable au déclenchement de la locomotion. D'un côté, le cortex moteur est nécessaire à l'exécution d'une tâche motrice impliquant le placement bien précis des membres comme la pose d'une patte sur un grillage ou sur les barreaux d'une échelle (Trendelenberg, 1911; Liddell et Phillips, 1944). De plus, les projections corticales sont impliquées dans la remise à zéro du cycle locomoteur (Orlovsky, 1972a) ainsi que dans les ajustements posturaux du tronc (Orlovsky et al., 1999; Zelenin et al., 2003; Beloozerova et al., 2005). D'un autre côté, l'ablation du cortex moteur ne perturbe pas la marche du chat (animal décortiqué) posé sur un tapis roulant ou sur un sol sans obstacle (Chambers et Liu, 1957; Dubrovsky et al., 1974; Beloozerova et Sirota, 1993). Cet animal produit des mouvements spontanés et dirigés, avec seulement quelques déficits mineurs. Il est aussi capable de supporter son poids et de garder l'équilibre.

Enfin, il existe une structure supraspinale responsable du contrôle de l'équilibre et qui informe les structures supraspinales de l'activité motrice en cours générée au niveau spinal.

e) Le cervelet

Par l'intermédiaire de ses projections ascendantes au niveau du tronc cérébral, le cervelet déclenche des ajustements automatiques afin de maintenir l'équilibre de l'animal et d'empêcher la perturbation de l'activité motrice en cours. En effet, l'absence de cervelet engendre des mouvements imprécis et sans coordination chez le chat, induit l'incapacité de poser correctement la patte sur les barreaux d'une échelle, et empêche la réalisation de tâches requérant des ajustements moteurs guidés par des indices visuels (Orlovski et Shik, 1976; Arshavsky et al., 1978a, b; revue Armstrong et Marple-Horvat, 1996).

Le cervelet est activé par les projections provenant du faisceau spino-cérébelleux dorsal qui véhicule des informations sensorielles proprioceptive du corps et qui renseigne le cervelet sur le mouvement effectué ou en cours de réalisation (Lundberg et Oscarsson, 1960 ; Arshavsky et al., 1972a, b). Une copie efférente provenant des CPG spinaux est aussi envoyée au cervelet par l'intermédiaire du faisceau ascendant spino-cérébelleux ventral et par la voie spino-réticulo-cérébelleuse qui acheminent des informations concernant le mouvement (Lundberg, 1971 ; Arshavsky et al., 1978a, b). Le cervelet compare ensuite les informations concernant le mouvement programmé au mouvement réellement accompli. Des signaux correcteurs peuvent alors être envoyés par le cervelet aux CPG spinaux par les voies descendantes réticulospinales, vestibulospinales, et rubrospinales (Arshavsky et al., 1986). De plus, une région locomotrice, qui jouerait aussi un rôle dans le contrôle de la posture, a été identifiée dans le cervelet de chat (Mori et al., 1998, 1999). Enfin, un cervelet primitif a été anatomiquement décrit chez de nombreux vertébrés inférieurs,

sans toutefois en préciser le rôle durant la locomotion (Straka et al., 2001 ; revue Okamoto et al., 2004).

La locomotion résulte donc de l'interaction entre des structures spinales et supraspinales. Cependant, des informations sensorielles provenant des muscles ou de la peau peuvent agir directement ou indirectement au niveau des interneurons ou des motoneurons spinaux (revue Dietz, 2002), ou activer les structures supraspinales, en empruntant des voies de projections spinales ascendantes. Ces structures supraspinales reçoivent également des afférences directes provenant des systèmes cutané, proprioceptif, visuel, vestibulaire, auditif (revue Rossignol et al., 2006). Vu la grande variété des afférences sensorielles pouvant agir durant la locomotion, je limiterai ici ma description aux afférences sensorielles de type cutané, auxquelles je me suis intéressée durant ma thèse.

1.2.2. Informations sensorielles : l'influence des afférences sensorielles de type cutané

Dans un environnement en perpétuel changement, les informations sensorielles de type cutané sont impliquées dans l'amorce, la modulation ou l'arrêt des mouvements générés au niveau central. Les informations cutanées sont acheminées au niveau du système nerveux central par le biais de l'activation du follicule pileux (chez les espèces poilues) et des mécanorécepteurs de la peau. Il existe deux types de mécanorécepteurs superficiels qui répondent à l'effleurement de la peau, à la pression et à la texture: les corpuscules de Meissner et les disques de

Merkel. Deux autres types de mécanorécepteurs plus profonds répondent à la vibration et à l'étirement de la peau: les corpuscules de Pacini et les terminaisons de Ruffini. Chez les vertébrés aquatiques, les disques de Merkel ont été observés dans l'épiderme (Whitear, (1989).

1.2.2.1. Amorce de la locomotion par les afférences cutanées

Les afférences cutanées peuvent agir directement au niveau de la moelle épinière et induire des mouvements locomoteurs. Par exemple, dans une étude réalisée sur des chats spinalisés (au niveau du 13^e segment thoracique), une stimulation sensorielle de type cutané appliquée sous forme de stimulation électrique des racines ou des colonnes dorsales (qui véhiculent les informations cutanées des membres et du tronc vers le système nerveux central) a induit une locomotion coordonnée (Barthélemy et al., 2006, 2007). De plus, la stimulation mécanique et tonique de la région périnéale du chat (scrotum, vulve, et base de la queue) a induit, de façon très efficace, une activité rythmique et alternée des membres postérieurs, 7 à 10 jours après la spinalisation (Sherrington, 1910b; Pearson et Rossignol, 1991; Rossignol et al., 2000; Barthélemy et al., 2007; Frigon et Rossignol, 2008; revue Rossignol et al., 2006).

Une information cutanée acheminée au niveau supraspinal, peut également déclencher la locomotion, comme il a été montré chez des lapins suite à la stimulation cutanée de la tête (Viala et Buser, 1974). De la même façon, la stimulation des racines dorsales ou des fibres ascendantes des colonnes dorsales a permis de déclencher des épisodes locomoteurs de façon très efficace chez des chats décérébrés

ou des lapins (Beresovskii et Baev, 1988; Viala et Buser 1969). Ces études ont montré que les informations cutanées sont acheminées jusqu'aux cellules de la formation réticulée (Viala et Buser, 1974). Puis, une fois activées, les cellules RS vont à leur tour activer les CPG locomoteurs spinaux responsables de déclencher un comportement locomoteur (Viala et Buser, 1974). Bien que la locomotion induite par la stimulation des colonnes dorsales puisse résulter de l'activation directe des CPG spinaux, Beresovskii et Baev (1988) ont indiqué qu'il est plus probable que ces fibres spinales ascendantes vers le tronc cérébral déclenchent la locomotion via l'activation synaptique des cellules RS. Une telle boucle spino-bulbo-spinale a déjà été décrite chez le chat (Shimamura et al, 1984, 1990). Cependant, dû à la complexité du système nerveux des mammifères, les mécanismes cellulaires par lesquels ces afférences cutanées initient la locomotion n'ont pas encore été mis en évidence chez cette espèce animale. Ces mécanismes ont néanmoins pu être étudiés chez des modèles de vertébrés aquatiques plus simples que les mammifères. Par exemple, chez le poisson-zèbre, la stimulation cutanée de la tête peut déclencher une nage de fuite (Fetcho et O'Malley, 1995; O'Malley et al., 1996) par l'intermédiaire de l'activité des cellules RS (Gahtan et al., 2002). Des travaux menés chez la raie ont aussi montré qu'une activité de nage peut être initiée par la stimulation du faisceau ventrolatéral, voie descendante issue de la formation réticulée (Livingston et Leonard, 1990).

1.2.2.2. Modulation de la locomotion par les afférences cutanées

Les afférences cutanées peuvent aussi moduler la locomotion, bien que les premières études de Sherrington sur des chats spinalisés aient montré que la

locomotion persiste même en absence d'informations cutanées (Sherrington, 1910a, b). En effet, le rôle principal des afférences cutanées consiste à corriger les réponses motrices suite à une perturbation du mouvement en repositionnant correctement le pied ou le membre. Par exemple, durant la marche d'un chat intact, une stimulation cutanée appliquée sur la partie dorsale d'un membre alors que celui-ci se retrouve au-dessus du sol (simulant le contact avec un obstacle) peut induire une flexion exagérée du genou en réponse au déséquilibre causé (Forssberg, 1979). Le pied s'éloigne alors de l'obstacle permettant à l'animal d'enjamber l'obstacle en évitant de trébucher. Lorsque cette stimulation est appliquée pendant que le pied est posée sur le sol, l'extension du membre est alors exagérée, ce qui permet à l'animal de garder l'équilibre. L'importance des afférences sensorielles dans le positionnement du pied lors de la locomotion a aussi été récemment démontrée chez des chats intacts dénervés (cinq nerfs cutanés ayant été sectionnés) qui s'adaptent et marchent normalement sur un tapis roulant (Bouyer et Rossignol, 2003a, b). Cependant, ces chats sont incapables de placer normalement les membres sur les barreaux d'une échelle horizontale. Enfin, des expériences menées chez le rat, le lapin et le chat ont établi l'importance des afférences cutanées dans le contrôle de la posture du tronc durant la locomotion (Beloozerova et al., 2003; Deliagina et al., 2000; Inglis et Macpherson, 1995; Stapley et al., 2002; Karayannidou et al., 2008).

1.2.2.3. Arrêt de la locomotion par les afférences cutanées

En plus de pouvoir déclencher et moduler la locomotion, une stimulation cutanée peut également être associée à l'arrêt d'un acte moteur (Viala et Buser, 1974;

Viala et al., 1978). En effet, des expériences menées chez les lapins ont montré que l'activation des informations cutanées au niveau lombaire par la pression ou le pincement de la peau du dos par exemple peut arrêter la locomotion (Viala et Buser, 1974). Cependant, les mécanismes impliqués n'ont pas encore été détaillés au niveau spinal. A l'inverse, au niveau supraspinal, les mécanismes cellulaires qui soutiennent l'arrêt de la locomotion par une stimulation sensorielle ont été décrits chez les batraciens (revue Roberts et al., 2008b). Le têtard de grenouille possède des cellules RS inhibitrices rhombencéphaliques, nommées interneurones réticulospinaux inhibiteurs (Roberts et Blight, 1975; Roberts, 1980; Perrins et al., 2002), qui sont inhibées durant la locomotion et activées par la stimulation (électrique ou mécanique) des afférences sensorielles provenant de la peau ou de la glande cémentaire. L'activation de ces cellules RS inhibitrices arrête la locomotion fictive car elles envoient des projections GABAergiques au niveau spinal sur les motoneurones ventraux et sur les interneurones prémoteurs responsables de la nage (Roberts et al., 1987; Li et al., 2003). Au niveau fonctionnel, une telle sensation cutanée a été associée à une situation où, au contact d'un obstacle dans son milieu naturel, l'animal arrête de nager.

La compréhension de l'organisation nerveuse de la locomotion a grandement progressé grâce aux expériences sur différents types de préparations. Cependant, la complexité du système nerveux des mammifères a limité les études de la locomotion à l'échelle cellulaire. En effet chez les mammifères, il est difficile d'identifier de façon détaillée les neurones impliqués, leurs interactions synaptiques (incluant

neurotransmetteurs et récepteurs) et leurs propriétés membranaires intrinsèques (canaux ioniques). Ainsi, d'autres modèles animaux plus simples ont été développés (revue Grillner et Wallén, 1999) et dans ce chapitre, ils ont été mentionnés à quelques reprises pour illustrer certains exemples. La lamproie est l'un de ces modèles simples sur lequel j'ai travaillé durant le doctorat. Ce modèle, ainsi que les données expérimentales relatives aux mécanismes nerveux impliqués dans l'organisation de la nage de cet animal seront décrits dans la section suivante.

2. LA LAMPROIE : UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL SIMPLE

2.1. Présentation de la lamproie

La lamproie fait partie de la classe des Cyclostomes. C'est un vertébré aquatique primitif (ou inférieur) au corps anguilliforme, au squelette cartilagineux, sans écailles ni mâchoire (Wischnitzer, 1993). Les lamproies possèdent plusieurs cycles de développement. Trois semaines après la fertilisation externe des œufs dans les cours d'eau douce, les larves (ammocètes) restent cachées dans le sable au fond des ruisseaux de trois à sept ans. Puis, elles subissent une métamorphose qui dure quelques semaines. Ces changements morphologiques permettent à la lamproie de se transformer alors en semi-parasitaire adulte (Rovainen, 1982). A ce stade, la lamproie s'accroche à d'autres poissons à l'aide d'un appareil buccal cartilagineux en forme de disque, qui comprend plusieurs rangées de dents, et au milieu duquel s'ouvre la bouche. Cette dernière lui permet d'exercer une succion adéquate pour sous-tirer sa nourriture à partir de son hôte. Après cette métamorphose, les lamproies adultes

vivent dans les grands lacs et dans les océans (en eau salée) pendant un ou deux ans, avant de retourner en eau douce pour se reproduire et mourir (Wischnitzer, 1993).

Depuis plus de 530 millions d'années, le système nerveux central (SNC) de la lamproie a été conservé au cours de l'évolution, possédant une organisation neuronale similaire à celle des mammifères, avec moins d'éléments (revue Grillner et Wallén, 1999). Très tôt au début du stade larvaire de la lamproie, des cellules du tronc cérébral et de la moelle épinière qui sont impliquées dans la nage sont déjà présentes (Whiting 1948, 1957). De par les caractéristiques anatomiques et physiologiques simples de cet animal, la lamproie est un modèle adéquat pour l'étude de l'organisation de la locomotion et qui possède plusieurs avantages.

2.1.1. Les avantages du modèle

Un des avantages de lamproie comme modèle d'étude, est que son SNC comporte des neurones non myélinisés, bien visibles par transillumination sous contrôle binoculaire, et ceci même en absence de coloration (Rovainen, 1982; revue Buchanan, 2001). La majorité de ces neurones ont une morphologie unique, une position constante et sont donc facilement identifiables d'une préparation à l'autre (Rovainen, 1967a, b). De plus, la possibilité d'isoler et de conserver le SNC de la lamproie en entier durant deux à trois jours dans une solution physiologique, *in vitro*, constitue un avantage exceptionnel (Rovainen, 1974a, b; Grillner et Wallén, 2002). De ce fait, différents types de préparations *in vitro* possédant des neurones et des réseaux moteurs fonctionnels ayant conservé leur intégrité sont utilisées, permettant

d'étudier l'organisation de la locomotion par le SNC, au niveau cellulaire (revue Buchanan, 2001).

2.1.2. Le cycle locomoteur de la lamproie

La nage de la lamproie est caractérisée par un mouvement ondulatoire rostro-caudal, en forme de « S » propulsant l'animal vers l'avant (Rovainen, 1976; Wallén et William, 1984; Grillner et Wallén, 1999). Durant la nage, en absence d'une perturbation de la position du corps ou de la tête dans l'espace, l'orientation du corps de l'animal est maintenue à la verticale, avec la partie dorsale vers le haut (Deliagina et al., 1993; Ullén et al., 1995a, b). Tout comme chez les mammifères, d'après les études pionnières de Bone, puis de Teräväinen et Rovainen, le cycle locomoteur de la lamproie consiste en une contraction suivie d'une relaxation dans chaque muscle, appelé myomère (Bone, 1966; Teräväinen, 1971; Teräväinen et Rovainen, 1971). Au cours de ces deux phases, les myomères sont activés selon une alternance gauche-droite produisant la courbure du corps d'un côté puis de l'autre. La courbure des segments spinaux consécutifs est coordonnée de façon séquentielle, avec un décalage rostro-caudal (de la tête vers la queue) constant (proportionnel à la durée du cycle locomoteur) qui propage l'ondulation tout le long du corps (Wallén et William, 1984). Pour que la lamproie nage vers l'avant, les segments spinaux les plus proches de la tête, plus excités, sont tout d'abord activés avant les autres. Puis, chaque segment spinal va être actif jusqu'au niveau de la queue. Cependant, il existe des situations où cette excitabilité est inversée au niveau spinal (Matsushima et Grillner, 1992; revue Grillner et Wallén, 2002; revue Grillner, 2003). Dans ce cas, le décalage

intersegmentaire ainsi que le mouvement ondulatoire se propageront caudo-rostralement (de la queue vers la tête) (Matsushima et Grillner, 1992). Au niveau fonctionnel, cette inversion de l'excitabilité permettra à la lamproie qui nage librement de faire marche arrière face à un obstacle. La lamproie nagera alors à reculons pendant quelques cycles locomoteurs avant de se retourner et nager vers l'avant (revue Grillner, 2003). Les mouvements rapides de la lamproie peuvent aussi être modifiés en mouvements lents et amples pour contrer une perturbation comme le contact d'une surface sablonneuse se trouvant dans sa trajectoire (revue Grillner et Wallén, 2002). Ces données biologiques concernant l'orientation du corps, la direction et le décalage intersegmentaire durant la nage ont également été analysées dans une lamproie virtuelle créée par modélisation mathématique (Ekeberg et Grillner, 1999; Kotalleski et al., 1999a, b; Kozlov et al., 2002).

2.2. Organisation de la locomotion chez la lamproie : niveau central et informations sensorielles

De la lamproie à l'homme, le système nerveux central s'est complexifié mais son organisation neuronale est restée similaire. Ainsi, la nage de lamproie implique également l'activation de structures spinales et supraspinales au **niveau central**, en étroite interaction avec des **afférences sensorielles** variées (voir Figure 2, page 9).

2.2.1. Niveau central : les motoneurones, les réseaux locomoteurs spinaux et les structures supraspinales

2.2.1.1. Les motoneurones

Dernier maillon de l'organisation de la nage de la lamproie, les motoneurones, avec leur activation alternée, déclenchent la contraction des muscles qu'ils innervent. Au niveau anatomique, les motoneurones sont organisés en colonnes longitudinales, et possèdent une arborisation dendritique en éventail orientée de façon transversale (Tretjakoff, 1909; Teräväinen et Rovainen, 1971; Tang et Selzer, 1979 ; Russel et Wallén, 1980, 1983 ; Wallén et al., 1985). Selon des travaux réalisés sur des préparations réduites, les motoneurones de la lamproie ne feraient pas partie des neurones du CPG, cependant, leur activité résulte de l'ensemble des afférences qu'ils reçoivent (Wallén et Lansner, 1983, 1984). Les motoneurones reçoivent entre autre des projections monosynaptiques glutamatergiques issues des cellules RS, ainsi que des interneurones excitateurs et inhibiteurs spinaux (revue Buchanan, 2001). Les motoneurones reçoivent aussi une excitation récurrente provenant de leurs fibres collatérales, mais une inhibition récurrente des motoneurones par des cellules de Renshaw est absente chez la lamproie (Rovainen, 1982).

Dans les motoneurones tout comme dans les interneurones de la lamproie, l'application d'agonistes glutamatergiques tels que le *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) peut déclencher une activité membranaire oscillatoire accompagnée de nage fictive dans des préparations réduites *in vitro* (Cohen et Wallén, 1980 ; Poon, 1980 ; Grillner et al., 1981). Cette activité membranaire oscillatoire consiste en une alternance entre des phases excitatrices et inhibitrices (Russell et Wallén, 1980, 1983; Buchanan et Cohen, 1982; Kahn, 1982). La phase excitatrice correspond à une dépolarisation membranaire rapide qui dépend de l'activation des récepteurs glutamatergiques

ionotropiques de type NMDA. Cette phase excitatrice se maintient quelques secondes, et est parfois accompagnée de potentiels d'action car elle implique aussi des conductances calciques voltage-dépendantes (Matsushima et al., 1993 ; Büschges et al., 2000 ; El-Manira et Bussièrès, 1997 ; revue Grillner et al., 2000). Quant à la phase inhibitrice, elle repolarise rapidement la membrane (Wallén et Grillner, 1987) par l'activation de conductances potassiques activées par le calcium (El Manira et al., 1994 ; Wikström et El Manira, 1998 ; revue Grillner, 2003). Dépendamment de la localisation des muscles qu'ils innervent, le patron d'activité oscillatoire peut différer entre les motoneurones (Wallén et al., 1985). Mais une fois activés, les motoneurones vont envoyer des projections cholinergiques ipsilatérales sur les muscles à contraction rapide et les muscles à contraction lente (Teräviäinen et Rovainen, 1971).

2.2.1.2. Les réseaux locomoteurs spinaux

La description des réseaux de neurones spinaux responsables de générer les patrons locomoteurs des vertébrés, les CPG, a été détaillée pour la première fois chez la lamproie par James Buchanan et Sten Grillner dans les années 1980s (Buchanan et Grillner, 1987; revue Grillner, 2003). Tout comme chez les vertébrés supérieurs, les neurones du CPG de la lamproie, localisés tout le long de la moelle épinière, peuvent produire le rythme de la nage, indépendamment des informations sensorielles et des commandes supraspinales (Wallén et Williams, 1984; Grillner, 1985; Buchanan et Grillner, 1987). Une seule classe d'interneurones excitateurs glutamatergiques ipsilatéraux et trois classes d'interneurones inhibiteurs glycinergiques ipsi et controlatéraux composent les CPG spinaux (Grillner et Wallén, 1980 ; Buchanan,

1982 ; Cohen et Harris-Warrick, 1984; Buchanan et Grillner, 1987 ; Alford et Williams, 1989). Les connexions synaptiques entre ces neurones, leur activité durant la locomotion fictive (en absence de mouvements) ainsi que leurs propriétés membranaires (récepteurs membranaires, canaux ioniques, neurotransmetteurs et neuromodulateurs) ont aussi été identifiées (revue Grillner 2003). Une fois activés, ces interneurones sont capables de produire un rythme locomoteur (interneurones excitateurs) ainsi qu'une alternance gauche/droite (interneurones inhibiteurs) par l'activation des motoneurones (Wallén et Lansner, 1983, 1984; Wallén et al., 1985 ; Buchanan et Kasicki, 1995; revue Buchanan, 2001).

a) Les interneurones excitateurs du CPG sont responsables du rythme locomoteur

Des préparations réduites ont permis d'identifier l'activité et le rôle des interneurones excitateurs faisant partie du CPG (Buchanan and Grillner, 1987; Buchanan et al., 1989). Durant la locomotion fictive, le potentiel membranaire des interneurones excitateurs oscille de façon rythmique en phase avec l'activité des motoneurones (Buchanan et Cohen, 1982; Buchanan et al., 1989). Les interneurones excitateurs commissuraux (dont l'axone traverse la ligne médiane) (Buchanan, 1982, 1993) ainsi que les interneurones excitateurs ipsilatéraux seraient nécessaires et suffisants pour générer le rythme (Grillner et Wallén, 1980; Cohen et Harris-Warrick, 1984; Cangiano et Grillner, 2003). En effet, dans des préparations *in vitro* de moelle épinière/notocorde isolées, une lésion longitudinale le long de la ligne médiane a graduellement séparé la moelle épinière en deux hémicordes, gauche et droite. Dans de telles conditions expérimentales et/ou lorsque la transmission glycinergique a été

bloquée (avec la strychnine) (Alford et Williams, 1989), une activité rythmique synchrone et légèrement accélérée a persisté dans chaque hémicorde (Cohen et Harris-Warrick, 1984 ; Cangiano et Grillner, 2003). L'accélération du rythme observé suite à l'inhibition de la transmission synaptique glycinergique indique aussi que les interneurons inhibiteurs participent au ralentissement du rythme.

b) Les interneurons inhibiteurs du CPG sont impliqués dans le rythme locomoteur et sont responsables de l'alternance gauche-droite

En plus de ralentir le rythme, les interneurons inhibiteurs du CPG sont responsables de l'alternance gauche-droite des segments spinaux puisque le patron locomoteur est passé d'une activité alternée à une activité synchrone, suite à l'inhibition de la transmission glycinergique (Grillner et Wallén, 1980; Cohen et Harris-Warrick, 1984; Alford et Williams, 1989; Cangiano et Grillner, 2003). Trois classes d'interneurons inhibiteurs ont été décrites: les **interneurons inhibiteurs commissuraux** (CINs, « commissural inhibitory interneurons ») (Buchanan, 1982; Buchanan et Cohen, 1982; revue Buchanan et McPherson, 1995) les **interneurons inhibiteurs** (IINs, « inhibitory interneurons »)(Buchanan et Grillner, 1988), et les **interneurons inhibiteurs latéraux** (LINs, « lateral inhibitory interneurons ») (Rovainen, 1974b, 1982; Buchanan, 1982; Buchanan et Cohen, 1982; Buchanan et Kasicki, 1995). Contrairement aux CINs, les projections des IINs et des LINs sont ipsilatérales et ne croisent pas la ligne médiane.

Durant la nage fictive, il a été montré que l'activité rythmique oscillatoire des interneurons inhibiteurs commissuraux précède les bouffées locomotrices

enregistrées au niveau des racines ventrales (Buchanan et Grillner, 1987; Buchanan et Kasicki, 1995). De plus, ces interneurons sont responsables de l'alternance gauche-droite du cycle locomoteur car cette alternance entre les deux côtés de la moelle épinière est abolie, même en présence d'interneurons glycinergiques ipsilatéraux intacts (Grillner et Wallén, 1980; Cohen et Harris-Warrick, 1984; Cangiano et Grillner, 2003).

Au niveau du CPG, il existe aussi des petits interneurons inhibiteurs (Buchanan et Grillner, 1988). Une fois activés, ils produisent des oscillations rythmiques et ils envoient des projections monosynaptiques glycinergiques qui inhibent l'activité des motoneurons ipsilatéraux. Ils inhibent aussi les interneurons inhibiteurs commissuraux qui représentent leur principale cible postsynaptique (Buchanan et Grillner, 1988; Parker et Grillner, 2000). Bien que leur rôle ne soit pas encore clairement établi, il est possible que ces petits interneurons inhibiteurs participent à la fréquence du rythme locomoteur.

Puis, au niveau des segments rostraux de la moelle épinière, on retrouve les interneurons inhibiteurs latéraux, qui possèdent une activité rythmique oscillatoire qui apparaît plus tardivement que les autres neurones spinaux, durant la locomotion (Buchanan et Cohen, 1982; Buchanan et Kasicki, 1995). Ces interneurons participent à désinhiber l'activité controlatérale. Cependant, ils ne semblent pas impliqués dans la formation du rythme et du patron locomoteur, qui persistent suite au blocage de la transmission glycinergique dans les hémicordes (Cangiano et Grillner 2003). Possédant une vitesse de conduction axonale rapide, il a donc été proposé que ces interneurons inhibiteurs latéraux jouent un rôle proprioceptif (revue

Grillner, 2003). De plus, ils sont impliqués dans une boucle d'inhibition réciproque avec les interneurons inhibiteurs commissuraux contralatéraux (Buchanan, 1982). Puisqu'ils inhibent aussi les motoneurons (Rovainen, 1982), il a été proposé que les interneurons inhibiteurs latéraux participent à l'arrêt des bouffées locomotrices (revue Grillner, 2003) en plus de leur rôle proprioceptif. Bien que ces neurones ne semblent pas indispensables à la formation du rythme locomoteur, ils ont toutefois été inclus dans les neurones faisant partie du CPG (Buchanan et Grillner, 1987).

Pendant la nage de la lamproie, les interneurons excitateurs et inhibiteurs faisant partie du CPG sont influencés par des informations intraspinales concernant les mouvements du corps.

c) Les cellules en bordure : neurones sensoriels sensibles à l'étirement du corps

A la frontière latérale de la moelle épinière il existe des neurones sensoriels, appelées **cellules en bordure** (« *edge cells* » ou « *intraspinal stretch receptors* »), sensibles à l'étirement et à la courbure du corps durant le cycle locomoteur (Grillner et al., 1982, 1984). Ces cellules, de nature excitatrice et inhibitrice, jouent un rôle proprioceptif car elles modulent l'activité des neurones du CPG. D'un côté, les cellules en bordure inhibitrices sont glycinergiques et participent à arrêter l'activité locomotrice controlatérale en inhibant les interneurons du CPG controlatéraux. D'un autre côté, les cellules en bordure excitatrices sont glutamatergiques et activent les neurones du CPG ipsilatéraux, pendant que les neurones controlatéraux sont inhibés (Viana Di Prisco et al., 1990). De plus, l'activation rythmique des cellules en bordure

est capable d'entraîner la locomotion fictive à adopter un rythme imposé plus rapide ou plus lent que celui en cours (Grillner et al., 1982; McClellan et Sigvardt, 1988; Williams et al., 1990; Vinay et al., 1996). Durant la nage fictive, le potentiel membranaire des cellules en bordure n'est toutefois que faiblement modulé (Buchanan et Cohen, 1982; Alford et al., 1990; Buchanan et Kasicki, 1995; Vinay et al., 1996).

A l'inverse, l'activité membranaire oscillatoire des neurones spinaux qui forment le CPG est rythmique et dépend de l'activation des récepteurs glutamatergiques ionotropes de type NMDA (Sigvardt et al., 1985; Wallén et Grillner, 1985, 1987; Brodin et al., 1991; revue Grillner et Wallén, 1985). Cette activité oscillatoire du potentiel de membrane est robuste (5-15 mV d'amplitude) et est intrinsèque aux cellules puisque cette activité est observée même en présence de bloqueur de la transmission synaptique, la tétrodotoxine (TTX).

2.2.1.3. Les structures supraspinales

a) La formation réticulée et les voies de projection descendantes

Chez la lamproie, comme chez l'ensemble des vertébrés, au niveau du tronc cérébral, les cellules RS, localisées dans la formation réticulée, constituent une partie très importante (90%) des voies de projections descendantes vers la moelle épinière. Ainsi, en activant les réseaux locomoteurs spinaux, les cellules RS jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le contrôle de la locomotion, ainsi que dans les ajustements posturaux.

Des critères histologiques ont permis la localisation et la description anatomique des cellules RS de la lamproie. La grande majorité des cellules RS a le corps cellulaire localisé près de la surface ventriculaire et possède une arborisation dendritique qui s'étend transversalement dans la plaque basale. De plus, au niveau de la moelle épinière, l'application de la peroxydase du raifort (de l'angl. *horse radish peroxidase* ou HRP; Ronan, 1989; Swain et al., 1993, 1995; Bussièrès, 1994; Davis et McClellan, 1994a,b) ou du cobalt-lysine (Bussièrès, 1994) comme marqueurs rétrogrades a permis d'établir que les cellules RS envoient des projections descendantes à tous les niveaux (différents segments) de la moelle épinière. Les cellules RS sont regroupées en quatre noyaux, un noyau mésencéphalique et trois noyaux rhombencéphaliques (figure 3): **1)** les cellules de Müller du noyau réticulé mésencéphalique (MRN), **2)** les cellules isthmiques de Müller du noyau réticulé rhombencéphalique antérieur (ARRN), **3)** les cellules de Müller et de Mauthner du noyau réticulé rhombencéphalique moyen (MRRN) et **4)** les cellules du noyau réticulé rhombencéphalique postérieur (PRRN). Les études pionnières de Rovainen (Rovainen, 1967a; Rovainen et al., 1973; Rovainen, 1978) ont montré que dans chaque noyau, plusieurs cellules RS sont pairées et sont localisées de façon symétrique et bilatérale.

La grande majorité des cellules RS du rhombencéphale (ARRN, MRRN et PRRN) projettent ipsilatéralement vers la moelle épinière. Cependant, toutes les cellules RS du mésencéphale (MRN), 30% des cellules de l'ARRN, 20% des cellules du MRRN (incluant les cellules de Mauthner) et 16% des cellules du PRRN projettent controlatéralement. Le gros diamètre des corps cellulaires observés dans l'ARRN et

le MRRN facilite leur localisation dans la région pontine du rhombencéphale. Ces cellules, ainsi que celles du MRN, envoient leurs projections *médialement* vers la moelle épinière. Les neurones du PRRN sont localisés dans la région bulbaire du rhombencéphale, et projettent *latéralement* au niveau spinal (Rovainen, 1967a, b; Ronan, 1989; Bussières, 1994; revue Brodin et al., 1988).

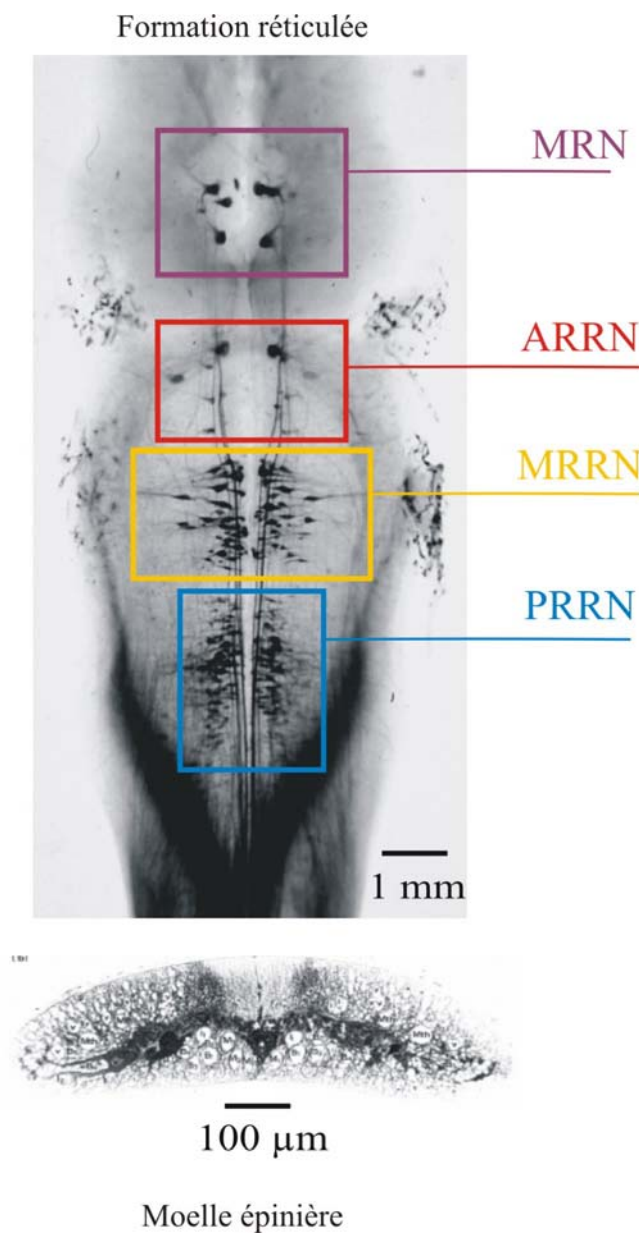


Figure 3. **Les cellules RS de la lamproie.** Photographie des cellules de la formation réticulée marquées par le transport rétrograde du cobalt-lysine appliqu e au niveau des segments rostraux de la moelle épinière. Les cellules RS sont regroupées de façon bilatérale, en quatre noyaux: le noyau réticulé mésencéphalique (MRN), et les noyaux rhombenc ephaliques antérieur (ARRN), moyen (MRRN) et postérieur (PRRN). Dans chaque noyau, plusieurs cellules RS sont pairées et localisées de façon symétrique. Les études de marquages rétrogrades ont permis de montrer que les cellules RS projettent vers la moelle épinière. (Tir e de Dubuc et al., 1993b; Rovainen, 1982).

Des marquages intracellulaires ont également permis de décrire la morphologie des cellules RS localisées dans les quatre noyaux réticulés (Martin, 1979; Swain et al., 1993; Bussièrès, 1994; revue Brodin et al., 1988). Les noyaux réticulés possèdent des cellules RS ayant une morphologie hétérogène, avec des diamètres allant de 5-10 μm à 150 μm (Swain et al., 1993; Bussièrès, 1994). Ces neurones possèdent toutefois des caractéristiques communes : leur arborisation dendritique s'étend majoritairement de façon latérale au niveau du mésencéphale (MRN, ARRN) et du rhombencéphale (MRRN, PRRN), à proximité des axones de neurones sensoriels secondaires qui sont activés par des modalités variées (somatosensorielle, visuelle, vestibulaire et de la ligne latérale). De plus, les cellules du MRRN et du PRRN de grosse taille projettent leurs dendrites au niveau de nombreuses projections spinales ascendantes et descendantes.

Chez la lamproie, en plus des cellules RS, il existe un autre système descendant qui projette vers les réseaux locomoteurs spinaux de façon monosynaptique et bilatérale : le système vestibulospinal (Rovainen, 1982). Les cellules vestibulospinales ont leur corps cellulaires localisés latéralement, au niveau du noyau réticulé rhombencéphalique moyen (MRRN), proche des cellules de Mauthner. Elles innervent le labyrinthe ipsilatéral et leur arborisation dendritique s'étend latéralement dans la plaque basale (Friszch et al., 1989; Koyama et al., 1989). Ces cellules montrent une activité rythmique durant la locomotion fictive (Bussièrès et Dubuc, 1992a). Tandis que les cellules RS innervent toutes les régions de la moelle épinière, les cellules vestibulaires projettent sur les 15 segments spinaux les plus rostraux (Nieuwenhuys, 1972 ; Bussièrès, 1994; revue Brodin et al., 1988), et ces

cellules agiraient donc de préférence à ce niveau (Zelenin et al., 2003). Toutefois, la contribution exacte des cellules vestibulaires durant la locomotion n'a pas encore été établie.

Chez les vertébrés supérieurs, la voie descendante vestibulospinale (issue du noyau de Deiters) est responsable de la posture et de l'équilibre. Chez la lamproie, cette fonction est toutefois exercée par la voie réticulospinale. En effet, les cellules RS reçoivent une importante innervation provenant des afférences vestibulaires (Rovainen, 1979; Bussièrès et Dubuc, 1992b; Deliagina et al., 1992; Bussièrès et al., 1999; Pflieger et Dubuc, 2004). Ainsi, c'est par l'intermédiaire des afférences vestibulaires que les cellules RS sont informées de l'orientation du corps de l'animal et peuvent ensuite, par la voie vestibulo-réticulospinale, commander les ajustements posturaux adéquats au niveau spinal (revue Grillner et al., 1995; revue Deliagina et al., 2002; revue Deliagina et Orlovsky, 2002; revue Deliagina et al., 2008).

Comme chez les vertébrés supérieurs, diverses afférences sensorielles projettent sur les cellules RS de la lamproie et participent activement dans l'élaboration du déclenchement de l'acte moteur (revue Dubuc et al., 2008). Une fois activées par ces afférences sensorielles, les cellules RS activent ensuite les réseaux locomoteurs spinaux ce qui déclenche la nage dite « de fuite » de la lamproie, même en l'absence de centres locomoteurs supraspinaux (Cardin et al., 1999). Ce comportement de fuite, où l'animal s'éloigne rapidement du côté opposé à la source de la stimulation, a été reproduit dans des préparations semi-intactes où la queue de l'animal est libre de bouger (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000).

Les mécanismes nerveux qui sous-tendent la nage de fuite de la lamproie déclenchée par les informations sensorielles forment le cœur de cette thèse. Cependant, avant de décrire les afférences synaptiques et les propriétés intrinsèques des cellules RS qui sont responsables du déclenchement de ce comportement de fuite, il est d'abord pertinent de décrire les structures locomotrices supraspinales impliquées dans la nage visant à répondre aux besoins internes de l'animal (Jordan, 1998; El Manira et al., 1997; Sirota et al., 2000; revue Sinnamon, 1993; revue Dubuc et al., 2008).

b) Les centres locomoteurs supraspinaux : la région locomotrice diencéphalique et la région locomotrice du mésencéphale

Sous l'influence des ganglions de la base et situé dans la région ventro-médiane du diencéphale, le thalamus ventral serait responsable de l'initiation de comportements motivés (El Manira et al., 1997). En effet, la stimulation électrique d'une région de ce noyau, nommée **région locomotrice diencéphalique** ou « **RLD** » par le groupe de Grillner (El Manira et al., 1997), a induit un activité locomotrice fictive enregistrée dans les racines ventrales d'une préparation réduite *in vitro*. Ainsi, la RLD serait une région homologue à la région locomotrice sous-thalamique des vertébrés supérieurs. Des résultats similaires ont été observés suite à la stimulation pharmacologique d'une région située au niveau du thalamus ventral (Paggett et al., 2004). De plus, la stimulation électrique ou chimique de cette région déclenche une nage stable avec des mouvements coordonnés dans une préparation semi-intacte (Jackson et McClellan, 2001, Ménard et Grillner, 2008). La RLD envoie des

projections monosynaptiques glutamatergiques bilatérales sur les cellules RS du rhombencéphale, et déclenche la locomotion via ces projections (El Manira et al., 1997; Paggett et al., 2004).

En plus de la région locomotrice diencephalique, **la région locomotrice mésencéphalique ou « RLM »** serait responsable du déclenchement de la nage avec un but. Découverte par l'équipe de Réjean Dubuc il y a moins d'une dizaine d'années (Sirota et al., 2000), la stimulation électrique (Sirota et al., 2000; Brocard et Dubuc, 2003) ou pharmacologique (Sirota et al., 2000; Le Ray et al., 2003; Brocard et al., 2005; Ménard et al., 2007) de la RLM induit une activité de nage dont la fréquence est directement proportionnelle à l'intensité de la stimulation chez la lamproie (Sirota et al., 2000). De plus, l'arrêt de la stimulation coïncide avec la fin de l'activité locomotrice. Cette structure, localisée au niveau de la barrière mésopontine, active les cellules RS par le biais de projections monosynaptiques, bilatérales, glutamatergiques et cholinergiques (Le Ray et al., 2003). Pour être activée, la RLM reçoit des afférences excitatrices de nombreuses sources comme l'hypothalamus médial et latéral. Cependant, au repos, la RLM est sous l'influence des projections inhibitrices du pallium, du striatum (noyau des ganglions de la base), mais aussi probablement du thalamus (Ménard et al., 2007; Ménard et Grillner, 2008). L'activation de la locomotion résulterait donc d'une levée de cette inhibition tonique au repos.

Ainsi, de la lamproie aux vertébrés supérieurs, les structures spinales et supraspinales impliquées dans l'amorce et le contrôle de la locomotion possèdent des caractéristiques générales similaires. Cependant, bien que certaines structures

supraspinales soient sous l'influence des ganglions de la base, la lamproie ne possède qu'un cortex non élaboré et un cervelet primitif.

c) Le pallium et les ganglions de la base

Tout comme chez d'autres vertébrés inférieurs, la lamproie possède une écorce cérébrale correspondant à la partie supérieure du télencéphale ou pallium (en latin, précurseur du cortex) (revue Grillner, 2003). Le pallium envoie des projections vers les ganglions de la base qui englobent des structures locomotrices. Les ganglions de la base de la lamproie font relais au niveau de structures supraspinales avant de projeter vers la moelle épinière. Chez la lamproie comme chez les vertébrés supérieurs, une voie disynaptique descendante issue du striatum projette sur des structures locomotrices du diencéphale et du mésencéphale (El Manira et al., 1997; Pombal et al., 1997a,b; Ménard et al., 2007; Ménard et Grillner, 2008). Sans être indispensable au déclenchement de la locomotion, les ganglions de la base jouent un rôle important dans le contrôle de la locomotion. En effet, cette structure est impliquée dans la posture et l'exécution normale d'un acte moteur chez la lamproie. Par exemple, inhiber l'innervation dopaminergique des ganglions de la base par l'administration de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) produit des déficits moteurs similaires aux symptômes Parkinsoniens décrits chez les primates. Suite à ce traitement, les épisodes locomoteurs de la lamproie sont déclenchés plus difficilement, et une fois amorcés, ils sont très brefs. De plus, un délai anormalement long est observé entre les premiers signes locomoteurs et le déclenchement de la

nage, et lors de l'arrêt de l'activité motrice une décharge tardive apparaît dans les muscles du tronc (Thompson et al., 2008).

d) Le cervelet

Chez la lamproie, un cervelet très primitif a été identifié sans que son rôle dans la locomotion ait pu être établi (revue Grillner, 2003). En effet, l'ablation du cervelet n'a pas d'effet sur l'activité rythmique des cellules RS durant la locomotion fictive (Kasicki et al., 1989). D'un autre côté, à l'instar du faisceau spino-cérébelleux ventral et de la voie spino-réticulo-cérébelleuse des mammifères, les cellules RS de la lamproie reçoivent des projections ascendantes provenant de la moelle épinière (Dubuc et Grillner, 1989; Vinay et Grillner, 1993 ; Einum et Buchanan, 2004). Durant la nage, ces projections spinales envoient une copie efférente de l'activité des CPG aux cellules RS. Cette modulation de l'activité des cellules RS par les afférences spinales est d'une importance considérable dans le contrôle moteur. En effet, les cellules RS ainsi modulées vont ensuite projeter cette information vers la moelle épinière, faisant partie d'une boucle spino-réticulo-spinale (Dubuc et Grillner, 2003; Vinay et Grillner, 1993).

Parallèlement aux mécanismes centraux qui ont été décrits ci-dessus, de nombreuses afférences sensorielles participent à l'organisation de la nage chez la lamproie. Dans les prochains paragraphes, je me limiterai toutefois aux afférences sensorielles de type cutané.

2.2.2. Informations sensorielles de type cutané acheminées aux cellules RS

2.2.2.1. Les récepteurs cutanés

Les informations sensorielles d'origine cutanée de la lamproie sont acheminées au système nerveux central par l'intermédiaire de récepteurs cutanés. En effet, tout le long du corps de l'animal, on retrouve des mécanorécepteurs appelés neuromasts, ainsi que des cellules de Merkel et des terminaisons libres (Rovainen, 1982).

Les mécanorécepteurs **du corps** de la lamproie acheminent les informations cutanées (toucher, pression et nociception) (Martin et Wickelgren, 1971) vers les cellules RS, par l'intermédiaire d'une voie disynaptique (figure 4). Ces informations activent d'abord les cellules dorsales, mécanorécepteurs primaires dont le corps cellulaire est localisé dans la partie dorso-médiane de la moelle épinière (Freud, 1877, 1878; Leonard et Wickelgren, 1985; Christenson et al., 1988). Puis, les cellules dorsales propagent ces informations sensorielles soit **1**) vers les segments plus caudaux de la moelle épinière sur des interneurons de relais géants (Rovainen, 1967b, 1974a, b), soit **2**) vers le tronc cérébral sur des interneurons de relais dans le noyau des colonnes dorsales (Dubuc et al., 1993a,b) ainsi que dans les noyaux octavolatéraux et octavomoteurs, par leur axone ascendant (Martin et Wickelgren, 1971; Birnberger et Rovainen, 1971). Ces interneurons de relais vont ensuite projeter sur les cellules RS (Rovainen, 1974a, b; Dubuc et al., 1993a,b). Enfin, des travaux suggèrent qu'en plus d'acheminer des informations cutanées vers les cellules RS, l'activation des cellules dorsales peut aussi influencer la nage en cours (Rovainen, 1974b; Buchanan, 1982). En effet, les cellules dorsales induisent des

réponses polysynaptiques excitatrices et inhibitrices dans certains interneurons inhibiteurs et dans les motoneurons (Buchanan et Cohen, 1982; Buchanan et Kasicki, 1995; El Manira et al., 1996).

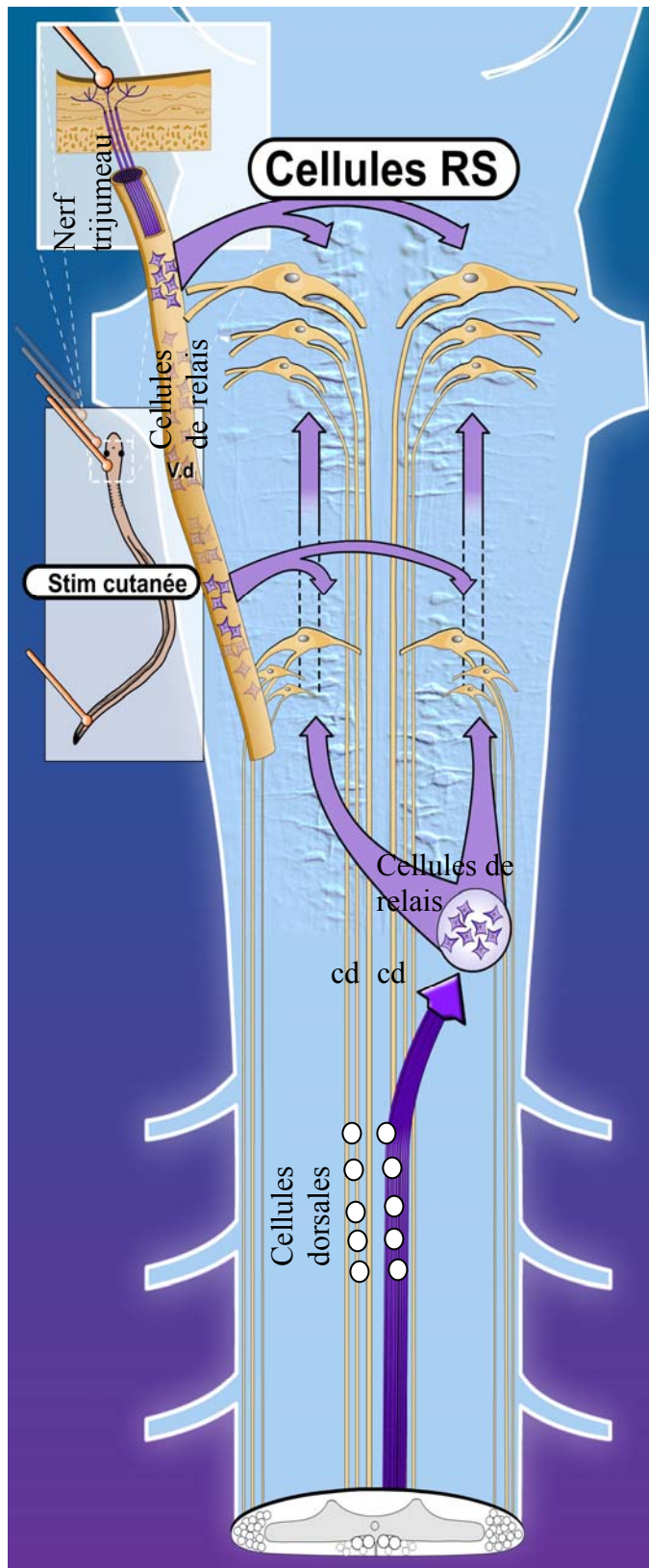


Figure 4. **L'activation des cellules RS par les informations sensorielles d'origine cutanée.** Les informations cutanées du corps activent d'abord les cellules dorsales, mécanorécepteurs primaires, qui envoient des projections ascendantes par les colonnes dorsales sur des cellules de relais. Localisées au niveau du tronc cérébral, ces cellules vont ensuite activer les cellules RS. Les informations cutanées de la tête activent d'abord les afférences sensorielles primaires qui voyagent à l'intérieur du nerf trijumeau. Les projections centrales de ces afférences vont activer les cellules de relais, localisées dans la racine descendante du nerf trijumeau. Puis, ces cellules de relais vont activer les cellules RS. V.d : tractus trigeminal descendant; cd : colonne dorsale. (Adapté de Dubuc et al., 2008).

De façon similaire, les récepteurs cutanés de **la région de la tête** de la lamproie acheminent les informations sensorielles aux cellules RS par le biais d'une voie disynaptique (voir figure 4). En effet, ces informations sensorielles sont d'abord acheminées aux cellules RS par les afférences primaires (ou neurones de relais) du système trigéminal ayant le corps cellulaire localisé au niveau du ganglion trigéminal, ainsi que par les afférences primaires dont le corps cellulaire est localisé dans le rhombencéphale et la moelle épinière rostrale (Finger et Rovainen, 1982). Ces afférences primaires envoient ensuite des projections aux cellules RS (Viana Di Prisco et al., 1995, 2005) en passant par la plaque alaire du rhombencéphale (Northcutt, 1979; Koyama et al., 1987). Certains neurones de relais, localisés à l'intérieur du tractus trigéminal descendant, projettent sur les cellules du MRRN, tandis que d'autres neurones plus caudaux, enverraient leurs projections au niveau des cellules du PRRN.

Nous venons de voir que la lamproie est un modèle de vertébré simple, dont l'organisation de la locomotion par le SNC est similaire à l'organisation plus complexe des vertébrés dits « supérieurs ». Grâce à ses nombreux avantages, la lamproie a notamment permis de décrire en détail les propriétés intrinsèques et synaptiques par lesquelles les RS du MRRN vont intégrer une information cutanée et la transformer en comportement de fuite. Ce comportement ainsi que les propriétés cellulaires impliquées font l'objet de la prochaine section.

3. L'INTEGRATION SENSORIMOTRICE : LES PROPRIETES SYNAPTiques ET INTRINSEQUES DES CELLULES RS ASSOCIEES AU DECLENCHEMENT DU COMPORTEMENT DE FUITE

3.1. L'intégration de l'information sensorielle par les cellules RS de la lamproie

3.1.1. La locomotion de fuite déclenchée par les afférences sensorielles

Observée chez plusieurs espèces animales, la locomotion de fuite ainsi que les mécanismes nerveux qui la sous-tendent ont été décrits de façon relativement détaillée chez des vertébrés aquatiques comme le poisson-zèbre (Fetcho et O'Malley, 1995; O'Malley et al., 1996). Caractérisée par la courbure du corps en forme de « C », suivie d'une nage très rapide en sens opposé, la nage de fuite du poisson-zèbre peut être induite par une stimulation cutanée au niveau de la tête. De façon similaire, toucher le corps ou la tête de la lamproie provoque une réponse de nage très rapide qui permet à l'animal de fuir du côté opposé à la stimulation (Cardin et al., 1999; McClellan et Grillner, 1983; McClellan, 1984; McClellan, 1986; Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). La nature balistique ou de « tout ou rien » de ce comportement de fuite est typiquement observée. De plus, la nage de fuite persiste longtemps après l'arrêt de la stimulation et ne requiert ni le maintien, ni la répétition de la stimulation sensorielle pour être maintenue (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Une fois son seuil de déclenchement atteint, la durée et l'intensité de l'activité locomotrice de fuite ne sont plus proportionnelles à l'intensité de la stimulation.

3.1.2. Les cellules RS : neurones de commande

Le concept de neurone de commande a été énoncé pour la première fois suite à une observation faite dans des neurones chez les invertébrés (Wiersma et Ikeda, 1964). En effet, chez la langouste, ce concept a été initialement utilisé pour décrire comment un seul potentiel d'action déclenché dans l'une des quatre fibres géantes qui parcourent la bordure dorsale du cordon nerveux a induit une réponse de fuite au niveau de la queue (Wiersma et Ikeda, 1964). Selon ce concept, un neurone de commande reçoit et intègre de nombreuses afférences convergentes issues de la périphérie et des neurones du CPG, pour ensuite activer différents groupes de neurones spinaux (Frost et Katz, 1996). Dès lors, plusieurs études portant sur les comportements rythmiques tels que le comportement de fuite chez les vertébrés et les invertébrés ont été influencées par ce concept (revue Marder et Calabrese, 1996).

Par leur position stratégique entre les afférences sensorielles et les neurones spinaux, il a été proposé que les cellules RS de la lamproie sont des neurones de commande responsables de déclencher la nage (McClellan et Grillner, 1984; McClellan, 1988; Viana Di Prisco et al., 1997, 2000; revue McClellan, 1987), comme chez le poisson-zèbre (Gahtan et al., 2002), les téléostéens (Nissanov et al., 1990; Eaton et Emberley, 1991).

D'un autre côté, les cellules RS sont également impliquées dans le contrôle de l'intensité et de la fréquence de la nage, en transmettant des commandes motrices issues des centres locomoteurs supérieurs à la moelle épinière. D'abord, dans des préparations réduites, des résultats ont montré que l'application locale d'agonistes cholinergiques augmente l'excitation des cellules RS ainsi que la locomotion fictive

en cours (Le Ray et al., 2003). Puis, selon des données obtenues dans des préparations semi-intactes, bloquer l'apport cholinergique de type nicotinique issu de la région locomotrice mésencéphalique sur les cellules RS a fortement diminué l'amorce de la nage. Ainsi, l'activation nicotinique des cellules RS participe au déclenchement et au contrôle de la nage. De plus, dans des préparations semi-intactes, des travaux ont montré que les noyaux rombencéphaliques moyen et postérieur (MRRN et PRRN) sont recrutés de façon séquentielle lors de la locomotion contrôlée, déclenchée par la région locomotrice mésencéphalique (Brocard et Dubuc, 2003). En effet, à une faible intensité de stimulation, cette région locomotrice a d'abord activé les cellules RS du MRRN et a déclenché une nage de faible intensité. Puis, les cellules du MRRN ayant atteint leur fréquence de décharge maximale, l'augmentation subséquente de l'intensité de la stimulation a activé les cellules du PRRN ainsi qu'une nage plus puissante (Brocard et Dubuc, 2003). L'activité simultanée de ces deux noyaux réticulés a donc permis de transmettre une commande motrice puissante aux réseaux locomoteurs spinaux. De plus, selon des résultats obtenus en électrophysiologie et en imagerie calcique, les cellules RS situées de chaque côté du cerveau, incluant les cellules ayant un petit diamètre, seraient impliquées dans le contrôle de la puissance de la nage déclenchée par les centres supérieurs (voir annexe : Brocard et al., 2008).

Enfin, en plus d'être responsable de l'initiation et du contrôle de la nage, la stimulation des cellules RS cause une remise à zéro (« reset ») du cycle locomoteur, ayant un effet sur le générateur de patron (Guertin et Dubuc, 1997). Les cellules RS sont également responsables du maintien de l'équilibre et de la posture durant la

locomotion (Grillner et al., 1995; Deliagina et al., 2002; Deliagina et Orlovsky, 2002; revue Deliagina et al., 2008).

Les afférences cutanées provenant du système trijéminal et des colonnes dorsales ne sont pas les uniques informations sensorielles à parvenir aux les cellules RS de la lamproie. En effet, ces cellules de commande reçoivent des afférences sensorielles de nombreuses autres sources telles que des systèmes visuel, vestibulaire, olfactif et proprioceptif (Wickelgren, 1977; Rovainen, 1979, 1982; Bussières et Dubuc, 1992a; Orlovsky et al., 1992; Deliagina et al., 1993, 1995; Zompa et Dubuc, 1996; Ullén et al., 1997; revue Dubuc et al., 2008). Ces sources peuvent également déclencher la locomotion chez la lamproie (*Système de la ligne latérale*: Fritzscht et al., 1984; Ronan, 1988; Kishida et al., 1988 ; Deliagina et al., 1995. *Champ électrique à basse fréquence* : Chung-Davidson et al., 2004. *Afférences visuelles* : Zompa et Dubuc, 1996; Ullén et al., 1997. *Afférences du tectum optique* : Saitoh et al., 2007. *Epithélium olfactif* : Derjean et al., 2008).

3.1.3. Activation des cellules RS par les afférences sensorielles d'origine cutan e

Des expériences antérieures ont permis de décrire les mécanismes cellulaires par lesquels les cellules RS déclenchent la locomotion en réponse à une stimulation sensorielle d'origine cutan e. Sur des préparations semi-intactes, la relation entre les réponses synaptiques des cellules RS et le comportement moteur suite à une brève stimulation cutan e a été examin e. Les cellules RS localis es dans les quatre noyaux de la formation r ticul e ont produit des potentiels postsynaptiques majoritairement

excitateurs (PPSE) en réponse à une stimulation cutanées appliquée au niveau du corps et de la tête de la lamproie (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Dans ces expériences, suite à l'augmentation graduelle de l'intensité de la stimulation, ces PPSE étaient proportionnels à l'intensité de la stimulation (figure 5). Puis, au-delà d'un certain seuil, cette relation stimulation-réponse linéaire a perdu sa linéarité. La stimulation sensorielle a alors déclenché une activité cellulaire persistante, accompagnée du déclenchement de la nage (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000).

Cette activité cellulaire prolongée, qui perdure même après l'arrêt de la stimulation, est caractérisée par une dépolarisation membranaire soutenue des cellules RS accompagnée de potentiels d'action et elle est associée à l'activation des réseaux locomoteurs spinaux (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Puisque cette activité prolongée peut durer même en absence d'entrées sensorielles continues, il a été proposé que cette activité dépend des propriétés intrinsèques à la cellule, ce qui a été démontré par la suite. Cet état membranaire dépolarisé, partiellement intrinsèque aux cellules, a été appelé « propriété de plateau » ou « plateau » ou « dépolarisation soutenue ». Chez la lamproie, les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la dépolarisation soutenue ont été identifiés et décrits en détail dans les cellules RS du noyau réticulé rhombencéphalique moyen (MRRN).

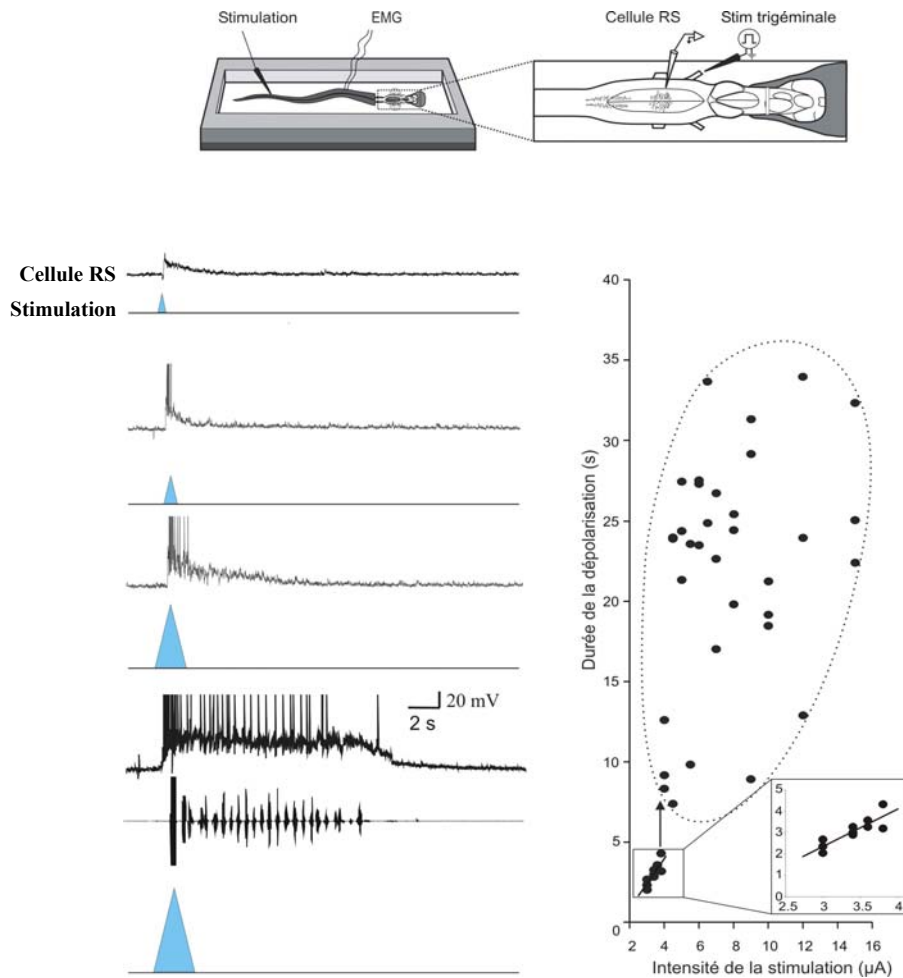


Figure 5. **La courbe stimulation-réponse des cellules RS.** *Panneau du haut*, La préparation de lamproie semi-intacte a été utilisée pour étudier les variations de potentiel membranaire des cellules RS du MRRN en réponse à la stimulation mécanique de la peau ou de la tête qui est équivalente à la stimulation électrique du nerf trijumeau. La nage (enregistrements EMG) a été enregistrée au milieu du corps de l'animal. *Panneau de gauche*, A de faibles intensités de stimulation, des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) ont été enregistrés. A des intensités plus élevées, une dépolarisations soutenue accompagnée d'une activité de nage ont été enregistrées. *Panneau de droite*, Le graphique de la relation stimulation-réponse montre qu'à de faibles intensités de stimulation, la relation est linéaire mais elle perd sa linéarité au-delà d'un certain seuil (flèche), au moment où des dépolarisations soutenues sont déclenchées. Adapté de Viana Di Prisco et al., 1997.

Avant de décrire les mécanismes d'induction et de maintien des dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie, je vais dans un premier temps décrire comment cet état dépolarisé a été mis en évidence.

3.2. Mise en évidence des propriétés de plateau

3.2.1. Le plateau

Le plateau a initialement été décrit dans divers types de cellules nerveuses, aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés. Par exemple, Hultborn et collaborateurs (1975) ainsi que Schwindt et Crill (1977, 1980) ont été les premiers à décrire le plateau dans les motoneurones du chat, tandis que Russell et Hartline (1978) ont fourni une des premières démonstrations de la présence des propriétés de plateau dans les neurones ganglionnaires somatogastriques du homard. Le plateau est caractérisé par une dépolarisation membranaire persistante, pouvant durer entre quelques secondes et plusieurs minutes, accompagnée de décharges dont la fréquence peut s'intensifier au cours du temps (Marder, 1991; revue Kiehn, 1991; revue Major et Tank, 2004). La valeur du potentiel permettant d'obtenir cet état membranaire, le potentiel de plateau, se situe autour de 10-20mV au-delà du potentiel de repos (Hultborn et al., 1975; Schwindt et Crill, 1977, 1980). Le déclenchement du plateau implique l'activation de conductances post-synaptiques spécifiques (Hartline et al., 1988; Marder, 1991; revue Llinás, 1988; revue Kiehn, 1991). De plus, il est soutenu par des propriétés intrinsèques des neurones, appelées propriétés endogènes de plateau, car il persiste bien après l'arrêt de la stimulation et il a été observé même en absence d'une excitation synaptique continue (Marder, 1991; revue Kiehn, 1991).

Divers propriétés intrinsèques, impliquées dans des mécanismes cellulaires variés, permettent l'apparition et/ou le maintien du plateau. Parmi ces propriétés, il est maintenant bien établi que l'activation des récepteurs glutamatergiques ionotropiques de type NMDA peut être impliquée (Kiehn et al., 1996 ; MacLean et al., 1997 ; Rioult-Pedotti, 1997 ; Grillner et al., 1998) ou des conductances calciques voltage-dépendantes (Hounsgaard et Kjaerulff, 1992 ; Morisset et Nagy, 1996 ; Russo et Hounsgaard, 1996 ; Smith et Perrier, 2006) ou encore un courant cationique non-sélectif activé par le calcium l' I_{CAN} (Zhang et al., 1995 ; Rekling et Feldman, 1997 ; Morisset et Nagy, 1999). Néanmoins, de manière générale, le plateau ou la dépolarisation soutenue permet aux cellules d'exprimer un comportement membranaire bistable qui a été amplement documenté dans divers types cellulaires (Hounsgaard et Kiehn, 1985; Hounsgaard et Mintz, 1988; Marder, 1991).

3.2.2. La bistabilité

La bistabilité, sous-tendue par les propriétés de plateau, représente le comportement d'une cellule qui possède deux états ou potentiels membranaires fonctionnellement différents mais stables: l'un au potentiel de repos et l'autre généralement à un niveau plus dépolarisé, c'est-à-dire, au potentiel de plateau. Les études respectives de Hultborn et collaborateurs (1975) puis de Schwindt et Crill (1977, 1980) réalisées sur des chats ont permis de conclure que la bistabilité peut être induite dans les motoneurones (en présence de neuromodulateurs comme les dérivés noradrénergiques ou la sérotonine) soit **1**) en stimulant brièvement les **afférences sensorielles primaires** (préparations décérébrées et non anesthésiées), soit **2**) en

stimulant directement les motoneurones à l'aide d'un **bref courant intracellulaire dépolarisant** (préparations anesthésiées). Les expériences initiales menées chez le homard ont également montré qu'un bref courant dépolarisant provenant soit d'un PPSE, soit d'une microélectrode pouvait déclencher la transition entre les deux états stables (Russell et Hartline 1978; Marder, 1991). Puis, dans ces différentes préparations, les dépolarisations persistantes ainsi induites ont été arrêtées soit par la stimulation du nerf périphérique innervant le muscle antagoniste, soit par une hyperpolarisation "spontanée", soit par l'injection d'un courant hyperpolarisant (Hultborn et al., 1975; Russel et Hartline 1978; Dickinson et Nagy, 1983; Hounsgaard et al., 1988; Marder, 1991).

Les études subséquentes visant à mieux comprendre ce comportement cellulaire ont porté sur les conductances intrinsèques impliquées. Lors de l'étude de la relation courant-potentiel (courbe I/V), il apparaît que tous les neurones ayant un comportement bistable possèdent une région de conductance négative (Schwindt et Crill 1977, 1980). Cette courbe I/V, en forme de « N », croise l'axe des abscisses à deux voltages avec une pente positive, correspondent aux potentiels de repos et de plateau. Il a ensuite été suggéré qu'un courant entrant persistant à inactivation lente, I_i , médié par le calcium contribuait à l'état dépolarisé. A l'heure actuelle, les propriétés intrinsèques qui sous-tendent le plateau ont été décrites dans plusieurs types de neurones aussi bien chez les vertébrés (Hounsgaard et Mintz, 1988; Kiehn, 1991; Fraser et MacVicar, 1996; Russo et Hounsgaard, 1996; Overton et Clark, 1997; Rekling et Feldman, 1997; Viana Di Prisco et al., 1997; Hsiao et al., 1998; Sandler et al., 1998) que chez les invertébrés (Dickinson et Nagy, 1983; Golowasch et

Marder, 1992; Kiehn et Harris-Warrick, 1992; Zhang et Harris-Warrick, 1995; Zhang et al., 1995; Angstadt et Choo, 1996; Wilson et al., 1996; Mills et Pitman, 1997).

Au cours de cette introduction, je limiterai toutefois mon intérêt aux propriétés synaptiques et intrinsèques qui déclenchent et maintiennent les dépolarisations soutenues décrites dans les cellules RS du MRRN de la lamproie.

3. 3. Le déclenchement des dépolarisations soutenues des cellules du MRRN chez la lamproie

3.3.1. Rôle des récepteurs glutamatergiques dans l'induction des dépolarisations soutenues

Chez la lamproie, l'activation des afférences sensorielles de type cutané activent les récepteurs glutamatergiques ionotropes postsynaptiques de types Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionate (AMPA) et NMDA des cellules RS (Dubuc et al., 1993a; Viana Di Prisco et al., 1995, 1997, 2000) (figure 6).

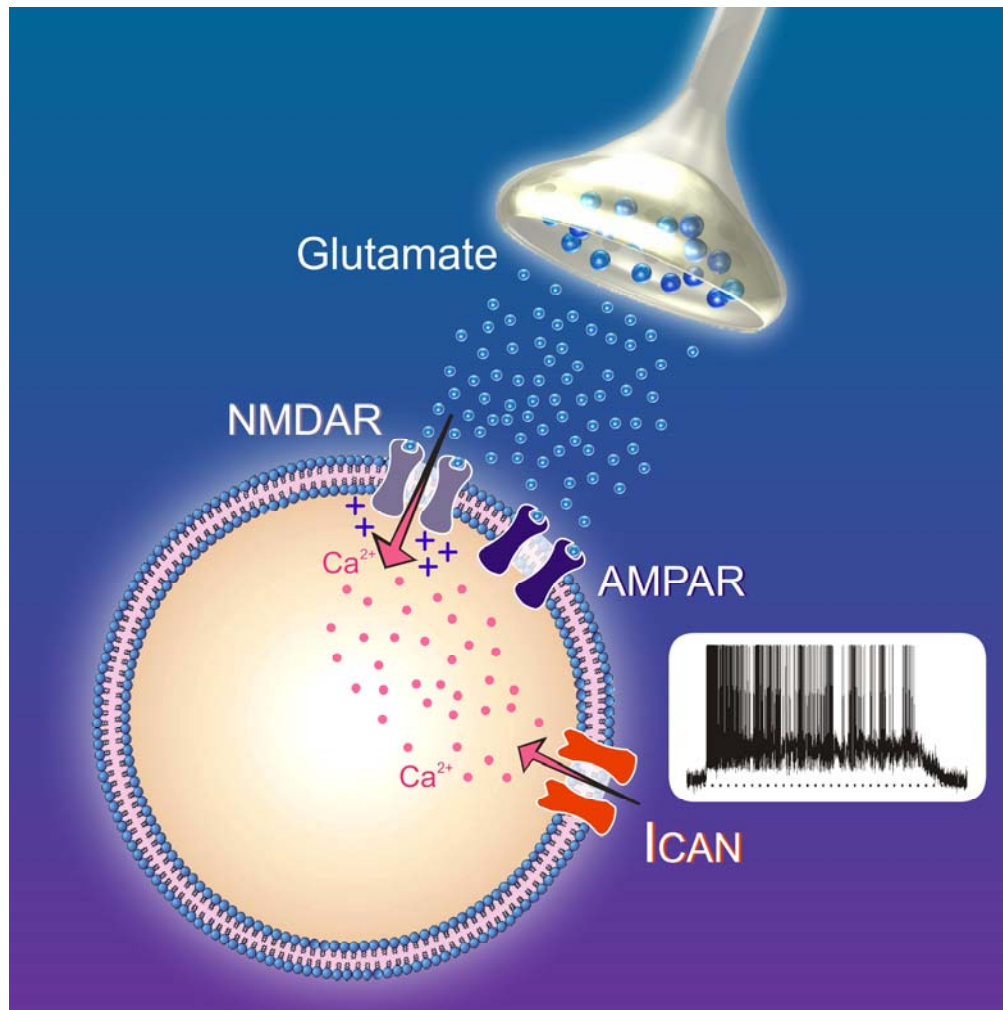


Figure 6. Schéma illustrant les mécanismes synaptiques et intrinsèques qui seraient impliqués dans la transformation d'une brève stimulation sensorielle en commande motrice par les cellules RS. Lors de la stimulation des afférences cutanées, le glutamate libéré à la synapse entre les cellules de relais et les cellules RS va activer les récepteurs AMPA et NMDA. Ceci induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire qui permettrait ensuite d'activer un courant cationique non sélectif activé par le calcium, I_{CAN} , crucial au déclenchement d'une dépolarisation soutenue. (Adapté de Viana Di Prisco et al., 2000).

Les récepteurs AMPA seraient responsables de la phase initiale de la dépolarisation membranaire des cellules RS du MRRN. Quant aux récepteurs NMDA, ils permettraient le déclenchement des dépolarisations soutenues d'origine sensorielle des cellules RS du MRRN car ces dépolarisations sont inhibées en présence de 2-amino-5-phosphonopentanoate (AP-5) appliqué dans le bain de perfusion ou par éjection locale sur ces cellules (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). La contribution des récepteurs glutamatergiques métabotropiques dans le déclenchement des dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS de la lamproie n'a toutefois pas été étudiée.

3.3.2. Les propriétés intrinsèques responsables de l'apparition des dépolarisations soutenues

Dans les cellules RS du MRRN, il a été montré que l'activation de ces récepteurs NMDA permet une augmentation de concentration de Ca^{2+} intracellulaire qui est associée à l'activation subséquente d'un courant cationique non sélectif calcium-dépendant (I_{CAN} ; Viana Di Prisco et al., 2000) (voir Figure 6, p. 69).

3.3.2.1. Le courant cationique non sélectif activé par le Ca^{2+} : I_{CAN}

Dans différents types de neurones tels que les neurones profonds de la corne dorsale de rat (Morisset et Nagy, 1999), les motoneurones du noyau ambigu de souris nouveau-né (Rekling et Feldman, 1997) et les motoneurones ganglionnaires somatogastriques de crabe (Zhang et Harris-Warrick, 1995; Zhang et al., 1995), il apparaît qu'un courant cationique non spécifique, principalement sodique, et activé

par le Ca^{2+} , l' I_{CAN} (revue Partridge et al., 1994), est responsable du déclenchement des plateaux. L' I_{CAN} a été mis en évidence dans les cellules excitables comme les neurones et les cellules cardiaques, ainsi que dans les cellules non excitables (cellules incapables de produire des potentiels d'action mais possédant des canaux voltage-indépendants et activés par un ligand ou un second messenger) telles que les cellules rénales et pancréatiques (Siemer et Gögelein, 1992; revue Thorn et Petersen, 1993; revue Partridge et al., 1994). Une caractéristique importante de ce courant est qu'il n'est pas soumis à une inactivation ni par le voltage, ni par le Ca^{2+} . L' I_{CAN} facilite donc des mécanismes de dépolarisation soutenue et l'entrée subséquente de calcium dans la cellule (Rekling et Feldman, 1997; revue Partridge et al., 1994).

Présent autant chez les vertébrés (Fraser et MacVicar, 1996 ; Congar et al., 1997 ; Klink et Alonso, 1997 ; Rekling et Feldman, 1997 ; Morisset et Nagy, 1999 ; Perrier et Hounsgaard, 1999 ; Beurrier et al., 1999; Egorov et al., 2002; Ghamari-Langroudi et Bourque, 2002; Baufreton et al., 2003 ; Zhu et al., 2004, 2005; Lee et Tepper, 2007) que chez les invertébrés (Zhang et al., 1995 ; Wilson et al., 1996), l' I_{CAN} peut être bloqué par l'acide flufenamique (FFA) (Lee et al., 1996; Morisset et Nagy, 1999; Partridge et Valenzuela, 2000). Le FFA fait partie de la classe des drogues anti-inflammatoires et non-stéroïdiennes (AINS). Les AINS sont des dérivés des diphenylamine-2-carboxylate (DPC) qui bloquent les courants CAN en augmentant le temps de fermeture du canal (Gögelein et Pfanmüller, 1989). Toutefois, des évidences suggèrent que le FFA ne soit pas un antagoniste spécifique à haute affinité et son action peut être plus complexe (Partridge et Valenzuela, 2000). En effet, le FFA peut causer une augmentation soutenue de la concentration de

calcium cytosolique, ce qui permet d'activer de façon transitoire l' I_{CAN} ainsi qu'une conductance Cl⁻ lente et activée par le calcium dans les neurones de mollusques (Shaw et al., 1995). Le FFA peut aussi avoir un effet sur les récepteurs NMDA (Lerma et Martin del Rio, 1992; Chen et al., 1998). De plus, dans les neurones hippocampiques, le FFA a induit une élévation maintenue du calcium intracellulaire (Partridge et Valenzuela, 2000). Dans les cellules sacciformes de l'Aplysie, le FFA aurait des effets sur de multiples conductances et causerait aussi une libération de calcium intracellulaire (Gardam et al., 2008). Le FFA pourrait également agir en tant qu'agoniste des récepteurs TRPV1 (Sinning et al., 2008). Enfin, dans les neurones spinaux de la lamproie, le FFA aurait un effet inhibiteur non-spécifique, agissant à la fois au niveau des canaux calciques voltage-dépendants et au niveau des récepteurs NMDA (Wang et al., 2006). Toutefois, au niveau des cellules RS du MRRN de la lamproie, le FFA n'a pas modifié les PPSE d'origine sensorielle médiés par les récepteurs AMPA et NMDA (Viana Di Prisco et al., 2000). De plus, l'abolition des dépolarisations soutenues par le FFA a montré la contribution des I_{CAN} dans l'apparition de cet état dépolarisé des cellules RS du MRRN (Viana Di Prisco et al., 2000). Le FFA demeure donc le seul bloqueur connu des I_{CAN} à l'heure actuelle.

Les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules du MRRN de la lamproie sont Ca^{2+} -dépendantes puisqu'elles sont accompagnées d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et qu'elles sont inhibées par la chélation du Ca^{2+} interne par le BAPTA, tampon calcique à action rapide (Viana Di Prisco et al., 2000). Cependant, l'origine de l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} interne

n'a pas été établie chez la lamproie. En effet, aucune expérience n'a été menée afin de déterminer si, en plus du Ca^{2+} entrant par les récepteurs NMDA, d'autres sources de Ca^{2+} sont impliquées.

3.4. Les réserves internes de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique lisse

A tous les niveaux du SNC, le Ca^{2+} provenant des réserves intracellulaires joue un rôle important dans l'excitabilité neuronale (Turrigiano et al., 1994 ; revue Berridge, 1998). Le Ca^{2+} extracellulaire entre par des canaux ou des récepteurs membranaires selon un gradient de concentration 1000 :1 entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme (la concentration cytoplasmique étant de 100 nM) (revue Bardo et al., 2006). Les variations de Ca^{2+} intracellulaire sont ensuite régulées par des protéines cytoplasmiques ainsi que par des pompes calciques localisées au niveau de la membrane cytoplasmique et des organelles internes (revue Meldolesi, 2001). Le réticulum endoplasmique lisse (REL) est une organelle composée d'un système membranaire hétérogène qui sert de réserve calcique intracellulaire. La libération du calcium provenant du REL est généralement déclenchée par un signal provenant de la membrane plasmique, ce qui induit l'ouverture des récepteurs situés sur la membrane du REL.

3.4.1. Les canaux de libération de calcium (RyR) des réserves internes

Parmi les récepteurs du REL, on retrouve les canaux de libération de calcium appelés récepteurs de la Ryanodine (RyR) dû à leur sensibilité à cet alcaloïde tiré de

la plante *Ryania speciosa* (Bezprozvanny et al., 1991; Berridge, 1993; revue Berridge, 1998). Trois isoformes des RyR ont été identifiés et clonés. Les RyR1, RyR2 et RyR3, sont respectivement majoritaires au niveau des muscles, du cœur et du cerveau. Ils sont cependant tous présents au niveau du cerveau (Sah et al., 1993, 1994 ; Furuichi et al., 1994; Giannini et al., 1995). Le REL y compris les RyR membranaires s'étendent du soma à tous les compartiments cellulaires, incluant dendrites et axones (revue Meldolesi, 2001).

3.4.2. La contribution des RyR dans les plateaux de différentes espèces

Dans les motoneurones ganglionnaires gastriques du crabe, les RyR contribuent aux plateaux (Zhang et al., 1995). En effet, l'éjection de caféine, agoniste des RyR, a induit la libération du Ca^{2+} provenant des réserves internes, ce qui a déclenché l'activation d'un courant entrant de type I_{CAN} ainsi qu'une lente dépolarisation. L'implication des RyR dans les plateaux a aussi été décrite dans les motoneurones spinaux de la tortue, où les plateaux, médiés par une conductance calcique voltage-dépendante, sont inhibés par le blocage des RyR avec la Ryanodine (Mejia-Gervacio et al., 2004). Selon une hypothèse émise par les auteurs, le Ca^{2+} entrant par des canaux calciques voltage-dépendants induirait l'ouverture des RyR et la libération de Ca^{2+} interne. Puis, par un mécanisme rétroactif, le Ca^{2+} ainsi libéré faciliterait l'entrée additionnelle de Ca^{2+} externe, ce qui maintiendrait le potentiel membranaire de la cellule dans un état dépolarisé (Mejia-Gervacio et al., 2004). Un mécanisme hypothétique a également été émis concernant les plateaux des

interneurones profonds de la corne dorsale de rat (Morisset et Nagy, 1999). Selon ce mécanisme, le Ca^{2+} provenant des réserves internes participerait à activer l' I_{CAN} durant ces plateaux qui sont aussi sous-tendus par une conductance calcique voltage-dépendante (Morisset et Nagy, 1999). Ainsi, à l'exception de l'étude de Zhang et collaborateurs (1995), aucune étude n'a clairement déterminé le mécanisme cellulaire par lequel les réserves internes de calcium maintiennent les plateaux.

Malgré cela, l'activation directe des RyR par le Ca^{2+} d'origine extracellulaire a été très documentée (revue Bardo et al., 2006). Suite à une entrée importante de Ca^{2+} extracellulaire, la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} peut être auto-régulée par un mécanisme rétroactif appelé libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} , impliquant l'activation des RyR (revue Berridge, 1997).

3.4.3. La libération du calcium induite par le calcium

Le mécanisme de libération du calcium induite par le calcium a initialement été décrit au début des années 70s dans les fibres musculaires squelettiques et cardiaques (Endo et al., 1970; Ford et Podolsky, 1970; revue Fabiato et Fabiato, 1977). Dans ces cellules, ce mécanisme implique l'interaction entre les RyR et les canaux calciques voltage-dépendants et il permet le couplage excitation-contraction (Fabiato, 1985; Satoh et al., 1998; Sipido et al., 1998; Katoh et al 2000; Wang et al., 2001; Kitchens et al., 2003; Copello et al., 2007. Revues : Fabiato, 1983 ; Protasi et al., 2002; Cheng et Wang, 2002 ; Endo, 2006). Au niveau du système nerveux, différentes études menées chez le rat dans des neurones dissociés (isolés ou en

culture) ainsi que dans des tranches de cerveau ont montré l'existence du mécanisme de la libération du Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} impliquant les réserves calciques internes et d'autres récepteurs membranaires, tels que les récepteurs glutamatergiques ionotropes (revue Simpson et al., 1995). Par exemple, dans les cellules cérébelleuses de Purkinje en culture, la dépolarisation membranaire consécutive à l'activation des récepteurs AMPA active les canaux Ca^{2+} sensibles au potentiel (Gruol et al., 1996). L'entrée de calcium par ces canaux active les RyR et induit une libération du Ca^{2+} interne. Une étude récente dans les tranches de cochlée du rat a également montré que l'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs AMPA déclenche la libération du Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} via une interaction directe avec les RyR (Morton-Jones et al., 2008). De façon concordante, une interaction entre les récepteurs NMDA et les RyR a été documentée dans des expériences menées sur des cellules granulaires du cervelet (Simpson et al., 1993), dans des expériences de microdialyse chez des rats (Lazarewicz et al., 1998; Makarewicz et al., 2000) ainsi que dans des neurones pyramidaux de la région CA1 dans des tranches de l'hippocampe chez le rat (Alford et al., 1993).

Ainsi, l'induction et le maintien des dépolarisations soutenues des cellules RS du MRRN de la lamproie dépendent de l'activation de propriétés synaptiques (récepteurs AMPA et NMDA) et intrinsèques (I_{CAN} ; Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Or les cellules RS de la lamproie reçoivent des afférences de nombreuses sources qui peuvent moduler leur activité. On peut donc penser que ces afférences, en plus des propriétés intrinsèques, peuvent également contribuer aux dépolarisations

soutenues d'origine cutanée. Les différentes afférences qui modulent l'activité des cellules RS seront donc détaillées à la section suivante.

4. MODULATION DE L'ACTIVITE DES CELLULES DE LA FORMATION RETICULEE PAR LES AFFERENCES SYNAPTIQUES

Des expériences électrophysiologiques menées en présence d'agents pharmacologiques dans différentes préparations de tranches *in vitro* indiquent que les propriétés membranaires intrinsèques qui sous-tendent les plateaux peuvent être modulées par l'activation des récepteurs glutamatergiques et fort probablement par des afférences excitatrices glutamatergiques (Morisset et Nagy, 1996 ; Russo et al., 1997 ; MacLean et al., 1997 ; Williams et Kauer, 1997 ; Wang et al., 1999 ; Derjean et al., 2003) ou inhibitrices (Russo et al., 1998 ; Derjean et al., 2003). Les plateaux peuvent aussi être facilités par des neuromodulateurs tels que la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT), la noradrénaline ou l'acétylcholine (Hounsgaard et al., 1988 ; Conway et al., 1988 ; Hounsgaard et Kiehn, 1989 ; Zhang et Harri-Warrick, 1995 ; Klink et Alonso, 1997 ; Hsiao et al., 1998 ; Delgado-Lezama et al., 1999 ; Lee et Heckman, 1999 ; Bennett et al., 2001 ; Ghamari-Langroudi et Bourque, 2004 ; Perrier et Tresch, 2005). De plus, dans une étude réalisée sur une préparation *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés de la tortue, les propriétés intrinsèques des motoneurons spinaux ont été facilitées par la libération synaptique de 5-HT (Perrier et Delgado-Lezama, 2005).

Comparativement à ces préparations, un des avantages de la préparation *in vitro* semi-intacte de la lamproie est qu'elle permet de garder la totalité du système

nerveux central. Dans cette préparation, il est possible d'étudier le rôle des afférences synaptiques, gardées intègres, dans la modulation des dépolarisations soutenues déclenchées par les afférences sensorielles. De plus, l'activité des cellules RS ainsi que le comportement moteur peuvent être enregistrés simultanément en temps réel.

4.1. La contribution des afférences spinales

Tout comme il a été montré chez le chat, le potentiel membranaire des cellules RS de la lamproie est modulé durant la locomotion. En effet, les cellules RS localisées dans les quatre noyaux de la formation réticulée montrent des oscillations membranaires rythmiques (Kasicki et Grillner, 1986; Kasicki et al., 1989). Selon une étude antérieure, les afférences provenant de la moelle épinière contribueraient, au moins en partie, à cette activité rythmique qui résulte de l'alternance entre des phases d'excitation et d'inhibition, ces dernières étant sous-tendues par un courant chlore (Dubuc et Grillner, 1989). Puis, une étude subséquente a montré que les neurones spino-bulbaires, qui projettent ventro-latéralement (Ronan et Northcutt, 1990 ; Vinay et al., 1998b) et de façon majoritairement monosynaptique sur les cellules RS, sont en grande partie responsables de ces oscillations dont la composante inhibitrice serait de type glycinergique (Vinay et al., 1998a; Einum et Buchanan, 2004). De plus, 75% des cellules RS produisent des oscillations en phase avec les bouffées d'activité des racines ventrales ipsilatérales, tandis que 25% des cellules montrent des oscillations en phase avec les racines ventrales controlatérales (Einum et Buchanan, 2005).

4.2. La contribution de la région locomotrice mésencéphalique (RLM)

La région locomotrice du mésencéphale envoie des projections glutamatergiques et cholinergiques sur les cellules RS qui activent les récepteurs glutamatergiques de type AMPA et NMDA, ainsi que les récepteurs cholinergiques de type nicotiniens des cellules RS (Brocard et Dubuc 2003 ; Le Ray et al., 2003). La contribution des afférences glutamatergiques issues de la RLM dans la modulation de l'activité des cellules RS a été décrite dans notre laboratoire (Brocard et Dubuc 2003). Dans des préparations semi-intactes, l'activation de la RLM a déclenché la nage et l'éjection locale d'antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA, le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) et l'AP-5, au niveau des cellules RS du MRRN ou du PRRN a fortement diminué l'activité persistante de ces cellules RS (Brocard et Dubuc, 2003).

L'activité des cellules RS est également positivement modulée par les afférences cholinergiques issues de la RLM qui activent les récepteurs cholinergiques de type nicotinique des cellules RS (Le Ray et al., 2003). En effet, l'application locale de la nicotine ou de l'acétylcholine a activé les cellules RS de façon dose-dépendante (Le Ray et al., 2003). Puis, en plus de déclencher la locomotion dans des préparations *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés (locomotion fictive) et dans des préparations semi-intactes (locomotion active), cette activation des cellules RS par les agonistes nicotiniens accélère la locomotion fictive en cours (Le Ray et al., 2003). L'application de la D-tubocurarine (antagoniste nicotinique) a déprimé l'amorce de la locomotion déclenchée par la stimulation de la RLM (Le Ray et al., 2003). Ainsi, les projections cholinergiques de la RLM sur les cellules RS jouent un rôle primordial

dans l'initiation, le contrôle mais aussi la modulation de l'activité des cellules RS durant la locomotion.

Chez la lamproie, un groupe de cellules immunoréactives aux récepteurs muscariniques a été localisé latéralement, au niveau du noyau réticulé rhombencéphalique postérieur (PRRN) grâce à des expériences en immunohistochimie (revue Dubuc et al., 2008). Des travaux en collaboration et obtenus en partie dans notre laboratoire ont montré que le système muscarinique augmente l'activité des cellules RS (Smetana et al., 2007). En effet, l'application en bain d'agonistes muscariniques a déclenché des dépolarisations récurrentes dans les cellules RS (Smetana et al., 2007). De plus, selon des données préliminaires, un groupe de cellules immunoréactives aux récepteurs muscariniques et localisées proche du PRRN serait activé par les projections cholinergiques issues de la région locomotrice mésencéphalique (Le Ray et al., 2003). Ainsi, la modulation muscarinique des cellules RS pourrait provenir de ces cellules immunoréactives, elle-mêmes activées par les projections cholinergiques de la RLM. Au niveau fonctionnel, il a été suggéré que cette modulation muscarinique permettrait de fournir une excitation additionnelle aux cellules RS durant la locomotion afin qu'elles puissent augmenter la puissance de la nage (revue Dubuc et al., 2008).

4.3. L'influence du système sérotoninergique

Plusieurs études anatomiques ont montré la présence d'une innervation sérotoninergique au niveau du tronc-cérébral et autour des cellules RS de la lamproie larvaire ou adulte (Steinbusch et al., 1981 ; Viana Di Prisco et al., 1994 ; Antri et al.,

2006, 2008 ; Abalo et al., 2007). Au niveau des cellules de relais du système trigéminal (Viana Di Prisco et al., 2005), une riche innervation sérotoninergique est aussi présente (Pierre et al., 1992). La contribution de la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) a été mise en évidence dans une étude récente réalisée dans notre laboratoire et portant sur les dépolarisations soutenues des cellules RS déclenchées par la stimulation des afférences trigéminales (Antri et al., 2008). En plus de diminuer la transmission sensorielle au niveau des cellules RS, la 5-HT a augmenté le seuil de déclenchement des dépolarisations soutenues. D'un point de vue fonctionnel, il a été suggéré que la 5-HT pourrait jouer un rôle important dans la locomotion de fuite en modulant les afférences sensorielles des cellules RS durant ce type de nage (Antri et al., 2008).

5. BUT DE L'ETUDE

Bien que l'organisation générale de la locomotion soit semblable chez tous les vertébrés, le système nerveux des mammifères est complexe. Nous avons donc utilisé la lamproie, modèle de vertébré simple, pour mieux comprendre comment les informations cutanées peuvent être transformées en comportement de fuite. Pour cela, il fallait étudier les mécanismes cellulaires qui sous-tendent l'activité des cellules RS, suite à une brève stimulation cutanée. Ainsi, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle des afférences synaptiques et des réserves de calcium internes dans le maintien des dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS du MRRN. Nous avons également étudié l'activité des cellules RS de différents groupes en réponse à une stimulation cutanée.

L'objectif de mon travail de thèse était donc de mieux comprendre les mécanismes synaptiques et intrinsèques qui sous-tendent l'activité des groupes de cellules RS de la lamproie suite à une brève stimulation sensorielle d'origine cutanée capable d'induire la nage de fuite.

Les questions que je me suis posées sont les suivantes:

- 1) Est-ce que les afférences synaptiques contribuent au maintien des dépolarisations soutenues déclenchées par une stimulation de type cutané?**

Dans des préparations semi-intactes, nous avons d'abord déterminé si les afférences spinales contribuent à maintenir les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS. Puis, nous avons évalué si les afférences cutanées, issues du corps de l'animal et étant acheminées aux cellules RS par les cordons dorsaux, étaient impliquées. Ensuite, nous avons examiné si les afférences excitatrices glutamatergiques contribuent au maintien des dépolarisations soutenues. Enfin, nous avons testé si les afférences inhibitrices glycinergiques participent à arrêter les dépolarisations soutenues des cellules RS.

- 2) Est-ce que les réserves internes de calcium contribuent aux dépolarisations soutenues des cellules RS?**

Dans des préparations *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés, nous avons d'abord confirmé la présence des réserves internes de Ca^{2+} au niveau des cellules RS à l'aide de l'imagerie calcique. Puis, à l'aide d'enregistrements intracellulaires, nous avons déterminé si les réserves de calcium internes contribuent aux dépolarisations soutenues d'origine sensorielle des cellules RS.

3) Est-ce que les groupes de cellules RS montrent un patron d'activation similaire suite à une stimulation cutanée ?

Dans des préparations réduites, l'imagerie calcique et les enregistrements intracellulaires nous ont permis d'étudier et de comparer les réponses des cellules RS localisées dans les différents noyaux réticulés suite à une stimulation sensorielle de type cutané.

Les travaux effectués durant mon doctorat montrent pour la première fois que les afférences excitatrices, incluant les afférences spinales, contribuent à prolonger la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée qui dépendent des propriétés intrinsèques. Nos données montrent toutefois que les afférences cutanées issues du corps et de la tête de l'animal ne participent pas au maintien des dépolarisations soutenues et que ces dernières ne dépendent pas des afférences glycinergiques pour s'arrêter. De plus, sans être indispensables au maintien des dépolarisations soutenues, les réserves de calcium internes sont présentes au niveau des cellules RS. Nous avons également montré que les afférences cutanées induisent un patron de recrutement similaire entre les différents groupes de cellules RS et ces cellules sont toutes capables de produire des dépolarisations soutenues au-delà d'une même intensité seuil. Ainsi, les cellules RS localisées au niveau des quatre noyaux réticulés sont susceptibles de se comporter en neurone de commande, capable d'activer plus ou moins simultanément les réseaux locomoteurs spinaux et de déclencher la nage de fuite en réponse à une stimulation sensorielle d'origine cutanée.

CHAPITRE 2 :
METHODOLOGIE

MÉTHODOLOGIE

1. LES TYPES DE PRÉPARATIONS

Au cours de mon doctorat, j'ai utilisé deux préparations de lamproie *in vitro*, possédant des neurones et des réseaux moteurs fonctionnels ayant conservé leur intégrité : la préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolés et la préparation semi-intacte. De façon générale, les animaux ont préalablement été anesthésiés dans une solution de MS-222. Ils ont ensuite été disséqués puis maintenus en vie dans une solution physiologique froide et continuellement perfusée: la solution de Ringer (pH 7.4 ; 8-10°C ; pour composition, voir les publications 1 et 2 du chapitre suivant).

1.1. La préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolés

Dans cette préparation, le tronc cérébral est attaché à quelques segments (10-12 segments) de la moelle épinière. Le cerveau, le tronc cérébral et la surface dorsale de la moelle épinière sont exposés, tandis que la surface ventrale de la moelle épinière est attachée à la notocorde sous-jacente. La peau de la région de la tête de l'animal peut être conservée afin d'y appliquer une stimulation mécanique cutanée. Dans certains cas, l' α -bungarotoxine (10 μ M / mL) a été appliquée pour éviter les mouvements musculaires indésirables de la ventouse de la préparation.

1.2. La préparation semi-intacte

Dans cette préparation, la queue est libre de bouger tandis que le cerveau, le tronc cérébral et la partie rostrale de la moelle épinière sont disséqués puis

immobilisés de la même façon que la préparation de tronc cérébral-moelle épinière isolés (Viana Di Prisco et al, 1997, 2000 ; Sirota et al., 2000 ; Brocard et Dubuc, 2003). Dans une telle préparation, qui conserve certaines afférences sensorielles, il est possible d'observer le déclenchement, la modulation et l'arrêt de l'activité cellulaire et du comportement locomoteur simultanément et en temps réel.

2. L'IMAGERIE CALCIQUE

La technique d'imagerie calcique permet de suivre l'activité de plusieurs cellules RS à l'intérieur d'un même noyau réticulé, en même temps (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Ainsi, dans des préparations réduites *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés, nous avons appliqué l'indicateur calcique fluorescent Calcium Green Dextran (10 000 MW, Molecular Probes, PO Box 22010, Eugene, OR, Etats-Unis) au niveau d'une lésion des segments les plus rostraux de la moelle épinière (rostral au 5^e segment spinal). Cette application des cristaux de Calcium Green a permis de marquer les cellules RS (qui projettent au niveau spinal) par transport rétrograde pendant 24-48 heures. Cette étape se faisait à la noirceur.

Les préparations ont ensuite été transférées dans une chambre expérimentale où les cellules RS marquées ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence de type Nikon Eclipse E600FN (Nikon, Montréal, QC, Canada) muni d'objectifs à immersion à eau (20X). Les sites d'enregistrements (corps cellulaires) ont été détectés et amplifiés grâce à une caméra de type Photometrics COOLSNAP HQ CCD (Photometrics; Trenton, NJ, Etats-Unis) et délimités sur l'écran de l'ordinateur. Les variations calciques ont été enregistrées et exprimées en termes de

changement de fluorescence relative ($\Delta F/F$). Les fichiers des signaux calciques ont été analysés en utilisant le programme Clampfit 9.2 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, Etats-Unis)

3. LES ENREGISTREMENTS INTRACELLULAIRES

Les enregistrements intracellulaires des cellules RS ont été réalisés à l'aide d'électrodes de verre ayant une résistance de 60-150 M Ω . Les électrodes étaient remplies d'une solution d'acétate de potassium (4M). Des enregistrements unitaires ont été effectués dans des cellules RS individuelles, et des enregistrements pairs ont été réalisés au niveau de paires de cellules RS homologues (localisées bilatéralement au même niveau dans le tronc cérébral). Ces enregistrements ont été amplifiés par un amplificateur Axoclamp 2A (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, Etats-Unis). Les données acquises ont été numérisées à l'aide d'une interface Digidata 1322 (Axon Instruments), puis visualisées et stockées grâce au logiciel informatisé Clampex 9.2 (Axon Instruments). Les données ont été analysées en utilisant le programme Clampfit 9.2 (Axon Instruments).

4. LE DÉCLENCHEMENT ET L'ENREGISTREMENT DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DE LA LAMPROIE

Durant nos expériences sur des préparations semi-intactes, la nage et l'activité des cellules RS ont été déclenchées par la stimulation des afférences cutanées. Les afférences cutanées ont été stimulées soit **1)** par la **stimulation électrique directement appliquée au niveau du nerf trijumeau** à l'aide d'une microélectrode

de tungstène ayant une résistance variant entre 0,5-5,0 Mohms, connectée à un stimulateur de type Grass S88 (Grass Instrument, Quincy, MA, Etats-Unis) et à une unité de stimulation (SIU; Grass Instrument), soit **2**) par la **stimulation mécanique de la peau de la tête ou de la queue**. La stimulation mécanique de la tête a été appliquée grâce à une sonde (0.5 mm de diamètre) contrôlée par ordinateur positionnée au-dessus de la préparation. La position initiale et la trajectoire de la sonde étaient initialement déterminés et entrés dans un programme informatique de sorte que la sonde puisse descendre vers la préparation, appliquer une force, puis remonter à sa position initiale de façon répétée. La stimulation mécanique de la queue a été effectuée en pinçant la partie caudale de la queue ou de la nageoire dorsale à l'aide de pinces fines.

Une période de repos de 3-5 minutes entre les stimulations a permis d'éviter une dépression synaptique ou des signes d'habituation des réponses.

Dans ces expériences, la nage a été visualisée à l'aide d'**enregistrements électromyographiques** (EMGs) par l'insertion de microfilaments en acier inoxydable (50 µm de diamètre ; California Fine Wire, Grover Beach, CA, Etats-Unis) directement au niveau des muscles de la queue. Les enregistrements unilatéraux ou bilatéraux ont été amplifiés (1000x), filtrés (bande passante : 30-500 Hz) et numérisés à une fréquence d'échantillonnage de 5 kHz.

5. L'APPLICATION D'AGENTS PHARMACOLOGIQUES

Dans des préparations semi-intactes, afin de déconnecter le tronc cérébral de la moelle épinière de façon réversible, la xylocaïne (anesthésiant) a été appliquée

localement dans un puits (2 to 3 mm de diamètre) composé d'un matériel élastomère (Reprosil, Vinyl Polysiloxane, Dentsply Caulk, Milford, DE, Etats-Unis) construit à cet effet au niveau des segments rostraux de la moelle épinière et scellé par de la Vaseline. Cette nouvelle technique d'application de la xylocaine employée dans le laboratoire nous a donc permis voir les effets de bloquer les afférences spinales ascendantes des cellules RS ainsi que les projections issues de structures supraspinales descendant vers la moelle épinière sur la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée. La xylocaine, mélangée à l'indicateur visuel Fast Green, était éjectée à partir d'une seringue montée sur un micromanipulateur et localisée directement au-dessus du puits. Le Fast Green a permis de visualiser d'éventuelles fuites de la xylocaine hors du puits. Par la suite, la xylocaine a été rincée pendant une période 60 à 75 minutes, en la remplaçant par une solution de Ringer dans le puits.

Durant les dépolarisations soutenues d'origine cutanée, les récepteurs glutamatergiques ionotropiques, AMPA et NMDA, des cellules RS ont été bloqués par l'éjection locale d'un mélange de CNQX (1 mM) et d'AP-5 (2 mM), directement au-dessus des cellules RS testées par des impulsions de pression positive passant par une micropipette d'éjection à l'aide d'un Picospritzer (General Valve Corporation, Fairfield, NJ, Etats-Unis). La glycine (1 mM) et la strychnine (500 μ M) ont été éjectées localement de façon similaire, afin de respectivement bloquer et activer les récepteurs glycinergiques des cellules RS, durant la dépolarisation soutenue en cours. Enfin, l'éjection locale de GABA a activé les récepteurs GABAergiques. Ces agents pharmacologiques étaient mélangés au Fast Green pour suivre l'étendue de l'éjection.

De plus, dans des préparations réduites, des éjections de glutamate (6 mM) et de caféine (50 mM) ont été appliquées le long de la ligne médiane afin d'activer des groupes de cellules RS. Dans ces expériences, la Ryanodine (20 μ M) a ensuite été ajoutée à la solution de perfusion afin de bloquer la libération du calcium provenant des réserves internes. Ceci était suivi de l'application subséquente de l'AP-5 (200 μ M) pour bloquer les récepteurs NMDA.

Enfin, dans certains cas, la Tetrodotoxine (TTX, 1 μ M) a été appliquée en bain tout au long de l'expérience, afin d'isoler synaptiquement les cellules testées.

Les agents pharmacologiques ont été ajoutés au système de perfusion pendant au moins 40 minutes avant les enregistrements, et dans certains expériences, une période de rinçage d'au moins 60 minutes a été allouée.

6. LES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Etats-Unis). Les résultats ont été présentés sous la forme d'une valeur moyenne +/- l'erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre « n » de préparations (animaux) utilisées a aussi été indiqué. La différence entre les valeurs moyennes de deux groupes de données a été évaluée à l'aide du test-t de Student. La différence entre les moyennes de plus de deux groupes a été évaluée par une Analyse de Variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey. Les valeurs moyennes ont été considérées statistiquement significatives lorsque les valeurs de p étaient inférieures à 0,05.

*CHAPITRE 3 : RÉSULTATS
EXPÉRIMENTAUX*

Ce premier chapitre de résultats comprend la publication suivante, acceptée pour publication dans « Journal of Neuroscience » le 20 décembre 2008:

The contribution of synaptic inputs to sustained depolarizations in reticulospinal neurons

Myriam Antri ², Karine Fénelon ² and Réjean Dubuc ^{*1,2}

¹Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, (Québec), Canada, H3C 3P8. ²Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Département de physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7

En réponse à une stimulation sensorielle, les cellules reticulospinales (RS) peuvent produire des dépolarisations soutenues qui dépendent de propriétés intrinsèques et qui sont associées à la nage de fuite. Ces dépolarisations soutenues peuvent durer pendant plusieurs secondes ou minutes et nous avons voulu savoir si, en plus des propriétés intrinsèques, les afférences synaptiques contribuent à moduler la durée des dépolarisations soutenues, en les prolongeant pendant de longues périodes de temps. Tout d'abord, l'influence des afférences spinales ascendantes sur les dépolarisations soutenues d'origine cutanée été étudiée sur des préparations semi-intactes, où la queue est libre de bouger. Bloquer ces afférences par l'application de xylocaine sur les segments spinaux les plus rostraux a considérablement diminué la durée des dépolarisations soutenues de longue durée. Les oscillations du potentiel membranaire en phase avec l'activité locomotrice et qui étaient visibles en conditions contrôles ont également été abolies par la xylocaine. Ensuite, nous avons étudié la contribution des afférences excitatrices glutamatergiques dans les dépolarisations soutenues de longue durée. Pour ce faire, le CNQX et l'AP-5 ont été appliqués sur l'une de deux cellules

RS homologues localisées de chaque côté du tronc cérébral, l'autre servant de contrôle. Dans la cellule exposée aux antagonistes glutamatergiques, l'amplitude de la dépolarisation soutenue a considérablement été diminuée, contrairement à la cellule RS contrôle controlatérale. A l'inverse, l'application locale de glycine n'a produit qu'une hyperpolarisation membranaire transitoire ainsi qu'une forte réduction de l'amplitude des oscillations membranaires. De plus, l'application locale de strychnine n'a pas modifié la durée des dépolarisations soutenues, ce qui suggère que des mécanismes autres qu'une inhibition glycinergique, sont impliqués dans l'arrêt des dépolarisations soutenues des cellules RS. Nous concluons que les afférences excitatrices glutamatergiques, incluant les afférences spinales ascendantes, coopèrent avec les propriétés intrinsèques des cellules RS afin de maintenir ces cellules dans un état dépolarisé pendant des périodes de temps prolongées afin de produire de longs épisodes de nage de fuite.

Section: Cellular/Molecular Neuroscience

Senior editor: Dr. Chris McBain

The contribution of synaptic inputs to sustained depolarizations in reticulospinal neurons

Myriam Antri ², Karine Fénelon ² and Réjean Dubuc ^{*1,2}

¹Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, (Québec), Canada, H3C 3P8

²Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Département de physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7

M. Antri and K. Fénelon contributed equally to this work.

Abbreviated title: Sustained depolarizations in reticulospinal neurons

Number of text pages: 37

Number of figures: 10

Number of tables: 0

Number of words: Abstract = 235 / Introduction = 466/ Discussion = 1498

Keywords: reticulospinal neurons; sensorimotor integration; sustained depolarization; glutamate; glycine; lamprey

* Correspondence to:

Dr. Réjean Dubuc

Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal,
(Québec), Canada, H3C 3P8

Phone: (514) 343 5729

Fax: (514) 343 6611

Email: dubuc.rejean@uqam.ca

Acknowledgements: The authors wish to express their gratitude to D. Veilleux for her assistance with the experiments, to C. Valiquette for his expertise in computer programming and to F. Bernard for his help with the figures. We are also grateful to F. Auclair and J. Einum for critical review of the manuscript.

Grant Sponsors: Individual and Group grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Grant Numbers: 15129 and 15176 (to RD), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Grant Number: 217435-01 (to RD), and the *Groupe de recherche sur le système nerveux central* from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ), Grant Number: 5249. MA received a Jasper Fellowship from the Université de Montréal. KF received a studentship from the FRSQ.

1. ABSTRACT

Sensory stimulation elicits sustained depolarizations in lamprey reticulospinal (RS) cells for which intrinsic properties were shown to play a crucial role. The depolarizations last up to minutes and we tested whether the intrinsic properties required the cooperation of synaptic inputs to maintain RS cells depolarized for such long periods of time. Ascending spinal inputs to RS cells were reversibly blocked by applying xylocaine over the rostral spinal cord segments. The duration of the sustained depolarizations was markedly reduced. The membrane potential oscillations in tune with locomotor activity that were present under control conditions were also abolished. The contribution of excitatory glutamatergic inputs was then assessed by applying CNQX and AP-5 over one of two simultaneously recorded homologous RS cells on each side of the brainstem. The level of sensory-evoked depolarization decreased significantly in the cell exposed to the antagonists as compared to the other RS cell monitored as a control. In contrast, local application of glycine only produced a transient membrane potential hyperpolarization with a marked reduction in the amplitude of membrane potential oscillations. Locally applied strychnine did not change the duration of the sustained depolarizations suggesting that mechanisms other than glycinergic inhibition are involved in ending the sustained depolarizations in RS cells. It is concluded that excitatory glutamatergic inputs, including ascending spinal feedback, cooperate with intrinsic properties of RS cells to maintain the cells depolarized for prolonged periods, sustaining long bouts of escape swimming.

2. INTRODUCTION

Neural activity depends on interactions between synaptic inputs and intrinsic membrane properties (Harris-Warrick and Marder, 1991; Marder, 1998; Steriade, 2001; Soto-Treviño et al., 2005; Marder and Goaillard, 2006). Understanding such interactions is particularly challenging in mammals because of the great complexity of their central nervous system (CNS) and simpler models are needed. The CNS of lampreys provides excellent accessibility to cell networks as well as the possibility to identify detailed cellular mechanisms underlying behaviors (McClellan and Grillner, 1984; Parker and Grillner, 1998; Viana Di Prisco et al., 1997, 2000; Grillner et al., 2001). In the spinal cord, synaptic inputs were shown to be essential to generate the basic locomotor pattern (Buchanan, 1999, 2001) and yet, postinhibitory rebound and bistable membrane properties contribute significantly (Wallén and Grillner, 1987; Matsushima et al., 1993, El Manira et al., 1994; Tegnér et al., 1997).

We previously demonstrated in the lamprey model that intrinsic membrane properties play a crucial role in the activation of brainstem reticulospinal (RS) neurons in response to sensory inputs (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). At low stimulation strengths, synaptic responses are elicited in RS cells, the size of which increased linearly with the stimulation strength (see Viana Di Prisco et al., 1997, Fig. 3). Further increasing the stimulation intensity produced depolarizing plateaus that required the activation of NMDA receptors. We showed that once triggered, the depolarizing plateaus in RS cells were associated with the onset of locomotion in an *in vitro* semi-intact preparation, where the brainstem and rostral spinal cord were

exposed with the tail left attached to freely swim behind. BAPTA injection into the recorded RS cell abolished the depolarizing plateaus. This indicated that intrinsic properties were involved and that they were Calcium-dependent. We then showed that the sustained depolarizations were abolished by flufenamate suggesting that a calcium-activated non-selective cationic current (I_{CAN}) produced the depolarizing plateaus in RS cells. In other systems, depolarizing plateaus have been shown to be voltage-dependent (Kiehn, 1991). This was not seen for the sustained depolarizing plateaus we described in RS cells despite the presence of Calcium mediated intrinsic properties. Therefore to avoid confusion, we will now use the term “sustained depolarizations” rather than “depolarizing plateaus”.

In semi-intact preparations, the sustained depolarizations could last for minutes. This raised the question as to whether intrinsic properties alone could provide such long-lasting sustained depolarizations in RS cells. We hypothesised that synaptic inputs could cooperate with the intrinsic properties to prolong the sustained depolarizations once elicited. This issue was addressed in this paper. We now show that spinal cord inputs do contribute as well as excitatory glutamatergic inputs. Inhibitory inputs on the other hand did not shut off the sustained depolarization. Altogether our results indicate that synaptic inputs can modulate intrinsic properties to maintain the RS cells depolarized for long periods of time.

3. METHODS

3.1. Semi-intact lamprey preparation

The experiments were carried out on larval sea lampreys (*Petromyzon marinus*, n= 51) collected from streams entering Lake Champlain (Québec, CANADA). All surgical procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and were approved by the University Animal Care and Use Committees of the Université de Montréal and Université du Québec à Montréal. Prior to dissection, the animals were anaesthetized with tricaine methanesulphonate (MS 222, 100 mg/l, Sigma, Oakville, ON, Canada) and transferred to a solution of oxygenated (with 100% O₂), cold Ringer's (pH 7.4) of the following composition (in mM): 130 NaCl, 2.1 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.8 MgCl₂, 4 HEPES, 4 dextrose and 1 NaHCO₃. The rostral part of the body down to the caudal gills was dissected extensively so that the skin, muscles and viscera were removed. The brain and the rostral spinal cord were exposed with the underlying cranium and notochord. The remaining caudal part of the body was left intact to freely swim in the recording chamber. In 7 experiments, the skin covering the dorsal head region was left attached. A complete brain transection was performed rostral to the mesencephalon for decerebration.

This semi-intact preparation was then transferred to the recording chamber continuously perfused with cold oxygenated Ringer's (8-10°C). The rostral, dissected end of the preparation was pinned down to a silicone elastomer (Sylgard) at the

bottom of the recording chamber, whereas the tail behind was completely free to swim in the deeper end of the chamber (see Fig.1A).

3.2. Recordings and stimulation

In all experiments, the recorded RS cells were located in the middle rhombencephalic reticular nuclei (MRRN) on both sides of the brain. The recorded cells were in all cases the giant Müller cells visually identifiable and bilaterally paired (Rovainen, 1967; Rovainen et al., 1973). Single and paired (bilaterally homologous cells recorded simultaneously) intracellular recordings of RS cells were performed. Neurons were impaled under visual inspection using sharp glass microelectrodes filled with 4 M potassium acetate (80-130 M Ω). Only RS cells with a stable resting membrane potential lower than -65 mV and having action potentials with amplitudes of more than 70 mV (truncated in the figures) were included in the data analysis. The intracellular recordings were made using an Axoclamp 2A amplifier in bridge mode (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) connected to a computer via a Digidata 1322 interface (Axon Instruments Inc.). The intracellular signals were digitized using Clampex 9.2 software (pCLAMP9 pack program; Axon Instruments Inc.). Off-line analysis was carried out using Clampfit 9.2 software (Axon Instruments Inc.).

Different modes of sensory stimulation were applied to elicit sustained depolarizations in RS cells. Mechanical pressure was applied to the skin of the head using a fine probe (tip diameter of 0.5 mm) kept at the same temperature as the bathing Ringer's solution. The probe was held above the preparation attached to a strain gauge connected to a computer-controlled step motor. The number of steps

needed to reach the preparation was calculated. Once the motor was activated, the probe moved down applying pressure to the skin after which it ascended back to its initial position. The number of steps was kept unchanged for all trials so that the stimulation (pressure) could be repeatedly applied at the same intensity for several trials, while monitoring the exact moment of the stimulation.

Electrical stimulation of the trigeminal nerve (Vth cranial nerve) was also used as a mean for eliciting sustained depolarizations in RS cells. Stimulation shocks of 1ms (0.3-8 μ A at 2-50 Hz) were applied with a glass-coated tungsten microelectrode (0.5-2 M Ω , 10-25 μ m tip; homemade) for periods lasting between 100 ms and 7 secs. The stimulation was delivered using a Grass S88 stimulator (Grass Instrument, Quincy, MA) connected to a stimulus isolation unit (SIU; Grass Instrument). Pinching the caudal dorsal fin of the body with fine forceps was also used to elicit the sustained depolarizations in RS cells. Each stimulation trial was followed by a resting period of at least 5 minutes to ensure that the recordings were made during steady conditions, with as little habituation of the responses as possible.

The swimming bouts were monitored by recording uni- or bilateral electromyographic (EMG) activity. Pairs of Teflon-coated stainless steel wires (50 μ m in diameter; California Fine Wire, Grover Beach, CA) were inserted in myotomes at the same rostro-caudal level on each side of the body (see Fig. 1A). The EMG recordings were amplified (1000x), filtered (bandwidth: 30 Hz to 500 Hz) and digitized at a sampling rate of 5 kHz.

3.3. Drug application

A small circular bath (2 to 3 mm in diameter) made out of elastomer-type material (Reprosil, Vinyl Polysiloxane, Dentsply Caulk, Milford, DE) was tightly fitted over the spinal cord, between the 3rd and 4th segments. The small bath, carefully sealed with Vaseline, was first filled with a small drop of Ringer's solution colored with the inert dye Fast Green, a visual control to ensure that the bath was not leaking. Then, the small bath was filled with xylocaine (0.01 mg/ml, AstraZeneca, Mississauga, ON) to reversibly block ascending spinal inputs to RS cells. The anaesthetic, mixed with Fast Green, was ejected into the small bath through the needle of a 1ml syringe mounted on a micromanipulator. A 60-75 minute washout period, where xylocaine was replaced with Ringer's, was allocated in some cases (n=10) for spinal inputs to RS cells to recover. In 5 cases, sensory inputs ascending in the dorsal columns were blocked prior to xylocaine application. The dorsal columns on both sides were lesioned 1 or 2 spinal segments caudal to the level of the last pair of gill pores. Histological sections of the lesioned area were made to verify that the lesion included only the dorsal columns and not other spinal cord funiculi.

During locomotion, a mixture of glutamatergic antagonists, CNQX and AP-5 (1 mM, 2 mM, respectively, n=15 RS cells), the inhibitory neurotransmitter glycine (1 mM, n=19 RS cells) or the glycine receptor antagonist strychnine (500 μ M, n = 4 RS cells) was locally ejected over one of two homologous RS cells recorded simultaneously on each side of the brainstem. All the drugs were ejected on average 11.9 ± 1.1 seconds after the end of the triggering synaptic stimulation to avoid an

action of the drugs on the effect of the stimulation. The membrane potential fluctuations of the homologous RS cell contralateral to the ejection served as a control. The ejections were made by applying positive pressure pulses (10-200 ms) through glass micropipettes using a Picospritzer (General Valve Corporation, Fairfield, NJ). As previously described by us and others (Viana Di Prisco et al., 2005; Paggett et al., 2004), care was used to efficiently produce very localized actions of drugs. The drugs were ejected close to the tissue and the ejected solution was colored with Fast Green as a visual indicator for monitoring the extent of the diffusion. The outflow of the recording chamber was positioned near the ejection site to restrict the ejection to the recorded RS cells. Ejections of Fast Green mixed with Ringer's did not produce any effect on RS cells (Brocard and Dubuc, 2003). In some cases, Tetrodotoxine (TTX, 1 μ M) was bath applied before and after glycine (100 μ M) perfusion.

All the above-mentioned drugs were purchased from Sigma, stored frozen in aliquots of stock solutions and diluted to the desired concentration in fresh Ringer's prior to use.

3.4. Data analysis

RS cells show sustained depolarizations with superimposed rhythmic membrane potential oscillations in response to sensory stimulation. The mean depolarization duration (in seconds) was measured in control, under xylocaine and, in ten cases, after the washout period. The starting point for the measurement of the depolarization duration was when the values of the membrane potential (V_m) started

to depolarize (above the resting level) right after the stimulation artefact. The end point was when the V_m values returned back to resting (or pre-stimulation) values. The effects of CNQX/AP-5 ejections were characterized by comparing the sustained depolarization durations of the control with that of the tested RS cells. The start and duration of the ejections (in seconds) were measured from the Picospritzer marker trace output. The effect of the drug mixture was also measured on the area of the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs).

The effects of glycine ejections were characterized using several parameters: 1) the duration of the drug ejection (obtained from the Picospritzer marker trace output), 2) the maximum membrane potential hyperpolarization (in mV), 3) the duration of the drug effect measured from the time elapsed between the beginning of the drug effect (i.e. intersection between a line fitted through the initial and sustained part of the depolarization and the first point where the V_m decreased below this fitted line) and the time when V_m returned to the depolarization level, 4) the latency (in seconds) between the start of the ejection (from the Picospritzer marker trace output) and the beginning of drug effect, 5) the time constant (τ) obtained by first, fitting an exponential curve between the beginning of the drug effect and the maximum hyperpolarization and then, taking the time (in ms) at which 63% of the maximum hyperpolarization was reached, 6) the return to baseline (subtracting the duration of the ejection from the duration of the effect).

The effect of the glycine receptor antagonist, strychnine, was also characterized. The duration (in seconds) of the sustained depolarizations of the control RS cells were measured and compared to that of the test RS cells.

The sustained depolarizations were accompanied by swimming in the semi-intact preparations. In all the experiments where membrane potential oscillations were clearly visible in RS cells during swimming under control conditions, their amplitude was measured before and during drug ejections by subtracting a peak value from the following trough value. Because the ejections were done rapidly after the start of the sustained depolarizations, only 8 consecutive steady oscillations were measured in control and in the presence of the drugs, during a bout of locomotion.

The swimming cycle duration was determined by measuring the time lapse between the onsets of two consecutive EMG bursts on the same side using homemade software.

Statistical analyses were done using Origin software (OriginLab Corporation, Northampton, MA). A Student's paired t-test was used to compare means between two groups. A one-way ANOVA, followed by a Tukey's test for post hoc analysis was used to compare means between more than two groups. A Pearson's correlation analysis was also performed to test whether two groups were linearly correlated. A confidence level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

4. RESULTS

Sustained depolarizations elicited by sensory stimulation in RS cells varied considerably in duration from relatively short depolarizations to longer events that could even last more than a minute (3 to 110 s). Variability was observed within as well as between preparations. We previously showed that intrinsic properties played a crucial role in the sustained depolarizations (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). We now examined whether synaptic inputs from the spinal cord (Dubuc and Grillner, 1989; Vinay and Grillner, 1993; Einum and Buchanan, 2004) could add to the intrinsic properties to prolong the depolarizations of RS cells.

4.1. The contribution of spinal inputs to sustained depolarizations elicited in RS cells

Ascending and descending spinal inputs were reversibly blocked by locally applying the anaesthetic xylocaine in a well constructed over the rostral spinal segments (Fig. 1A) and the duration of the trigeminal-evoked sustained depolarization and locomotor activity were examined. In preliminary experiments, glass coated tungsten microelectrodes (0.5-2 M Ω , 10-25 μ m tip; homemade) were used to microstimulate the ascending lateral spinal cord axons (Fig. 1, S stim) in order to confirm the blockade of spinal inputs by xylocaine. The rostro-caudal position of the microelectrodes was localized from 5 to 10 spinal segments away from the xylocaine bath. In all cases, the synaptic responses elicited by lateral column stimulation under control condition were abolished by xylocaine. Furthermore, during xylocaine, the trigeminal sensory stimulation failed to induce swimming indicating

that the drug was efficiently blocking the connexions between the brainstem and the spinal cord (Fig. 1B2, C2, EMG traces). In 20 of the 22 RS cells, the sustained depolarizations were still present (Fig. 1B2, C2). Overall, there was a significant decrease in the durations of the sustained depolarizations (Fig. 2A, B xylocaine). In 10 of these cases, the RS cells were recorded long enough to obtain full or partial recovery (Fig. 2A, B washout). After a washout period of 45-60 minutes, the sustained depolarizations recovered with a duration similar to that of control conditions (Fig. 2B; control = 28.8 ± 4.5 s; xylocaine = 10.3 ± 1.1 s; washout = 31.5 ± 7.2 s; $p < 0.01$ for xylocaine, 1-way ANOVA; $n = 20$). Swimming activity also recovered (Fig. 1B2 vs. 1B3; 1C2 vs. 1C3, EMG traces). In the 2 of the 22 RS cells, xylocaine abolished the sustained depolarizations altogether (data not shown).

Interestingly, the effects of blocking ascending spinal inputs to RS cells varied depending on whether the sustained depolarizations were of short (Fig. 1B1) or of long duration (Fig. 1C1). Xylocaine significantly reduced the duration of the sustained depolarizations when the latter lasted 25 s and more (Fig. 2A). In the 9 neurons with depolarizations shorter than 25 s, xylocaine did not significantly reduce the duration (Fig. 2C, less than 25 s; control = 12.5 ± 1.8 s vs. xylocaine = 10.1 ± 1.8 s; $p > 0.05$, t-test; $n = 9$), whereas in the other 11 neurons with depolarization lasting more than 25 s, there was a significant reduction after xylocaine (Fig. 2C more than 25 s; control = 43.4 ± 4.9 s vs. xylocaine = 8.9 ± 1.7 s; $p < 0.001$, t-test; $n = 9$).

In 12 out of the 20 RS cells, membrane potential oscillations were clearly visible during swimming in control conditions. Xylocaine abolished the oscillations in all cases. One such example is illustrated in Figure 1C2. In the remaining 8 RS

cells, the membrane potential oscillations were not large enough in control conditions to allow quantification of their amplitude before and after xylocaine.

We then investigated the effects of reversibly blocking ascending inputs coming from the spinal cord in the absence of sensory feedback. In 5 experiments, the dorsal columns were bilaterally transected at the rostralmost spinal segments level. The duration of the trigeminal-evoked sustained depolarizations recorded in RS cells was then measured following the reversible blockade of the remaining ascending spinal inputs by locally applying xylocaine as described above. In control conditions, long lasting sustained depolarizations associated with locomotor activity were still induced in the absence of sensory feedback (dorsal column lesion; Fig. 3A1). Xylocaine application over the rostral spinal segments elicited a significant decrease in the duration of the sustained depolarizations as observed in experiments where the dorsal columns were left intact (Fig. 3A2). Following a 60 minutes washout period, the reduction partially reverted back to control values (Fig. 3A3, B; control = 39.3 ± 6.5 s, xylocaine = 9.4 ± 1.7 s, washout = 24.8 ± 10.7 s, $p < 0.01$, 1-way ANOVA; n = 5).

Overall, these results suggest that the spinal cord inputs ascending in the ventral and/or lateral funiculi contribute to maintaining RS cells depolarized for a longer period of time. Moreover, the rhythmic membrane potential oscillations seen in RS cells during locomotion would require spinal cord inputs.

4.2. The effects of blocking excitatory glutamatergic inputs on sustained depolarizations

The previous results stressed the contribution of spinal inputs to the sustained depolarizations in RS cells. The possible contribution of glutamatergic synaptic inputs was then examined. Homologous RS cells on either side of the brainstem were recorded intracellularly while a mixture of ionotropic glutamate receptor antagonists (1 mM CNQX, 2 mM AP-5) was locally ejected over one of the recorded RS cells, the other cell serving as a control (Fig. 4A; test and control RS cells). First, we established that two homologous RS cells on either side exhibited sustained depolarizations of identical durations (Fig. 4 B1-B5). The response duration to a unilateral sensory stimulation were the same in the ipsi- and contralateral RS cell populations (Fig. 4C). The membrane potential oscillations were on the other hand antiphasic in the two homologous RS cells recorded on either side (Fig. 4B5, inset). Because the ionotropic glutamate receptor antagonists were locally applied on one of the recorded RS cell (tRS cell), it was necessary to determine the time course of the effects of the drugs. This was examined on the subthreshold synaptic responses elicited in RS cells (n=4) by single shocks delivered to one trigeminal nerve at a low frequency (0.1 Hz) for 2 minutes (Fig. 5A). Figure 5B1 shows an example of the gradual decrease in EPSP area with time for one RS cell. The data for the four recorded cells are illustrated in Figure 5B2. The synaptic responses began to decrease 10 to 20 s following the ejection and the effect was about maximal after 60 s. This indicated that the effects of the antagonists could be examined during the course of the sustained depolarizations. The effects were thus examined for 15 pairs of homologous RS cells recorded in 10 semi-intact preparations in which swimming was monitored through EMG recordings (Fig. 6A). The glutamate receptor antagonists

CNQX and AP-5 were ejected on average 8.9 ± 1.2 s after the beginning of the sustained depolarization for a mean duration of 50.9 ± 16.9 s. As expected from the previous experiments (Fig. 5), the ejection did not produce an immediate effect. Instead, there was a gradual decrease in the membrane potential of the test RS cell as compared to the control RS cell on the other side (Fig. 6C). Even though the drug ejection ended before the end of the locomotor bout, the membrane potential of the test RS cell failed to return to the depolarization level comparable to that of the control RS cell on the non-ejected side. Whereas the duration of the responses of two homologous cells was very similar and perfectly correlated under control conditions (Fig. 6B, D1), the depolarization durations of the test RS cells were shorter (Fig. 6D2). Pooling the 15 pairs together showed a significant reduction of 32.2 % in the depolarization duration of the test RS cells as compared to the control homologous RS cells (cRS cells: mean depolarization duration = 100 ± 12.2 % of control and tRS cells: mean depolarization duration = 67.8 ± 8.3 % of control; $p < 0.01$, t-test; $n = 15$ pairs). These results suggest that in addition to intrinsic properties, ionotropic glutamate receptor activation contributes to maintaining RS cells depolarized for a long period of time.

The glutamate receptor antagonists CNQX and AP-5 also induced a gradual decrease in the amplitude of membrane potential oscillations related to the locomotor activity (Fig. 7A – B). In 5 experiments, the mean oscillation amplitude decreased from 100 ± 13.1 % of control before ejection, to 67.3 ± 9.7 % of control 40 seconds after CNQX and AP5 ejection ($p < 0.05$, t-test; $n = 5$). On the other hand, there were

no significant changes in EMG burst frequency or area following the local application of the antagonists over one RS cell on one side (Fig. 6C; tEMG: mean frequency = 1.3 ± 0.2 Hz in control vs. 1.2 ± 0.2 Hz 40s after ejection, mean area = 837.9 ± 275.5 mV.s in control vs. 642.8 ± 229.6 40 mV.s after ejection and cEMG: mean frequency = 1.4 ± 0.2 Hz in control vs. 1.2 ± 0.2 Hz 40s after ejection, mean area = 457.5 ± 240.3 mV.s in control vs. 318.6 ± 143.4 40 mV.s after ejection; $p > 0.05$, paired t-test; $n = 10$ EMG pairs).

4.3. The effects of glycine receptor agonist and antagonist on sustained depolarizations

The above results suggest that intrinsic properties as well as excitatory synaptic transmission contribute to maintaining RS cells into a depolarized state. We investigated whether inhibitory amino acid transmission contributed to ending the sustained depolarizations. RS cells are known to receive fast inhibitory glycinergic inputs from different sources such as the ascending dorsal and lateral columns in the spinal cord and from the trigeminal nerve (Dubuc et al., 1993a, b; Vinay et al., 1998a, b; Einum and Buchanan, 2004). Using the experimental paradigm described above, glycine (1 mM) was ejected on one of two homologous RS cells recorded simultaneously, during sustained depolarizations ($n = 19$ pairs) induced by sensory stimulation. Unlike the slow and gradual effects of the mixture of CNQX and AP-5, the effects of glycine were rapid (Fig. 8A). The ejection of the drug (durations ranging from 6.9 to 11.1 s; mean duration = 8.5 ± 0.4 s) produced a transient

hyperpolarization ranging in amplitude from -5.36 to -20.61 mV with a mean value of -12.4 ± 0.8 mV. During the hyperpolarization, spiking activity ceased. Glycine acted very rapidly with a latency ranging from 0.04 to 0.45 s (mean 0.20 ± 0.04 s). The RS cell membrane potential hyperpolarized very quickly, as characterized by the very fast time constant (τ) ranging from 117.3 to 1726.7 ms (mean = 594.2 ± 100.0 ms). The duration of the membrane hyperpolarization (ranging from 8.8 to 21.69 s; mean = 15.4 ± 1.4 s) was proportional to that of the glycine ejection ($r = 0.46$; $p = 0.02$; $n = 19$). In 56 trials (out of 66 trials), the ejection was stopped before the end of the sustained depolarization and the membrane potential promptly returned back to the pre-ejection level, similar to that of the control cell. The time required for the test cell to return to control depolarizing values ranged from 2.3 to 13.0 s with a mean of 7.1 ± 1.3 s (Fig. 8A).

In 8 of the 19 pairs of RS cells, membrane potential oscillations were clearly visible under control conditions. The amplitude of the oscillations was measured before and during the ejection of glycine (Fig. 8B). In 4 out of 8 tested RS cells, the oscillations were no longer visible after glycine. In the other 4 cases, the oscillation amplitude decreased from 8.8 ± 0.28 mV to 2.2 ± 0.2 mV after glycine ejection ($p < 0.001$, t-test; $n = 19$). The frequency of the locomotor activity remained unchanged, most likely because the ejections were localized over only a few RS cells out of the several hundreds in the nucleus. The effects of glycine were then examined on the current-voltage ($I-V$) relationship in RS cells. Glycine was bath-applied (100 μ M) for 20 - 40 minutes in the presence of tetrodotoxin (TTX, 1 μ M). Current pulses (500 ms; from -4 to 2.5 nA, average of 3 trials) were injected in the recorded RS cells ($n = 2$).

Glycine produced a 14 % decrease in the membrane input resistance of the recorded cells (from 13.1 M Ω to 11.2 M Ω ; Fig. 8C).

Because RS cells receive glycinergic inputs coming from various sources such as the spinal cord, an endogenous release of glycine onto RS cells is very likely during locomotion. In order to test the effect of blocking the endogenous release of glycine on sustained depolarizations, glycine receptor antagonist strychnine (500 μ M) was locally applied over one of two homologous RS cells. In control conditions as well as following strychnine ejection, both the control and the test cells had sustained depolarizations with similar durations (Fig. 9A control and Fig. 9B strychnine). In all experiments, strychnine ejection never produced significant change in the duration of sustained depolarizations ($p > 0.05$, t-test; $n = 4$ pairs). Interestingly however, strychnine ejection abolished the membrane potential oscillations and increased the firing frequency of the test cells (Fig. 9A,B and insets).

Taken together, these results indicate that glycine transiently hyperpolarizes RS cells during the sustained depolarizations without terminating the latter, whereas the glycine receptor antagonist increases the firing probably due to a decrease of the inhibitory inputs.

5. DISCUSSION

We have previously shown that sensory stimulation elicits sustained depolarizations in RS cells that are the substrate for the descending command to the spinal locomotor networks during escape swimming in lampreys. Intrinsic membrane properties of the RS cells were shown to play a crucial role in the sustained depolarizations. We now show that for such sustained depolarizations to last for very long periods of time (25-110 seconds; mean = 47.3 +/- 2.5 seconds; n=73 individual values taken from the 11 xylocaine experiments having sustained depolarizations longer than 25 seconds in control), excitatory glutamatergic synaptic inputs are required and combine with the intrinsic membrane properties. Ascending spinal cord inputs appear to also play a crucial role in both maintaining the sustained depolarizations and in generating superimposed membrane potential oscillations in tune with the locomotor activity.

5.1. Cooperation between intrinsic and synaptic properties

We propose that cooperation occurs between intrinsic and synaptic properties as illustrated in figure 10. Sensory stimulation produces EPSPs in RS cells via the activation of AMPA and NMDA receptors. Activation of the latter receptors leads to calcium entry (top left and bottom). Sustained depolarizations are prevented by chelating the intracellular Calcium with BAPTA or adding flufenamate (Viana Di Prisco et al., 2000). This indicates that intrinsic membrane properties via the activation of a calcium-activated non selective cation current (I_{CAN}) are essential. Results presented here show that the excitatory synaptic inputs allow for a temporal

amplification of the sustained depolarizations. This hypothesis is schematized on the top left hand side of figure 10. Sensory inputs originating from the periphery first depolarize RS cells (in hachured filling) and intrinsic properties such as the I_{CAN} are then activated (in grey). We propose that as the I_{CAN} activation diminishes, excitatory glutamatergic synaptic inputs (in black), some of which coming from the spinal cord, will kick in to boost the I_{CAN} activation and maintain the RS cells depolarized. This could be done via additional Calcium entry through NMDA receptors. We also suggest that towards the end of the sustained depolarizations, both the intrinsic and the synaptic properties are gradually reduced so that RS cells repolarize and swimming ends. Whether other active repolarisation mechanisms such as common inhibitory inputs come into play remains to be determined.

5.2. Contribution of spinal cord inputs

RS cells are part of a spino-bulbo-spinal loop that plays a key role in controlling locomotion (Dubuc and Grillner, 1989; Vinay and Grillner, 1993). RS cells activate spinal interneurons and motoneurons (Rovainen, 1974; Buchanan, 1982; Buchanan and Cohen, 1982; Buchanan et al., 1987; Ohta and Grillner, 1989) and, in turn, they receive inputs from the spinal cord locomotor networks (Dubuc and Grillner, 1989; Vinay and Grillner, 1993; Einum and Buchanan, 2004, 2005, 2006). We now show that the spinal inputs to RS cells are also involved in prolonging the sensory-evoked sustained depolarizations in RS cells. In the absence of spinal cord inputs, the RS cells were activated for a much shorter period of time. Under those conditions, the sustained depolarizations did not last more than about 20 s. Excitatory

synaptic inputs may just be required to generate sustained depolarizations lasting several 10s of seconds and leading to an escape locomotor bout. Functionally, maintaining RS cells depolarized for long periods of time may allow the escape response to be of sufficient duration for the animal to flee far away from the stimulus. The persistence of sustained depolarizations may thus constitute the basis of the RS cell responses underlying escape-swimming (McClellan and Grillner, 1983; McClellan, 1984) and this may be a general feature in several animal species. Goldfish and zebrafish also display a vigorous escape reaction in response to sensory stimulation and the reticulospinal system plays a key role (Eaton et al., 1988, 2001; Fetcho and Faber, 1988; Gahtan et al., 2002).

RS cells receive ascendant spinal inputs coming from either from the dorsal column or from the ventral and/or lateral column (Dubuc et al., 1993a, b; Ronan and Northcutt, 1990; Vinay et al., 1998b). We now show that only the ventral and lateral spinal cord inputs contribute to maintaining RS cells depolarized for a long period of time. Furthermore, these projections to RS cells are more numerous on the controlateral side (Ronan and Northcutt, 1990; Vinay et al., 1998b). In addition, while both polysynaptic (Vinay et al., 1998a) and monosynaptic pathways are likely present, it appears that the monosynaptic spinobulbar projections provide most of the rhythmic locomotor input to reticulospinal neurons that ascends from the spinal cord (Einum and Buchanan, 2004, 2005, 2008). Thus, we suggest that the spinal inputs responsible to maintain RS cells depolarized for long periods of time are likely the controlateral ascending inputs coming from ventral and lateral regions of the spinal cord and sending monosynaptic projections to RS cells.

The rhythmic membrane potential oscillations seen in RS cells during the swimming bouts were completely abolished by blocking the transmission between the spinal cord and the brainstem. RS cells have been shown to be rhythmically active during locomotion in several animal species, including mammals (Orlovsky, 1970a, b; Drew et al., 1986) and lampreys (Kasicki and Grillner, 1986; Dubuc and Grillner, 1989; Kasicki et al., 1989; Vinay and Grillner, 1992). Orlovsky proposed in the early 70s that the rhythmic modulation in cat RS cells originated from the spinal locomotor networks (Orlovsky, 1970a). This remained a hypothesis for several years until the *in vitro* preparation of the lamprey brainstem/spinal cord was used to show that spinal cord inputs participated at least in part in the modulation in RS cells (Dubuc and Grillner, 1989). Results from the present study now indicate that spinal inputs are not only participating in part, but that they appear to be the sole contributors to the rhythmic modulation of RS cell activity during locomotion.

5.3. Glutamatergic and glycinergic synaptic inputs

The ejection of ionotropic glutamate receptor antagonists over one of two homologous MRRN cells induced a marked decrease in membrane oscillations and depolarization level in the cell receiving the drugs. The membrane potential progressively returned to resting levels despite the maintained depolarization in the control cell on the other side of the brainstem. Glutamatergic inputs thus likely contribute in maintaining RS cells into a depolarized state. A quantitative estimate of the synaptic inputs contribution cannot be provided however. Local ejections of the glutamate receptor antagonists were made and we cannot determine if all targeted

glutamate receptors were blocked. Preliminary data indicated little effects of the local injections when performed directly over the cell bodies of the RS cells (data not shown). Therefore, the ejections were made over the dendrites of RS cells, lateral to the soma. In support of this, it has been shown in the spinal cord of lampreys that glutamate receptors are more densely distributed on the dendrites of spinal neurons (Moore et al., 1995). Moreover, the dendritic arborization of lamprey large RS cells within the MRRN is very extensive. The antagonists may thus require time to diffuse to the small ramifications of the RS cell dendrites deep in the tissue. The diffusion time being an unknown variable, we cannot assume that all ionotropic glutamate receptors were blocked.

The origin of the excitatory glutamatergic inputs maintaining RS cells in a depolarized state is not established. Because we found a significant reduction in the sustained depolarization duration after blocking ascending spinal inputs to RS cells, it is tempting to propose that excitatory glutamatergic inputs coming from the spinal cord are involved in maintaining RS cells depolarized. Nevertheless, we can not rule out that other excitatory sources are involved during active locomotion. Several regions send excitatory glutamatergic projections to lamprey RS cells. Examples of such regions are the higher brain centers like the mesencephalic locomotor region (MLR; Sirota et al, 2000), or the ventral thalamus in the diencephalic region (El Manira et al., 1997). Previous studies have also shown that the vestibular inputs to RS neurons responsible for postural reflexes are glutamatergic and that the trigeminal inputs which convey sensory information from the head region to RS neurons are mediated by both glycine and glutamate receptors (Alford et Dubuc, 1993; Viana Di

Prisco et al., 1995). It would have been interesting to study the effects of CNQX and AP-5 ejection under xylocaine condition, to test blocking the maintaining synaptic inputs that remained. However, because of the long time of action of the drug (between 30-60 seconds) and due to the short duration of the sustained depolarizations, it would not have been possible.

In contrast to blocking ionotropic glutamate receptors, glycine ejections onto the soma of a single RS cell caused an almost instantaneous, transient hyperpolarization of the RS cell membrane potential. Glycine did not end the sustained depolarization as the membrane potential of the test RS cell returned to a depolarized state similar to that observed in the control cell very shortly after the ejection. Because GABA is also an important inhibitory neurotransmitter and that GABAergic receptors have been localized around RS cells (Dubuc et al., 1993a), experiments similar to those of glycine ejections have been performed. However, negative results have also been observed following ejection of GABA onto the soma of RS cells (n =16 pairs of RS cells; data not shown). A calcium-activated nonselective cationic conductance (I_{CAN}) that does not undergo voltage-dependant inactivation (Partridge et al., 1994; Zhang et al., 1995) was proposed to be responsible for generating sustained depolarizations in lamprey RS cells (Viana Di Prisco et al., 2000). Whether the return to the previous depolarization level was due to intrinsic properties of the cell involving an I_{CAN} or due to synaptic excitatory inputs cannot be determined. These results also support that the sustained depolarizations seen in RS cells are not voltage-dependent as the glycine-induced hyperpolarization failed to end the ongoing depolarizations. On the other hand, voltage-dependent long-

lasting depolarizations were recorded in rat spinal and supraspinal neurons, involving L-type Calcium channels opening and subsequent I_{CAN} activation (Morisset and Nagy, 1999; Voisin and Nagy, 2001; Baufreton et al., 2003; Zhu et al., 2005; Derjean, et al., 2005; Lee and Tepper, 2007).

The very similar time course of the sustained depolarizations observed in two homologous RS cells suggests that common synaptic inputs are likely to play a crucial role in shutting down the sustained depolarizations. The excitatory drive could be relieved simultaneously for the entire population of the RS cells or a common synaptic inhibitory input could be activated. We cannot rule out that glycine receptor activation could terminate the sustained depolarizations by acting at the very end of the responses.

The oscillation amplitude was reduced by the application of glycine. The mechanisms by which this occurs remain to be established. However, one explanation could be that the drug-induced hyperpolarization produced a resistance shunt in the postsynaptic cell membrane, which decreased the global excitability of the cell.

Finally, the locomotor cycle showed no change following glycine and CNQX/AP-5 local application onto a single RS cell. A complete block of all glutamatergic inputs projecting to the whole MRRN nucleus may be required to modify locomotor activity.

In conclusion, we provide evidence that excitatory synaptic inputs cooperate with intrinsic membrane properties to maintain RS cells depolarized in association with long bouts of escape swimming in response to sensory stimulation.

6. REFERENCES

- Alford S, Dubuc R (1993) Glutamate metabotropic receptor mediated depression of synaptic inputs to lamprey reticulospinal neurones. *Brain Res* 605:175-179.
- Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci* 23:816-825.
- Brocard F, Dubuc R (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90:1714-1727.
- Buchanan JT (1982) Identification of interneurons with contralateral, caudal axons in the lamprey spinal cord: synaptic interactions and morphology. *J Neurophysiol* 47:961-975.
- Buchanan JT (1999) The roles of spinal interneurons and motoneurons in the lamprey locomotor network. *Prog Brain Res* 123:311-321.
- Buchanan JT (2001) Contributions of identifiable neurons and neuron classes to lamprey vertebrate neurobiology. *Prog Neurobiol* 63:441-466.
- Buchanan JT, Brodin L, Dale N, Grillner S (1987) Reticulospinal neurones activate excitatory amino acid receptors. *Brain Res* 408:321-325.
- Buchanan JT, Cohen AH (1982) Activities of identified interneurons, motoneurons, and muscle fibers during fictive swimming in the lamprey and effects of reticulospinal and dorsal cell stimulation. *J Neurophysiol* 47:948-960.

- Derjean D, Bertrand S, Nagy F, Shefchyk SJ (2005) Plateau potentials and membrane oscillations in parasympathetic preganglionic neurones and intermediolateral neurones in the rat lumbosacral spinal cord. *J Physiol* 563:583-596.
- Drew T, Dubuc R, Rossignol S (1986) Discharge patterns of reticulospinal and other reticular neurons in chronic, unrestrained cats walking on a treadmill. *J Neurophysiol* 55:375-401.
- Dubuc R, Bongianini F, Ohta Y, Grillner S (1993a) Dorsal root and dorsal column mediated synaptic inputs to reticulospinal neurons in lampreys: involvement of glutamatergic, glycinergic, and GABAergic transmission. *J Comp Neurol* 327:251-259.
- Dubuc R, Bongianini F, Ohta Y, Grillner S (1993b) Anatomical and physiological study of brainstem nuclei relaying dorsal column inputs in lampreys. *J Comp Neurol* 327:260-270.
- Dubuc R, Grillner S (1989) The role of spinal cord inputs in modulating the activity of reticulospinal neurons during fictive locomotion in the lamprey. *Brain Res* 483:196-200.
- Eaton RC, DiDomenico R, Nissanov J (1988) Flexible body dynamics of the goldfish C-start: implications for reticulospinal command mechanisms. *J Neurosci* 8:2758-2768.
- Eaton RC, Lee RK, Foreman MB (2001) The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Prog Neurobiol* 63:467-485.

- Einum JF, Buchanan JT (2004) Reticulospinal neurons receive direct spinobulbar inputs during locomotor activity in lamprey. *J Neurophysiol* 92:1384-1390.
- Einum JF, Buchanan JT (2005) Membrane potential oscillations in reticulospinal and spinobulbar neurons during locomotor activity. *J Neurophysiol* 94:273-281.
- Einum JF, Buchanan JT (2006) Spinobulbar neurons in lamprey: cellular properties and synaptic interactions. *J Neurophysiol* 96:2042-2055.
- Einum JF, Buchanan JT (2008). The spinobulbar system in lamprey. *Brain Res Rev* 57:37-45. Review.
- El Manira A, Tegnér J, Grillner S (1994) Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *J Neurophysiol* 72:1852-1861.
- El Manira A, Pombal MA, Grillner S (1997) Diencephalic projection to reticulospinal neurons involved in the initiation of locomotion in adult lampreys *Lampetra fluviatilis*. *J Comp Neurol* 389:603-616.
- Fetcho JR, Faber DS (1988) Identification of motoneurons and interneurons in the spinal network for escapes initiated by the mauthner cell in goldfish. *J Neurosci* 8:4192-4213.
- Gahtan E, Sankrithi N, Campos JB, O'Malley DM (2002) Evidence for a widespread brain stem escape network in larval zebrafish. *J Neurophysiol* 87:608-614.
- Goaillard JM, Marder E (2006) Dynamic clamp analyses of cardiac, endocrine, and neural function. *Physiology (Bethesda)* 21:197-207.

- Grillner S, Cangiano L, Hu G, Thompson R, Hill R, Wallén P (2000) The intrinsic function of a motor system--from ion channels to networks and behavior. *Brain Res* 886:224-236.
- Grillner S, Wallén P, Hill R, Cangiano L, El Manira A (2001) Ion channels of importance for the locomotor pattern generation in the lamprey brainstem-spinal cord. *J Physiol* 533:23-30.
- Harris-Warrick RM, Marder E (1991) Modulation of neural networks for behavior. *Annu Rev Neurosci* 14:39-57.
- Kasicki S, Grillner S (1986) Müller cells and other reticulospinal neurones are phasically active during fictive locomotion in the isolated nervous system of the lamprey. *Neurosci Lett* 69:239-243.
- Kasicki S, Grillner S, Ohta Y, Dubuc R, Brodin L (1989) Phasic modulation of reticulospinal neurones during fictive locomotion and other types of spinal motor activity in lamprey. *Brain Res* 484:203-216.
- Kiehn (1991) Plateau potentials and active integration in the 'final common pathway' for motor behaviour. *Trends Neurosci.* 14:68-73.
- Lee CR, Tepper JM (2007) A calcium-activated nonselective cation conductance underlies the plateau potential in rat substantia nigra GABAergic neurons. *J Neurosci* 27:6531-6541.
- Marder E (1998) From biophysics to models of network function. *Annu Rev Neurosci* 21:25-45.
- Marder E, Goaillard JM (2006) Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci* 7:563-574.

- Matsushima T, Tegnér J, Hill RH, Grillner S (1993) GABAB receptor activation causes a depression of low- and high-voltage-activated Ca^{2+} currents, postinhibitory rebound, and postspike afterhyperpolarization in lamprey neurons. *J Neurophysiol* 70:2606-2619.
- McClellan AD, Grillner S (1983) Initiation and sensory gating of 'fictive' swimming and withdrawal responses in an in vitro preparation of the lamprey spinal cord. *Brain Res* 269:237-250.
- McClellan AD (1984) Descending control and sensory gating of 'fictive' swimming and turning responses elicited in an in vitro preparation of the lamprey brainstem/spinal cord. *Brain Res* 302:151-162.
- McClellan AD, Grillner S (1984) Activation of 'fictive swimming' by electrical microstimulation of brainstem locomotor regions in an in vitro preparation of the lamprey central nervous system. *Brain Res* 300:357-361.
- Moore LE, Buchanan JT, Murphey CR (1995) Localization and interaction of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors of lamprey spinal neurons. *Biophys J* 68:96-103.
- Morisset V, Nagy F (1999) Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci* 19:7309-7316.
- Ohta Y, Grillner S (1989) Monosynaptic excitatory amino acid transmission from the posterior rhombencephalic reticular nucleus to spinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* 62:1079-1089.
- Orlovsky GN (1970a) Work of the reticulo-spinal neurones during locomotion. *Biophysics USSR* 15:761-771.

- Orlovsky GN (1970b) Influence of the cerebellum on the reticulo-spinal neurones during locomotion. *Biophysics USSR* 15:928-936.
- Pagget KC, Jackson A, McClellan AD (2004) Organization of higher-order brain areas that initiate locomotor activity in larval lamprey. *Neuroscience* 125:25-33.
- Parker D, Grillner S (1998) Cellular and synaptic modulation underlying substance P-mediated plasticity of the lamprey locomotor network. *J Neurosci* 18:8095-8110.
- Partridge LD, Müller TH, Swandulla D (1994) Calcium-activated non-selective channels in the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 19:319-325.
- Ronan M, Northcutt RG (1990) Projections ascending from the spinal cord to the brain in petromyzontid and myxinoïd agnathans. *J Comp Neurol* 291:491-508.
- Rovainen CM (1967) Physiological and anatomical studies on large neurons of central nervous system of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). I. Müller and Mauthner cells. *J Neurophysiol* 30:1000-1023.
- Rovainen CM (1974) Synaptic interactions of reticulospinal neurons and nerve cells in the spinal cord of the sea lamprey. *J Comp Neurol* 154:207-223.
- Rovainen CM, Johnson PA, Roach EA, Mankovsky JA (1973) Projections of individual axons in lamprey spinal cord determined by tracings through serial sections. *J Comp Neurol* 149:193-202.

- Sirota MG, Viana Di Prisco G, Dubuc R (2000) Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur J Neurosci* 12:4081-4092.
- Soto-Treviño C, Rabbah P, Marder E, Nadim F (2005) Computational model of electrically coupled, intrinsically distinct pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 94:590-604.
- Steriade M (2001) Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* 86:1-39.
- Tegnér J, Hellgren-Kotaleski J, Lansner A, Grillner S (1997) Low-voltage-activated calcium channels in the lamprey locomotor network: simulation and experiment. *J Neurophysiol* 77:1795-1812.
- Viana Di Prisco G, Ohta Y, Bongiani F, Grillner S, Dubuc R (1995) Trigeminal inputs to reticulospinal neurones in lampreys are mediated by excitatory and inhibitory amino acids. *Brain Res* 695:76-80.
- Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Robitaille R, Dubuc R (1997) Role of sensory-evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science* 278:1122-1125.
- Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Le Ray D, Robitaille R, Dubuc R (2000) A cellular mechanism for the transformation of a sensory input into a motor command. *J Neurosci* 20:8169-8176.
- Viana Di Prisco G, Boutin T, Petropoulos D, Brocard F, Dubuc R (2005) The trigeminal sensory relay to reticulospinal neurones in lampreys. *Neuroscience* 131:535-546.

- Vinay L, Bongianni F, Ohta Y, Grillner S, Dubuc R (1998a) Spinal inputs from lateral columns to reticulospinal neurons in lampreys. *Brain Res* 808:279-293.
- Vinay L, Bussi eres N, Shupliakov O, Dubuc R, Grillner S (1998b) Anatomical study of spinobulbar neurons in lampreys. *J Comp Neurol* 397:475-492.
- Vinay L, Grillner S (1992) Spino-bulbar neurons convey information to the brainstem about different phases of the locomotor cycle in the lamprey. *Brain Res* 582:134-138.
- Vinay L, Grillner S (1993) The spino-reticulo-spinal loop can slow down the NMDA-activated spinal locomotor network in lamprey. *Neuroreport* 4:609-612.
- Voisin DL, Nagy F (2001) Sustained L-type calcium currents in dissociated deep dorsal horn neurons of the rat: characteristics and modulation. *Neuroscience* 102:461-472.
- Wallén P, Grillner S (1987) N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. *J Neurosci* 7:2745-2755.
- Zhang B, Wootton JF, Harris-Warrick RM (1995) Calcium-dependent plateau potentials in a crab stomatogastric ganglion motor neuron. II. Calcium activated slow inward current. *J Neurophysiol* 74:1938-1946.
- Zhu ZT, Munhall A, Shen KZ, Johnson SW (2005) NMDA enhances a depolarization-activated inward current in subthalamic neurons. *Neuropharmacology* 49:317-327.

7. FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effects of blocking spinal cord feedback with xylocaine on sensory-evoked sustained depolarizations. A, The experimental set-up. Stimulation of the ascending spinal tracts (S stim) was used to confirm that xylocaine efficiently blocked the connexions between spinal cord and brainstem. Sustained depolarizations were intracellularly recorded from RS cells following mechanical pressure (M stim) applied to the skin covering the head, or electrical stimulation of the trigeminal nerve (V^{th} stim). Xylocaine was locally injected in a circular bath tightly fitted on the rostralmost spinal segments. B and C, Sustained depolarizations of different durations (top) and EMG activity (bottom) recorded in two different preparations under control (B1 and C1), xylocaine (B2 and C2) and after washout (B3 and C3) elicited by the electrical stimulation of the trigeminal nerve. The EMG activity was recorded at segmental level 30. Note the absence of EMG activity under xylocaine (B2 and C2) and the recovery of EMG bursts following washout (B3 and C3).

Figure 2: Durations of sensory-evoked depolarizations before, during xylocaine and after washout. A, Plot showing the mean depolarization duration (\pm SEM) of 8-10 trials measured in 20 experiments under control (ascending order), xylocaine, and after washout obtained in 10 experiments. Note the thick black line separating the experiments showing no significant decrease in duration after xylocaine from those that did. B, Histogram illustrating the mean depolarization durations for the 20 experiments shown in A, under control (black), xylocaine (gray) and after washout

(white). C, Histogram depicting the mean depolarization durations under the three experimental conditions, for all the trials having, in control conditions, a depolarization duration shorter (left), and longer (right) than 25 s. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non significant.

Figure 3: Effects of blocking ascending spinal inputs with xylocaine on sensory-evoked depolarizations in the absence of sensory feedback from the dorsal columns. A, Following the bilateral lesion of the dorsal columns, sustained depolarizations were intracellularly recorded from RS cells in response to electrical stimulation of the trigeminal nerve (V^{th} stim). Sustained depolarizations (top) and EMG activity (bottom) recorded under control (A1), after xylocaine locally injected in a circular bath fitted on the rostralmost spinal segments (A2) and after washout (A3), in one preparation. Note that EMG bursts recorded at segmental level 30, were abolished under xylocaine (A2, EMG) and recovered following washout (A3, EMG). B, Histogram of the mean depolarization durations of five experiments under the three experimental conditions. ** $p < 0.01$, t-test.

Figure 4: Sensory-evoked depolarizations in two simultaneously recorded homologous RS cells. A, Drawing illustrating the experimental set-up. Paired intracellular recordings from two homologous RS cells located on either side of the brain were performed. One cell always served as the control RS cell (cRS cell) allowing drug ejections to be made over the contralateral test RS cell (tRS cell). B1-B5, Sustained depolarization recorded simultaneously in both cells at different

trigeminal nerve stimulation intensities (7.0, 7.6, 11.0, 8.0 and 8.0 μ A, respectively). The depolarization varied similarly in the two RS cells from very short (B1, 3 s), to much longer (B5, 50 s). Note the alternating pattern of membrane potential oscillations observed in B5 (inset). C, Plot of the stimulus-response relationship for the control (cRS cell: black circles) and the test (tRS cell: gray circles) RS cells illustrated in B. The stimulation intensity varied from 7 to 11 μ A and the response durations from 3 to 55 s.

Figure 5: Effects of a local application of a mixture of CNQX (1 mM) and AP-5 (2 mM) on sensory-evoked subthreshold responses in a RS cell. A, Experimental set-up whereby glutamate receptor antagonists were locally pressure ejected over one RS cell. B1, A typical gradual reduction of the trigeminal-induced EPSPs is shown for one RS cell in control and after 20-, 30-, and 60- s exposure to the glutamate receptor antagonists. B2, Time course of EPSP areas (relative to control value) in four RS cells (different preparations) after exposure to the glutamate receptor antagonists. Traces in B1 are from the experiment represented by the inverted triangles.

Figure 6: Effects of a local application of a mixture of CNQX (1 mM) and AP-5 (2 mM) over one of two homologous RS cells. A, The experimental set-up. B, Paired intracellular recordings from two homologous RS cells on either side of the brainstem (control and test RS cells) showing sustained depolarizations induced by mechanical stimulation of the tail (arrow) under control condition. C, Local ejections of the glutamate receptor antagonists (grey horizontal bar) over the test RS cell (tRS cell).

Note that the membrane potential depolarization decreased in the cell exposed to the glutamate receptor antagonists without affecting the contralateral control neuron (cRS cell). EMG activity (bottom traces) recorded at segmental level 30 from the control (cEMG) and test (tEMG) sides. Recordings in B and C are from the same neurons. D, Duration of sensory-evoked sustained depolarizations for the control (cRS cell: black circles) and the test (tRS cell: gray circles) RS cells before (D1) and after a local ejections of CNQX and AP-5 over the test RS cells (D2). Note that in the 10 pairs of simultaneously recorded homologous RS cells, the control RS cells and test RS cells display sustained depolarizations with similar durations under control conditions (D1). After a local ejection of CNQX and AP-5, the sustained depolarizations in the test RS cells are in general of a shorter duration (D2).

Figure 7: Effect of the glutamate receptor antagonists on the amplitude of RS cell membrane potential oscillations during locomotion. A, Gradual decrease in the oscillation amplitude of one RS cell following the local application of CNQX (1 mM) and AP-5 (2 mM) at time = 0 s (dotted line). B, Plot showing the mean amplitude (\pm SEM) of a series of eight consecutive membrane potential oscillations measured in control and 40 s after the local ejections of CNQX and AP-5 for five RS cells.

Figure 8: Effects of local ejections of glycine (1 mM) on sensory-evoked sustained depolarizations, membrane potential oscillations, and input resistance of RS cells. A, Local application of glycine (grey horizontal bar) over one of two homologous cells (tRS cell) produce a transient hyperpolarization without ending the sustained

depolarization evoked by a mechanical stimulation (M stim) of the tail. The EMG activity (bottom traces) was recorded at segmental level 30 from both sides (cEMG, tEMG). B, Local ejections of glycine also strongly reduce the membrane potential oscillatory pattern, without affecting the swimming episode (cEMG and tEMG recordings). C, Effect of bath-applied glycine (100 μ M) on the membrane input resistance. Responses to current injections in presence of TTX before and after glycine ejection (left traces). The V-I relationship (right) is plotted before and after glycine ejection.

Figure 9: Effects of local ejections of strychnine (500 μ M) on sensory-evoked sustained depolarizations. A, The control condition. Sustained depolarizations intracellularly recorded from two homologous RS cells (control and test RS cells) in response to mechanical tail stimulation (M stim, arrow). Swimming activity was recorded ipsilateral to the tRS cell at segmental level 30 (tEMG). B, Effect of strychnine. The drug was locally applied over the test RS cell (tRS cell). Note that strychnine was applied from the beginning to the end of the sustained depolarization (grey horizontal bar). *Insets*, Parts of the traces (shaded areas) recorded under control or strychnine are shown at a faster time scale below (A) or above (B) the respective recordings. Traces in A and B are from the same pair of neurons. Note that strychnine neither prolonged the sustained depolarization of the tRS cell nor affected the contralateral cRS. Strychnine had also no effect on the swimming bout. On the other hand, strychnine abolished the membrane potential oscillations and increased the firing frequency of the tRS cell.

Figure 10: Schematic illustration of the proposed cellular cascade of events involved in sensory-evoked sustained depolarizations in lamprey RS cells. *Top left and bottom*, Glutamate released (green circles) from trigeminal sensory relay cells, denoted “triggering synaptic inputs”, that project onto RS cells first activates AMPA and NMDA receptors, producing membrane depolarization and allowing Calcium entry (black circles). Intracellular calcium then activates an I_{CAN} that generates a sustained depolarization in RS cells. Excitatory synaptic inputs, referred to as “maintaining synaptic inputs”, will provide additional excitation during the sustained depolarizations. *Inset top right*, Schematic illustration of proposed cooperation between synaptic inputs and intrinsic membrane properties in RS cells. Triggering synaptic inputs (hachured filling) provide the initial excitation. Intrinsic membrane properties (grey filling) would then provide most of the following excitation to keep the cell depolarized together with superimposed maintaining synaptic inputs (black filling) that generate membrane potential oscillations and would provide the additional excitation to maintain the RS cells depolarized for long periods of time as the intrinsic excitation would start to die-off.

Figure 1

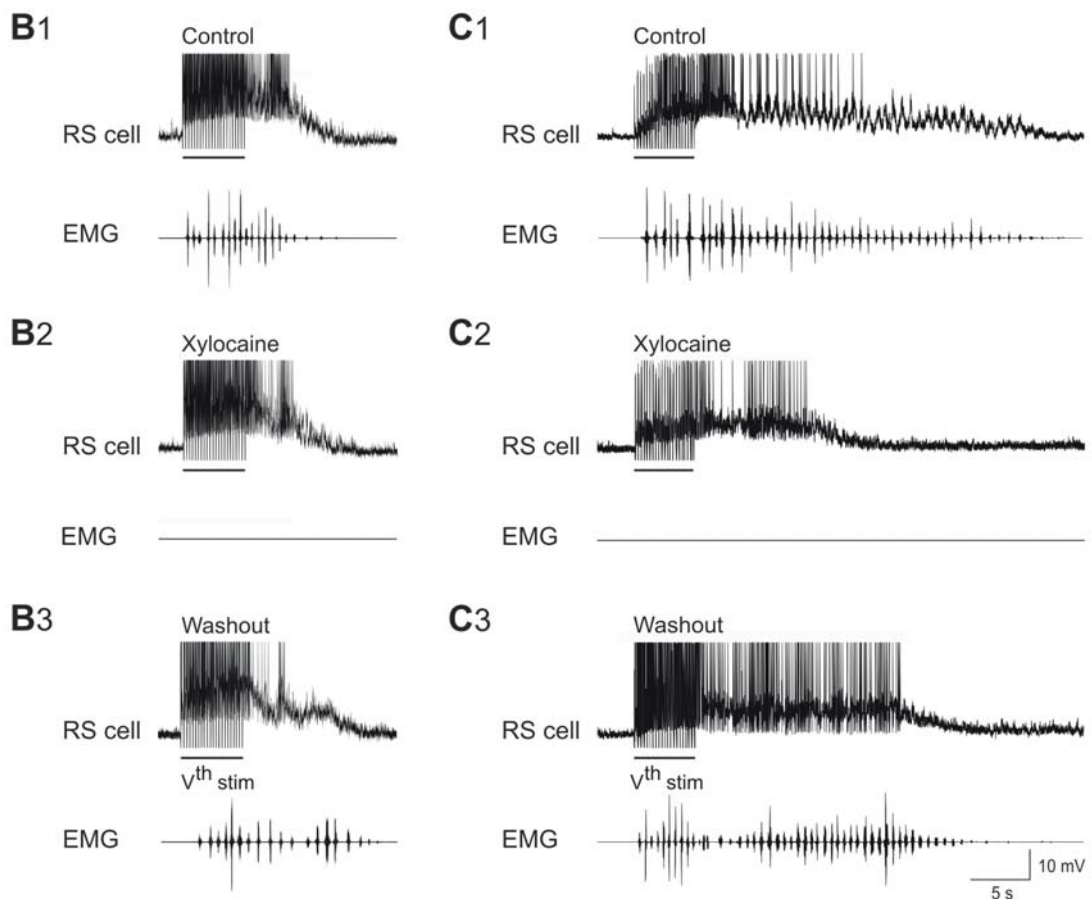
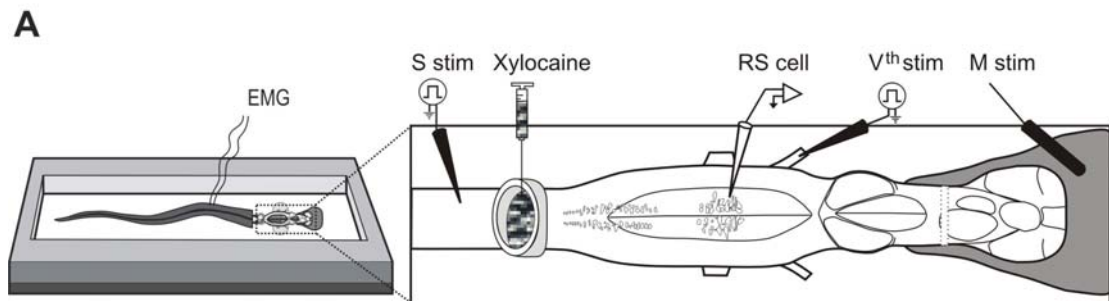
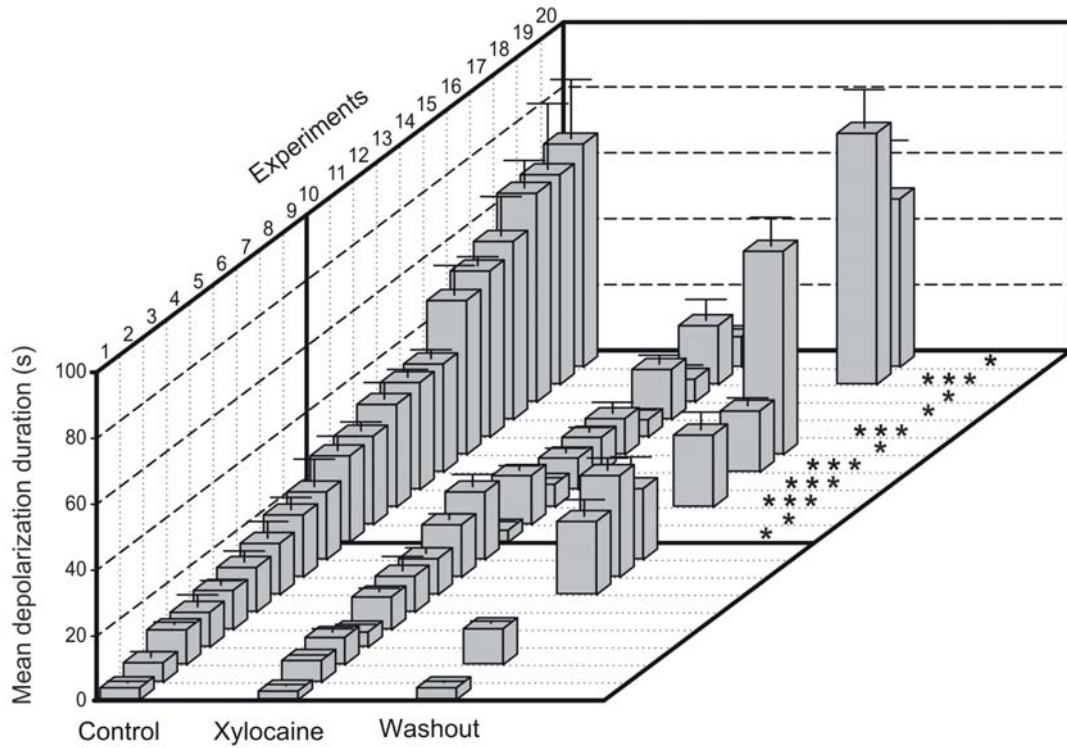
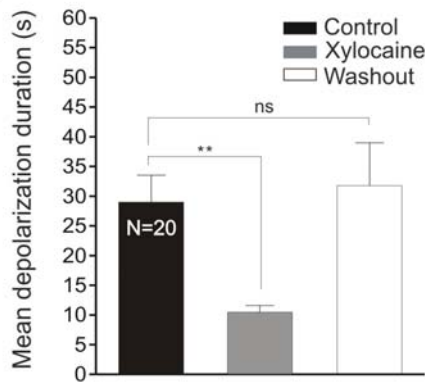


Figure 2

A



B



C

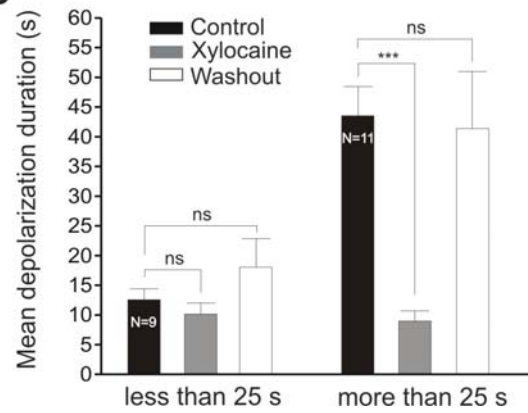


Figure 3

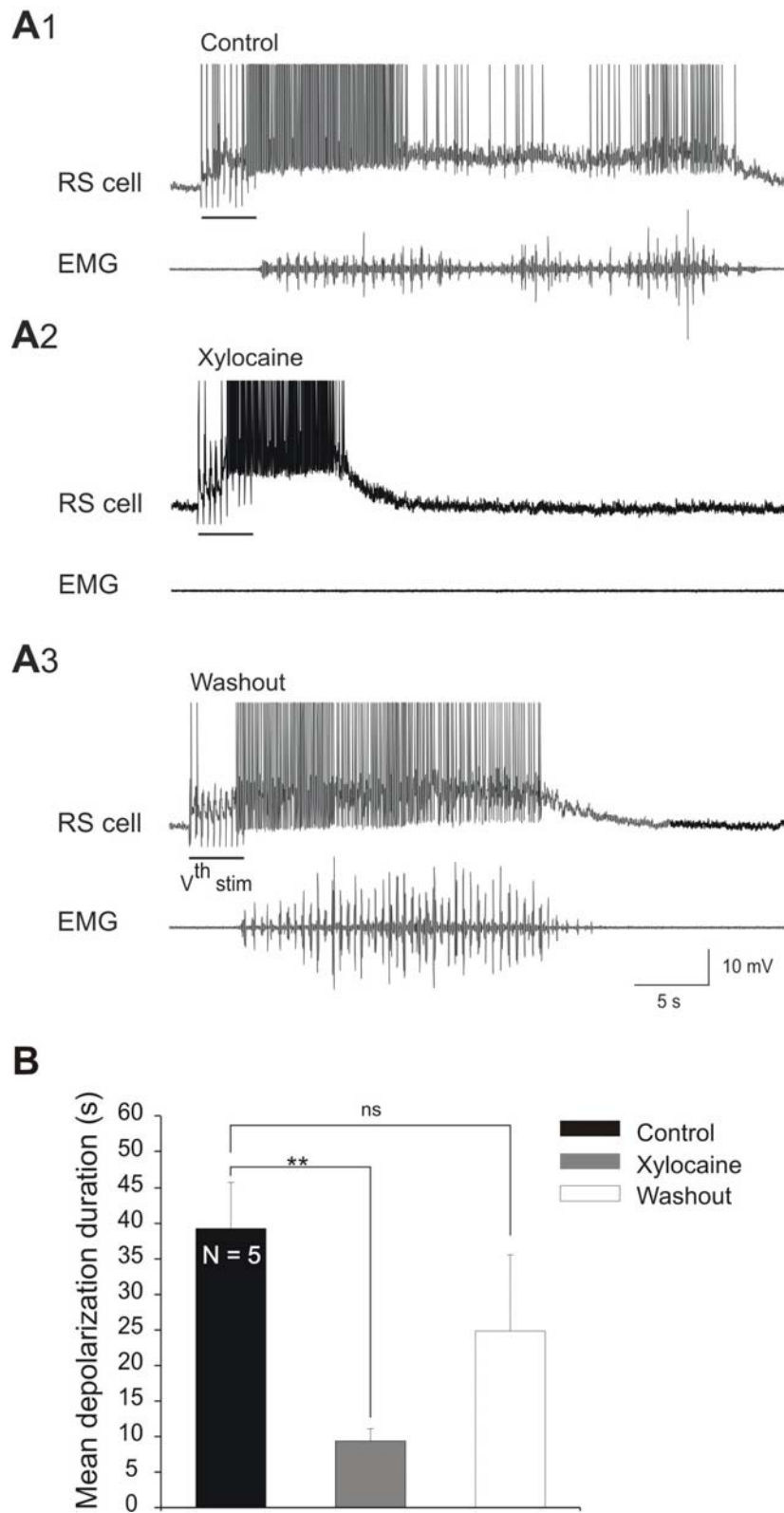


Figure 4

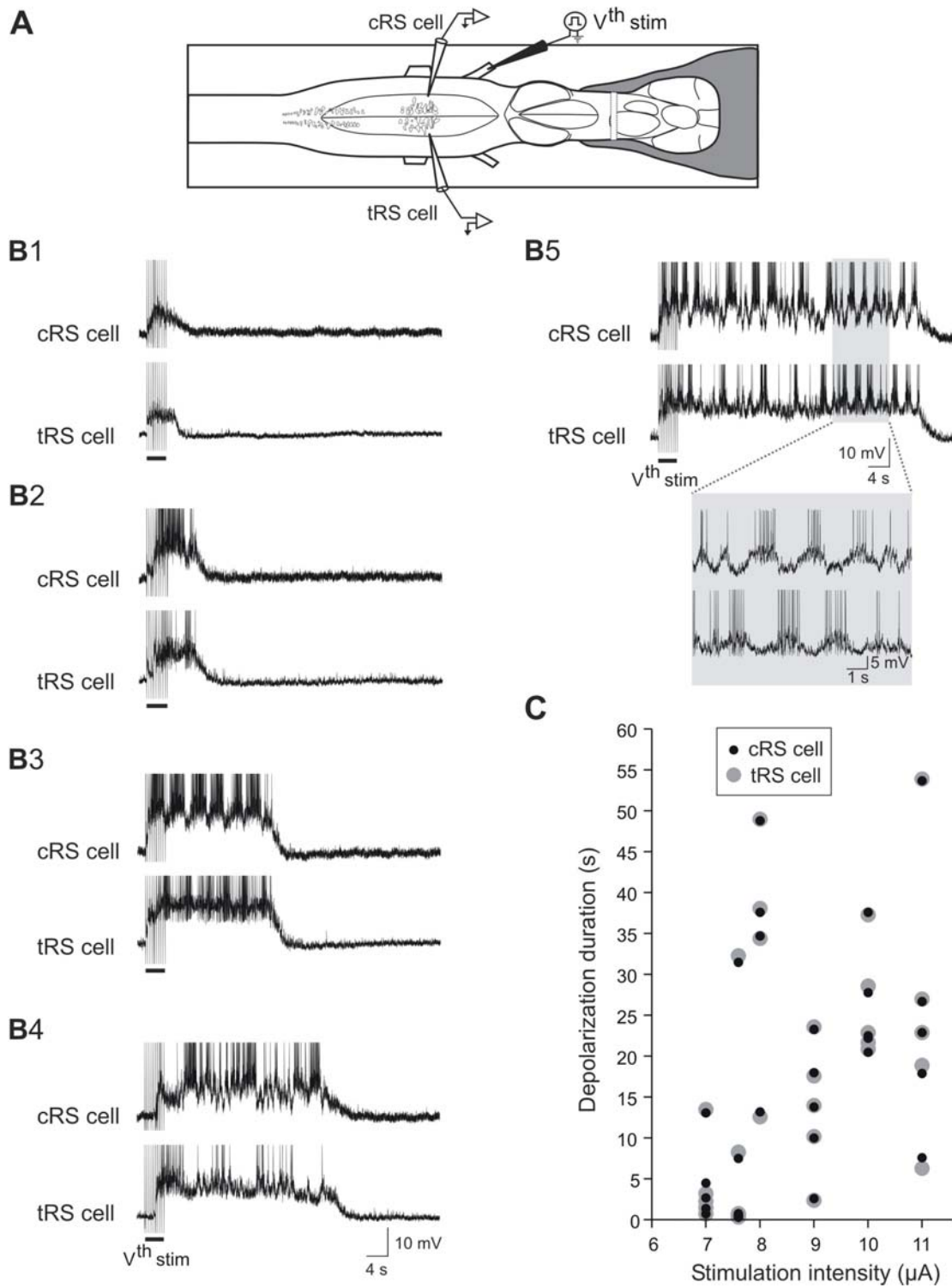
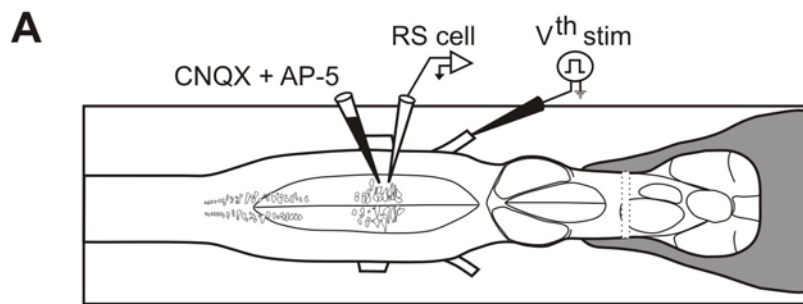
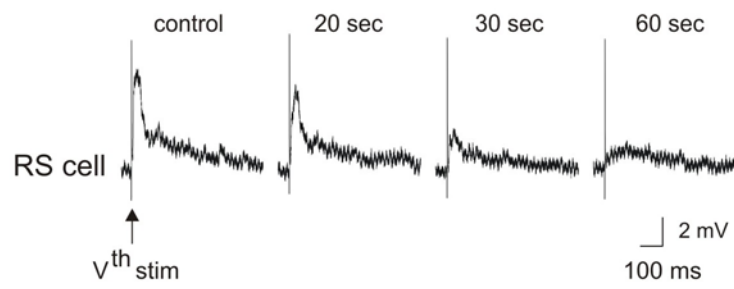


Figure 5



B1



B2

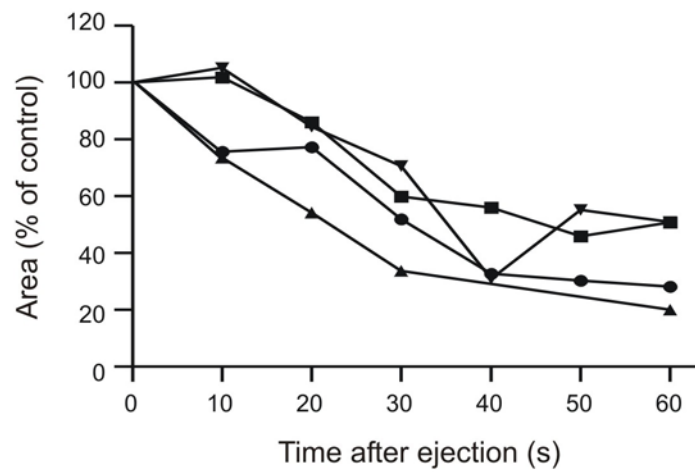


Figure 6

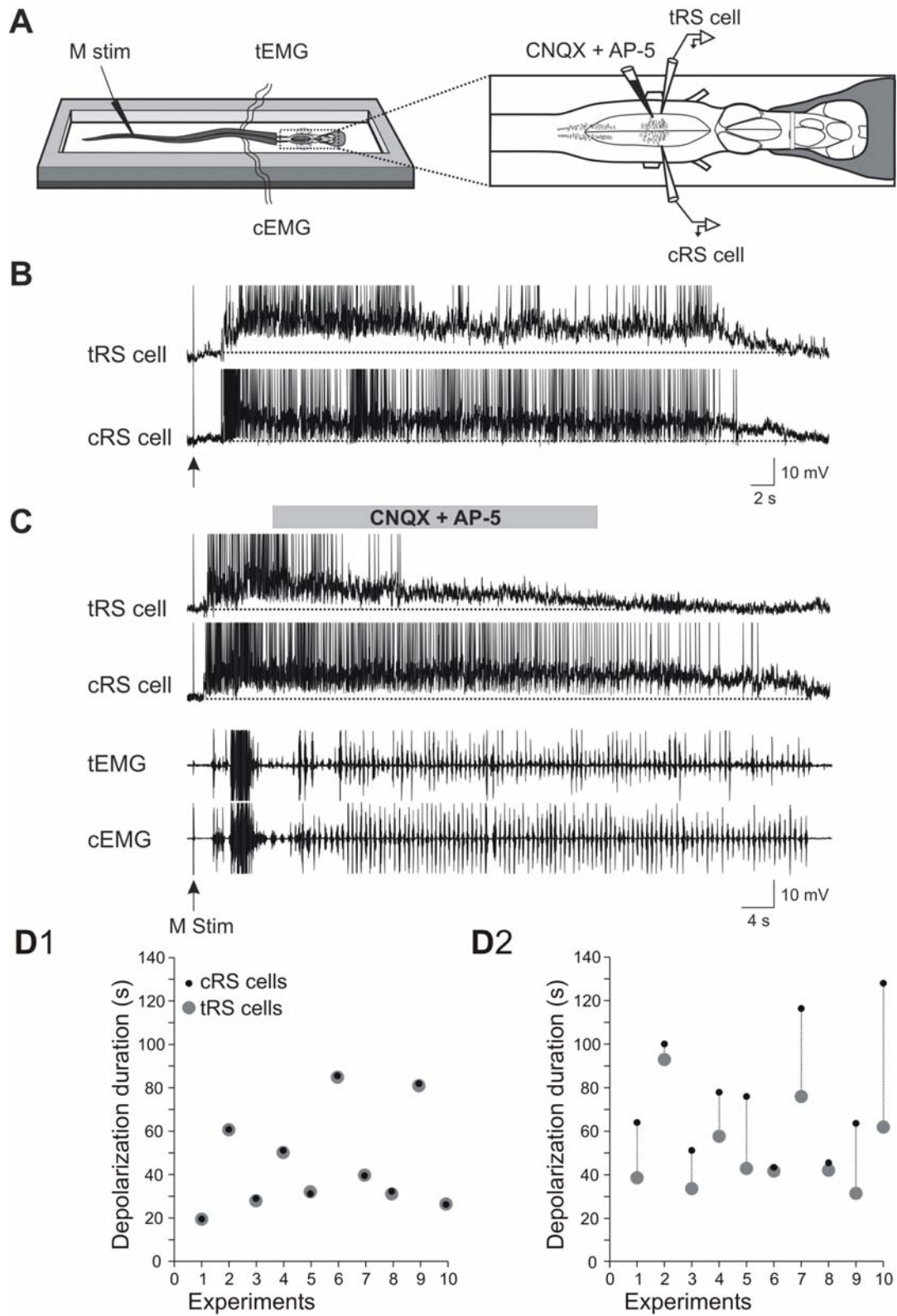


Figure 7

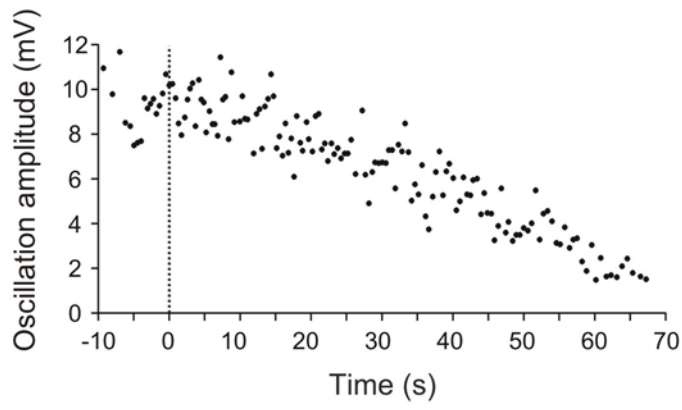
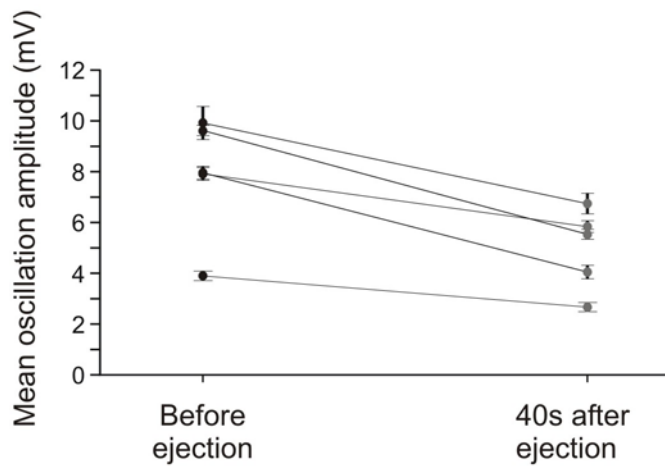
A**B**

Figure 8

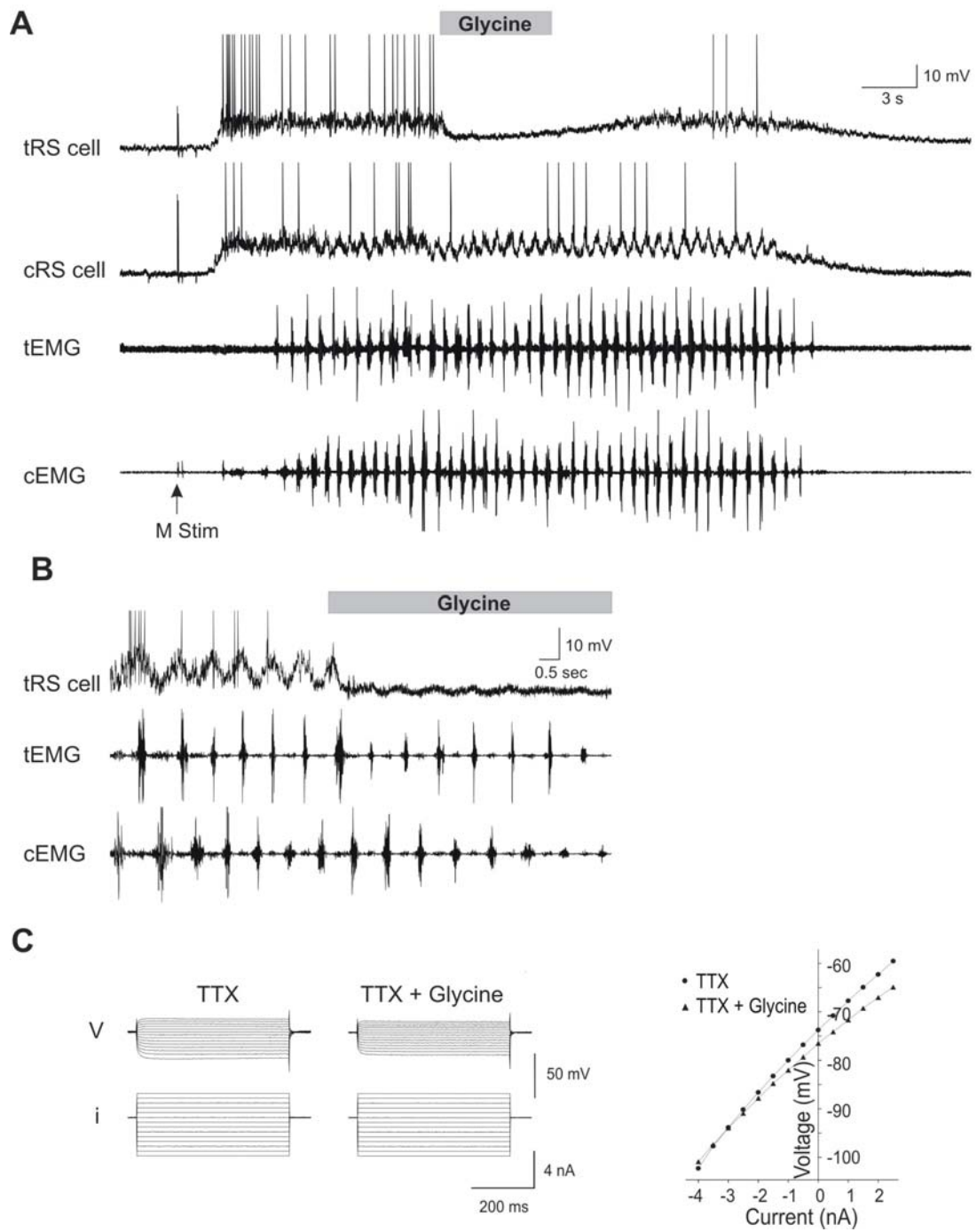


Figure 9

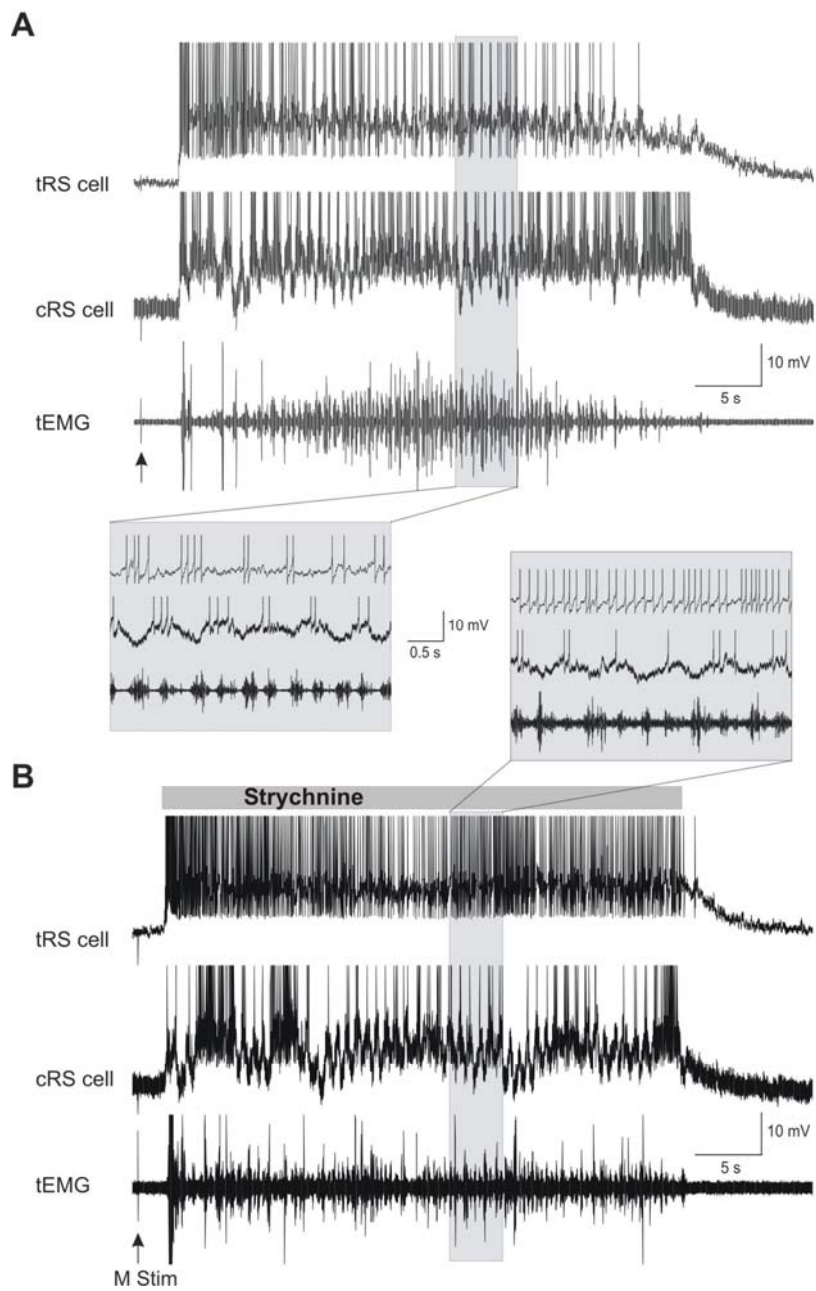
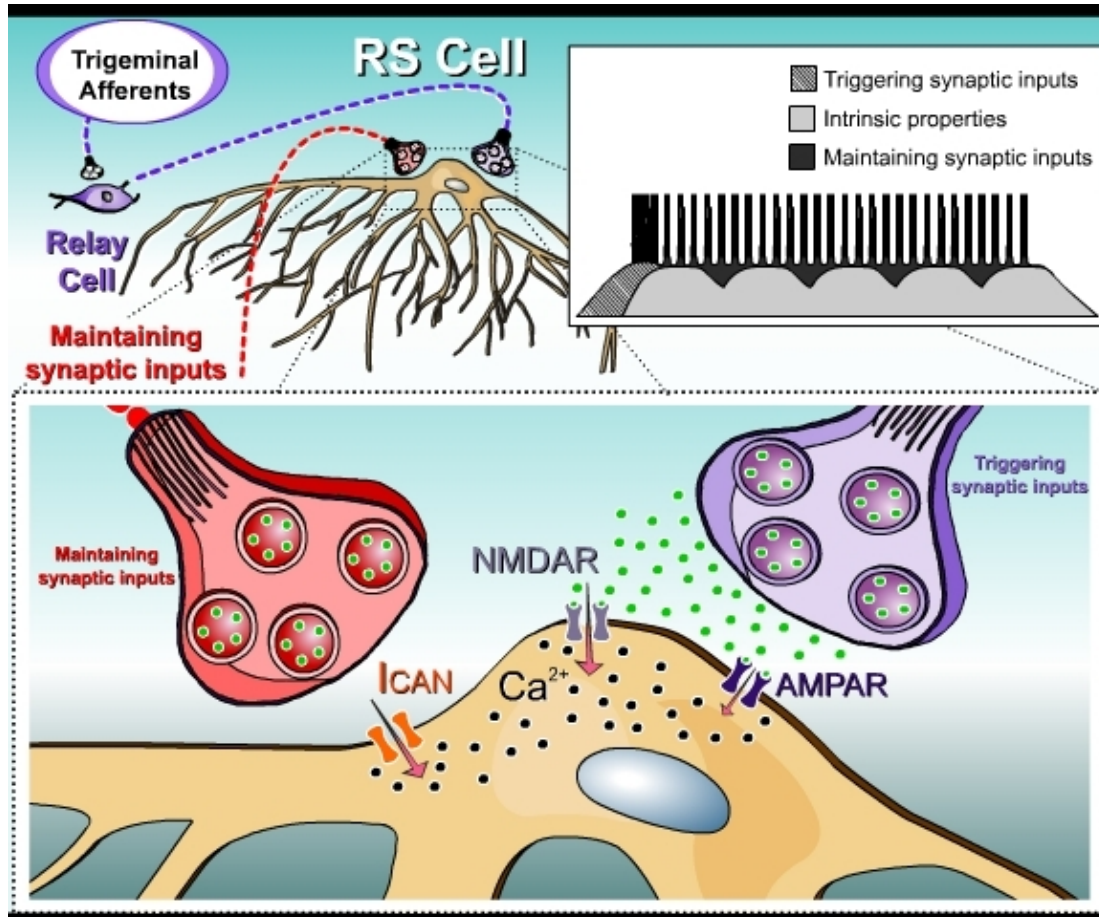


Figure 10



Ce deuxième chapitre de résultats comprend la publication suivante:

Ca²⁺ dynamics underlying the sensorimotor integration by reticulospinal neurons in lampreys

K. Fénelon², G. Viana Di Prisco², E. Pearlstein², R. Robitaille² and R. Dubuc^{1,2}

¹Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, (Québec), Canada, H3C 3P8. ²Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Département de physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7

Chez la lamproie, les cellules réticulospinales (RS) sont considérées comme étant des neurones de commande car elles intègrent des informations sensorielles de nombreuses modalités et projettent au niveau spinal pour déclencher et contrôler la nage. Dans cette étude, nous avons utilisé l'imagerie calcique et des enregistrements intracellulaires dans des préparations *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés de la lamproie pour déterminer si les différentes populations de cellules RS produisent des réponses similaires suite à une stimulation sensorielle (stimulation du nerf trijumeau). Dans la majorité des cellules RS, à de faibles intensités de stimulation, la taille des réponses a augmenté de façon proportionnelle jusqu'au moment où les réponses transitoires se sont transformées en réponses soutenues à de fortes intensités de stimulation. Cette transformation a eu lieu à la même intensité seuil pour les cellules RS de différents groupes, et ces différents groupes n'ont pas été recrutés de façon séquentielle. Les petites et les grosses cellules RS homologues localisées de chaque côté du tronc cérébral ont produit des réponses calciques de taille similaire. Sachant que les dépolarisations soutenues dépendent du Ca²⁺, nous avons ensuite étudié si les réserves internes de Ca²⁺ contribuent aux dépolarisations

soutenues. L'éjection de caféine (50 mM) sur les cellules RS a produit des réponses calciques qui ont été abolies par la Ryanodine (20 μ M), ce qui a confirmé la présence des réserves internes au niveau de ces cellules. De façon intéressante, l'éjection locale de glutamate a induit la libération de Ca^{2+} interne, mais bloquer cette dernière n'a pas réduit les dépolarisations soutenues. Nous concluons que l'activité prolongée des cellules RS dépend essentiellement du Ca^{2+} entrant par les récepteurs NMDA et que ces cellules, localisées dans les quatre noyaux de la formation réticulée, agissent simultanément pour transformer une brève stimulation cutanée en une commande excitatrice soutenue pour déclencher la nage de fuite.

**Ca²⁺ dynamics underlying the sensorimotor integration by
reticulospinal neurons in lampreys**

K. Fénelon², G. Viana Di Prisco², E. Pearlstein², R. Robitaille² and R. Dubuc^{1,2}

¹Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, H3C 3P8 and

²Groupe de recherche sur le Système Nerveux Central, Département de physiologie,
Université de Montréal, Montréal Québec, Canada, H3C 3J7

Abbreviated title: Ca²⁺ dynamics of lamprey RS cells

To whom correspondence should be addressed:

Dr Réjean Dubuc

Département de Kinanthropologie,

Université du Québec à Montréal,

Montreal (Québec), Canada, H3C 3P8

Phone: (514) 343-5729

Fax: (514) 343-6611

Email: dubuc.rejean@uqam.ca

1. ABSTRACT

In lampreys, reticulospinal (RS) cells are believed to act as command neurons because they integrate sensory inputs from several modalities and project to the spinal cord to initiate and control swimming. In the present study, intracellular recordings and Ca^{2+} imaging were used in an *in vitro* brainstem-spinal cord preparation to examine whether the different populations of lamprey RS cells display similar responses to sensory stimulation (trigeminal nerve stimulation). Responses of increasing size were observed in the vast majority of RS cells as the stimulation intensity was increased until a switch occurred from transient responses to sustained responses at high stimulation strength. The switch occurred at the same threshold intensity in RS cells of the different groups, with an absence of sequential recruitment of the different RS cell groups. Small and large RS cells on either side showed Ca^{2+} responses of similar magnitude. Knowing that the sustained responses are Ca^{2+} -dependent, we then assessed whether the internal Ca^{2+} stores could contribute. Caffeine (50 mM) ejections over RS cells elicited Ca^{2+} responses that were abolished by Ryanodine (20 μM), providing evidence that intracellular Ca^{2+} stores are present. Interestingly, local applications of glutamate (6 mM) induced internal Ca^{2+} release, but blocking the latter did not shorten the sustained depolarisations. We conclude that RS cells sustained depolarizations essentially depend on calcium entry through NMDA receptors, and that these cells, located in four reticular nuclei, act in synergy to transform a brief sensory input into a sustained excitatory command in order to trigger escape swimming.

2. INTRODUCTION

In animals, a brief cutaneous stimulation can evoke escape locomotion allowing animals to flee away from a potential danger (Willows and Hoyle, 1969; Viala and Buser, 1969, 1974; McClellan and Grillner, 1984; Jordan, 1986; McClellan, 1987, 1988; Eaton et al., 1988; Fetcho, 1991; Ritzmann and Pollack, 1994). The first descriptions of the cellular pathways and mechanisms involved in escape locomotion came from studies in invertebrates. This also led to the concept of a command neuron (Wiersma and Ikeda, 1964) defined as a neuron located between sensory neurons and central pattern generators (CPG), which is both necessary and sufficient for sensorimotor integration (Frost and Katz, 1996). In vertebrates, the neural mechanisms underlying sensory-evoked escape behavior were best described in aquatic animals where the reticulospinal (RS) cells were shown to be crucial in eliciting escape swimming (Eaton et al., 1988, 2001; Fetcho and Faber, 1988; Gahtan et al., 2002). The lamprey model provided the first detailed description of the system and cellular mechanisms involved in escape locomotion (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000).

In lampreys, cutaneous inputs reach the RS cells via a disynaptic pathway. Sensory primary afferents project onto relay neurons, which in turn activate RS cells, the main descending system of these animals (for review, see Dubuc et al., 2008). Lamprey RS cells are located in four reticular nuclei: the mesencephalic reticular nucleus (MRN), and the anterior (ARRN), middle (MRRN) and posterior (PRRN) rhombencephalic reticular nuclei (Rovainen, 1967, 1978; Nieuwenhuys, 1972; Rovainen et al., 1973; Bussi eres, 1994). RS cells display different morphologies and

sizes. They also receive sensory inputs from many sources and in turn activate spinal CPG neurons. Because of this, lamprey RS cells were proposed to act as command cells for locomotion in analogy with the concept previously described in invertebrates (McClellan and Grillner, 1984; McClellan, 1987, 1988). They were also shown to display specific integrative properties in relation to locomotion. At low stimulation intensity, cutaneous inputs induce linearly-related postsynaptic potentials in RS cells located in the MRRN cells which were replaced, at high stimulation, by non-linear sustained depolarizations. The latter responses had superimposed spikes and membrane potential oscillations in tune with swimming bouts in a semi-intact preparation in which the tail could freely move (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). The sustained depolarizations depended on NMDA receptor activation and were associated with a long-lasting intracellular calcium rise. It was also shown that a calcium-activated non-selective cationic current (I_{CAN}) was involved in the sustained depolarisations (Viana Di Prisco et al., 2000). This was investigated only in one population of RS cells, the MRRN, and we now investigated whether the switch from transient to sustained responses was seen in all the RS cells. We also investigated whether additional sources of calcium were needed for the sustained depolarizations.

Using Ca^{2+} imaging and electrophysiological recordings on the *in vitro* brainstem-spinal cord lamprey preparation, we now show that small and large RS cells located in the four reticular nuclei can switch from transient to sustained responses upon increasing the strength of a sensory stimulation. We also show that calcium coming from the internal stores does not contribute to maintain the sustained

depolarizations. Some of the results were previously published in abstract form (Fénelon and Dubuc, 2006).

3. METHODS

3.1. Animal preparation

The experiments were performed on 47 larval sea lampreys (*Petromyzon marinus* lampreys) from 10 to 15 cm long, collected from streams entering Lake Champlain. All the surgical and experimental procedures followed the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and were approved by the University Animal Care and Use Committees of the Université de Montréal and Université du Québec à Montréal. The animals were first anaesthetized with tricaine methanesulphonate (MS 222), and a complete transection below the last pair of gills was performed. Each preparation was then transferred and pinned down ventral side up at the bottom of a Sylgard-lined chamber containing freshly made Ringer's solution (pH = 7.4) with the following composition (in mM): 130 NaCl, 2.1 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.8 MgCl₂, 4 HEPES, 4 Dextrose and 1 NaHCO₃. Muscles, viscera and connective tissues were removed around the notochord, which was kept for support. The preparation was then placed dorsal side up, and the remaining tissues were dissected out to expose and isolate the brain and rostral spinal segments. This *in vitro* isolated brainstem-spinal cord preparation was transferred to the experimental chamber provided with a steady flow of cold (7 - 10°C) and oxygenated Ringer's. The trigeminal (Vth cranial) nerves on both sides of the brain were made visible for electrical stimulation (see below; Fig. 1A). In two preparations, a patch of skin covering the dorsal head region (snout) was kept intact for mechanical skin

stimulation. In all cases, a complete transection was made rostral to the mesencephalon for decerebration purposes.

3.2. Calcium imaging

The *in vitro* brainstem-spinal cord preparation was used for calcium imaging experiments (n = 26 preparations). RS cells were loaded by placing Calcium Green-Dextran crystals (10,000 MW, Molecular Probes, PO Box 22010, Eugene, OR; USA) directly into a complete spinal transection at the level of the fifth spinal segment (Fig. 1A). Following this, the preparation was transferred in a dark refrigerated chamber perfused with cold Ringer's for 24-48 hours for optimal labeling. The cells were thus labeled by the *in vitro* retrograde transport of the dye in the dark.

The preparation was then placed in a small recording chamber mounted onto a Nikon Eclipse E600FN microscope (Nikon, Montreal, QC, Canada) and continuously perfused with oxygenated Ringer's cooled down by a small homemade Pelletier device. The somata of the labeled RS cells from the mesencephalic reticular nucleus (MRN), and the anterior (ARRN), middle (MRRN) and posterior (PRRN) rhombencephalic reticular nuclei could be clearly identified and delineated for measurement on the video monitor. Cell identification in the lamprey brainstem was performed in each case according to known cytoarchitectural charts (Swain et al., 1993) and are denoted "A" (ARRN), "M" (MRRN) and "P" (PRRN) cells. The labeled RS cells having a diameter < 30 μm were classified as small cells, while the others were classified as large cells.

Images of labeled RS cells were observed on the Nikon microscope equipped

with a 20X water immersion objective and detected with an intensified Photometrics COOLSNAP HQ CCD camera (Photometrics; Trenton, NJ, USA). The images were recorded at a rate of 1/s using a video image acquisition system. Whenever a preparation gave signs of deterioration such as sudden increases or drops in resting fluorescence, the experiment was terminated.

In two cases, α -bungarotoxin (10 μ M/mL) was added to the perfusing solution for 10 minutes to block cholinergic transmission and movements of the preparation due to muscle contractions.

The intracellular Ca^{2+} variations were expressed as relative changes in fluorescence ($\Delta F/F$ in %). The files of the $\Delta F/F$ signals were analyzed off-line using the Clampfit 9.2 software (Axon Instruments Inc., Foster City, CA; USA).

3.3. Intracellular recordings

Using this reduced preparation, intracellular recordings were made from RS cells located in the four reticular nuclei ($n = 21$ preparations). The RS cells were impaled under visual inspection (Rovainen, 1967) with sharp glass micropipettes (diameter: outside = 1mm, inside = 0.75mm, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) filled with 4 M potassium acetate (60-150 M Ω in resistance). Depolarizing responses were recorded and amplified by an Axoclamp 2A amplifier (Axon instruments Inc., Foster City, CA; USA) at a sampling rate of 10 kHz in bridge mode. Only RS cells with a stable membrane potential more negative than -65 mV were included in this study. Electrophysiological data acquisition was digitized on a computer using a 1322A Digidata interface and the Clampex 9.2 software (pClamp9,

Axon Instruments Inc.). Off-line analysis was carried out using Clampfit 9.2 software (Axon Instruments Inc.).

3.4. Sensory stimulation

Both electrical and mechanical stimulations were used to elicit sensory-evoked Ca^{2+} responses (n = 15/26 preparations) or depolarizing responses (n = 21 preparations) in RS cells. Electrical stimulation was delivered to one of the two trigeminal nerves (V^{th} cranial nerves) using a glass-coated tungsten microelectrode (0.5 – 2.0 M Ω) connected to a Grass S88 stimulator (Grass Instrument Co., Quincy, MA) and to a stimulus isolation unit (SIU, Grass Instrument). Electrical stimulation was also performed within the area of the rhombencephalic relay cells for trigeminal inputs (Finger and Rovainen, 1982; Koyama et al., 1987; Viana Di Prisco et al, 2005) to elicit monosynaptic responses in RS cells. Trains of stimuli (2-ms shock duration; 0.5 – 6.5 μA ; 10-40 Hz; train duration : 100ms) were delivered every 30 seconds to the trigeminal nerve to elicit transient calcium responses or postsynaptic potentials (PSPs) in RS cells. To elicit sustained Ca^{2+} or sustained depolarizing responses, the 100-ms trains were repetitively delivered to the trigeminal nerve every 10 or 5 seconds and/or at higher intensities (7.0-40.0 μA). In some cases, the stimuli were delivered for periods lasting 1-2 seconds (0.5 – 6.5 μA ; 20 Hz).

Mechanical pressure to the skin of the head was also applied as a sensory stimulation using a glass rod probe (tip diameter = 0.5 mm) held above the preparation. The initial position and trajectory (downward and upward) of the probe were controlled by a computerized step motor system. The number of steps needed

for the probe to move down, apply pressure to the preparation and revert back to its initial position was programmed using homemade software. The exact moment of the stimulation was monitored while repeated stimulation trials (pressure applications) at the same intensity were given. Resting periods of at least 3 minutes were allowed between successive stimulation trials to avoid depression of synaptic transmission or habituation of the responses.

3.5. Drug application

Intracellular Ca^{2+} was released using local applications of Caffeine (50 mM; $n = 3/26$ preparations) or the excitatory neurotransmitter glutamate (6 mM; $n = 8/26$ preparations) over cells located in the MRRN during Ca^{2+} imaging experiments. The local applications were performed by positive pressure pulses (30 psi, 600-900 ms) through a glass micropipette filled by capillarity, using a Picospritzer (General Valve Corporation, Fairfield, NJ, USA). The ejection micropipette was positioned at the level of the midline, in very close apposition to the tissue, allowing the drug to equally spread over the cells located on both sides of the brainstem. Similar ejections using Ringer's as the ejected solution were also performed as a control, and this had no effect on RS cells. Ryanodine (20 μM) was then bath applied to reversibly block the Ca^{2+} release channels (RyRs) located on the endoplasmic reticulum of RS cells. In three cases, the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist 2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5; 200 μM) was subsequently added to the perfusing solution. Throughout all those experiments, tetrodotoxin (TTX; 1 μM) was present in

the bathing solution. Each drug was bath-applied for > 40 minutes prior to recording and in some cases, a washout period > 60 minutes was allowed for recovery.

In 11 out of the 21 electrophysiological experiments, intracellular recordings of RS sustained depolarizations were performed in control, in the presence of Ryanodine and following washout.

All the drugs were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, Ontario, CANADA) except for Ryanodine, which was obtained from CedarLine (CedarLine Laboratories Limited, Burlington, Ontario, CANADA). Ryanodine, TTX and AP-5, were stored frozen in individual vials as stock solutions (2 mM, 0.1 mM, and 20 mM, respectively). All drugs were dissolved at the desired concentration in fresh Ringer's prior to use.

3.6. Data Analysis

Ca^{2+} and depolarizing responses were recorded in individual RS cells in response to sensory stimulation. Ca^{2+} and the depolarizing responses were quantified by calculating the area under the curve of the signals from the onset of the responses (upward deflection from baseline values) or right after the stimulation artefact to the return back to resting values (pre-stimulation level). The area of the Ca^{2+} responses were expressed in arbitrary units (a.u.), whereas that of the depolarizing response were mV.s.

The area of the individual cell responses (Ca^{2+} or the depolarizing responses) was expressed in percentage of the maximum response area (set at 100%) obtained in each nucleus for comparisons between reticular nuclei. To compare the calcium

responses between homologous paired (bilateral) RS cells, the RS cells were grouped into four groups according to their size and location in relation to the cutaneous stimulation: small ipsilateral cells, small contralateral cells, large ipsilateral cells, and large contralateral cells. The mean response area of each category was expressed in percentage of the value of the category displaying the highest mean response area (set at 100%).

The peak amplitude, the time to peak and the slope of the sensory-evoked PSPs were also measured. The peak amplitude consisted of the largest voltage upward deflection from the resting values. The time to peak was measured as the time interval between the onset and the peak amplitude of the PSPs. The slope was measured at the largest rising phase between two consecutive points.

Statistical analyses were done using Origin software (OriginLab Corporation, Northampton, MA). A student t-test was used to compare the means of two groups. A one-way ANOVA was used to compare multiple groups, followed by a post hoc Tukey's test. Data in the text and the figures are expressed as the means \pm SE. Significant differences had a $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1. RS cell response to cutaneous stimulation

We first examined the responses of RS cells of the different reticular nuclei trigeminal nerve stimulation using Ca^{2+} imaging (Fig. 1A) Figure 1B (middle) shows a schematic representation of the RS cells typically labelled and clearly identified from one preparation to another. We first determined whether trigeminal nerve stimulation elicited both transient and sustained calcium responses in all of the labelled RS cells. In 11 preparations, one of the two trigeminal nerves (V^{th} stim) was electrically stimulated at two different intensities (low and high, 1.5-fold stronger than the former). Figure 1B shows examples of Ca^{2+} responses in identified RS cells on both sides (ipsi and contralateral to the stimulation) in one preparation. Low intensity stimulation (small arrow), elicited transient Ca^{2+} responses of various amplitudes Ca^{2+} in RS cells on both sides in the rhombencephalic reticular nuclei. The mean response durations were less than 15 seconds (ARRN = $11 \pm 1.8\text{s}$, MRRN = $10.7 \pm 1.5\text{s}$, PRRN = $12.1 \pm 1.6\text{s}$). By increasing the stimulation strength 1.5-fold (large arrow), all RS cells produced sustained Ca^{2+} responses of variable amplitude lasting several tens of seconds (ARRN = $36.1 \pm 9.5\text{s}$, MRRN = $44.8 \pm 6\text{s}$, PRRN = $31.8 \pm 4.0\text{s}$). The Ca^{2+} responses (transient or sustained) had a very similar time course within one nucleus.

4.2. Summation of Ca^{2+} responses to high frequency stimulation

It was shown that low repetitive trigeminal stimulation produces summation

of Ca^{2+} responses in RS cells of the MRRN (Viana Di Prisco et al., 1997). Whether this occurs in all rhombencephalic RS cells was investigated in four preparations at low, intermediate and high stimulation frequencies. Figure 2 shows the Ca^{2+} responses in one preparation. Transient Ca^{2+} responses of maximum amplitude were evoked in the RS cells in response to a low stimulation frequency, F_{low} (Fig. 2A1-C1, F_{low}). The Ca^{2+} transients were short in duration and widely spaced without failure. They were reproducible in size. The stimulation frequency was then increased to an intermediate value and closely spaced Ca^{2+} transients were induced until a point where a summation occurred (Fig. 2A1-C1, $F_{\text{intermediate}}$). Within a single preparation, this sudden increase in fluorescence appeared approximately at the same moment in the three reticular nuclei (Fig. 2A1-C1, $F_{\text{intermediate}}$, shaded areas). Further increasing the frequency of the stimulation induced sustained responses (Fig. 2A1-C1, F_{high} ; shaded areas).

4.3. Activation pattern of RS cells in response to trigeminal stimulation

We then examined the Ca^{2+} responses of RS cells to increasing stimulation intensities of the trigeminal nerve in 11 preparations (Fig. 3A). The areas of the Ca^{2+} responses were measured and stimulus-response relationships were plotted. Typical Ca^{2+} responses recorded in RS cells in the ARRn, MRRN and PRRN are illustrated for one preparation at the top of figure 3B1-B3. At subthreshold intensities (below the stimulation intensity needed to induce a sustained Ca^{2+} response), gradually increasing the intensity of stimulation induced transient Ca^{2+} responses of increasing area in

individual RS cells (Fig. 3B1-B3, first three traces of the insets). Then, further increasing the intensity of the trigeminal nerve stimulation produced long-lasting Ca^{2+} responses in RS cells of the three reticular nuclei (Fig. 3B1-B3, last trace of the insets). Consequently, the shape of the stimulus-response relationship was similar for the cells located in the three rhombencephalic reticular nuclei. At such subthreshold stimulation intensities for the induction of sustained responses, the different groups of RS cells showed a linear correlation in the stimulus-response relationships (Fig. 3B1-B3 graphs, straight lines). In contrast, at higher stimulation strengths, long lasting responses were no longer linearly related to the intensity of the stimulation (Fig. 3B1-B3 graphs, encircled values). Interestingly, within each of the 11 tested preparations, the threshold intensities to elicit sustained responses were not statistically different for the different nuclei ($p > 0.05$, 1-way ANOVA).

4.4. RS cell depolarizing responses in the four reticular nuclei

The above results indicate RS cell Ca^{2+} responses can switch from transient to sustained ones in all three reticular nuclei investigated. Ca^{2+} imaging allows for non invasive monitoring of cellular populations, but with slow temporal resolution. We thus used intracellular recordings to confirm the Ca^{2+} imaging results to increasing trigeminal nerve stimulation strengths in RS cells from the four reticular nuclei in 10 preparations (Fig. 4A). The depolarizing responses are illustrated on top in Figure 4B1-B4. Subthreshold stimulation (below Th) elicited post-synaptic depolarizing responses that increased linearly in size with the stimulation intensity (Fig. 4B1-B4, first three traces of the insets and graphs). During the transient depolarizing

responses, spiking activity was observed in some cases. Beyond Th , sustained depolarizing responses occurred in RS cell in all four reticular nuclei (Fig. 4B1-B4, last trace of the insets). The relationship between the size of the response and the stimulation intensity was lost (Fig. 4B1-B4 graphs, encircled values). As for the Ca^{2+} imaging experiments, the thresholds intensities to induce the sustained depolarisations were not statistically different among the four nuclei ($p > 0.05$; 1-way ANOVA) in the 10 preparations.

Excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) of maximum amplitude were also elicited in RS cells in response to the trigeminal nerve stimulation at $0.9 \times Th$ (data not shown). There were no significant differences in neither the time to peak nor the slope of response in RS cells of the four the nuclei. This suggests that RS cells in the four reticular nuclei are not recruited in a specific sequential order in response to trigeminal nerve stimulation ($p > 0.05$; $n = 10$ preparations).

4.5. Sensory-evoked responses in small versus large RS cells

While previous electrophysiological studies on the sensorimotor integration were biased towards the larger RS cells (easier to visualise), it is known that reticular nuclei are heterogeneous, composed of cells having different sizes and morphologies. In the three rhombencephalic reticular nuclei of 11 preparations, the Ca^{2+} responses between 1) homologous (bilateral) small or large cells and between 2) small and large ipsilateral cells were compared. The measured areas were normalized by the area of the cell showing the largest response to allow comparisons of Ca^{2+} responses having different amplitudes in each nucleus. Then, the data showing the highest mean area

was set to 100%.

Figure 5A-C shows the compiled data of the trigeminal nerve-evoked Ca^{2+} responses recorded in small and large RS cells located on both sides (Fig. 2; $n = 78$ ARRN cells, 134 MRRN cells, 92 PRRN cells). We first compared the Ca^{2+} responses of cells ipsilateral to the stimulation with the Ca^{2+} responses of their contralateral homologous cell following a low (thin horizontal bar) or a high (thick horizontal bar) stimulation intensity. In the ARRN, the area of the sustained Ca^{2+} responses (elicited by high stimulation strength) was slightly larger in the small ipsilateral cells than in the small contralateral homologous cells (Fig. 5A, ipsi $100 \pm 11.9\%$ vs. contra $86.2 \pm 15.6\%$; $p < 0.05$, paired t-test). However, in all the other cases, the areas of the calcium responses were larger in the contralateral RS cells, with no significant difference between ipsilateral and contralateral sides (Fig. 5A-C, ipsi vs. contralateral cells; $p > 0.05$, paired t-test). The Ca^{2+} responses of the small and large RS cells located on the same side were then compared. In the MRRN, the areas of the transient Ca^{2+} responses were significantly smaller in the small ipsilateral cells than in the large ipsilateral cells (Fig. 5B, small ipsi = $10.6 \pm 2.8\%$ vs. large ipsi = $21.6 \pm 3.7\%$ of maximum response; $p < 0.05$, paired t-test). In the other cases, no significant difference was observed between small and large RS cells located on the same side of the rhombencephalon (Fig. 5A-C, $p > 0.05$, ANOVA). These results indicate that homologous RS cells located on either side show similar transient or sustained responses and that small and large ipsilateral RS cells show similar responses.

4.6. Responses of RS to skin and trigeminal nerve stimulation

We then compared the Ca^{2+} responses evoked by skin and trigeminal nerve stimulation applied on the same side ($n = 2$ preparations; Fig. 6A). Within each rhombencephalic reticular nucleus, the mechanical skin stimulation and the electrical trigeminal nerve stimulation were first set to elicit Ca^{2+} responses displaying similar time courses, when scaled to the same amplitude. Figure 6B1-B3 shows typical responses of ARRNs, MRRNs and PRRNs RS cells, ipsilateral to the stimulations in one preparation. Then, in each nucleus, to compare the response patterns of cells following both types of stimulation, the individual response areas were normalized by the highest response (set at 100%) (Fig. 3C1-C3). The superimposed gray (skin) and black (trigeminal nerve) lines indicate that both types of stimulation recruit the RS cells with a similar pattern, which suggests that the trigeminal nerve stimulation faithfully reproduces a cutaneous stimulation.

4.7. Internal Ca^{2+} Sources are present in RS cells

According to the above results, RS cells in the four reticular nuclei can display similar sensory-evoked sustained responses. It thus seems likely that the responses similarly depend on extracellular Ca^{2+} entry through activated NMDA receptors and on the subsequent intracellular Ca^{2+} rise as was previously shown for MRRN cells (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). However, whether the internal Ca^{2+} stores contribute as well is unknown. We first examined the presence of the internal

Ca²⁺ stores in MRRN cells because their bigger size makes them easy to identify, and because they behave like all the other RS cells to a sensory stimulation.

In three preparations, Caffeine (50 mM) was locally applied to release Ca²⁺ from internal stores, in the presence of tetrodotoxin (TTX, 1 μM). The Ca²⁺ responses were recorded in 15 small and large MRRN cells (Fig. 7A1). Caffeine induced a rapid and steep increase in fluorescence in small (dotted lines) and large (solid lines) MRRN cells (Fig. 7A2, control). After adding Ryanodine (20 μM; Fig. 7A2, Ryanodine), Caffeine failed to elicit Ca²⁺ responses (Fig. 7A3, control = 100.0 ± 8.9 % vs. Ryanodine = 4.5 ± 0.4 %; *p* < 0.001, t-test). These results confirmed that Ca²⁺ can be released from the internal stores of RS cells.

Extracellular Ca²⁺ entry through NMDA receptors can induce the release of Ca²⁺ from internal stores in many cell types, through a mechanism of Ca²⁺-induced calcium release (CICR; Alford et al., 1993; Simpson et al., 1993; Lazarewicz et al., 1998; Makarewicz et al., 2000). We tested if this could occur in our system. Glutamate was locally ejected (6 mM) over a total of 110 small and large MRRN cells, first in the absence and then, in the presence of Ryanodine (Fig. 7B1) in 8 experiments. Representative Ca²⁺ responses of small (dotted lines) and large (solid lines) MRRN cells are illustrated in figure 7B2, for one preparation. Local glutamate ejections produced Ca²⁺ responses (Fig. 7B2, Control; Fig. 7B3, Control = 100 ± 9.9 %) that were greatly attenuated by bath application of Ryanodine (Fig. 7B2, Ryanodine; Fig. 7B3, Ryanodine = 52.3 ± 11.1 %). The remaining responses were due to Ca²⁺ entry through NMDA receptors because they were blocked by adding 200

μM AP-5 to the bath (Fig. 7B2, Ryanodine + AP-5; Fig. 7B3, Ryanodine + AP5 = 11.0 ± 6.2 %). Both effects were statistically significant (Fig. 7B3, $p < 0.05$ for Ryanodine and for Ryanodine + AP5, 1-way ANOVA). Four out of the 8 preparations tested were kept long enough to allow recovery by washing out the drugs. The responses then partly recovered with areas similar to that obtained under Ryanodine (Fig. 7B2, Washout; Fig. 7B3, Washout = 54.4 ± 15.9 %).

4.8. Contribution of internal stores to the sustained depolarizations

Then, to examine whether internal stores of Ca^{2+} contribute to the sustained depolarizations, trigeminal nerve-evoked sustained depolarizing responses were recorded in MRRN cells in control conditions and after blocking the internal Ca^{2+} release channels with Ryanodine (Fig. 8A1; $n = 10$ experiments). Surprisingly, the area of the sustained depolarization was significantly increased by the bath application of Ryanodine (Fig. 8A1, Control vs. Ryanodine; Fig. 8A2, Control = 100 ± 19.7 % vs. Ryanodine = 258.9 ± 58.3 %; $p < 0.05$, 1-way ANOVA). Recovery was obtained following a washout period of at least 60 minutes (Fig. 8A2, Washout; Fig. 8A3, Washout = 120.4 ± 29.6 %).

Sensory inputs coming from the head region to RS cells involve a disynaptic pathway (Viana Di Prisco et al., 1995) where trigeminal relay cells project monosynaptically to RS cells. Thus, the increase in area of the sustained depolarizations could have resulted from an effect on the relay cells. To test this, the axons of the relay cells projecting onto the ipsilateral recorded RS cells were electrically stimulated following the trigeminal nerve stimulation (Fig. 8B1, $n = 5$

experiments). The area of the relay cells-evoked sustained depolarizations was again increased following Ryanodine application but did not reach statistical significance (Fig. 8B1, Control vs. Ryanodine; Fig. 8B2, Control = 100 ± 18.4 % vs. Ryanodine = 145 ± 27.2 %; $p > 0.05$; 1-way ANOVA). The values reverted back to the control values after washout (Fig. 8B1, Washout; Fig. 8B2, Washout = 85.9 ± 9.4 %). Ryanodine did not affect the peak amplitude nor the area of the subthreshold synaptic responses induced in RS cells by trigeminal afferent stimulation (Fig. 8A1, 8B1 insets; $p > 0.05$; 1-way ANOVA; n = 6 experiments),

5. DISCUSSION

In lampreys, a brief cutaneous stimulation of sufficient strength can initiate swimming and in MRRN RS cells, NMDA-dependant sustained depolarizations associated with long lasting calcium responses can be recorded during such behavior. Here we show that MRN, ARRN, MRRN and PRRN RS cells are similarly activated by a sensory stimulation of cutaneous origin. In most cells, the linearly-related transient responses switched to sustained responses at high stimulation strengths. The switch from transient to sustained responses occurred at a similar threshold in the different groups of RS cells, suggesting that RS cells were simultaneously recruited. In addition, responses of similar magnitude were recorded in small and large RS cells on both sides. Surprisingly, the sensory-evoked sustained depolarizations did not require intracellular Ca^{2+} release to be maintained. We conclude that escape swimming relies on the simultaneous sensory-evoked long lasting activity of RS cells.

5.1. The activation pattern of RS cells

Calcium imaging allowed us to estimate the level of excitation of individual RS cells in the different reticular nuclei. According to our results, within each reticular nucleus, when the repetitive mild trigeminal nerve stimulation was applied at increasing frequencies, the majority of labelled RS cells showed a summation of the background activity level underlying the transient calcium responses. Because the summation of the transient response occurred approximately at the same time

between the different reticular nuclei, this suggests that all RS cells simultaneously integrate the frequency of a sensory stimulation. The sustained responses of RS cells at high stimulation frequency could be responsible for raising the level of excitation of spinal neurons to generate swimming. In fact, mild repeated mechanical stimulation of the skin was found to be effective in eliciting motor behaviors in semi-intact preparations where the tail was left attached to the brainstem and freely moved behind (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000).

The similar stimulus-response relationships of RS cells within and among the different reticular nuclei showed that the switch from transient to sustained responses occurred at the same trigeminal nerve threshold intensity. This suggested that groups of RS cells are not sequentially recruited. Moreover, the mean time to peak and the mean slope of trigeminal nerve-induced EPSPs was similar between cells of different nuclei, further confirming that the different groups of RS cells are not activated in a specific order.

Interestingly, the labelled cells that showed transient calcium responses at low stimulation intensities all displayed long lasting responses at higher stimulation strengths. This suggests that increasing the intensity of the stimulation does not recruit additional inactive populations of RS cells. Rather, there seems to be a synchronous increase in the activity of individual RS cells. In order to elicit an efficient escape behaviour, a large number of RS cells would need to be activated at their maximum, at the same time. Our data show that the RS cells can simultaneously produce sustained depolarizations in an all-or-none fashion and not proportional to

the stimulation strength. This synchronized sensory-evoked sustained activity of RS cells may be an important feature to strongly activate the spinal locomotor networks leading to an efficient escape behaviour as was demonstrated in the trout and in the zebrafish (Bosch et al., 2001; Gathan et al., 2002). This stands in contrast to other modes of locomotion driven by internal needs such as exploration or food seeking where the animal may need to control the speed of swimming. For example, the control of swimming by the mesencephalic locomotor region (MLR), which was proposed to adapt the locomotion of animals according to internal needs, involves the sequential activation of two reticular nuclei. As the intensity of the MLR stimulation is increased, the action potential frequency varies in an almost linear fashion in the MRRN and PRRN RS cells (Brocard and Dubuc, 2003). After the firing frequency of MRRN cells reaches a plateau, then the cells in the PRRN begin to discharge. The RS cells progressively activated in that way were shown to control the intensity of locomotion in a “nearly linear” fashion in lampreys (Sirota et al., 2000; Brocard and Dubuc, 2003) and in other species such as mammals (Shik et al., 1966), birds (Steeves et al., 1987), and reptiles (Cabelguen et al., 2003) allowing a gradual increase in swimming speed. Additional recruitment of large RS cells is also seen in lampreys not only during swimming but also during postural adjustments of the body (Deliagina et al., 2000; Zelenin et al., 2003). The graded recruitment of individual cells within a group was also described in zebrafish brainstem neurons during escape swimming, where only few large RS cells are activated during weak cutaneous-evoked escape responses, whereas all RS cells respond during strong escapes (O’Malley et al., 1996). In lampreys however, our results show that the RS

cells within each reticular nucleus, which are known to make excitatory connections with neurons of the spinal locomotor networks (Buchanan et al., 1987; Ohta and Grillner, 1989), display a similar recruitment pattern by sensory inputs of cutaneous origin.

5.2. The activity of small vs. large RS cells to trigeminal nerve stimulation

It was previously shown in lampreys that a mild cutaneous stimulation produces excitatory post-synaptic potentials in RS cells located in the four reticular nuclei (Viana Di Prisco et al., 1995, 1997, 2000). In such studies, the intracellular recordings were likely to be biased towards large RS cells. Our calcium imaging results now show that a sensory stimulation evokes calcium responses of variable amplitudes but with the same duration in both small and large labelled RS cells from the three rhombencephalic reticular nuclei. In our experiments it was not possible to image the RS cells in the mesencephalic nucleus (MRN), because the cells are located quite deeper rostrally within the mesencephalon and were not easily visible after labeling. However, these cells were intracellularly recorded, and the results show that they behaved like the RS cells of the rhombencephalic nuclei. Because the RS cells recorded in each group displayed sensory-evoked sustained depolarizations, it is tempting to propose that these responses rely on similar intrinsic mechanisms. Future electrophysiological experiments should be carried out to determine whether this is true.

5.3. The role of internal calcium stores during sustained depolarizations

Our results show that following glutamate receptor activation, Ca^{2+} can be released from the internal stores of RS cells. Surprisingly, internal Ca^{2+} release did not seem to contribute to the switch from transient to sustained depolarizations since Ryanodine significantly increased the area of the trigeminal nerve-evoked sustained depolarisation. However, the area of the relay cells-evoked sustained depolarisation were not significantly increased during Ryanodine, suggesting that Ryanodine could be acting not only at the level of RS cells but also on the relay cells. It is thus possible that relay cells also display sustained depolarisations which then induce sustained depolarizations in the RS cells. A similar prolongation of NMDA-induced responses by blocking internal calcium release with Ryanodine was observed in cat respiratory neurons (Haji and Ohi, 2006). The internal calcium release was shown to decrease the excitability of those neurons by repolarizing the membrane potential and by decreasing the spiking frequency through a calcium-activated potassium conductance (K_{Ca}). Here, a possibility would be that Ca^{2+} entry through NMDA receptors could activate the release of Ca^{2+} from the internal calcium stores, which could then act on K_{Ca} which were shown to be present on lamprey RS cells (Viana Di Prisco et al., 1992 ; McClellan et al., 2008). Such cellular cascade of events could be part of an intrinsic mechanism that would repolarize the RS cells membrane potential at the end of the sustained depolarization.

5.4. Functional implication

Overall, our results show that a sensory stimulation of cutaneous origin simultaneously activate RS cells which can display sustained depolarizations. However, the role of the different reticular nuclei in escape swimming is not determined yet. Since the sensory-evoked sustained responses previously recorded in MRRN cells were shown to be associated with the onset of locomotion (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000), it is more than likely that the other RS cells contribute to the activation of the spinal locomotor networks leading to the motor output. This could be addressed by inactivating specific groups of cells and study the effects on sensory-evoked escape swimming in semi-intact lamprey preparations. One possibility could be that the individual nuclei participate, in an independent manner, to increase the power of sensory-evoked swimming. If this is the case, it is therefore possible that the inhibition of one reticular nucleus would not end the ongoing locomotor activity, but rather, slow down the swimming frequency. The simultaneous activation of RS cells in the four reticular nuclei, could also be needed to decrease the delay to initiate an escape behaviour and to most likely generate a maximal local motor output. This will be important for the survival of the animal because it will allow it to efficiently escape away from the stimulus (McClellan and Grillner, 1984; McClellan, 1984). Functionally, this is in contrast to the MLR-induced locomotion where the MRRN and PRRN were respectively shown to be responsible for the onset and the frequency of the MLR-induced goal-directed locomotion (Brocard and Dubuc, 2003).

Altogether, these results indicate that the different populations of RS cells are indeed activated simultaneously by a sensory stimulation of cutaneous origin. There was no difference between the responses of cells within and among the different reticular nuclei, nor between small and large RS cells, whether they were located on the same or on opposite side from the stimulus. In addition, the sustained depolarizations did not rely on internal Ca^{2+} release, which could rather be part of an intrinsic mechanism responsible for membrane potential repolarization.

6. ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors wish to express their gratitude to D. Veilleux for her technical assistance with the experiments, to C. Valiquette for expertise in computer programming and to F. Bernard for his help with the figures. We are also grateful to Dr. M. Antri, Dr. D. Derjean, Dr. L. Juvin and Mr. F. Auclair for critical review of this manuscript. **Grant Sponsors:** Individual and Group grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Grant Numbers: 15129 and 15176 (to RD), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Grant Number: 217435-01 (to RD), and the Groupe de recherche sur le système nerveux central from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), Grant Number: 5249. KF received a studentship from the FRSQ.

7. REFERENCES

- Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, Collingridge GL (1993) Characterization of Ca^{2+} signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. *J Physiol* 469: 693-716.
- Bosch TJ, Maslam S, Roberts BL (2001) Fos-like immunohistochemical identification of neurons active during the startle response of the rainbow trout. *J Comp Neurol* 439(3): 306-314.
- Brocard F, Dubuc R (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90(3):1714- 1727.
- Buchanan JT, Brodin L, Dale N, Grillner S (1987) Reticulospinal neurones activate excitatory amino acid receptors. *Brain Res* 408(1-2): 321-325.
- Bussi eres N (1994) Les systèmes descendants chez la lamproie. Etude anatomique et fonctionnelle. *Ph.D thesis*. Université de Montréal.
- Cabelguen JM, Bourcier-Lucas C, Dubuc R (2003) Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the salamander *Notophthalmus viridescens*. *J Neurosci* 23(6): 2434-2439.
- Deliagina T, Beloozerova IN, Popova LB, Sirota MG, Swadlow HA, Grant G, Orlovsky GN (2000) Role of different sensory inputs for maintenance of body posture in sitting rat and rabbit. *Motor Control* 4(4):439-452.
- Dubuc R, Brocard F, Antri M, Fénelon K, Gariépy JF, Smetana R, Ménard A, Le Ray D, Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Sirota MG, Derjean D, St-Pierre M,

- Zielinski B, Auclair F, Veilleux D (2008) Initiation of locomotion in lampreys. *Brain Res Rev* 57(1):172-182. Review.
- Eaton RC, DiDomenico R, Nissanov J (1988) Flexible body dynamics of the goldfish C- start: implications for reticulospinal command mechanisms. *J Neurosci* 8(8): 2758-2768.
- Eaton RC, Lee RK, Foreman MB (2001) The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Prog Neurobiol* 63(4): 467-485. Review.
- Fénelon K, Dubuc R (2006) Ca²⁺ sources involved in sensory-evoked sustained depolarizations in reticulospinal neurones of lampreys. *Soc Neurosci Abstr* 448.15/U6.
- Fetcho JR (1991) Spinal network of the Mauthner cell. *Brain Behav Evol* 37(5): 298-316. Review.
- Fetcho JR, Faber DS (1988) Identification of motoneurons and interneurons in the spinal network for escapes initiated by the mauthner cell in goldfish. *J Neurosci* 8(11): 4192-4213.
- Frost WN, Katz PS (1996) Single neuron control over a complex motor program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 422-426.
- Gahtan E, Sankrithi N, Campos JB, O'Malley DM (2002) Evidence for a widespread brain stem escape network in larval zebrafish. *J Neurophysiol* 87(1): 608-614.
- Haji A, Ohi, Y (2006) Ryanodine receptor/Ca(2+) release mechanisms in rhythmically active respiratory neurons of cats in vivo. *Neuroscience* 140(1): 343-354.

- Lazarewicz JW, Rybkowski W, Sadowski M, Ziembowicz A, Alaraj M, Wegiel J, Wisniewski HM (1998) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated, calcium-induced calcium release in rat dentate gyrus/CA4 in vivo. *J Neurosci Res* 51(1): 76-84.
- Makarewicz D, Salinska E, Puka-Sundvall M, Alaraj M, Ziembowicz A, Skangiel-Kramska J, Jablonska B, Bona E, Hagberg H, Lazarewicz JW (2000) NMDA-induced ⁴⁵Ca release in the dentate gyrus of newborn rats: in vivo microdialysis study. *Neurochem Int* 37(2-3): 307-316.
- McClellan AD (1984) Descending control and sensory gating of 'fictive' swimming and turning responses elicited in an in vitro preparation of the lamprey brainstem/spinal cord. *Brain Res* 302(1): 151-162.
- McClellan AD (1987) In vitro CNS preparations: unique approaches to the study of command and pattern generation systems in motor control. *J Neurosci Methods* 21(2-4): 251-264. Review.
- McClellan AD (1988) Brainstem command systems for locomotion in the lamprey: localization of descending pathways in the spinal cord. *Brain Res* 457(2): 338-349.
- McClellan AD (2008) Spinal cord injury induces changes in electrophysiological properties and ion channel expression of reticulospinal neurons in larval lamprey. *J Neurosci* 28(3): 650-9.
- McClellan AD, Grillner S (1984) Activation of 'fictive swimming' by electrical microstimulation of brainstem locomotor regions in an in vitro preparation of

- the lamprey central nervous system. *Brain Res* 300(2): 357-361.
- Nieuwenhuys R (1972) Topological analysis of the brain stem of the lamprey *Lampetra fluviatilis*. *J Comp Neurol* 145(2): 165-177.
- O'Malley DM, Kao YH, Fetcho JR (1996) Imaging the functional organization of zebrafish hindbrain segments during escape behaviors. *Neuron* 17(6): 1145-1155.
- Ohta Y, Grillner S (1989) Monosynaptic excitatory amino acid transmission from the posterior rhombencephalic reticular nucleus to spinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* 62(5): 1079-1089.
- Ritzmann RE, Pollack AJ (1994) Responses of thoracic interneurons to tactile stimulation in cockroach, *Periplaneta americana*. *J Neurobio* 25(9): 1113-1128.
- Rovainen CM (1967) Physiological and anatomical studies on large neurons of central nervous system of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). I. Müller and Mauthner cells. *J Neurophysiol* 30(5): 1000-1023.
- Rovainen CM (1978) Müller cells, "Mauthner" cells, and other identified reticulospinal neurons in the lamprey. In: *Neurobiology of the Mauthner cell*. Faber DS and Korn H (Eds). New-York: Raven Press p. 245-269.
- Rovainen CM, Johnson PA, Roach EA, Mankovsky JA (1973) Projections of individual axons in lamprey spinal cord determined by tracings through serial sections. *J Comp Neurol* 149(2): 193-202.
- Shick ML, Severin FV, Orlovsky GN (1966) Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics* 11: 756-765.

- Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR (1993) Involvement of intracellular stores in the Ca²⁺ responses to N-Methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 61(2): 760-763.
- Sirota MG, Di Prisco GV, Dubuc R (2000) Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur J Neurosci* 12(11): 4081-4092.
- Steeves JD, Sholomenko GN, Webster DM (1987) Stimulation of the pontomedullary reticular formation initiates locomotion in decerebrate birds. *Brain Res* 401(2): 205-212.
- Swain GP, Snedeker JA, Ayers J, Selzer ME (1993) Cytoarchitecture of spinal projecting neurons in the brain of the larval sea lamprey. *J Comp Neurol* 336(2): 194-210.
- Viala G, Buser P (1969). Activités locomotrices rythmiques stéréotypées chez le lapin sous anesthésie légère. Etude de leur caractéristiques spéciales. *Exp Brain Res* 8(4): 346-63.
- Viala G, Buser P (1974) Inhibition des activités spinales à caractère locomoteur par une modalité particulière de stimulation somatique chez le lapin. *Exp Brain Res* 21(3): 275-284.
- Viana Di Prisco G, Ohta Y, Bongianini F, Grillner S, Dubuc R (1995) Trigeminal inputs to reticulospinal neurones in lampreys are mediated by excitatory and inhibitory amino acids. *Brain Res* 695(1): 76-80.
- Viana Di Prisco G, Dubuc R, Wallén P, Grillner S (1992) 5-Hydroxytryptamine

modulates spike frequency regulation in reticulospinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey. *Neurosci Lett* 134(2): 279-283.

Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Le Ray D, Robitaille R, Dubuc R (2000) A cellular mechanism for the transformation of a sensory input into a motor command. *J Neurosci* 20(21): 8169-8176.

Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Robitaille R, Dubuc R (1997) Role of sensory evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science* 278(5340): 1122-1125.

Zelenin PV, Grillner S, Orlovsky GN, Deliagina TG (2003) The pattern of motor coordination underlying the roll in the lamprey. *J Exp Biol* 206(Pt 15):2557-2566.

Wiersma CA, Ikeda K (1964) Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus Clarki* (Girard). *Comp Biochem Physiol* 12:509-525.

Willows AO, Hoyle G (1969) Neuronal Network Triggering a Fixed Action Pattern. *Science* 166(3912): 1549-1551.

8. FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ca^{2+} responses of RS cells to sensory stimulation of cutaneous origin. *A*, Drawing of the experimental set up for Ca^{2+} imaging of retrogradely labeled RS cells in the anterior (ARRN), middle (MRRN) and posterior (PRRN) rhombencephalic reticular nuclei. Ca^{2+} responses were recorded in RS cells in response to the electrical stimulation of the trigeminal nerve (V^{th} stim). *B*, *central column*, Schematic representation of typically labeled RS cells in three rhombencephalic reticular nuclei [ARRN, MRRN (except Mauthner cells) and PRRN cells are denoted “A”, “M” and “P” cells] on each sides of the brainstem. *Left and right columns*, Examples of transient (small arrow) and sustained (large arrow) Ca^{2+} responses to low and high stimulation intensities ipsilateral and contralateral to the trigeminal nerve stimulation.

Figure 2. Effect of increasing the frequency of the trigeminal nerve stimulation on calcium responses in groups of RS cells. *A1-C1*, Examples of transient calcium responses from two cells in the ARRN (A1), MRRN (B1) and PRRN (C1) at low (F_{low} , top), intermediate ($F_{\text{intermediate}}$, middle) and high (F_{high} , bottom) stimulation frequency. Note that within each preparation, RS cells from different nuclei show transient Ca^{2+} responses that fuse at the same time (shaded areas) at higher stimulation frequencies.

Figure 3. Activation pattern of groups of RS cells to trigeminal nerve stimulation. *A*, Schematic representation of the experimental set-up. Calcium responses were evoked in groups of RS cells from the ARRN (B1), MRRN (B2) and PRRN (B3) by

stimulating the trigeminal nerve (V^{th} stim) at increasing intensities. *B1-B3, top traces*, illustrate the transient calcium responses elicited at three subthreshold stimulation intensities (0.7, 0.8 and 0.9 x Th) and one sustained calcium response triggered at threshold intensity (Th), in one RS cell from the ARRN, MRRN and PRRN in one preparation. *Graphs* show the stimulus-response relationships of several identified RS cells from each nucleus. The areas of the responses are expressed in percent of the maximum response (set at 100%) and are plotted as a function of the stimulation intensity. At low intensities, linearly related transient responses (straight lines) are replaced by non linear sustained responses at higher intensities (encircled values). The traces in the insets are from the cells with their names underlined.

Figure 4. Intracellular recordings of the activation pattern of individual RS cells from the four reticular nuclei to trigeminal nerve stimulation. *A*, The experimental set-up showing the electrical stimulation of the trigeminal nerve (V^{th} stim) and the intracellular RS cell recording. *B1-B4, top traces*, illustrate transient depolarizing responses elicited in one cell from the MRN, ARRN, MRRN and PRRN at three subthreshold stimulation intensities (0.7, 0.8 and 0.9 x Th) and one sustained depolarization triggered at threshold intensity (Th), in one preparation. Note that spiking activity could be observed during subthreshold and sustained responses. *Graphs* show the stimulus-response relationships of the RS cells from each reticular nucleus. The areas of the responses obtained from three trials at each intensity (expressed in percent of the maximum response set at 100%) are plotted as a function of stimulation intensity. Linearly related transient responses (straight lines) were

elicited at low intensities and at higher intensities non linear sustained responses were triggered (encircled values).

Figure 5. Area of cutaneous-evoked calcium responses recorded in small and large RS cells. *A-C*, Histograms showing the pooled data of 10 experiments where the mean area of Ca^{2+} responses from the ARRN (A), MRRN (B) and PRRN (C) grouped into four different categories: small ipsilateral and contralateral cells (left), as well as large ipsilateral and contralateral cells (right). For each nucleus, the category of the pooled data with the maximum mean area is set to 100%. The Ca^{2+} responses of small and large cells ipsilateral (black) and contralateral (grey) to the stimulation were compared as well as small and large cells located on the same side of the brainstem in response to low (below T_h , thin line) or high (above T_h , thick line) stimulation intensity. Numbers in parentheses correspond to the total number of ipsi and contralateral cells. * $p < 0.05$, ANOVA.

Figure 6. Ca^{2+} responses of RS cells to mechanical skin and trigeminal nerve stimulations. *A*, Drawing illustrating the experimental set-up. The responses recorded in labeled RS cells from the ARRN (B1), MRRN (B2) and PRRN (B3) were elicited by pressure applied to the skin of the head (skin) and by the electrical stimulation of the trigeminal nerve (V^{th}), on the same side. *B1-B3*, Examples of Ca^{2+} responses elicited in RS cells by both types of sensory stimulations and scaled to the same amplitude, in one preparation. *C1-C3*, The response patterns of ARRN (C1), MRRN (C2) and PRRN (C3) cells to skin (grey) and to trigeminal nerve (black) stimulation

of constant intensity. In each nucleus, the response area of each individual cell is expressed in percent of the cellular response having the maximum value (set at 100%).

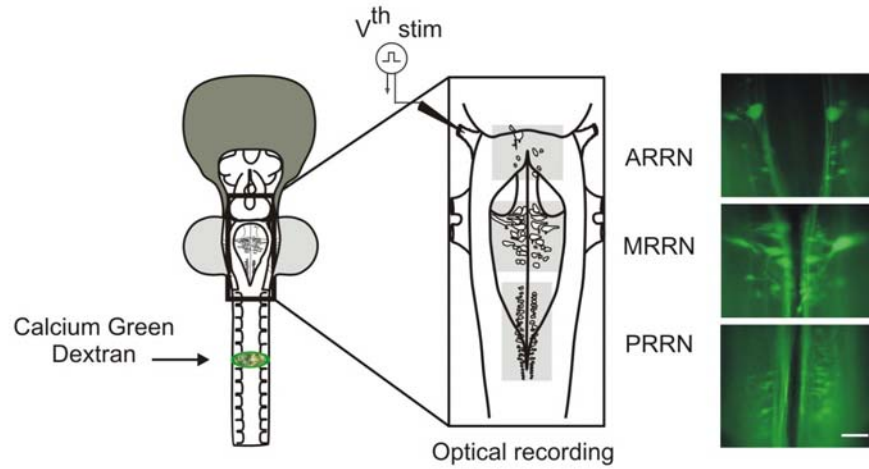
Figure 7. Evidence that internal calcium stores are present in RS cells. *A1, B1*, RS cells from the MRRN were microinjected by caffeine (*A1*; 50 mM) or glutamate (*B1*; 6 mM). *A2, B2*, The responses of small (dotted lines) and large (solid lines) MRRN cells to caffeine (*A2*) or glutamate (*B2*) ejection in control, in the presence of the blocker of the internal calcium release channels (RyRs) Ryanodine (20 μ M; *A2, B2*), in Ryanodine + AP-5 (*B2*) and following washout (*B2*). *A3, B3*, Histograms of the mean areas of the caffeine-evoked (*A3*) or glutamate-evoked (*B3*) calcium responses under the different experimental conditions. The mean responses are expressed in percent of the control values. A and B are from different preparations. The numbers in parentheses represent the number of cells. *** $p < 0.05$, t-test; * $p < 0.05$, ANOVA.

Figure 8. Effect of blocking the internal calcium release channels with Ryanodine (20 μ M) on the sensory-evoked sustained depolarizations. *A1, B1, left*, Experimental set-up. In MRRN cells, the intracellularly recorded sustained depolarizations were first elicited by the electrical stimulation of the trigeminal nerve (*A1*), and then, by the electrical stimulation of the trigeminal relay cells fibers (*B1*). *Right*, In the same preparation, the sustained depolarizations elicited by both types of stimulations were recorded under control, during Ryanodine bath application and after washout. *Insets*,

Representative EPSPs elicited by the stimulation of the trigeminal nerve (A1) and the stimulation of the relay cells fibers (B1) are shown in a MRRN cell of one preparation in control, during Ryanodine and after washout. The traces are averages of 3 trials. A2, B2, Histograms illustrating the mean areas of the sustained depolarizations, expressed in percentage of the control, under the three experimental conditions. The numbers in parentheses represent the number of cells. * $p < 0.05$, ANOVA. ns : non significant.

Fig 1. Fénelon et al.

A



B

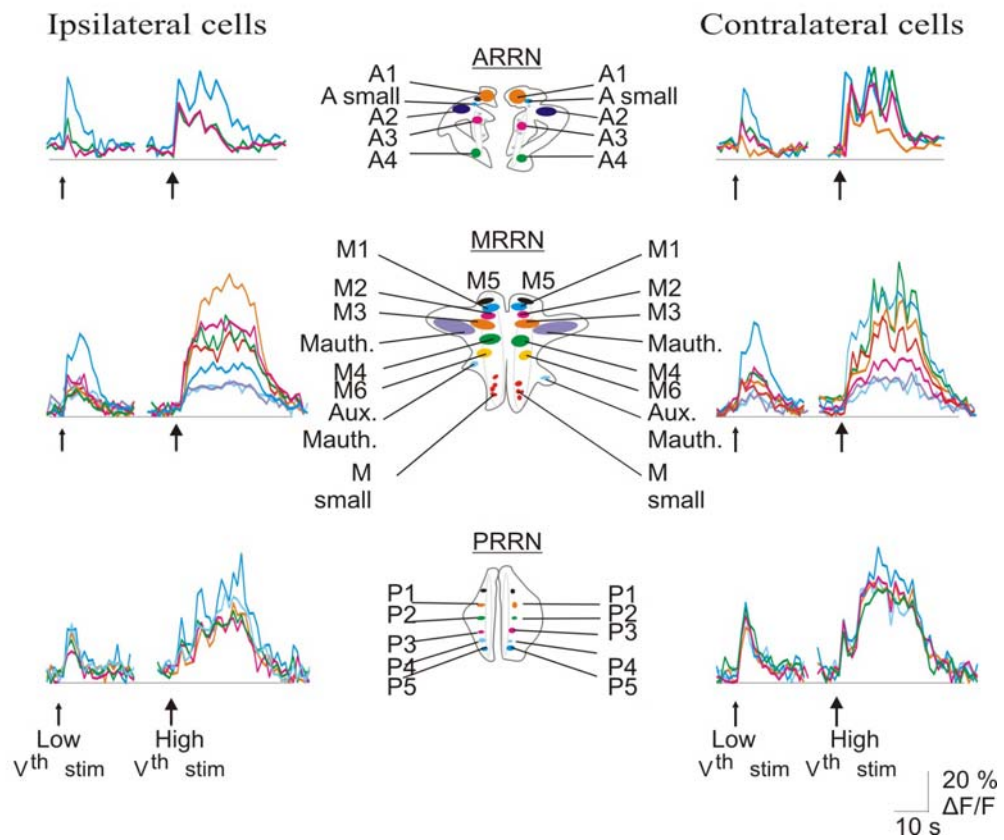


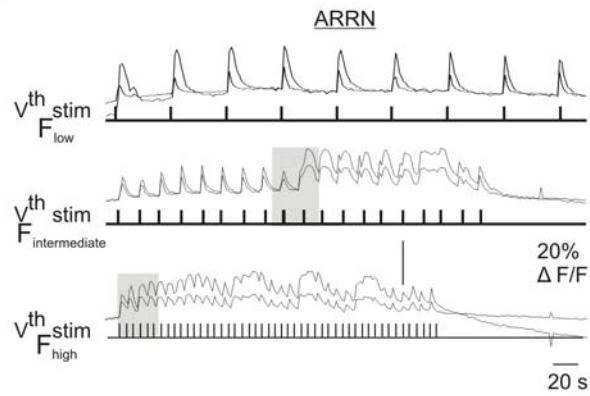
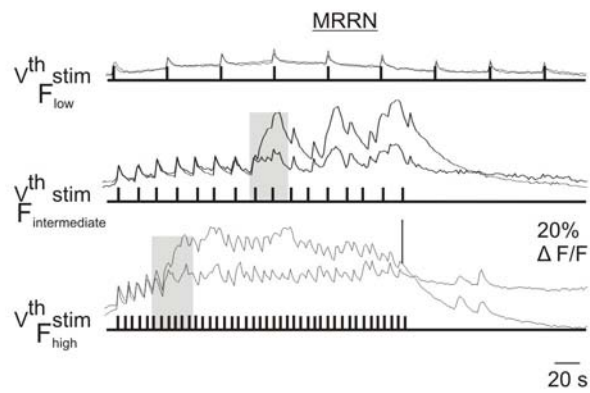
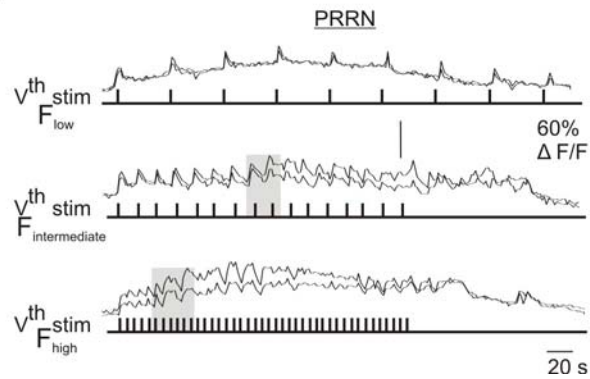
Fig 2. Fénelon et al.**A1****B1****C1**

Fig 3. Fénelon et al.

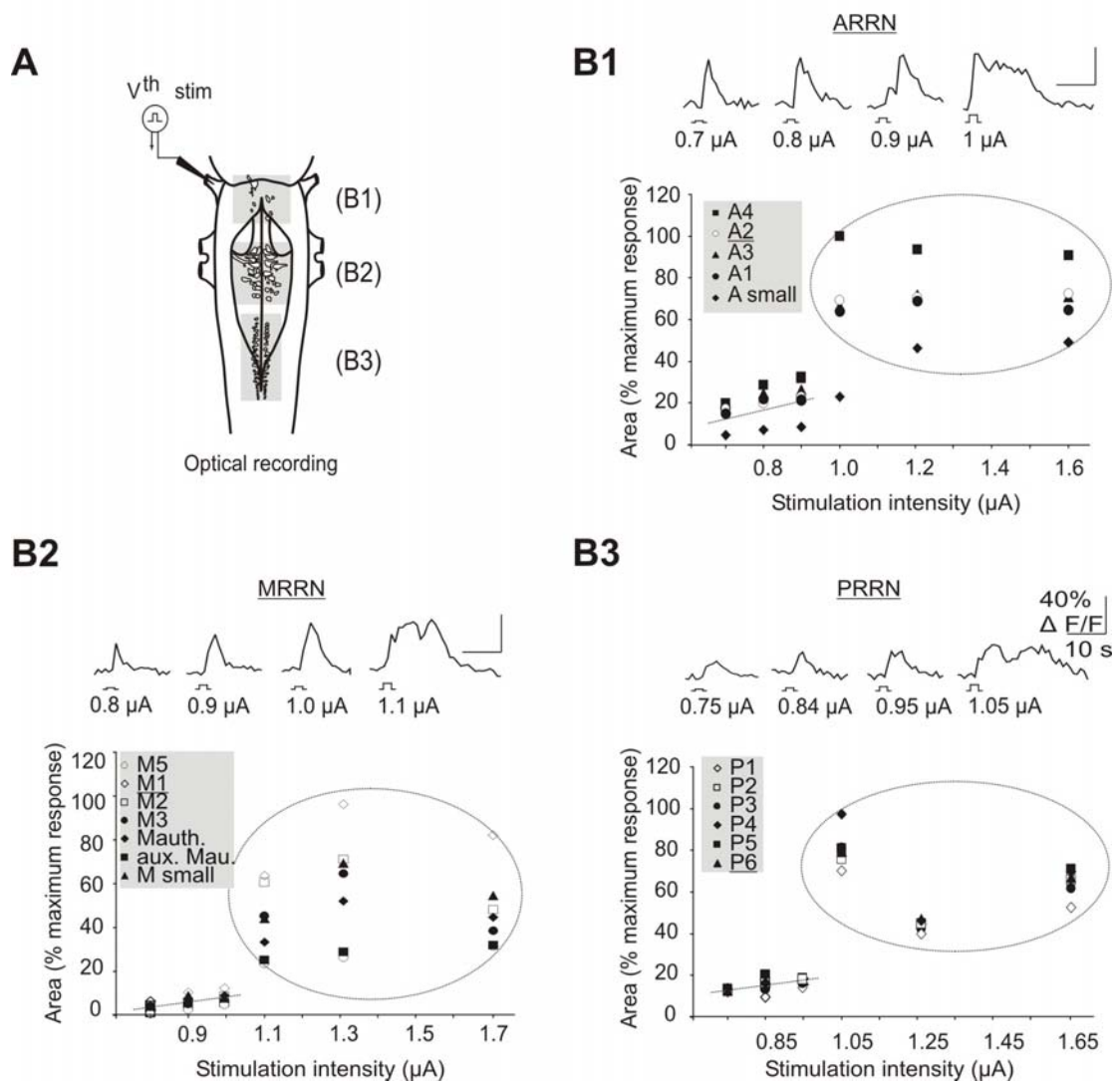
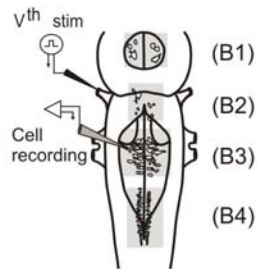
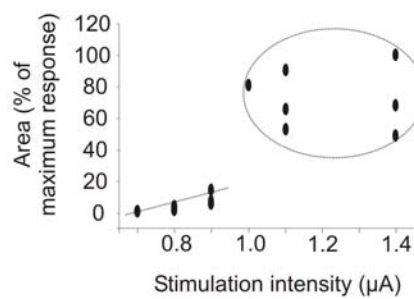
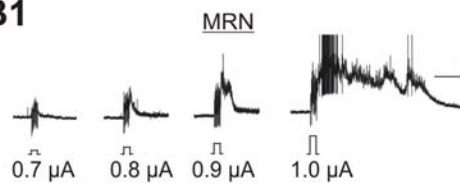


Fig 4. Fénelon et al.

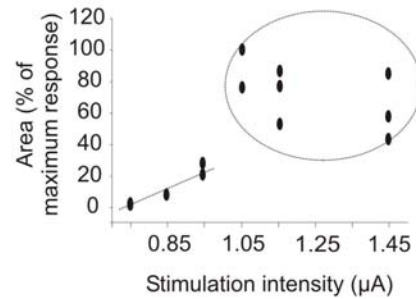
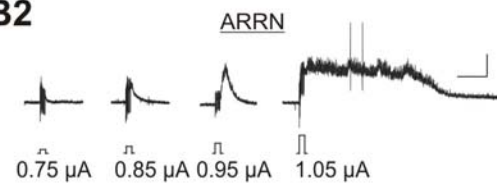
A



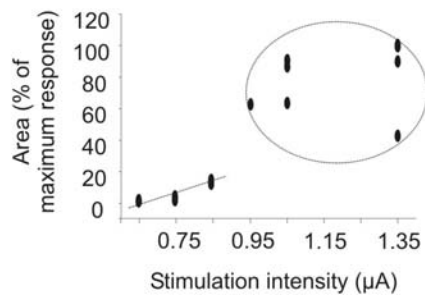
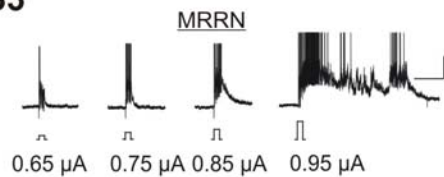
B1



B2



B3



B4

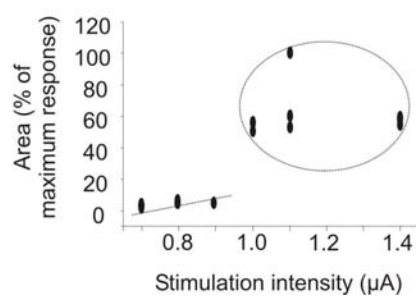
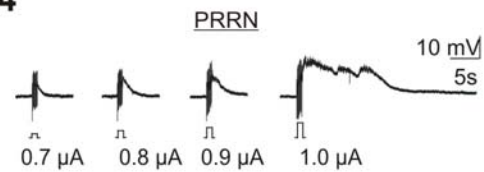


Fig 5. Fénelon et al.

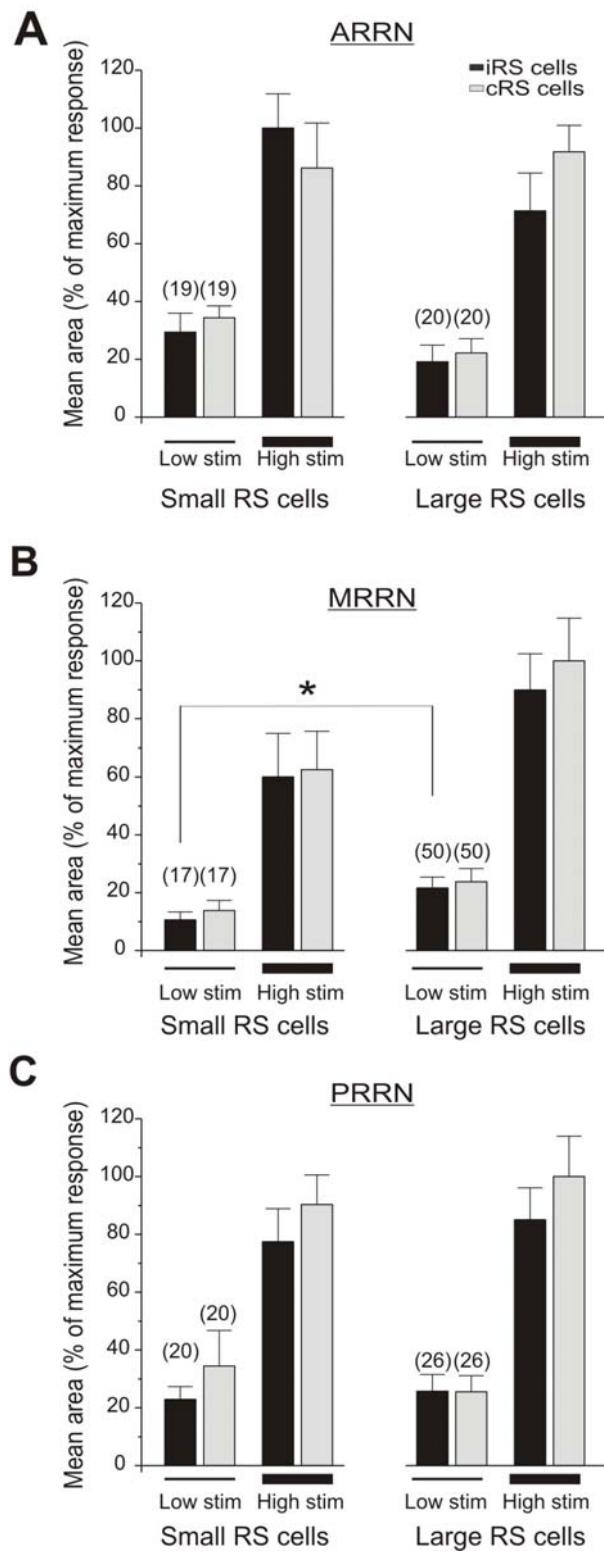


Fig 6. Fénelon et al.

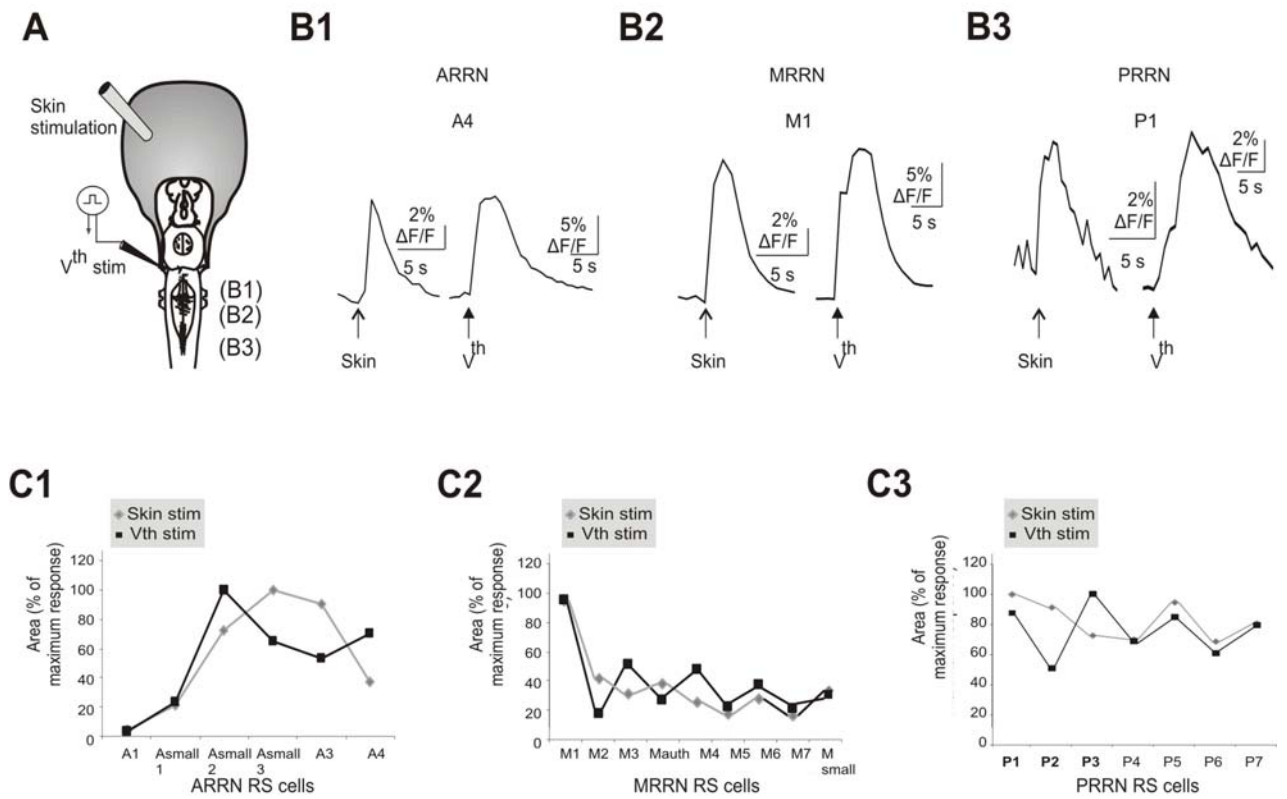


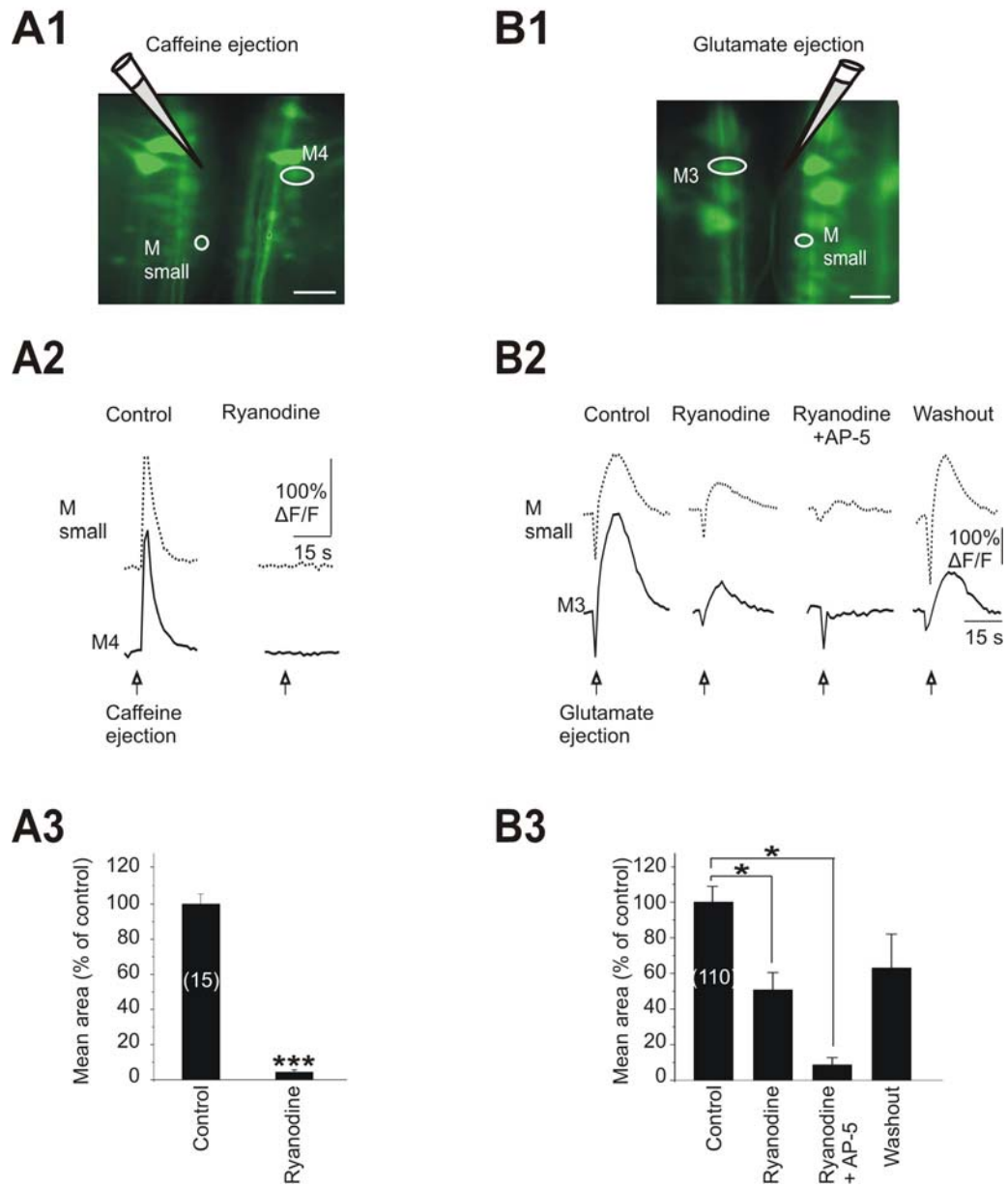
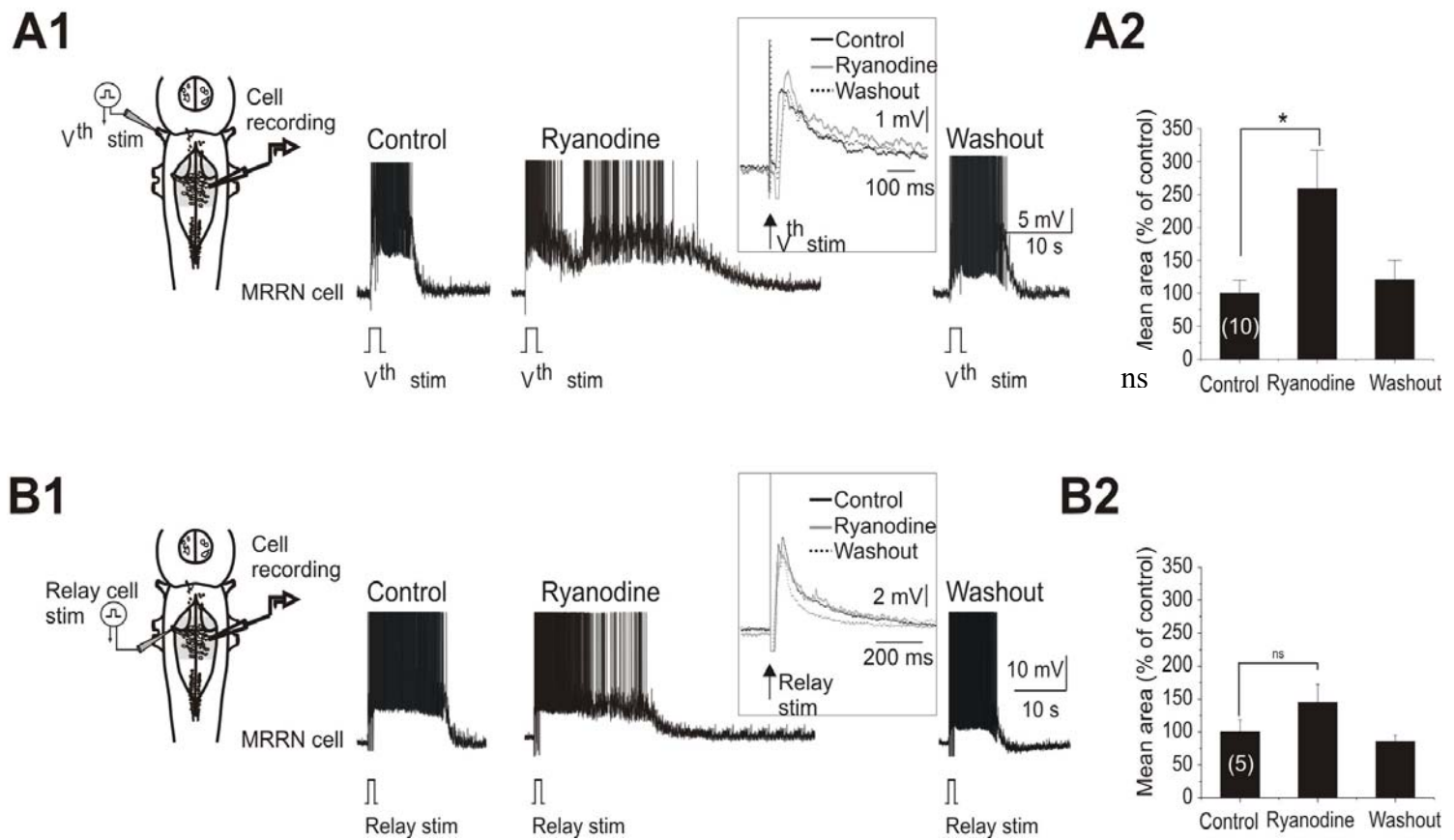
Fig 7. Fénelon et al.

Fig 8. Fénelon et al.



CHAPITRE 4 :

DISCUSSION

DISCUSSION

- Les principaux résultats

Dans la première partie de ce travail doctoral, nous avons déterminé la contribution des propriétés synaptiques dans les dépolarisations soutenues des cellules RS. Nous avons d'abord montré que les afférences spinales contribuent à prolonger la durée des dépolarisations soutenues déclenchées par une stimulation cutanée. Puis, nous avons montré qu'en bloquant les récepteurs glutamatergiques ionotropiques, les dépolarisations soutenues sont diminuées en durée et en amplitude. De plus, d'après nos données, les afférences excitatrices, incluant les afférences spinales, sous-tendent les oscillations membranaires en phase avec l'activité de nage. Par contre, les afférences inhibitrices glycinergiques n'influencent pas la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie.

Dans la seconde partie de ce travail doctoral, nous avons étudié l'activité des cellules RS localisées dans les quatre noyaux de la formation réticulée, en réponse à une brève stimulation cutanée, afin de mieux comprendre le rôle des cellules RS dans la nage de fuite. Les résultats ont permis de montrer que l'ensemble des cellules RS présentent des propriétés d'intégration et un patron de recrutement similaires lors d'une stimulation cutanée. Initialement transitoires à de faibles intensités ou fréquences de stimulation, les réponses des cellules RS se transforment en réponses soutenues au-delà d'un certain seuil de stimulation. Puis, nous avons déterminé la contribution des réserves de calcium internes du réticulum endoplasmique lisse dans les dépolarisations soutenues des cellules du

MRRN. Le réticulum endoplasmique lisse est une organelle qui sert de réserve de calcium (revue Meldolesi, 2001) et qui possède des canaux de libération de calcium sensibles à la Ryanodine, dénotés « RyR ». Une fois activés par le calcium, les RyR permettent de libérer le calcium des réserves internes dans le cytoplasme. Contrairement à l'hypothèse de travail selon laquelle les réserves calciques internes contribueraient à maintenir l'activité persistante, ces réserves internes ne contribuent pas au maintien des dépolarisations soutenues. Ces réserves internes pourraient toutefois être impliquées dans un mécanisme intrinsèque qui sous-tend le potentiel membranaire.

- L'importance de ces travaux par rapport au sujet de l'étude

Un des défis rencontrés dans les études portant sur le contrôle moteur est de comprendre comment les cellules de commande sont recrutées et d'identifier les mécanismes cellulaires qui sont impliqués. Les résultats de nos travaux sont d'une importance considérable dans le domaine de la motricité car ils permettent de mieux comprendre quels sont les structures et les mécanismes impliqués dans la nage de fuite. Nos résultats montrent clairement que les entrées synaptiques des cellules RS jouent un rôle important dans la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée. Ces entrées synaptiques permettent de prolonger la durée des dépolarisations soutenues pendant de longues périodes de temps. De plus, nous montrons que les cellules RS des quatre noyaux réticulés peuvent produire des dépolarisations soutenues d'origine cutanée, qui ont été associées à la nage de fuite. La capacité que possèdent les cellules RS de transformer une brève information cutanée en commande motrice en produisant des dépolarisations

soutenues pourrait représenter le mécanisme de base de l'intégration sensorimotrice non seulement chez la lamproie, mais aussi chez d'autres types de vertébrés. Ainsi, les propriétés intrinsèques et synaptiques de l'ensemble des cellules RS pourraient donc permettre à de fuir rapidement et très loin, en réponse à une stimulation sensorielle.

1. Les plateaux et les dépolarisations soutenues: deux terminologies, un phénomène.

Les études antérieures réalisées dans notre laboratoire avaient utilisé les termes « potentiel de plateau » ou « plateau dépolarisant » afin de décrire la dépolarisation membranaire de longue durée observée dans les cellules RS du MRRN de la lamproie en réponse à une brève stimulation cutanée (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Suite à ces publications, nous avons décidé de changer de terminologie et d'employer plutôt la « dépolarisation soutenue » au lieu de « plateau ». La raison pour laquelle nous avons changé de terminologie était pour éviter toute ambiguïté. En effet, les plateaux observés chez d'autres espèces diffèrent des dépolarisations soutenues des cellules RS car ils sont sous-tendus et/ou modulés par des mécanismes différents, qui seront décrits dans les prochains paragraphes.

Les caractéristiques « classiques » du plateau ont initialement été décrites chez les invertébrés, dans des neurones montrant des décharges auto-rythmiques (crustacé : Watanabe et al., 1967. Aplysie: Wilson et Watchel., 1974. Escargot: Eckert et Lux, 1976. Homard : Russel et Hartline, 1978). Puis, chez les vertébrés, le plateau a été décrit dans divers types de neurones et notamment, dans les

neurones impliqués dans la production d'un patron moteur tels que les motoneurones (chat : Lee et Heckman, 1996 ; Elbasiouny et al., 2005. Rat : Li et Bennett, 2003. Souris : Carlin et al., 2000. Tortue : Hounsgaard et Kiehn, 1985, 1989 ; Hounsgaard et Mintz, 1988 ; Perrier et al., 2000), les interneurones ventraux (Hounsgaard et Kjaerulff, 1992 ; Smith et Perrier, 2006) et les motoneurones du trijumeau (Cobaye : Hsiao et al., 1998). Dans l'ensemble de ces neurones, les plateaux persistent longtemps après l'arrêt de la stimulation qui les a déclenchés. De plus, ils sont voltage-dépendants puisqu'ils peuvent être arrêtés par l'injection intracellulaire d'un bref courant hyperpolarisant ou par des potentiels synaptiques inhibiteurs. De la même manière, les neurones spinaux de la lamproie produisent des bouffées d'activité rythmique de type plateau voltage-dépendant (Matsushima et al., 1993 ; Büschges et al., 2000 ; revue Grillner et al., 2001).

D'un autre côté, on sait qu'une brève stimulation cutanée d'intensité suffisante peut produire une augmentation tonique de l'activité des réseaux locomoteurs spinaux, qui déclencheront ensuite la nage de fuite chez la lamproie. Ce comportement repose sur un état dépolarisé persistant des cellules RS, qui perdure au-delà de l'arrêt de la stimulation. Cet état dépolarisé a été décrit dans les cellules RS du MRRN mais contrairement aux plateaux décrits plus haut, il ne dépend pas de propriétés intrinsèques voltage-dépendantes pour être maintenu (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). En effet, une hyperpolarisation n'arrête pas cette dépolarisation persistante des cellules RS, et l'injection d'un courant dépolarisant ne permet pas de la déclencher (Rouse et al., 1998).

Donc, par l'absence d'une dépendance au voltage, les plateaux dépolarisants des cellules RS diffèrent des plateaux décrits dans d'autres types cellulaires. Ainsi, pour mettre l'emphasis sur le fait que les cellules RS produisent des plateaux dépolarisants qui ne sont pas voltage-dépendants, nous avons appelées ces plateaux « dépolarisations soutenues » dans les cellules RS de la lamproie.

Ces deux terminologies, « plateau » et « dépolarisation soutenue », sont donc employées pour différencier des mécanismes cellulaires qui sont toutefois à la base d'un même phénomène : une dépolarisation membranaire persistante.

Ce phénomène, nous savons qu'il implique des mécanismes sous-tendus par des conductances ioniques très variées. D'un côté, certains plateaux sont sous-tendus par des conductances calciques voltage-dépendantes (Hounsgaard et Kjaerulff, 1992 ; Morisset et Nagy, 1996 ; Russo et Hounsgaard, 1996 ; Smith et Perrier, 2006). D'autres plateaux nécessitent l'activation des récepteurs NMDA (Kiehn et al., 1996 ; MacLean et al., 1997 ; Rioult-Pedotti, 1997 ; Grillner et al., 1998). Enfin, certains plateaux sont sous-tendus par l' I_{CAN} (Zhang et al., 1995 ; Rekling et Feldman, 1997 ; Morisset et Nagy, 1999). D'un autre côté, en ce qui concerne les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS du MRRN de la lamproie, il a été démontré qu'elles dépendent de l'activation initiale des récepteurs NMDA, et de l'activation subséquente de l' I_{CAN} (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Certains pourraient argumenter que seules les dépolarisations membranaires persistantes qui dépendent du voltage devraient porter le nom de

« plateau ». Au cours de ce doctorat, nous avons jugé inutile de s'attarder sur la terminologie à employer et nous nous sommes intéressés au phénomène auquel les deux terminologies (plateau et dépolarisation soutenue) font référence, c'est-à-dire, la dépolarisation membranaire persistante. Nous avons notamment étudié les mécanismes cellulaires impliqués dans le maintien et l'arrêt de ce phénomène, au niveau des cellules RS de la lamproie.

Puisque nous savons que les cellules RS reçoivent des afférences synaptiques de nombreuses sources, dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS, dont l'apparition nécessite l'activation des propriétés intrinsèques, dépend aussi des propriétés synaptiques que reçoivent ces cellules.

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'influence des afférences synaptiques des cellules RS dans la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée.

2. Les mécanismes impliqués dans les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS.

Dans des préparations semi-intactes, nous avons d'abord confirmé les résultats antérieurs montrant qu'une brève stimulation cutanée peut déclencher des dépolarisations soutenues dans les cellules RS du MRRN. Puis, en examinant ces données plus en détail, nous avons constaté que la durée de ces dépolarisations soutenues était très variable, pouvant s'étendre de quelques secondes à plusieurs minutes (publication 1). Cette variabilité a été observée à l'intérieur d'une même

préparation mais aussi, d'une préparation à l'autre. Cependant, quelle que soit leur durée, ces dépolarisations soutenues étaient toujours associées à des épisodes de nage. Nous avons donc d'abord déterminé si les afférences spinales s'ajoutent aux propriétés intrinsèques pour prolonger la durée des dépolarisations soutenues puisque nous savions que la moelle épinière représente une importante source d'afférences projetant sur les cellules RS (Dubuc et Grillner, 1989 ; Vinay et Grillner, 1993 ; Einum et Buchanan, 2004).

De manière intéressante, nos résultats ont permis de montrer que bloquer les afférences spinales a eu un effet différent, dépendamment de la durée des dépolarisations soutenues obtenues en condition contrôle.

Dans certaines préparations, les dépolarisations soutenues d'origine cutanée que nous avons enregistrées ont duré moins de 25 secondes en condition contrôle. Selon nos résultats, la durée de ces « courtes » dépolarisations soutenues n'est pas influencée par les projections spinales (publication 1). En effet, bloquer les afférences spinales n'a pas significativement modifié la durée de ces dépolarisations. Ces données mettent en exergue l'importance des propriétés intrinsèques et peut-être aussi des afférences synaptiques autres que spinales (voir section **2.1. Les afférences glutamatergiques excitatrices des cellules RS provenant de diverses structures chez la lamproie**, plus bas). Ces préparations ont donc permis de montrer que les afférences spinales ne sont pas essentielles pour produire des dépolarisations soutenues de courte durée, associées à de courts épisodes de nage. D'un point de vue fonctionnel, on peut suggérer que les afférences spinales ne sont pas indispensables pour permettre à l'animal de nager pendant de courtes périodes de temps.

D'un autre côté, certaines préparations ont produit des dépolarisations « longues », c'est-à-dire dont la durée dépasse 25 secondes (variant entre 25 secondes et 110s). Dans ces préparations, l'inhibition pharmacologique des afférences spinales a significativement diminué la durée de ces dépolarisations soutenues et a arrêté l'activité oscillatoire des cellules RS (publication 1). Ainsi, d'après nos données, les voies spinales ascendantes sont importantes à la fois pour prolonger la durée des dépolarisations soutenues, et pour induire les oscillations membranaires rythmiques. D'un point de vue fonctionnel, nos résultats montrent que ce prolongement de la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS par les afférences spinales pourrait permettre à l'animal de nager pendant de longues périodes de temps, de façon à ce que l'animal puisse s'éloigner rapidement et très loin de la source de la stimulation.

Le prolongement de l'activité persistante des cellules RS pourrait être à la base de la locomotion de fuite déclenchée par une stimulation sensorielle qui est observée non seulement chez la lamproie (McClellan et Grillner, 1983 ; McClellan, 1984) mais aussi chez d'autres types de vertébrés aquatiques. En effet, chez le poisson rouge, les paires de cellules RS de Mauthner reçoivent des informations sensorielles de la plupart des modalités sensorielles (Eaton et al., 1988 ; revue 2001). Ces cellules RS envoient ensuite des projections monosynaptiques controlatérales sur les interneurones spinaux et les motoneurones qui activent les myomères pour produire la nage (Fetcho et Faber, 1988). Nous savons que ces cellules font partie du système de fuite car des expériences menées en imagerie calcique chez le poisson-zèbre ont montré que des populations de cellules RS (incluant les cellules de Mauthner ainsi que

d'autres cellules RS homologues telles que les cellules Mid2cm et Mid3cm) jouent un rôle primordial durant la vigoureuse nage de fuite déclenchée de façon fiable par une brève stimulation sensorielle (Gahtan et al., 2002). Chez le têtard de grenouille, la locomotion fictive est déclenchée et maintenue par une excitation tonique au niveau spinal due à l'activité de cellules RS (Kahn et Roberts, 1982). Ces dernières peuvent être activées par une brève stimulation cutanée appliquée sur la tête ce qui produit une activité cellulaire prolongée, essentielle pour activer les réseaux locomoteurs et maintenir la nage (Li et al., 2006).

Durant nos expériences, certaines préparations n'ont produit que de courts épisodes de nage associés à des dépolarisations soutenues d'origine cutanée de courte durée. En effet, après la chirurgie, la capacité de récupération a varié de façon aléatoire, d'une préparation à l'autre, ce qui pourrait résulter d'une récupération partielle de l'animal. Une autre possibilité serait que certaines préparations sont plus sensibles à l'insertion des fils d'acier (EMGs) dans les muscles qui permettent l'enregistrement de l'activité de nage. Ensuite, dans ces expériences, la stimulation électrique du nerf trijumeau a été employée pour déclencher les dépolarisations soutenues. Bien que l'intégrité des nerfs trijumeaux ait été préalablement visualisée par contrôle binoculaire au début de chaque expérience, on ne peut cependant pas écarter l'hypothèse selon laquelle certaines fibres sensorielles auraient été perdues lors de la dissection. De ce fait, ces préparations auraient été moins sensibles à la stimulation cutanée. Malgré cela, il est peu probable que les dépolarisations soutenues de courte durée de ces préparations soient dues à des modifications des propriétés de réseaux

occasionnées par la chirurgie. En effet, les dépolarisations soutenues de ces animaux étaient toujours associées à des épisodes de nage.

Après avoir montré que les afférences spinales contribuent à prolonger la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée pendant plusieurs dizaines de secondes, nous avons ensuite voulu étudier si les afférences sensorielles d'origine cutanée provenant des colonnes dorsales participent à prolonger la durée des dépolarisations soutenues. Au cours de nos expériences de lésions des cordons dorsaux, nos résultats ont montré que bloquer les afférences spinales même en l'absence de l'influence des cordons dorsaux a significativement diminué la durée des dépolarisations soutenues (publication 1). Ceci indique que les informations cutanées du corps ne sont pas indispensables pour prolonger les dépolarisations soutenues pendant de longues périodes de temps. L'ensemble de ces résultats apporte une information additionnelle concernant l'origine des afférences spinales qui contribuent au prolongement des dépolarisations soutenues. Puisque les afférences cutanées provenant des colonnes dorsales ne contribuent pas à prolonger les dépolarisations soutenues de longue durée, il apparaît que ce sont les autres voies spinales ascendantes qui sont impliquées.

Au niveau spinal, on retrouve les neurones spinobulbaires, ascendant latéralement et ventralement vers le tronc cérébral (Ronan et Northcutt, 1990 ; Vinay et al., 1998b). Les neurones spinobulbaires acheminent les informations concernant l'activité des réseaux locomoteurs spinaux aux cellules RS (Einum et Buchanan, 2004, 2005, 2006 ; revue Buchanan et Einum, 2008). Ils envoient des projections polysynaptiques (Vinay et al., 1998a) et monosynaptiques (Einum et Buchanan, 2004) bilatéralement (Ronan et Northcutt, 1990 ; Vinay et al., 1998b)

sur les cellules RS qui projettent à leur tour sur les interneurons et les motoneurons spinaux (Rovainen, 1974a ; Buchanan, 1982 ; Buchanan et Cohen, 1982 ; Buchanan et al., 1987 ; Ohta et Grillner, 1989). Les cellules RS et les neurones spinobulbaires de la lamproie font donc partie d'une boucle spino-bulbo-spinale qui a initialement été décrite chez le chat où les cellules RS sont actives durant presque tout le cycle locomoteur (durant la phase d'appui et durant la moitié de la phase de transfert) (Shimamura et al., 1982; 1990). Chez la lamproie, la boucle spino-bulbo-spinale jouerait également un rôle fondamental dans le contrôle de la locomotion (Dubuc et Grillner, 1989 ; Vinay et Grillner, 1993). Dans ce contexte, des expériences antérieures ont été réalisées sur des préparations *in vitro* de tronc cérébral-moelle épinière isolés afin d'étudier les effets d'une perte de l'intégrité de la boucle spino-réticulo-spinale sur le patron locomoteur. Dans ces expériences, une barrière de diffusion avait été construite où le tronc cérébral et la moelle épinière étaient placés dans deux compartiments différents (Vinay et Grillner, 1993). Grâce à cette barrière, le NMDA avait pu être appliqué uniquement dans le compartiment comprenant la moelle épinière, et la nage fictive avait été enregistrée au niveau des racines ventrales. Durant la nage fictive, bloquer la transmission synaptique au niveau du tronc cérébral uniquement avait augmenté la fréquence du rythme de nage, tandis que stimuler une seule cellule RS avait diminué la fréquence du rythme locomoteur (Vinay et Grillner, 1993). De façon concordante, nos résultats suggèrent que l'intégrité de la boucle spino-bulbo-spinale serait indispensable pour prolonger la durée des dépolarisations soutenues et la nage d'origine cutanée des cellules RS ainsi que

pour produire les oscillations membranaires due à l'activité locomotrice (publication 1).

En effet, selon nos résultats, bloquer les afférences spinales a aboli l'activité membranaire oscillatoire des cellules RS, en phase avec le rythme de nage (publication 1). Tout comme chez la lamproie, des oscillations rythmiques du potentiel membranaire, synchrones avec la phase de flexion ou d'extension, sont observées dans les cellules RS chez les mammifères (Orlovsky, 1970a, b; Drew et al., 1986). Ces oscillations membranaires dépendent du cervelet qui envoie des projections au niveau du tronc cérébral, puisqu'elles sont abolies par l'ablation du cervelet (Orlovsky, 1970b ; Arshavsky et al., 1987c, d). Le cervelet reçoit des projections ascendantes issues des faisceaux spino-cérébelleux dorsaux et ventraux ainsi que de la voie spino-réticulo-cérébelleuse. Comme il a été mentionné dans l'introduction de cette thèse, le cervelet reçoit des informations sensorielles par l'intermédiaire du faisceau spino-cérébelleux dorsal (Lundberg et Osarsson, 1960 ; Arshavsky et al., 1972), et des informations concernant l'activité des neurones des CPG spinaux par le biais du faisceau spino-cérébelleux ventral et de la voie spino-reticulo-cérébelleuse (Lundberg, 1971 ; Arshavsky et al., 1978a, b). Ce signal ascendant qui informe les cellules RS de l'activité rythmique des réseaux locomoteurs spinaux, via l'activation du cervelet, permet d'activer les voies supraspinales descendantes qui vont ensuite envoyer des commandes motrices vers la moelle épinière au moment opportun durant la locomotion. Chez la lamproie, une expérience antérieure réalisée sur des préparations réduites a aussi permis de montrer que les afférences spinales participent à la modulation de l'activité oscillatoire des cellules RS (Dubuc et Grillner, 1989). Dans cette

expérience, le tronc cérébral et les huit segments spinaux les plus rostraux ont été séparés de la moelle épinière caudale à l'aide d'une barrière de diffusion (Dubuc et Grillner, 1989). La nage fictive induite par le NMDA avait été enregistrée uniquement au niveau du compartiment des racines ventrales caudales, tandis que les racines ventrales les plus rostrales (situées dans l'autre compartiment comprenant uniquement une solution de Ringer) étaient inactives. Dans de telles conditions, où seule la moelle épinière caudale avait été responsable de la locomotion, l'activité des neurones RS était plus faible que celle observée durant des conditions où le tronc cérébral et la moelle épinière sont connectés (Dubuc et Grillner, 1989). Selon les auteurs, cette diminution de l'amplitude des oscillations serait due au fait que les neurones spinobulbaires, dont les corps cellulaires sont majoritairement localisés au niveau des segments spinaux les plus rostraux (Ronan et Northcutt, 1990; Vinay et al., 1998b), auraient été inactifs, étant placé dans le compartiment non activé par le NMDA. De plus, une étude subséquente a montré que les projections monosynaptiques des neurones spinobulbaires sont en grande partie responsables des oscillations membranaires rythmiques provenant de la moelle épinière et enregistrées dans les cellules RS durant la locomotion fictive (Einum et Buchanan, 2004). Ces résultats antérieurs ont donc permis de suggérer que les segments spinaux rostraux, incluant la majorité des neurones spinobulbaires, participent à amplifier l'activité et les oscillations membranaires des cellules RS. Enfin, nos résultats suggèrent que les afférences de la moelle épinière sont non seulement impliquées dans l'activité oscillatoire des cellules RS mais elles en seraient entièrement responsables (publication 1).

Nous savions que la moelle épinière mais aussi des afférences issues de nombreuses autres sources envoient des projections glutamatergiques excitatrices sur les cellules RS. Avant de discuter de la contribution des récepteurs glutamatergiques des cellules RS dans les dépolarisations soutenues d'origine cutanée, il est pertinent de décrire les structures qui envoient des projections excitatrices glutamatergiques sur les cellules RS et qui seraient susceptibles d'influencer la durée des dépolarisations soutenues d'origine sensorielle. Ces structures seront donc exposées dans les prochains paragraphes.

2.1. Les afférences glutamatergiques excitatrices des cellules RS provenant de diverses structures chez la lamproie

Nos résultats ont montré que les afférences spinales permettent de prolonger la durée des dépolarisations soutenues. Sachant que ces afférences envoient des projections excitatrices glutamatergiques au niveau des cellules RS (Dubuc et al., 1993a,b; Vinay et al., 1998a,b ; Einum et Buchanan, 2004), il est tentant de penser que les afférences glutamatergiques d'origine spinale sont les seules afférences excitatrices impliquées dans la modulation de la durée des dépolarisations. Cependant, de nombreuses autres structures envoient des projections glutamatergiques sur les cellules RS. Ces sources glutamatergiques pourraient en plus des afférences d'origine spinale contribuer à prolonger la durée des dépolarisations soutenues enregistrées dans les cellules RS. Par exemple, nous savons que les centres locomoteurs supraspinaux tels que les régions locomotrices du diencephale et du mésencéphale envoient des projections monosynaptiques excitatrices sur les cellules RS (El Manira et al., 1997; Brocard

et Dubuc, 2003). Il a été proposé que l'activation de ces régions locomotrices permettrait le déclenchement de la locomotion dite « contrôlée » ou avec un but. De plus, la région locomotrice mésencéphalique envoie des projections cholinergiques sur les cellules RS, qui sont capables d'activer les récepteurs nicotiques des cellules RS (Le Ray et al., 2003). Cette activation cholinergique des cellules RS a mené au déclenchement de la nage fictive (dans des préparations réduites) ou active (dans des préparations semi-intactes) et a accéléré la nage en cours. Bien qu'il ait été montré que la nage de fuite puisse être déclenchée par une stimulation cutanée même en l'absence de ces centres locomoteurs supraspinaux (Cardin et al., 1999), on ne peut pas écarter l'hypothèse selon laquelle ces régions seraient actives durant la locomotion de fuite et participeraient aux dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS la lamproie.

Expériences futures : Afin de déterminer si ces centres locomoteurs sont actifs durant la nage déclenchée par une stimulation cutanée, ces régions locomotrices seraient d'abord localisées dans des préparations semi-intactes. Puis, à l'aide d'une électrode de surface, l'activité extracellulaire des neurones qui forment ces régions serait enregistrée durant la nage d'origine cutanée. Une autre possibilité serait d'inactiver les centres locomoteurs de façon réversible (par l'éjection locale de GABA par exemple), et de regarder les effets sur les dépolarisations soutenues et sur la nage induites par une stimulation sensorielle d'origine cutanée. Ces expériences viseraient à déterminer si l'activité des centres locomoteurs supraspinaux peut participer à prolonger la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS.

Les afférences glutamatergiques trigéminales ne contribuent pas à prolonger la durée des dépolarisations soutenues. En effet, dans une étude antérieure réalisée sur une préparation semi-intacte, les racines du trijumeau n'ont produit une activité de décharge qu'au moment de l'application de la stimulation cutanée (Viana Di Prisco et al., 2000). De plus, dans nos expériences, puisque la tête et le tronc cérébral de nos préparations étaient immobilisées, les afférences vestibulaires glutamatergiques des cellules RS (responsables des réflexes posturaux) n'étaient donc pas mises en jeu. On ne peut toutefois pas écarter le fait que d'autres afférences inconnues pourraient contribuer à prolonger la durée des dépolarisations soutenues telles que des afférences sensorielles spinales ascendantes ou d'éventuelles connexions synaptiques au niveau du tronc cérébral.

Nous avons ensuite voulu déterminer si les récepteurs glutamatergiques ionotropiques participent aussi à prolonger la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS qui sont notamment activés par les afférences spinales ascendantes glutamatergiques.

2.2. Est-ce que les récepteurs glutamatergiques ionotropiques contribuent à prolonger la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS?

Nos résultats ont permis de montrer que le blocage des récepteurs AMPA et NMDA des cellules du MRRN diminue significativement l'amplitude des oscillations membranaires et la durée des dépolarisations soutenues de longue durée déclenchées par une stimulation cutanée. L'activation des récepteurs

glutamatergiques ionotropiques semble impliquée dans l'apparition de l'activité oscillatoire et dans le prolongement des dépolarisations soutenues des cellules RS (publication 1). Ceci suggère que les afférences synaptiques excitatrices qui activent les récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA des cellules RS (incluant les afférences spinales ascendantes glutamatergiques) permettent de prolonger la durée des dépolarisations soutenues et que les propriétés intrinsèques ne sont pas suffisantes pour maintenir les dépolarisations soutenues pendant de longues périodes de temps. Au cours de nos expériences, nous n'avons toutefois pas déterminé la contribution respective des récepteurs AMPA et NMDA dans les dépolarisations soutenues d'origine cutanée accompagnées d'oscillations. Il est possible que ces récepteurs soient différemment impliqués dans la modulation de la durée des dépolarisations soutenues des cellules RS. Par exemple, nous savons que bloquer les récepteurs NMDA des cellules RS avec l'AP-5 empêche l'apparition des dépolarisations soutenues et que dans de telles conditions, une stimulation cutanée ne déclenche que des réponses dépolarisantes transitoires (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Ces réponses transitoires dépendraient donc de l'activation des récepteurs AMPA. Les récepteurs AMPA possèdent des cinétiques d'activation et d'inactivation très rapides et certains de ces récepteurs sont perméables au calcium (Jonas, 2000 ; Malenka et Bear, 2004). Ainsi, il est possible que suite au déclenchement des dépolarisations soutenues, celles-ci soient prolongées pendant de longues périodes de temps dû à l'activation des récepteurs AMPA par les afférences excitatrices glutamatergiques. Pour ce faire, les afférences glutamatergiques favoriseraient le déclenchement d'une activation récurrente des récepteurs AMPA. Puis, il est possible que les récepteurs AMPA

ainsi activés maintiennent les récepteurs NMDA activés permettant une entrée de calcium et l'activation subséquente de l' I_{CAN} pendant de longues périodes de temps. D'un autre côté, on ne peut pas écarter une seconde hypothèse selon laquelle les récepteurs AMPA seraient uniquement responsables du déclenchement des dépolarisations soutenues. En effet, puisque nous savons que l'AP-5 abolit le déclenchement des dépolarisations soutenues (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000), et que nous avons montré que l'AP-5 a significativement diminué la durée des dépolarisations soutenues en cours (publication 1), on peut penser que l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA est importante pour maintenir l'activation de l' I_{CAN} qui ne demande peut-être qu'un apport additionnel pour prolonger la durée des dépolarisations soutenues, bien que cela reste à être démontré.

Dans nos expériences, nous n'avons toutefois pas déterminé si les récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR) participent aussi à prolonger les dépolarisations soutenues, sans toutefois être essentiels. En effet, les mGluR de type I (mGluRI) contribuent à maintenir les plateaux des motoneurones et des neurones des couches profondes de la corne dorsale de la tortue (Russo et al., 1996 ; Svirskis et Hounsgaard, 1997 ; Delgado-Lezama et al., 1997) et du rat (Morisset et Nagy, 1996 ; Derjean et al., 2003) ainsi que les plateaux des neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique (noyau des ganglions de la base qui sont impliqués dans le contrôle des mouvements volontaires) de rat (Beurrier et al., 1999).

Chez la lamproie, au niveau spinal, des travaux antérieurs ont mis en évidence un effet de l'activation post-synaptique des mGluRI sur la durée des dépolarisations de type plateau NMDA-dépendants des interneurons et des motoneurons spinaux (Krieger et al., 2000). Il est également bien établi que les mGluR peuvent libérer le calcium provenant des réserves internes du réticulum endoplasmique lisse, par l'intermédiaire des récepteurs sensibles à l'IP3 (revue Verkhratsky, 2002). Ainsi, on pourrait penser que la réponse calcique qui sous-tend les dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie implique aussi l'activation des mGluR. Cependant, nous avons montré que l'éjection de glutamate sur les cellules RS, en présence de la TTX, a déclenché une réponse calcique qui a **1)** été fortement diminuée en bloquant d'abord les canaux de libération de calcium sensibles à la Ryanodine, les RyR, du réticulum endoplasmique et qui a **2)** ensuite été complètement abolie par l'ajout subséquent de l'AP-5, un bloqueur des récepteurs NMDA (publication 2). Ceci suggère que la libération du calcium interne par les récepteurs sensibles à l'IP3 et activés par les mGluR n'est pas impliquée dans cette réponse calcique. De plus, nous savons que l'AP-5 bloque l'induction des dépolarisations soutenues d'origine cutanée (Viana Di Prisco et al., 2000), ce qui suggère que les mGluR ne sont pas suffisants ou pas impliqués dans le déclenchement des dépolarisations soutenues des cellules RS. Enfin, nous avons montré que bloquer les récepteurs glutamatergiques ionotropiques contribue à diminuer les dépolarisations soutenues en cours (publication 1), suggérant que si les mGluR contribuent à maintenir les dépolarisations soutenues, ils ne sont pas suffisants. Ainsi, bien que le rôle des récepteurs glutamatergiques métabotropiques reste à être déterminé au niveau des

dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS, on peut supposer que les mGluR postsynaptiques ne participent pas à les prolonger.

Expériences futures : Des expériences futures devraient être menées afin de déterminer si les récepteurs AMPA, NMDA et mGluR contribuent de façon individuelle au prolongement de la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS. Dans des préparations semi-intactes, les dépolarisations soutenues ainsi que la nage seraient déclenchées par une stimulation cutanée. Les récepteurs AMPA, NMDA et mGluR seraient respectivement bloqués par le CNQX, l'AP-5 et le MCPG durant la dépolarisation soutenue en cours. Les bloqueurs seraient individuellement éjectés localement sur l'une de deux cellules RS homologues, l'autre servant de contrôle. L'effet individuel de ces bloqueurs serait déterminé. Il est à noter que puisque les antagonistes glutamatergiques tels que le CNQX et l'AP-5 peuvent prendre un certain temps avant d'agir (publication 1), il faudra préalablement déterminer le temps d'action du MCPG au niveau des cellules RS.

Les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS de la lamproie dépendent d'une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire notamment due à l'ouverture des récepteurs NMDA. En effet, dans les cellules RS du MRRN, il avait été montré que les dépolarisations soutenues sont associées à des réponses calciques soutenues qui sont inhibées par l'AP-5 mais aussi par la chélation du Ca^{2+} interne par le BAPTA, tampon calcique à action rapide (Viana Di Prisco et al., 2000). Cependant, aucune expérience n'avait été menée afin de déterminer si,

en plus du Ca^{2+} entrant par les récepteurs NMDA, d'autres sources de Ca^{2+} , telles que les réserves internes de calcium, seraient impliquées dans le maintien des dépolarisations soutenues.

2.3. Est-ce que le calcium provenant des réserves internes contribue à maintenir les dépolarisations soutenues des cellules RS?

Sachant que les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules du MRRN dépendent d'un mécanisme calcique, nous avons donc voulu savoir si, en plus des récepteurs NMDA, d'autres sources de calcium pouvaient contribuer à maintenir les dépolarisations soutenues. Parmi les sources possibles, nous avons étudié la contribution du calcium provenant des réserves internes, libéré par les RyR. Des études réalisées sur divers types cellulaires ont montré que les RyR contribuent à maintenir la dépolarisation membranaire durant les plateaux. Par exemple, les plateaux voltage-dépendants des motoneurones spinaux de tortue sont inhibés en bloquant les réserves de calcium internes par la Ryanodine (Mejia-Gervacio et al., 2004). De façon concordante, dans des motoneurones ganglionnaires gastriques de crabe, la libération de calcium interne a favorisé le maintien de l'état dépolarisé en activant une conductance cationique non sélective activée par le calcium (de type I_{CAN}) (Zhang et al., 1995). De plus, dans les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique (qui libèrent de la vasopressine) de rats, l'entrée de calcium par les canaux calciques voltage-dépendants active les RyR, ce qui provoque la libération du calcium des réserves internes (Li et Hatton, 1997). Selon les auteurs, ce mécanisme a pour effet

d'amplifier les post-décharges dépolarisantes et d'augmenter l'excitabilité neuronale par un mécanisme de libération de calcium induite par le calcium.

Dans ce contexte, nous avons d'abord mis en évidence la présence des réserves internes de calcium au niveau des cellules RS du MRRN (publication 2). Ensuite, nous avons montré que l'activation des récepteurs NMDA est liée à la libération du calcium provenant des réserves internes. Nous avons donc supposé que le calcium provenant des réserves internes participe au maintien des dépolarisations soutenues. Pour tester cette hypothèse, nous avons bloqué la libération de calcium interne à l'aide de la Ryanodine et nous avons regardé les effets de ce blocage sur la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée. De façon surprenante, nos résultats ont montré que, malgré leur présence au niveau des cellules RS, les réserves internes de calcium ne participent pas au maintien des dépolarisations soutenues. En effet, le blocage des RyR par la Ryanodine a significativement prolongé la durée des dépolarisations soutenues déclenchées par la stimulation du nerf trijumeau (publication 2). Ainsi, les réserves internes de calcium ne feraient pas partie des propriétés intrinsèques qui sous-tendent les dépolarisations soutenues. Si c'était le cas, bloquer la libération du calcium provenant des réserves aurait considérablement diminué la durée des dépolarisations soutenues, contrairement à nos résultats. Ainsi, il est possible que les RyR soient plutôt impliqués dans un mécanisme intrinsèque qui permet de diminuer la dépolarisation membranaire. De façon concordante à nos résultats, dans les neurones respiratoires chez le chat *in vivo*, bloquer la libération de calcium interne par le rouge de Ruthenium a augmenté la durée des bouffées de décharges rythmiques, tandis que la libération de calcium interne par de faibles

concentrations de Ryanodine (la Ryanodine a un effet agoniste à de faibles concentrations) a hyperpolarisé la membrane et a diminué ces décharges rythmiques (Haji et Ohi, 2006). Selon ces auteurs, les réserves de calcium internes auraient pour rôle de moduler le potentiel membranaire des neurones respiratoires en activant des conductances calcium-dépendants telles que le courant sous-tendu par les canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca}), qui participent à repolariser le potentiel membranaire.

Puisque les K_{Ca} sont présents au niveau des cellules RS de lamproie (Viana Di Prisco et al., 1992 ; McClellan et al., 2008), il est donc possible que les réserves internes jouent un rôle similaire. Cette repolarisation membranaire calcium-dépendante pourrait contribuer à terminer les dépolarisations soutenues. En effet, nous suggérons que les dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie ne sont pas terminées par des mécanismes voltage-dépendants, puisque selon des données préliminaires obtenues dans le laboratoire, l'injection intracellulaire d'un courant hyperpolarisant n'a pas terminé une dépolarisation soutenue en cours.

Un tel mécanisme d'arrêt des plateaux par les K_{Ca} a déjà été décrit dans divers types cellulaires. En effet, dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Sipilä et al., 2006), les cellules de Purkinje dissociées de rat (Swensen et Beam, 2003), les motoneurones trigéminaux du tronc cérébral du cobaye (del Negro et al., 1999), des neurones du noyau supraoptique en culture (Hu et Bourque, 1992), des tranches du noyau du tractus solitaire (Tell et Jean, 1993) et dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale chez le rat (revue Overton et Clark, 1997), les K_{Ca} seraient impliqués dans l'arrêt des plateaux ou des bouffées de potentiels

d'action. Il en est de même pour l'arrêt des dépolarisations de type plateau NMDA-dépendantes enregistrées au niveau des neurones spinaux de la lamproie. Dans ces neurones, les K_{Ca} sous-tendent un courant de type potentiel post-décharge, I_{AHP} , sensible à l'apamine et responsable de la repolarisation membranaire (El Manira et al., 1994 ; Wikström et El Manira, 1998 ; revue Grillner et al., 2001 ; Cangiano et al., 2002). De plus, les K_{Ca} des neurones spinaux seraient activés par le calcium entrant par les récepteurs NMDA et par les canaux calciques voltage-dépendants à haut seuil d'activation de type N et P/Q (Wikström et El Manira, 1998 ; Büschges et al., 2000 ; revue Grillner et al., 2001). De façon concordante, l'activation des récepteurs NMDA permet d'activer les K_{Ca} dans les cellules granulaires du bulbe olfactif (Isaacson et Murphy, 2001), dans les neurones épineux de l'amygdale latérale (Faber et al., 2005 ; Ngo-Anh et al., 2005) et dans les neurones ganglionnaires (Morton-Jones et al., 2008) ce qui diminue l'excitation neuronale via un shunt membranaire.

La libération du calcium des réserves internes peut également activer les K_{Ca} . En effet, dans les neurones dopaminergiques du diencephale de rat, une brève activation des mGluR1 induit la libération du calcium interne, ce qui active les K_{Ca} (Fiorillo et Williams, 1998). De plus, dans les neurones hippocampiques de rat, le calcium entrant par les canaux calciques voltage-dépendants de type L permet l'activation des K_{Ca} par un mécanisme impliquant le calcium provenant des réserves internes (Tanabe et al., 1998). Dans les neurones parasympathiques cardiaques des amphibiens, il a été suggéré que les canaux calciques voltage-dépendants permettent d'activer la libération du calcium des réserves internes, qui activent ensuite les K_{Ca} (Merriam et al., 1999). Dans les cellules granulaires du

cervelet, la libération de calcium interne par la caféine a activé les K_{Ca} , effet qui a été bloqué par la Ryanodine (Chavis et al., 1998). Dans tous ces exemples, il apparaît que le rôle des K_{Ca} ainsi activés est de moduler l'excitabilité neuronale, en agissant au niveau du potentiel membranaire.

Dans les cellules RS de la lamproie, on pourrait donc spéculer que durant les dépolarisations soutenues, le calcium externe entrant par les récepteurs NMDA déclenche deux mécanismes parallèles: 1) l'activation de l' I_{CAN} pour maintenir la cellule dans un état dépolarisé, et 2) la libération du calcium des réserves internes pouvant permettre d'ajouter à l'activation de l' I_{CAN} mais surtout permettant l'activation des K_{Ca} , responsables de l'AHP et de la repolarisation membranaire.

2.3.1. Considérations pharmacologiques

La prolongation des dépolarisations soutenues par la Ryanodine aurait pu être due à un effet agoniste (au lieu d'un effet antagoniste) de la Ryanodine sur les RyR du réticulum endoplasmique lisse, cependant, nos résultats indiquent que cela ne semble pas être le cas. En effet, les RyR peuvent être activés par des concentrations de Ryanodine inférieures à 1 μ M, mais ils sont bloqués par de fortes concentrations (supérieures à 10 μ M) de Ryanodine (Fill et Copello, 2002 ; revue Bardo et al., 2006). Sachant cela, dans nos expériences, nous avons utilisé une concentration de Ryanodine de 20 μ M, ce qui devrait être suffisant pour bloquer les RyR. D'ailleurs, nous avons obtenu des résultats similaires dans des expériences où nous avons utilisé des concentrations de Ryanodine plus élevées, de 50 et 100 μ M. Nous avons aussi perfusé la drogue pendant des périodes de 45-60 minutes, afin de s'assurer que la Ryanodine ait atteint sa concentration

maximale et qu'elle produise un effet antagoniste, et non un effet agoniste, au niveau des cellules RS.

2.4. Est-ce que les récepteurs glycinergiques participent à arrêter les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS ?

En ce qui concerne les dépolarisations soutenues de longues durées des cellules RS, il est peu probable que l'activation des propriétés intrinsèques seules soit entièrement responsable de leur arrêt. En effet, durant les longs épisodes de nage, les dépolarisations soutenues de deux cellules RS du MRRN homologues (bilatérales), ont un décours temporel similaire et leurs dépolarisations se terminent au même moment (publication 1). Il est difficile de concevoir qu'une telle synchronie soit uniquement due à des propriétés intrinsèques telles que l' I_{CAN} ou les K_{Ca} , sous-tendues par des mécanismes calciques parfaitement identiques dans les cellules RS. On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle des afférences communes à l'ensemble des cellules RS seraient responsables d'inhiber les afférences excitatrices pour arrêter les dépolarisations soutenues de longue durée. En effet, comme mentionné plus haut, nos résultats ont montré que les afférences excitatrices permettent de prolonger la durée des dépolarisations soutenues, puisque que bloquer l'activation des récepteurs AMPA et NMDA des cellules RS par ces afférences a significativement diminué la durée des dépolarisations soutenues (publication 1).

Sachant que la moelle épinière envoie des projections inhibitrices sur les cellules RS (Dubuc et Grillner, 1989; Einum et Buchanan, 2004; Vinay et al., 1998a), nous avons, dans un premier temps, déterminé si la transmission

synaptique inhibitrice de type glycinergique pouvait contribuer à arrêter les dépolarisations soutenues de longue durée. Nos résultats ont montré que l'activation locale des récepteurs glycinergiques des cellules RS provoque une hyperpolarisation membranaire rapide et transitoire, mais insuffisante pour arrêter les dépolarisations soutenues en cours (publication 1). De plus, nos expériences ont montré que bloquer les récepteurs glycinergiques par l'éjection locale de strychnine n'a pas prolongé les dépolarisations soutenues (publication 1). Ainsi, d'après nos résultats, le mécanisme d'arrêt des dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie ne semble pas impliquer les récepteurs glycinergiques. Ces résultats confirment toutefois que l'arrêt des dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie n'est pas voltage-dépendant. On peut donc supposer que l'arrêt des dépolarisations soutenues de longue durée des cellules RS de la lamproie implique soit un autre mécanisme inhibiteur, soit une inhibition des afférences excitatrices. Il n'est toutefois pas impossible que la transmission glycinergique agisse à la toute fin des dépolarisations soutenues, au moment où l'activité des afférences excitatrices glutamatergiques diminue. L'inhibition glycinergique deviendrait alors plus efficace, étant potentialisée par une diminution de l'excitation.

Nous avons également obtenus des résultats préliminaires concernant la possibilité que la transmission GABAergique puisse contribuer à arrêter les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS.

Le système GABAergique (GABA : acide gamma-aminobutyrique) est un système synaptique inhibiteur qui pourrait potentiellement repolariser les cellules RS et arrêter les dépolarisations soutenues de longue durée. Nous avons donc voulu déterminer si les récepteurs GABAergiques pouvaient participer à arrêter les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS (voir discussion de la publication 1). D'après les résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire mais qui n'ont pas été inclus dans les publications, l'éjection locale de GABA sur une de deux cellules RS homologues n'arrête pas les dépolarisations soutenues en cours. En effet, tout comme les éjections de glycine, les éjections locales de GABA ont produit une hyperpolarisation membranaire transitoire et une abolition des oscillations dans les cellules du MRRN ayant reçu le neurotransmetteur inhibiteur, mais cette hyperpolarisation a été insuffisante pour arrêter les dépolarisations soutenues de longue durée associées à de longs épisodes de nage (voir discussion de la publication 1).

Les récepteurs GABAergiques sont de deux types : **1)** les récepteurs-canaux GABA_A et GABA_C ionotropiques, perméables au Cl⁻ et **2)** les récepteurs GABA_B métabotropiques, couplés aux protéines G et qui activent une conductance potassique hyperpolarisante. Bien que les récepteurs GABAergiques soient localisés dans plusieurs régions du système nerveux, les GABA_C sont exprimés de façon plus importante au niveau de la rétine de l'œil (Qian H, 2000; revue Chebib et Johnston, 1999). Ainsi, il a été montré que le système GABAergique inhibe les plateaux des neurones de projection des couches profondes (couche V) de la corne dorsale de rat, qui sont influencés par une balance entre les afférences excitatrices glutamatergiques et les afférences GABAergiques, via l'activation de

conductances potassiques (Derjean et al., 2003). De façon concordante, dans les neurones de projection des couches profondes (couches IV, V) de la corne dorsale de tortue, le blocage des récepteurs GABA_A par la bicuculline a facilité l'expression des plateaux, tandis que l'activation des récepteurs GABA_B les a inhibés (Russo et al., 1998). De plus, selon des études antérieures menées au niveau des cellules RS de la lamproie, l'agoniste des récepteurs GABA_B, le β -*p*-chlorophenyl-GABA (baclofène), diminue la transmission synaptique entre les afférences sensorielles issues des colonnes dorsales et les cellules RS du PRRN, par un mécanisme qui serait présynaptique (Dubuc et al. 1993a). Ensuite, il a été montré que l'activation des récepteurs GABA_B, possiblement présynaptiques, diminue les réponses excitatrices et inhibitrices déclenchées dans les cellules RS par la stimulation des afférences spinales ascendantes latérales (Vinay et al., 1998a). Nos résultats indiquent toutefois que l'activation des récepteurs GABAergiques n'est pas suffisante pour arrêter les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS (voir discussion de la publication 1).

D'un autre côté, le système GABAergique prolonge les dépolarisations de type plateau des interneurons spinaux de la lamproie qui possèdent des récepteurs GABA_A et GABA_B. En effet, l'activation des récepteurs GABAergiques présynaptiques diminue la transmission sensorielle entre les cellules dorsales et les interneurons géants mais prolonge la durée des dépolarisations de type plateau des interneurons spinaux (Alford et al., 1991; El Manira et al., 1997b). De la même manière, au niveau postsynaptique, l'activation des récepteurs GABA_B des neurones spinaux augmente également la durée des dépolarisations de type plateau. Pour ce faire, l'activation des récepteurs GABA_B

postsynaptiques diminue le courant entrant par les canaux calciques voltage-dépendants à haut seuil d'activation. Ceci a pour effet de diminuer les courants potassiques calcium-dépendants, I_{KCa} responsables de la repolarisation de la membrane et de l'arrêt des bouffées d'activité (Matsushima et al., 1993 ; Schotland et al., 1995 ; Wikström et El Manira, 1998 ; Krieger et al., 1999 ; revue Grillner et al., 2001).

Expériences futures : nos résultats ont montré que l'éjection locale de glycine n'a pas arrêté les dépolarisations soutenues en cours. Ainsi, il faudrait déterminer par quel mécanisme les afférences excitatrices, incluant les afférences spinales, des cellules RS sont inhibées pour stopper les dépolarisations soutenues de longue durée. Une possibilité serait d'éjecter les neurotransmetteurs inhibiteurs à la fin des dépolarisations soutenues, sur l'une de deux cellules RS homologues, l'autre servant de contrôle.

La contribution quantitative des afférences synaptiques et des propriétés intrinsèques dans les dépolarisations soutenues des cellules du MRRN était au-delà du cadre de nos travaux. De plus, il n'a pas été possible de déterminer à quel moment précis les afférences synaptiques interviennent une fois la réponse soutenue déclenchée.

2.5. La coopération entre les afférences synaptiques et les propriétés intrinsèques.

Puisque nous avons montré que bloquer les afférences synaptiques spinales n'influence pas la durée des dépolarisations soutenues de moins de 25 secondes, il est tentant de penser que les propriétés intrinsèques sont capables de maintenir les dépolarisations soutenues pendant 25 secondes au maximum. Ceci suggère que les propriétés intrinsèques auraient, seules, une action limitée dans le temps. Cela permettrait d'expliquer pourquoi lors du blocage des inputs spinaux, les dépolarisations ne dépassent pas une certaine durée. La méthode du clamp dynamique permettrait de quantifier la contribution des propriétés intrinsèques (Goaillard et Marder, 2006).

Ensuite, on peut suggérer que les afférences synaptiques interviendraient de manière plus conséquente pour prolonger la réponse soutenue en cours au-delà de 25 secondes. Les afférences synaptiques des cellules RS pourraient contribuer de façon sporadique aux dépolarisations soutenues qui dépendent des propriétés intrinsèques, pour les prolonger pendant des périodes de temps supérieures à 25 secondes. Ainsi, la contribution des propriétés synaptiques permettrait une augmentation temporelle des dépolarisations soutenues comme l'illustre la figure 10 de la publication 1 (figure 7). D'abord, les informations sensorielles provenant de la périphérie dépolarisent les cellules RS, ce qui active les propriétés intrinsèques, incluant l' I_{CAN} . Puis, nous proposons qu'au moment où l'activation de l' I_{CAN} diminue, les afférences excitatrices glutamatergiques, incluant celles provenant de la moelle épinière, interviennent afin de maintenir l'activation de l' I_{CAN} et l'état dépolarisé des cellules RS. Ceci pourrait impliquer une entrée additionnelle de calcium dans la cellule par l'intermédiaire des récepteurs NMDA.

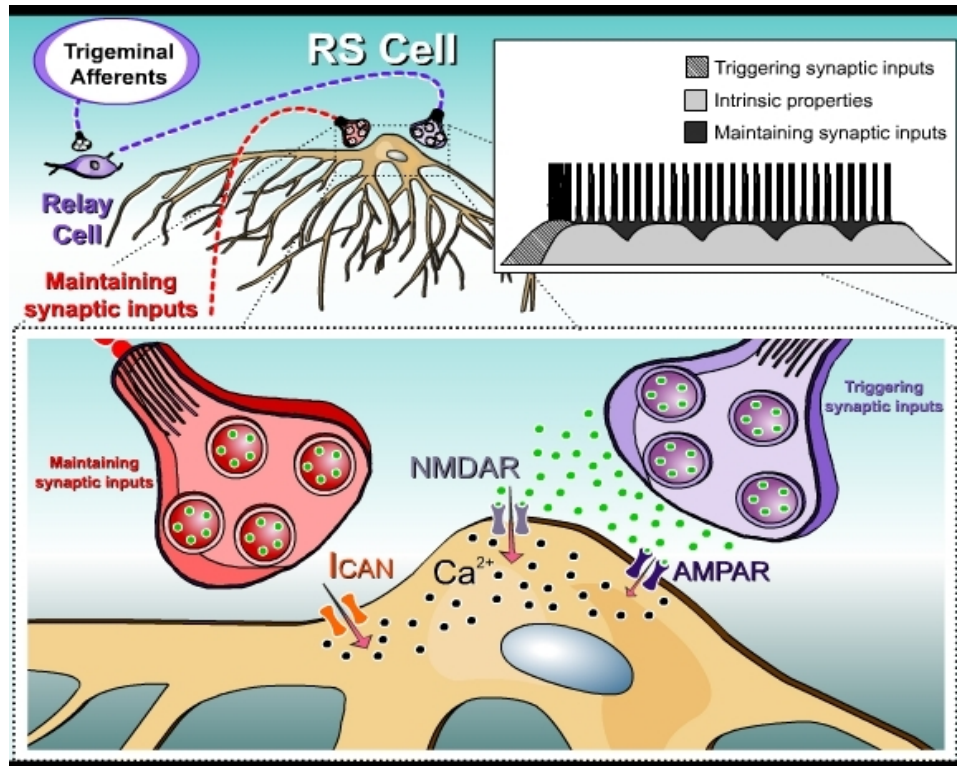


Figure 7. Schéma illustrant la cascade d'événements cellulaires impliqués dans les dépolarisations soutenues d'origine cutanée des cellules RS de la lamproie. *Panneaux de gauche et du bas*, Le glutamate (cercles verts) libéré des cellules de relais du trijumeau active les récepteurs AMPA et NMDA des cellules RS. Ceci produit une dépolarisation membranaire et une entrée de calcium dans la cellule (cercles noirs). Le calcium intracellulaire va activer l' I_{CAN} qui déclenche les dépolarisations soutenues des cellules RS qui seront prolongées par les afférences synaptiques excitatrices. *Insertion en haut à droite*, Schéma illustrant la coopération entre les afférences synaptiques excitatrices et les propriétés membranaires intrinsèques des cellules RS. Les afférences cutanées déclenchent l'excitation initiale (hachuré). Puis, les propriétés intrinsèques (gris) fourniraient l'excitation subséquente pour maintenir la cellule dans un état dépolarisé en coopération avec les afférences excitatrices superposées (remplissage noir), responsables des oscillations membranaires et du maintien de l'excitation des cellules RS jusqu'à ce que l'excitation intrinsèque commence à diminuer.

Enfin, nous suggérons que vers la fin des dépolarisations soutenues, l'activité des propriétés intrinsèques ainsi que des afférences synaptiques diminue graduellement, permettant la repolarisation membranaire de la cellule ainsi que l'arrêt de la nage.

3. Les aspects fonctionnels

Après avoir étudié les mécanismes cellulaires qui maintiennent et prolongent les dépolarisations soutenues des cellules du MRRN, dans un second temps, nous avons voulu mieux comprendre comment l'ensemble des cellules RS est activé par une stimulation cutanée.

3.1. Est-ce que les cellules localisées dans les quatre noyaux de la formation réticulée peuvent produire des réponses soutenues suite à une stimulation cutanée ?

Les cellules RS de la lamproie sont groupées de façon bilatérale en quatre noyaux réticulés localisés dans le tronc cérébral: le noyau réticulé mésencéphalique (MRN) et les noyaux rombencéphaliques antérieur (ARRN), moyen (MRRN) et postérieur (PRRN) (Rovainen, 1967a, 1978; Rovainen et al., 1973). Dans chacun des noyaux, on retrouve des cellules RS de morphologies et de tailles variées. Une des questions que nous nous sommes donc posées était de savoir si les cellules RS de différentes tailles localisées dans les différents noyaux réticulés sont capables de produire des réponses soutenues suite à une stimulation cutanée (publication 2). Dans ce cas, on pourrait penser que l'ensemble des

cellules RS est susceptible d'activer les réseaux locomoteurs spinaux pour déclencher la nage.

Sachant que les différents groupes de cellules RS sont hétérogènes, nous avons étudié l'activité des cellules RS de différentes tailles dans chaque noyau réticulé. Nos expériences réalisées en imagerie calcique nous ont permis de montrer que des réponses calciques similaires ont été évoquées dans l'ensemble des cellules RS, indépendamment de leur taille et de leur localisation par rapport à la stimulation du nerf trijumeau. Des propriétés physiologiques auraient donc pu faire en sorte que les petites et les grosses cellules RS montrent des propriétés d'intégration différentes. Nos résultats montrent toutefois que ce n'est pas le cas. De plus, d'après nos données obtenues dans un très grand nombre de paires de cellules échantillonnées, la stimulation sensorielle d'origine cutanée unilatérale a induit des réponses légèrement plus importantes dans les grosses cellules de l'ARRN controlatérales à la stimulation ainsi que dans l'ensemble des cellules controlatérales du MRRN et du PRRN (publication 2) tout comme ce qui a été observé dans des travaux antérieurs dans les cellules du MRRN (Viana Di Prisco et al., 2000). Fonctionnellement, l'activité légèrement plus importante observée dans la majorité des cellules RS controlatérales pourrait permettre de courber le corps de l'animal du côté opposé à la stimulation afin que l'animal puisse fuir dans cette direction.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons utilisé deux approches complémentaires afin d'étudier l'activité des cellules RS de la lamproie en réponse à une stimulation cutanée: l'imagerie calcique (qui a permis d'enregistrer l'activité d'un très grand nombre de cellules de différentes tailles) et

l'électrophysiologie (qui a permis de suivre l'activité cellulaire à haute résolution).

Nos résultats en électrophysiologie ont confirmé les données en imagerie calcique montrant qu'une brève stimulation sensorielle d'origine cutanée d'intensité suffisante peut produire des dépolarisations soutenues dans les cellules RS des quatre noyaux réticulés (publication 2). Durant ces expériences, nous n'avons toutefois pas déterminé si le déclenchement des dépolarisations soutenues des cellules RS localisées dans les quatre noyaux réticulés dépend de l'activation des récepteurs AMPA et NMDA. Or, nous savons que l'activation des afférences sensorielles de type cutané déclenche des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) dans l'ensemble des cellules RS (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Il a été montré dans les cellules RS du MRRN et du PRRN que ces PPSE dépendent des récepteurs AMPA et NMDA (Viana Di Prisco et al., 1995). Puis, dans les cellules du MRRN, des expériences ont montré que ces PPSEs sont à la base de la dépolarisation membranaire initiale et de l'entrée de calcium, mécanismes essentiels au déclenchement des dépolarisations soutenues (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Ensuite, d'après des travaux antérieurs, les cellules RS localisées dans les quatre noyaux réticulés possèdent des propriétés membranaires semblables au repos. Par exemple, les cellules RS du MRN, de l'ARRN, du MRRN et du PRRN possèdent des potentiels membranaires et une amplitude des potentiels d'action similaires (Table 1 de Kasicki et al., 1989). De plus, les cellules du MRRN et du PRRN possèdent une résistance d'entrée et une rhéobase similaires (Brocard et Dubuc, 2003). Puisque les cellules RS des différents noyaux possèdent des propriétés membranaires similaires, on peut donc supposer

que le déclenchement des réponses soutenues de l'ensemble des cellules RS dépend de l'activation initiale des récepteurs AMPA et NMDA et que des mécanismes intrinsèques semblables sont impliqués.

Expériences futures : Il serait intéressant de confirmer que les dépolarisations soutenues des cellules RS localisées dans les différents noyaux réticulés sont sous-tendues par des propriétés intrinsèques similaires. D'abord, afin de montrer la nature intrinsèque des dépolarisations soutenues, le chélateur de calcium BAPTA serait injecté à l'intérieur des cellules enregistrées dans chacun des noyaux. Puis, à l'aide de l'AP-5, du CNQX et du FFA (appliqués en bain ou localement au-dessus de la cellule enregistrée), la contribution respective des récepteurs AMPA, NMDA ainsi que l' I_{CAN} dans le déclenchement des dépolarisations soutenues des cellules RS de différents groupes serait étudiée. Ces expériences permettraient de déterminer si les cellules RS des différents noyaux sont toutes susceptibles d'activer les réseaux locomoteurs spinaux pour produire la nage, en partageant des mécanismes d'activation similaires qui sous-tendent les dépolarisations soutenues.

Nous avons ensuite voulu savoir si les cellules RS des différents noyaux montrent un patron de recrutement similaire, en réponse à une stimulation cutanée.

3.2. Est-ce que les différents groupes de cellules RS sont recrutés de façon similaire par une stimulation cutanée?

Nous avons d'abord étudié le patron d'activation des cellules RS individuelles localisées dans les différents noyaux réticulés.

La similitude des courbes stimulation-réponse ont montré que les cellules RS localisées dans le MRN, l'ARRN, le MRRN et le PRRN sont recrutées de façon similaire par une stimulation sensorielle d'origine cutanée. En effet, en augmentant l'intensité de la stimulation du nerf trijumeau, les réponses cellulaires initialement transitoires et linéairement corrélées à l'intensité de la stimulation ont été remplacées par des réponses persistantes au-delà d'un certain seuil de stimulation (publication 2). Un tel patron d'activation avait antérieurement été décrit mais uniquement dans les cellules RS du MRRN (Viana di Prisco et al., 1997, 2000). Dans notre étude, puisque toutes les cellules marquées qui ont été enregistrées ont répondu à de faibles intensités de stimulation, l'augmentation de l'intensité de stimulation ne semble pas recruter des cellules RS inactives ni augmenter uniquement l'activité des certaines cellules RS. Il semble plutôt qu'à de faibles intensités de stimulation cutanée, l'augmentation de l'intensité produit une augmentation progressive du niveau d'activité de chaque cellule RS, de façon similaire. En effet, on aurait pu s'attendre à ce que les grosses cellules RS uniquement montrent des réponses soutenues, ou que les petites cellules produisent des réponses soutenues à des intensités de stimulation plus élevées que les grosses cellules. Par exemple, des expériences antérieures réalisées chez le

poisson-zèbre en imagerie calcique ont montré qu'à de faibles intensités de stimulation (stimulation cutanée de la queue), les grosses cellules de Mauthner seulement ont été activées, tandis que ces cellules, ainsi que des cellules homologues plus petites, les CiD2cm et MiD3cm, ont ensuite été activées par des stimulations plus fortes (stimulation cutanée de la tête) (O'Malley et al., 1996). Notre étude indique toutefois que les cellules RS marquées que nous avons étudiées et qui étaient localisées dans chaque noyau ont toutes été activées plus ou moins simultanément et de façon similaire par une stimulation sensorielle de type cutané.

Nous avons aussi comparé le patron d'activation des différents groupes de cellules RS.

Par la suite, nous avons comparé l'intensité de stimulation seuil nécessaire pour produire les réponses soutenues dans les différents groupes de cellules RS. Cette intensité seuil était similaire pour les différents noyaux et ceci indique que les différents groupes de cellules RS ne sont pas recrutés de façon séquentielle, mais seraient plutôt activés simultanément par une stimulation sensorielle de type cutané (publication 2). Un patron d'activation similaire entre différents groupes de cellules RS, tel que ce que nous avons décrit dans notre étude suite à une stimulation d'origine cutanée, a également été observé chez le poisson-zèbre (Gahtan et al., 2002). Dans cette étude, la majorité des grosses cellules RS de Mauthner, les cellules homologues Mid2cm et Mid3cm ainsi que de nombreuses cellules plus petites qui projettent de façon ipsilatérale et controlatérale au niveau

spinal ont montré des réponses calciques transitoire suite à une brève stimulation cutanée de la tête (stimulation mécanique), ce qui normalement déclenche efficacement une nage de fuite. Puisque les cellules RS marquées qui ont répondu à la stimulation cutanée projettent au niveau spinal, les auteurs ont suggéré que l'ensemble de ces cellules RS envoie une commande motrice de fuite aux centres locomoteurs spinaux. De la même façon, une étude réalisée chez la truite a permis de comparer le nombre de cellules RS actives dans des poissons contrôles au nombre de cellules RS actives dans des poissons ayant été exposés à une stimulation tactile de la peau par la vibration de l'eau de l'aquarium (correspondant à une stimulation globale d'un nerf comparativement à une stimulation périphérique spécifique) (Bosch et al. 2001). Dans cette étude, un plus grand nombre de neurones RS, incluant les cellules de Mauthner, ont exprimé une immunoréactivité au c-Fos (dont l'expression est un indicateur de l'activité neuronale) chez les poissons ayant subi la stimulation tactile comparativement aux poissons contrôles. Les auteurs ont donc proposé que l'activation de l'ensemble des neurones RS localisés dans la formation réticulée serait à la base de la nage de fuite d'origine cutanée.

Contrairement à la locomotion de fuite, lors des ajustements posturaux chez la lamproie, les afférences vestibulaires recrutent différents groupes de cellules RS qui permettent alors de rétablir l'équilibre et la position initiale de l'animal dans l'espace (Karayannidou et al., 2007 ; Zelenin et al., 2007). Un recrutement de différents groupes de cellules RS a aussi été observé lors de la stimulation de la région locomotrice mésencéphalique. Dépendamment de l'intensité de la stimulation de la région locomotrice mésencéphalique, les cellules

RS du MRRN et du PRRN sont activées de façon différentielle (Brocard et Dubuc, 2003). Les cellules RS du MRRN sont d'abord recrutées à de faibles intensités de stimulation, puis les cellules du PRRN sont activées à des intensités plus élevées. L'activation progressive des différents groupes de cellules RS par cette région locomotrice permettrait à l'animal de nager de plus en plus vite, et de façon graduelle. De façon concordante, l'activation de différents groupes de neurones localisés au niveau de la moelle épinière a également été décrit dans une étude effectuée sur le poisson-zèbre (McLean et al., 2007). Dans cette étude, les motoneurones ventraux ainsi que les interneurones excitateurs ont été recrutés à de faibles fréquences de nage, tandis que les neurones excitateurs dorsaux ont été recrutés à des intensités de nage plus élevées. De plus, les interneurones inhibiteurs ont montré un patron de recrutement inverse. Dans l'ensemble de ces exemples, il apparaît que différents groupes de cellules RS reçoivent des informations excitatrices différentes provenant d'afférences de la même origine. Contrairement à cela, nos résultats suggèrent que les différents groupes de cellules RS reçoivent une information similaire provenant des afférences cutanées de la tête.

Chez la lamproie, le recrutement différentiel des cellules RS par les afférences vestibulaires et par la région locomotrice mésencéphalique diffère du recrutement sans ordre séquentiel des différents groupes de cellules RS par la stimulation cutanée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que contrairement aux ajustements posturaux induits par les afférences vestibulaires ou à la nage activée par les centres locomoteurs supraspinaux, la nage déclenchée par les afférences cutanées nécessite l'activation rapide et maximale des réseaux locomoteurs

spinaux. En effet, cette nage dite de fuite doit être déclenchée de façon efficace pour permettre à l'animal de s'éloigner très rapidement et loin de la source de la stimulation (McClellan et Grillner, 1983 ; McClellan, 1984). On peut donc suggérer que l'activité soutenue des cellules RS des quatre noyaux réticulés pourrait permettre la transmission d'une commande motrice, obéissant à une loi de « tout ou rien », aux réseaux locomoteurs spinaux. Dans un contexte fonctionnel, une telle activation synchrone des neurones spinaux par les cellules RS, serait à la base du caractère balistique de la nage de fuite déclenchée par une stimulation cutanée.

Après avoir déterminé le patron d'activation des différents groupes de cellules RS par les afférences cutanées, il aurait été intéressant de déterminer le rôle des différents noyaux réticulés durant la nage de fuite.

Durant nos expériences, nous n'avons pas déterminé le rôle des différents noyaux réticulés durant la nage de fuite. De plus, dans nos expériences en imagerie calcique, bien que nous ayons enregistré jusqu'à une quarantaine de cellules RS marquées par préparation, ceci ne représente que 1.6 % des 2500 cellules RS (environ 1250 cellules RS de chaque côté du tronc cérébral) présentes dans la formation réticulée (Swain et al., 1993). Malgré cela, il est tentant de dire que l'activité soutenue générée par les cellules RS des différents groupes est impliquée dans l'activation des réseaux locomoteurs spinaux responsable de produire la nage de fuite.

Ainsi, les cellules RS pourraient représenter des neurones de commande, regroupés en différents syncytiums fonctionnels, à l'intérieur desquels les cellules RS individuelles seraient activées simultanément et à leur maximum par une stimulation cutanée. Cette activité simultanée des cellules RS des différents groupes pourrait permettre de réduire le délai nécessaire pour déclencher la nage de fuite. Si les différents noyaux sont activés au maximum, il est possible que l'inhibition de l'activité d'un noyau réticulé n'affecte pas la nage de fuite en cours. Les différents noyaux pourraient aussi participer, de façon indépendante, à augmenter la puissance de la nage de fuite déclenchée par une stimulation cutanée.

Expériences futures : Nous avons montré que les différents groupes de cellules RS possèdent un patron d'activation similaire en réponse à une stimulation sensorielle d'origine cutanée. De plus, au-delà d'un certain seuil de stimulation, les cellules RS des quatre noyaux de la formation réticulée ont produit des réponses soutenues. Nous avons donc proposé que chacun de ces noyaux comprend des neurones capables d'activer les réseaux locomoteurs spinaux et de déclencher la nage de fuite. Ainsi, il faudrait déterminer si l'activité soutenue des cellules RS des quatre noyaux réticulés est indispensable à l'amorce et au maintien de la locomotion déclenchée par une stimulation cutanée. Pour ce faire, il faudrait inactiver l'ensemble des cellules de chacun des quatre noyaux dans des préparations semi-intactes, à l'aide d'éjections de CNQX et AP-5, et regarder les effets sur l'amorce et le maintien de la nage.

4. Conclusions

De façon générale, nos travaux ont permis de mieux comprendre la contribution des mécanismes synaptiques et intrinsèques dans les dépolarisations soutenues des cellules RS en réponse à une brève stimulation sensorielle de type cutané. Nous savions qu'une stimulation des afférences cutanées induit l'activation des récepteurs AMPA et NMDA et une entrée de calcium permettant l'activation subséquente de l' I_{CAN} dans les cellules du MRRN de la lamproie. Ces mécanismes déclenchent les dépolarisations soutenues et seraient à la base de la nage de fuite.

Selon nos résultats, les afférences synaptiques excitatrices, incluant les afférences spinales ascendantes, permettent de prolonger la durée des dépolarisations soutenues d'origine cutanée. Bien que ces dépolarisations soutenues dépendent d'une augmentation de calcium interne, nous avons montré que les réserves calciques ne sont pas impliquées dans leur maintien. Nos résultats suggèrent également que les différents groupes de cellules RS possèdent un patron d'activation similaire, et que les cellules RS des quatre noyaux réticulés peuvent produire des dépolarisations soutenues. Puisque celles-ci sont associées à de la nage de fuite, toute modification des propriétés cellulaires à la base des dépolarisations soutenues des cellules RS de la lamproie aurait un effet considérable sur le comportement locomoteur.

En conclusion, nos résultats ont permis d'améliorer nos connaissances sur le contrôle descendant de la locomotion et possiblement sur le contrôle de la motricité en général. Nos résultats permettent de mieux comprendre le fonctionnement des cellules nerveuses qui sont responsables de l'amorce et du

contrôle des mouvements. Éventuellement, ces informations pourraient contribuer à améliorer les traitements dédiés aux patients atteints de pathologies sensorimotrices.

REFERENCES

Abalo XM, Villar-Cheda B, Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Anadón R, Rodicio MC (2007) Development of the serotonergic system in the central nervous system of the sea lamprey. *J Chem Neuroanat* 34(1-2): 29-46.

Afelt Z (1974) Functional significance of ventral descending tracts of the spinal cord in the cat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 34(3): 393-407.

Alford S, Christenson J, Grillner S (1991) Presynaptic GABAA and GABAB Receptor-mediated Phasic Modulation in Axons of Spinal Motor Interneurons. *Eur J Neurosci* 3(2):107-117.

Alford S, Frenguelli BG, Schofield JG, Collingridge GL (1993) Characterization of Ca²⁺ signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synaptic activation of NMDA receptors. *J Physiol* 469: 693-716.

Alford S, Williams TL (1989) Endogenous activation of glycine and NMDA receptors in lamprey spinal cord during fictive locomotion. *J Neurosci* 9(8):2792-800.

Alford S, Williams TL, Sigvardt KA (1990) Effects of bicuculline and strychnine on

synaptic inputs to edge cells during fictive locomotion. *Brain Res* 509(1): 137-140.

Angstadt JD, Choo JJ (1996) Sodium-dependent plateau potentials in cultured Retzius cells of the medicinal leech. *J Neurophysiol* 76(3): 1491-1502.

Antri M, Auclair F, Albrecht J, Djeudjang N, Dubuc R (2008) Serotonergic modulation of sensory transmission to brainstem reticulospinal cells. *Eur J Neurosci* 28(4): 655-667.

Antri M, Cyr A, Auclair F, Dubuc R (2006) Ontogeny of 5-HT neurons in the brainstem of the lamprey, *Petromyzon marinus*. *J Comp Neurol* 495(6): 788-800.

Armstrong DM (1986) Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat. *Prog Neurobiol* 26(4): 273-361. *Revue*.

Armstrong DM, Marple-Horvat DE (1996) Role of the cerebellum and motor cortex in the regulation of visually controlled locomotion. *Can J Physiol Pharmacol* 74(4): 443-455. *Revue*.

Arshavsky YI, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM, Orlovsky GN (1972a) Recordings of neurones of the dorsal spinocerebellar tract during evoked

locomotion. *Brain Res* 43(1): 272-275.

Arshavsky YI, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM, Orlovsky GN (1972b) Origin of modulation in neurones of the ventral spinocerebellar tract during locomotion. *Brain Res* 43(1): 276-279.

Arshavsky YI, Gelfand IM, Orlovsky GN, Pavlova GA (1978a) Messages conveyed by spinocerebellar pathways during scratching in the cat. I. Activity of neurons of the lateral reticular nucleus. *Brain Res* 151(3): 479-491.

Arshavsky YI, Gelfand IM, Orlovsky GN, Pavlova GA (1978b) Messages conveyed by spinocerebellar pathways during scratching in the cat. II. Activity of neurons of the ventral spinocerebellar tract. *Brain Res* 151(3): 493-506.

Arshavsky YI, Gelfand IM, Orlovsky GN, Pavlova GA (1978c) Messages conveyed by descending tracts during scratching in the cat. I. Activity of vestibulospinal neurons. *Brain Res* 159(1): 99-110.

Arshavsky YI, Orlovsky GN (1986) Role of the cerebellum in the control of rhythmic movements. In: Grillner S, Stein PSG, Stuart DG, Forssberg H, Herman RM (Eds), *Neurobiology of Vertebrate Locomotion*. MacMillan, London, pp. 677-689.

Arshavsky YI, Orlovsky GN, Pavlova GA, Perret C (1978d) Messages conveyed by descending tracts during scratching in the cat. II. Activity of rubrospinal neurons. *Brain Res* 159(1): 111-123.

Atsuta Y, Garcia-Rill E, Skinner RD (1990) Characteristics of electrically induced locomotion in rat in vitro brain stem-spinal cord preparation. *J Neurophysiol* 64(3): 727-735.

Bardo S, Cavazzini MG, Emptage N (2006) The role of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store in the plasticity of central neurons. *Trends Pharmacol Sci* 27(2):78-84. *Revue*.

Barthélemy D, Leblond H, Provencher J, Rossignol S (2006) Non-locomotor and locomotor hindlimb responses evoked by electrical microstimulation of the lumbar cord in spinalized cats. *J Neurophysiol* 96(6): 3273-3292.

Barthélemy D, Leblond H, Rossignol S (2007) Characteristics and mechanisms of locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation in spinal cats. *J Neurophysiol* 97(3):1986-2000.

Baufreton J, Garret M, Rivera A, de la Calle A, Gonon F, Dufy B, Bioulac B,

Taupignon A (2003) D5 (not D1) dopamine receptors potentiate burst-firing in neurons of the subthalamic nucleus by modulating an L-type calcium conductance. *J Neurosci* 23(3): 816-825.

Bedford TG, Loi PK, Crandall CC (1992) A model of dynamic exercise: the decerebrate rat locomotor preparation. *J Appl Physiol* 72(1): 121-127.

Beloozerova IN, Sirota MG (1993) The role of the motor cortex in the control of accuracy of locomotor movements in the cat. *J Physiol* 461: 1-25.

Beloozerova IN, Sirota MG, Orlovsky GN, Deliagina TG (2005) Activity of pyramidal tract neurons in the cat during postural corrections. *J Neurophysiol* 93(4):1831-1844.

Beloozerova IN, Zelenin PV, Popova LB, Orlovsky GN, Grillner S, Deliagina TG (2003) Postural control in the rabbit maintaining balance on the tilting platform. *J Neurophysiol* 90(6): 3783-3793.

Bem T, Górski T, Majczyński H, Zmysłowski W (1995) Different patterns of fore hindlimb coordination during overground locomotion in cats with ventral and lateral spinal lesions. *Exp Brain Res* 104(1): 70-80.

Bennett DJ, Li Y, Harvey PJ, Gorassini M (2001) Evidence for plateau potentials in

tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity. *J Neurophysiol* 86(4): 1972-1982.

Beresovskii VK, Bayev KV (1988) New locomotor regions of the brainstem revealed by means of electrical stimulation. *Neuroscience* 26(3): 863-869.

Bernau NA, Puzdrowski RL, Leonard RB (1991) Identification of the midbrain locomotor region and its relation to descending locomotor pathways in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Brain Res* 557(1-2): 83-94.

Berridge MJ (1993) Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 365(6445): 388-389.

Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499 (Pt 2): 291-306. Revue.

Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21(1): 13-26. Revue.

Beurrier C, Congar P, Bioulac B, Hammond C (1999) Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *J Neurosci* 19(2): 599-609.

Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE (1991) Bell-shaped calcium-response curves of

Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351(6329): 751-754.

Birnberger KL, Rovainen CM (1971) Behavioral and intracellular studies of a habituating fin reflex in the sea lamprey. *J Neurophysiol* 34(6): 983-989.

Blessing WW, Goodchild AK, Dampney RA, Chalmers JP (1981) Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord, with special reference to catecholamine-containing neurons. *Brain Res* 221(1):35-55.

Blight AR (1976) Undulatory swimming with and without waves of contraction. *Nature* 264(5584): 352-354.

Blight AR (1977) The muscular control of vertebrate swimming movements. *Biol. Rev* 52: 181-218. *Revue*.

Bone Q (1966) On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. I. *Mar Biol Ass UK* 46:321-49.

Borelli GA (1680-1681) *De motu animalium*. Rome.

Bosch TJ, Maslam S, Roberts BL (2001) Fos-like immunohistochemical

identification of neurons active during the startle response of the rainbow trout. *J Comp Neurol* 439(3): 306-314.

Bouyer LJ, Rossignol S (2003a) Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion. I. Intact cats. *J Neurophysiol* 90(6): 3625-3639.

Bouyer LJ, Rossignol S (2003b) Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion. II. Spinal cats. *J Neurophysiol* 90(6): 3640-3653.

Brocard F, Dubuc R (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90(3):1714- 1727.

Brocard F, Bardy C, Dubuc R (2005) Modulatory effect of substance P to the brain stem locomotor command in lampreys. *J Neurophysiol* 93(4): 2127-2141.

Brodin L, Grillner S (1985a) The role of putative excitatory amino acid neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. I. The effects of excitatory amino acid antagonists. *Brain Res* 360(1-2): 139-148.

Brodin L, Grillner S (1985b) The role of putative excitatory amino acid

neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. II.

The effects of amino acid uptake inhibitors. *Brain Res* 360(1-2): 149-158.

Brodin L, Grillner S, Dubuc R, Ohta Y, Kasicki S, Hökfelt T (1988) Reticulospinal neurons in lamprey: transmitters, synaptic interactions and their role during locomotion. *Arch Ital Biol* 126(4): 317-345. *Revue*.

Brodin L, Tråvén HG, Lansner A, Wallén P, Ekeberg O, Grillner S (1991) Computer simulations of N-methyl-D-aspartate receptor-induced membrane properties in a neuron model. *J Neurophysiol* 66(2): 473-484.

Buchanan JT (1982) Identification of interneurons with contralateral, caudal axons in the lamprey spinal cord: synaptic interactions and morphology. *J Neurophysiol* 47(5): 961-975.

Buchanan JT (1993) Electrophysiological properties of identified classes of lamprey spinal neurons. *J Neurophysiol* 70(6): 2313-2325.

Buchanan JT (2001) Contributions of identifiable neurons and neuron classes to lamprey vertebrate neurobiology. *Prog Neurobiol* 63(4): 441-466. *Revue*.

Buchanan JT, Cohen AH (1982) Activities of identified interneurons, motoneurons, and muscle fibers during fictive swimming in the lamprey and effects of

reticulospinal and dorsal cell stimulation. *J Neurophysiol* 47(5): 948-960.

Buchanan JT, Einum JF (2008) The spinobulbar system in lamprey. *Brain Res Rev* 57(1): 37-45. Revue.

Buchanan JT, Grillner S (1987) Newly identified 'glutamate interneurons' and their role in locomotion in the lamprey spinal cord. *Science* 236(4799): 312-314.

Buchanan JT, Grillner S (1988) A new class of small inhibitory interneurons in the lamprey spinal cord. *Brain Res* 438(1-2): 404-407.

Buchanan JT, Kasicki S (1995) Activities of spinal neurons during brain stem dependent fictive swimming in lamprey. *J Neurophysiol* 73(1): 80-87.

Buchanan JT, McPherson DR (1995) The neuronal network for locomotion in the lamprey spinal cord: evidence for the involvement of commissural interneurons. *J Physiol Paris* 89(4-6): 221-233. Revue.

Buchanan JT, Brodin L, Dale N, Grillner S. (1987) Reticulospinal neurones activate excitatory amino acid receptors. *Brain Res* 408(1-2):321-325.

Buchanan JT, Grillner S, Cullheim S, Risling M (1989) Identification of excitatory interneurons contributing to generation of locomotion in lamprey: structure,

pharmacology, and function. *J Neurophysiol* 62(1): 59-69.

Büschges A, Wikström MA, Grillner S, El Manira A (2000) Roles of high-voltage activated calcium channel subtypes in a vertebrate spinal locomotor network. *J Neurophysiol* 84(6): 2758-2766.

Bussièrès N (1994) Les systèmes descendants chez la lamproie. Etude anatomique et fonctionnelle. Thèse de doctorat. Université de Montréal.

Bussièrès N, Dubuc R (1992a) Phasic modulation of vestibulospinal neuron activity during fictive locomotion in lampreys. *Brain Res* 575(1): 174-179.

Bussièrès N, Dubuc R (1992b) Phasic modulation of transmission from vestibular inputs to reticulospinal neurons during fictive locomotion in lampreys. *Brain Res* 582(1): 147-153.

Bussièrès N, Pflieger JF, Dubuc R (1999) Anatomical study of vestibulospinal neurons in lampreys. *J Comp Neurol* 407(4): 512-526.

Cabelguen JM, Bourcier-Lucas C, Dubuc R (2003) Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the salamander *Notophthalmus viridescens*. *J Neurosci* 23(6): 2434-2439.

- Cangiano L, Grillner S (2003) Fast and slow locomotor burst generation in the hemispinal cord of the lamprey. *J Neurophysiol* 89(6): 2931-2942.
- Cangiano L, Wallén P, Grillner S (2002) Role of apamin-sensitive k(ca) channels for reticulospinal synaptic transmission to motoneuron and for the afterhyperpolarization. *J Neurophysiol* 88(1): 289-299.
- Caplan LR, Goodwin JA (1982) Lateral tegmental brainstem hemorrhages. *Neurology* 32(3): 252-260.
- Cardin S, Le Ray D, Robitaille R, Dubuc R (1999) Motor responses elicited by skin stimulations in lampreys. *Soc Neurosci Abstr* 25: 1906. Abstr.
- Carlin KP, Jones KE, Jiang Z, Jordan LM, Brownstone RM (2000) Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* 12(5): 1635-1646.
- Chambers WW, Liu CN (1957) Corticospinal tract of the cat: an attempt to correlate the pattern of degeneration with deficits in reflex activity following neocortical lesions. *J Comp Neurol* 108(1): 23-55.
- Chavis P, Ango F, Michel JM, Bockaert J, Fagni L (1998) Modulation of big K⁺

channel activity by ryanodine receptors and L-type Ca²⁺ channels in neurons.

Eur J Neurosci 10(7): 2322-2327.

Chen Q, Olney JW, Lukasiewicz PD, Almlı T, Romano C (1998) Fenamates protect neurons against ischemic and excitotoxic injury in chick embryo retina.

Neurosci Lett 242(3): 163-166.

Cheng H, Wang SQ (2002) Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells. Front Biosci 7: d1867-1878.

Revue.

Christenson J, Boman A, Lagerback PA, Grillner S (1988) The dorsal cell, one class of primary sensory neuron in the lamprey spinal cord. I. Touch, pressure but no nociception--a physiological study. Brain Res 440: 1-8.

Chung-Davidson YW Yun SS, Teeter J, Li W (2004) Brain pathways and behavioural responses to weak electric fields in parasitic sea lampreys (*Petromyzon marinus*). Behav Neurosci 118(3): 611-619.

Clarac F (2008) Some historical reflections on the neural control of locomotion.

Brain Res Rev 57(1): 13-21. Revue.

Cohen AH, Harris-Warrick RM (1984) Strychnine eliminates alternating motor

output during fictive locomotion in the lamprey. *Brain Res* 293(1): 164-167.

Cohen AH, Wallén P (1980) The neuronal correlate of locomotion in fish. "Fictive swimming" induced in an in vitro preparation of the lamprey spinal cord. *Exp Brain Res* 41(1): 11-18.

Coles SK, Iles JF, Nicolopoulos-Stournaras S (1989) The mesencephalic centre controlling locomotion in the rat. *Neuroscience* 28(1): 149-157.

Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crépel V (1997) A long-lasting calcium activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 17(14): 5366-5379.

Conway BA, Hultborn H, Kiehn O, Mintz I (1988) Plateau potentials in alpha motoneurons induced by intravenous injection of L-dopa and clonidine in the spinal cat. *J Physiol* 405: 369-384.

Copello JA, Zima AV, Diaz-Sylvester PL, Fill M, Blatter LA (2007) Ca²⁺ entry independent effects of L-type Ca²⁺ channel modulators on Ca²⁺ sparks in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(6): C2129-2140.

Corio M, Palisses R, Viala D (1993) Origin of the central entrainment of respiration

by locomotion facilitated by MK 801 in the decerebrate rabbit. *Exp Brain Res* 95(1): 84-90.

Currie SN, Ayers J (1987) Plasticity of fin command system function following spinal transection in larval sea lamprey. *Brain Res* 415(2): 337-341.

Czarnecki A, Magloire V, Streit J (2008) Local oscillations of spiking activity in organotypic spinal cord slice cultures. *Eur J Neurosci* 27(8): 2076-2088.

Dale N (1986) Excitatory synaptic drive for swimming mediated by amino acid receptors in the lamprey. *J Neurosci* 6(9): 2662-2675.

Dale HH, Feldberg W, Vogt M (1936) Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol* 86(4): 353-380.

Dale N, Roberts A (1985) Dual-component amino-acid-mediated synaptic potentials: excitatory drive for swimming in *Xenopus* embryos. *J Physiol* 363:35-59.

Davis GR Jr, McClellan AD (1994a) Long distance axonal regeneration of identified lamprey reticulospinal neurons. *Exp Neurol* 127(1): 94-105.

Davis GR Jr, McClellan AD (1994b) Extent and time course of restoration of descending brainstem projections in spinal cord-transected lamprey. *J Comp*

Neurol 344(1):65-82.

Delgado-Lezama R, Perrier JF, Hounsgaard J (1999) Local facilitation of plateau potentials in dendrites of turtle motoneurons by synaptic activation of metabotropic receptors. *J Physiol* 515 (Pt 1): 203-207.

Delgado-Lezama R, Perrier JF, Nedergaard S, Svirskis G, Hounsgaard J (1997) Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of turtle spinal motoneurons. *J Physiol* 504 (Pt 1): 97-102.

Deliagina T, Beloozerova IN, Popova LB, Sirota MG, Swadlow HA, Grant G, Orlovsky GN (2000) Role of different sensory inputs for maintenance of body posture in sitting rat and rabbit. *Motor Control* 4(4):439-452.

Deliagina TG, Orlovsky GN (2002) Comparative neurobiology of postural control. *Curr Opin Neurobiol* 12(6): 652-657. Review.

Deliagina TG, Beloozerova IN, Zelenin PV, Orlovsky GN (2008) Spinal and supraspinal postural networks. *Brain Res Rev* 57(1): 212-221. Review.

Deliagina TG, Grillner S, Orlovsky GN, Ullén F (1993) Visual input affects the response to roll in reticulospinal neurons of the lamprey. *Exp Brain Res* 95(3): 421-428.

Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S, Wallén P (1992) Vestibular control of swimming in lamprey. II. Characteristics of spatial sensitivity of reticulospinal neurons. *Exp Brain Res* 90(3): 489-498.

Deliagina T, Ullén F, Gonzalez M, Ehrsson H, Orlovsky G, Grillner S (1995) Initiation of locomotion by lateral line photoreceptors in lamprey: behavioural and neurophysiological studies. *J Exp Biol* 198(Pt 12): 2581-2591.

Deliagina TG, Zelenin PV, Orlovsky GN (2002) Encoding and decoding of reticulospinal commands. *Brain Res Brain Res Rev* 40(1-3): 166-177. *Revue.*

del Negro CA, Hsiao CF, Chandler SH (1999) Outward currents influencing bursting dynamics in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 81(4): 1478-1485.

Delvolvé I, Bem T, Cabelguen JM (1997) Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*. *J Neurophysiol* 78: 638-650.

Derjean D, Bertrand S, Le Masson G, Landry M, Morisset V, Nagy F (2003) Dynamic balance of metabotropic inputs causes dorsal horn neurons to switch functional states. *Nat Neurosci* 6(3): 274-281.

- Derjean D, Moussaddy A, Atallah E, St-Pierre M, Ren X, Chang S, Auclair F, Zielinski B, Dubuc R (2008). Neural pathways and mechanisms underlying olfactory-locomotor transformations in lampreys. ISOT Abstr P 445. Résumé.
- Dickinson PS, Nagy F (1983) Control of a central pattern generator by an identified modulatory interneurone in crustacea. II. Induction and modification of plateau properties in pyloric neurones. *J Exp Biol* 105: 59-82.
- Dietz V (2002) Proprioception and locomotor disorders. *Nat Rev Neurosci* 3: 781-90.
- Douthel J, Althausen S, Gissel C, Paschen W (1999) Activation of Myd 116 (gadd34) expression following transient forebrain ischemia of rat: implications for a role of disturbances of endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Mol Brain Res* 63: 225-232.
- Doty RL (1976) *Mammalian Olfaction. Reproductive procesus and behavior.* Academic Press. New-York, p. 337.
- Drew T, Dubuc R, Rossignol S (1986) Discharge patterns of reticulospinal and other reticular neurons in chronic, unrestrained cats walking on a treadmill. *J Neurophysiol* 55(2): 375-401.

- Drew T (1991) Functional organization within the medullary reticular formation of the intact unanesthetized cat. III. Microstimulation during locomotion. *J Neurophysiol* 66(3): 919-938.
- Dubrovsky B, Garcia-Rill E, Surkes MA (1974) Effects of discrete precruciate cortex lesions on motor behavior. *Brain Res* 82(2): 328-333.
- Dubuc R, Bongiani F, Ohta Y, Grillner S (1993a) Dorsal root and dorsal column mediated synaptic inputs to reticulospinal neurons in lampreys: involvement of glutamatergic, glycinergic, and GABAergic transmission. *J. Comp Neurol* 327 (2): 251-259.
- Dubuc R, Bongiani F, Ohta Y, Grillner S (1993b) Anatomical and physiological study of brainstem nuclei relaying dorsal column inputs in lampreys. *J Comp Neurol* 327(2): 260-270.
- Dubuc R, Brocard F, Antri M, Fénelon K, Gariépy JF, Smetana R, Ménard A, Le Ray D, Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Sirota MG, Derjean D, St-Pierre M, Zielinski B, Auclair F, Veilleux D (2008) Initiation of locomotion in lampreys. *Brain Res Rev* 57(1):172-182. Revue.
- Dubuc R, Grillner S (1989) The role of spinal cord inputs in modulating the activity

of reticulospinal neurons during fictive locomotion in the lamprey. *Brain Res* 483(1): 196-200.

Eaton RC, Emberley DS (1991) How stimulus direction determines the trajectory of the Mauthner-initiated escape response in a teleost fish. *J Exp Biol* 161: 469-487.

Eaton RC, DiDomenico R, Nissanov J (1988) Flexible body dynamics of the goldfish C-start: implications for reticulospinal command mechanisms. *J Neurosci* 8(8):2758-2768.

Eaton RC, Lee RK, Foreman MB (2001) The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Prog Neurobiol* 63(4): 467-485. *Revue*.

Eckert R, Lux HD (1976) A voltage-sensitive persistent calcium conductance in neuronal somata of *Helix*. *J Physiol* 254(1):129-251.

Eidelberg E, Story JL, Walden JG, Meyer BL (1981) Anatomical correlates of return of locomotor function after partial spinal cord lesions in cats. *Exp Brain Res* 42(1): 81-88.

Einum JF, Buchanan JT (2004) Reticulospinal neurons receive direct spinobulbar inputs during locomotor activity in lamprey. *J Neurophysiol* 92(3):1384-1390.

- Einum JF, Buchanan JT (2005) Membrane potential oscillations in reticulospinal and spinobulbar neurons during locomotor activity. *J Neurophysiol.* Jul;94(1):273-81. Epub 2005 Mar 2.
- Egorov AV, Hamam BN, Fransén E, Hasselmo ME, Alonso AA (2002) Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* 420(6912):173-178.
- Ekeberg O, Grillner S (1999) Simulations of neuromuscular control in lamprey swimming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* May 29;354(1385):895-902.
- Elbasiouny SM, Bennett DJ, Mushahwar VK (2005) Simulation of dendritic CaV1.3 channels in cat lumbar motoneurons: spatial distribution. *J Neurophysiol* 94(6): 3961-3974.
- El Manira A, Bussièrès N (1997) Calcium channel subtypes in lamprey sensory and motor neurons. *J Neurophysiol* 78(3): 1334-1340.
- El Manira A, Pombal MA, Grillner S (1997) Diencephalic projection to reticulospinal neurons involved in the initiation of locomotion in adult lampreys *Lampetra fluviatilis*. *J Comp Neurol* 389(4): 603-616.
- El Manira A, Shupliakov O, Fagerstedt P, Grillner S (1996) Monosynaptic input from

cutaneous sensory afferents to fin motoneurons in lamprey. *J Comp Neurol* 369(4):533-42.

El Manira A, Tegnér J, Grillner S (1994) Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *J Neurophysiol* 72(4): 1852-1861.

El Manira A, Tegnér J, Grillner S (1997b) Locomotor-related presynaptic modulation of primary afferents in the lamprey. *Eur J Neurosci* 9(4): 696-705.

Endo M (2006) Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling. *J Pharmacol Sci* 100(5): 519-524. *Revue.*

Endo M, Tanaka M, Ogawa Y (1970) Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228(5266): 34-36.

Faber ES, Delaney AJ, Sah P (2005) SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* 8(5): 635-641.

Fabiato A (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245(1): C1-14. *Revue.*

Fabiato A (1985) Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85(2): 247-289.

Fabiato A, Fabiato F (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 40(2): 119-129. Review.

Fariss MW, Pascoe GA, Reed DJ (1985) Vitamin E reversal of the effect of extracellular calcium on induced toxicity in hepatocytes. *Science* 227:751-754.

Fetcho JR, Faber DS (1988) Identification of motoneurons and interneurons in the spinal network for escapes initiated by the mauthner cell in goldfish. *J Neurosci* 8(11): 4192-4213.

Fetcho JR, O'Malley DM (1995) Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. *J Neurophysiol* 73(1): 399-406.

Finger TE, Rovainen CM (1982) Spinal and medullary dorsal cell axons in the trigeminal nerve in lampreys. *Brain Res* 240(2): 331-333.

Fill M, Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels.

Physiol Rev 82(4): 893-922. Revue.

Fiorillo CD, Williams JT (1998) Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394(6688): 78-82.

Ford LE, Podolsky RJ (1970) Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* 167(914): 58-59.

Forsberg H (1979) Stumbling corrective reaction: a phase-dependent compensatory reaction during locomotion. *J Neurophysiol* 42: 936-953.

Fraser DD, MacVicar BA (1996) Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 16(13): 4113-4128.

Freud S (1877) Über den Ursprung der hinteren Nervenwurzeln im Rückenmark von *Ammocoetes* (*Peteromyzon Planeri*). *Sber Akad Wiss Wein (Math –Naturwiss Cl.)* 75: 15-30.

Freud S (1878) Über Spinalganglien und Rückenmark des *Peteromyzon*. *Sber Akad Wiss Wein (Math –Naturwiss Cl.)* 78: 81-167.

Frigon A, Rossignol S (2008) Adaptive changes of the locomotor pattern and cutaneous reflexes during locomotion studied in the same cats before and after

pinalization. *J Physiol* 586(Pt 12): 2927-2945.

Fritzsich B, Dubuc R, Ohta Y, Grillner S (1989) Efferents to the labyrinth of the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*) as revealed with retrograde tracing techniques. *Neurosci Lett* 96(3): 241-246.

Fritzsich B, Crapon de Caprona MD, Wächtler K, Körtje KH (1984) Neuroanatomical evidence for electroreception in lampreys. *Z Naturforsch [C]* 39(7-8): 856-858.

Frolich LM, Biewener AA (1992) Kinematic and electromyographic analysis of the functional role of the body axis during terrestrial and aquatic locomotion in the salamander *Ambystoma tigrinum*. *J exp Biol* 162: 107–130.

Frost WN, Katz PS (1996) Single neuron control over a complex motor program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 422-426.

Furuichi T, Furutama D, Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Mikoshiba K (1994) Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci* 14(8): 4794-4805.

Gahtan E, Sankrithi N, Campos JB, O'Malley DM (2002) Evidence for a widespread brain stem escape network in larval zebrafish. *J Neurophysiol* 87(1): 608-614.

Garcia-Rill E (1986) The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res* 396(1): 47-63. *Revue.*

Garcia-Rill E, Kinjo N, Atsuta Y, Ishikawa Y, Webber M, Skinner RD (1990) Posterior midbrain-induced locomotion. *Brain Res Bull* 24(3): 499-508.

Gardam KE, Geiger JE, Hickey CM, Hung AY, Magoski NS (2008) Flufenamic Acid affects multiple currents and causes intracellular Ca²⁺ release in aplysia bag cell neurons. *J Neurophysiol* 100(1): 38-49.

Gatesy SM, Biewener AA (1991) Bipedal locomotion: effects of speed, size and limb posture in birds and humans. *J. Zool. Lond.* 224, 127–147. Cambridge University Press.

Ghamari-Langroudi M, Bourque CW (2002) Flufenamic acid blocks depolarizing afterpotentials and phasic firing in rat supraoptic neurones. *J Physiol* 545(Pt 2): 537-542.

Ghamari-Langroudi M, Bourque CW (2004) Muscarinic receptor modulation of slow afterhyperpolarization and phasic firing in rat supraoptic nucleus neurons. *J Neurosci* 24(35): 7718-7726

- Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol* 128(5): 893-904.
- Gögelein H, Pfanmüller B (1989) The nonselective cation channel in the basolateral membrane of rat exocrine pancreas. Inhibition by 3',5-dichlorodiphenylamine-2-carboxylic acid (DCDPC) and activation by stilbene disulfonates. *Pflugers Arch* 413(3): 287-298.
- Goaillard JM, Marder E (2006) Dynamic clamp analyses of cardiac, endocrine, and neural function. *Physiology (Bethesda)* 21:197-207.
- Golowasch J, Marder E (1992) Ionic currents of the lateral pyloric neuron of the stomatogastric ganglion of the crab. *J Neurophysiol* 67(2): 318-331.
- Goudard I, Orsal D, Cabelguen JM (1992) An Electromyographic Study of the Hindlimb Locomotor Movements in the Acute Thalamic Rat. *Eur J Neurosci* 4(11): 1130-1139.
- Górska T, Bem T, Majczyński H, Zmysłowski W (1993) Unrestrained walking in cats with partial spinal lesions. *Brain Res Bull* 32(3): 241-249.
- Gray J (1933) Directional Control of Fish Movement. *Proceedings of the Royal*

Society of London. Series B, 113(781): 115-125

Grillner S (1974) On the generation of locomotion in the spinal dogfish. *Exp Brain Res* 20(5): 459-70.

Grillner S (1981) Control of locomotion in bipeds, tetrapods and fish. In: Brookhart JM, Mountcastle VB. , editors. *Handbook of Physiology. The Nervous System. Motor Control*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1981, sect. 1, vol. II, pt. 2, chapt. 26, p. 1179-1236.

Grillner S (1985) Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228(4696): 143-149.

Grillner S (2003) The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 4(7):573-86. Revue.

Grillner S, Cangiano L, Hu G, Thompson R, Hill R, Wallén P (2000) The intrinsic function of a motor system--from ion channels to networks and behavior. *Brain Res*. 886(1-2):224-236. Revue.

Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, el Manira A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN,

Wallén P (1995) Neural networks that co-ordinate locomotion and body orientation in lamprey. *Trends Neurosci* 18(6): 270-279. Revue.

Grillner S, Dubuc R (1988) Control of locomotion in vertebrates: spinal and supraspinal mechanisms. *Adv Neurol* 47:425-53. Revue.

Grillner S, Ekeberg, El Manira A, Lansner A, Parker D, Tegnér J, Wallén P (1998) Intrinsic function of a neuronal network - a vertebrate central pattern generator. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3): 184-197. Revue.

Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström MA (2005) Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28(7): 364-370. Revue.

Grillner S, McClellan A, Sigvardt K (1982) Mechanosensitive neurons in the spinal cord of the lamprey. *Brain Res* 235(1): 169-173.

Grillner S, McClellan A, Sigvardt K, Wallén P, Wilén M (1981) Activation of NMDA-receptors elicits "fictive locomotion" in lamprey spinal cord in vitro. *Acta Physiol Scand* 113(4): 549-551.

Grillner S, Wallén P (1980) Does the central pattern generation for locomotion in lamprey depend on glycine inhibition? *Acta Physiol Scand* 110(1): 103- 105.

Grillner S, Wallén P (1985) Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 8:233-261. Revue.

Grillner S, Wallén P (1999) On the cellular bases of vertebrate locomotion. *Prog Brain Res* 123:297-309. Revue.

Grillner S, Wallén P (2002) Cellular bases of a vertebrate locomotor system-steering, intersegmental and segmental co-ordination and sensory control. *Brain Res Brain Res Rev* 40(1-3): 92-106. Revue.

Grillner S, Wallén P, Hill R, Cangiano L, El Manira A (2001) Ion channels of importance for the locomotor pattern generation in the lamprey brainstem-spinal cord. *J Physiol* 533(Pt 1): 23-30. Revue.

Grillner S, Williams T, Lagerbäck PA (1984) The edge cell, a possible intraspinal mechanoreceptor. *Science* 223(4635): 500-503.

Gruol DL, Netzeband JG, Parsons KL (1996) Ca²⁺ signaling pathways linked to glutamate receptor activation in the somatic and dendritic regions of cultured cerebellar purkinje neurons. *J Neurophysiol* 76(5): 3325-3340.

Guertin P, Dubuc R (1997) Effects of stimulating the reticular formation during

fictive locomotion in lampreys. *Brain Res* 753(2): 328-334.

Haji A, Ohi Y (2006) Ryanodine receptor/Ca(2+) release mechanisms in rhythmically active respiratory neurons of cats in vivo. *Neuroscience* 140(1): 343-354.

Hanna JP, Frank JI (1995) Automatic stepping in the pontomedullary stage of central herniation. *Neurology* 45(5): 985-986.

Hartline DK, Russell DF, Raper JA, Graubard K (1988) Special cellular and synaptic mechanisms in motor pattern generation. *Comp Biochem Physiol C* 91(1):115-131.

Hochman S, Jordan LM, Schmidt BJ (1994) TTX-resistant NMDA receptor-mediated voltage oscillations in mammalian lumbar motoneurons. *J Neurophysiol* 72(5): 2559-2562.

Houngaard J, Hultborn H, Jespersen B, Kiehn O (1988) Bistability of alpha motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J Physiol* 405: 345-367.

Houngaard J, Kiehn O (1985) Ca⁺⁺ dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons. *Exp Brain Res* 57(2): 422-425.

Hounsgaard J, Kiehn O (1989) Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* 414: 265-282.

Hounsgaard J, Kjaerulff O (1992) Ca²⁺-Mediated Plateau Potentials in a Subpopulation of Interneurons in the Ventral Horn of the Turtle Spinal Cord. *Eur J Neurosci* 4(2): 183-188.

Hounsgaard J, Mintz I (1988) Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *J Physiol* 398: 591-603.

Hsiao CF, Del Negro CA, Trueblood PR, Chandler SH (1998) Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 79(6): 2847-2856.

Hu B, Bourque CW (1992) NMDA receptor-mediated rhythmic bursting activity in rat supraoptic nucleus neurons in vitro. *J Physiol* 458: 667-687.

Hultborn H, Peterson N and Brownstone RM (1993) Evidence of fictive spinal locomotion in the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Soc Neurosci Abstr* 19, 539. (Abstr.).

Hultborn H, Wigstrom H, Wangberg B (1975) Prolonged activation of

soleus motoneurons following a conditioning train in soleus Ia afferents—
a case for a reverberating loop? *Neurosci Lett* 1: 147–152.

Inglis JT, Macpherson JM (1995) Bilateral labyrinthectomy in the cat: effects on the
postural response to translation. *J Neurophysiol* 73(3): 1181-1191.

Isaacson JS, Murphy GJ (2001) Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct
coupling of NMDA receptors to Ca(2+)-activated K⁺ channels. *Neuron* 31(6):
1027-1034.

Iwahori N, Nakamura K, Mameya C (1992) Differentiation of the brain stem
structures in the salamander, *Hynobius nebulosus*. *Ann Anat* 174(5): 461-466.

Jackson AW, McClellan AD (2001) Locomotor behavior initiated by chemical
microstimulation in higher locomotor centers and reticular nuclei in semi
intact preparations of larval lamprey. *Soc Neurosci Abstr* 27: 2481. Abstr.

Jackson AW, Pino FA, Wiebe ED, McClellan AD (2007) Movements and muscle
activity initiated by brain locomotor areas in semi-intact preparations from
larval lamprey. *J Neurophysiol* 97(5): 3229-3241.

Jonas P (2000) The Time Course of Signaling at Central Glutamatergic Synapses.
News Physiol Sci 15: 83-89.

- Jordan LM (1986) Initiation of locomotion from the mammalian brainstem. In:
Neurobiology of Vertebrate Locomotion, edited by Grillner S, Stein PSG,
Stuart DG, and Forssberg H. London: Macmillan, 1986, p. 21-37.
- Jordan LM (1998) Initiation of locomotion in mammals. *Ann N Y Acad Sci* 860: 83-
93. Revue.
- Kahn JA (1982) Patterns of synaptic inhibition in motoneurons and interneurons
during fictive swimming in the lamprey, as revealed by Cl⁻ injections. *J Comp
Physiol* 147: 189-194.
- Kahn JA, Roberts A (1982) Experiments on the central pattern generator for
swimming in amphibian embryos. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*
296(1081): 229-243.
- Karayannidou A, Deliagina TG, Tamarova ZA, Sirota MG, Zelenin PV, Orlovsky
GN, Beloozerova IN (2008) Influences of sensory input from the limbs on
feline corticospinal neurons during postural responses. *J Physiol* 586(1): 247-
263.
- Karayannidou A, Zelenin PV, Orlovsky GN, Deliagina TG (2007) Responses of

reticulospinal neurons in the lamprey to lateral turns. *J Neurophysiol* 97(1): 512-521.

Kasicki S, Grillner S (1986) Müller cells and other reticulospinal neurones are phasically active during fictive locomotion in the isolated nervous system of the lamprey. *Neurosci Lett* 69(3): 239-243.

Kasicki S, Grillner S, Ohta Y, Dubuc R, Brodin L (1989) Phasic modulation of reticulospinal neurones during fictive locomotion and other types of spinal motor activity in lamprey. *Brain Res.* Apr 10;484(1-2):203-16.

Katoh H, Schlotthauer K, Bers DM (2000) Transmission of information from cardiac dihydropyridine receptor to ryanodine receptor: evidence from BayK 8644 effects on resting Ca(2+) sparks. *Circ Res* 87(2): 106-111.

Kettunen P, Krieger P, Hess D, El Manira A (2002) Signaling mechanisms of metabotropic glutamate receptor 5 subtype and its endogenous role in a locomotor network. *J Neurosci* 22(5): 1868-1873.

Kiehn O (1991) Plateau potentials and active integration in the 'final common pathway' for motor behaviour. *Trends Neurosci* 14(2): 68-73. *Revue.*

Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord.

Annu Rev Neurosci 29:279-306. Revue.

Kiehn O, Harris-Warrick RM (1992) Serotonergic stretch receptors induce plateau properties in a crustacean motor neuron by a dual-conductance mechanism. *J Neurophysiol* 68(2): 485-495.

Kiehn O, Johnson BR, Raastad M (1996) Plateau properties in mammalian spinal interneurons during transmitter-induced locomotor activity. *Neuroscience* 75(1): 263-273.

Kim YI, Chandler SH (1995) NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* 74(1): 334-346.

Kinjo N, Atsuta Y, Webber M, Kyle R, Skinner RD, Garcia-Rill E (1990) Medioventral medulla-induced locomotion. *Brain Res Bull* 24(3):509-16.

Kishida R, Koyama H, Goris RC (1988) Giant lateral-line afferent terminals in the electroreceptive dorsal nucleus of lampreys. *Neurosci Res* 6(1): 83-87.

Kitchens SA, Burch J, Creazzo TL (2003) T-type Ca^{2+} current contribution to Ca^{2+} induced Ca^{2+} release in developing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 35(5): 515-523.

- Klink R, Alonso A (1997) Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 77(4): 1829-1843.
- Kotaleski JH, Lansner A, Grillner S (1999a) Neural mechanisms potentially contributing to the intersegmental phase lag in lamprey.II. Hemisegmental oscillations produced by mutually coupled excitatory neurons. *Biol Cybern* 81(4): 299-315.
- Kotaleski JH, Grillner S, Lansner A (1999b) Neural mechanisms potentially contributing to the intersegmental phase lag in lamprey.I. Segmental oscillations dependent on reciprocal inhibition. *Biol Cybern* 81(4): 317-330.
- Koyama H, Kishida R, Goris RC, Kusunoki T (1987) Organization of sensory and motor nuclei of the trigeminal nerve in lampreys. *J Comp Neurol* 264(4): 437-448.
- Koyama H, Kishida R, Goris RC, Kusunoki T (1989) Afferent and efferent projections of the VIIIth cranial nerve in the lamprey *Lampetra japonica*. *J Comp Neurol* 280(4): 663-671.
- Kozlov AK, Ullén F, Fagerstedt P, Aurell E, Lansner A, Grillner S (2002) Mechanisms for lateral turns in lamprey in response to descending unilateral commands: a modeling study. *Biol Cybern* 86(1): 1-14.

Krieger P, Büschges A, el Manira A (1999) Calcium channels involved in synaptic transmission from reticulospinal axons in lamprey. *J Neurophysiol* 81(4): 1699-1705.

Krieger P, Hellgren-Kotaleski J, Kettunen P, El Manira AJ (2000) Interaction between metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulates neuronal network activity. *J Neurosci* 20(14): 5382-5391.

Kristián T, Siesjö BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29(3): 705-718. Revue.

Kuypers HG, Maisky VA (1977) Funicular trajectories of descending brain stem pathways in cat. *Brain Res* 136(1): 159-165.

Lai YY, Siegel JM (1990) Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *J Neurosci* 10(8): 2727-2734.

Lavoie S, Drew T (2002) Discharge characteristics of neurons in the red nucleus during voluntary gait modifications: a comparison with the motor cortex. *J Neurophysiol* 88(4): 1791-1814.

- Lazarewicz JW, Rybkowski W, Sadowski M, Ziembowicz A, Alaraj M, Wegiel J, Wisniewski HM (1998) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated, calcium-induced calcium release in rat dentate gyrus/CA4 in vivo. *J Neurosci Res* 51(1): 76-84.
- Leblond H, Ménard A, Gossard JP (2000) Bulbospinal control of spinal cord pathways generating locomotor extensor activities in the cat. *J Physiol* 525 Pt 1: 225-240.
- Lee RH, Heckman CJ (1999) Enhancement of bistability in spinal motoneurons in vivo by the noradrenergic alpha1 agonist methoxamine. *J Neurophysiol* 81(5): 2164-2174.
- Lee RJ, Shaw T, Sandquist M, Partridge LD (1996) Mechanism of action of the non steroidal anti-inflammatory drug flufenamate on $[Ca^{2+}]_i$ and Ca^{2+} -activated currents in neurons. *Cell Calcium* 19(5): 431-438.
- Lee CR, Tepper JM (2007) A calcium-activated nonselective cation conductance underlies the plateau potential in rat substantia nigra GABAergic neurons. *J Neurosci* 27(24): 6531-6541.
- Leichnetz GR, Watkins L, Griffin G, Murfin R, Mayer DJ (1978) The projection from nucleus raphe magnus and other brainstem nuclei to the spinal cord in the rat: a study using the HRP blue-reaction. *Neurosci Lett* 8: 119–124.

Leonard JP, Wickelgren WO (1985) Calcium spike and calcium-dependent potassium conductance in mechanosensory neurons of the lamprey. *J Neurophysiol* 53: 171-182.

Le Ray D, Brocard F, Bourcier-Lucas C, Auclair F, Lafaille P, Dubuc R (2003) Nicotinic activation of reticulospinal cells involved in the control of swimming in lampreys. *Eur J Neurosci* 17(1): 137-148.

Lerma J, Martín del Río R (1992). Chloride transport blockers prevent N-methyl-D aspartate receptor-channel complex activation. *Mol Pharmacol* 41(2): 217-222.

Li Y, Bennett DJ (2003) Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 90(2): 857-869.

Li Z, Hatton GI (1997) Ca²⁺ release from internal stores: role in generating depolarizing after-potentials in rat supraoptic neurones. *J Physiol* 498 (Pt 2): 339-350.

Li WC, Perrins R, Walford A, Roberts A (2003) The neuronal targets for GABAergic reticulospinal inhibition that stops swimming in hatchling frog tadpoles. *J*

Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 189(1): 29-37.

Li WC, Soffe SR, Wolf E, Roberts A (2006) Persistent responses to brief stimuli: feedback excitation among brainstem neurons. *J Neurosci* 26(15): 4026-4035.

Liddell EGT, Phillips CG (1944) Pyramidal section in the cat. *Brain* 67:1-9.

Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79: 1431-1468.

Livingston CA, Leonard RB (1990) Locomotion evoked by stimulation of the brain stem in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *J Neurosci* 10(1): 194-204.

Llinás RR (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242(4886): 1654-1664. *Revue*.

Lundberg A (1971) Function of the ventral spinocerebellar tract. A new hypothesis. *Exp Brain Res* 12(3): 317-330.

Lundberg A, Oscarsson O (1960) Functional organization of the dorsal spino cerebellar tract in the cat. VII. Identification of units by antidromic activation from the cerebellar cortex with recognition of five functional subdivisions. *Acta Physiol Scand* 50: 356-374.

MacDonald JF, Porietis AV, Wojtowicz JM (1982) L-aspartic acid induces a region of negative slope conductance in the current-voltage relationship of cultured spinal neurons. *Brain Res* 237: 248-253.

MacLean JN, Schmidt BJ, Hochman S (1997) NMDA receptor activation triggers voltage oscillations, plateau potentials and bursting in neonatal rat lumbar motoneurons in vitro. *Eur J Neurosci* 9(12): 2702-2011.

Magnuson DS, Schramm MJ, MacLean JN (1995) Long-duration, frequency dependent motor responses evoked by ventrolateral funiculus stimulation in the neonatal rat spinal cord. *Neurosci Lett* 192(2): 97-100.

Major G, Tank D (2004) Persistent neural activity: prevalence and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 14(6): 675-684. Revue.

Makarewicz D, Salinska E, Puka-Sundvall M, Alaraj M, Ziembowicz A, Skangiel-Kramska J, Jablonska B, Bona E, Hagberg H, Lazarewicz JW (2000) NMDA-induced ^{45}Ca release in the dentate gyrus of newborn rats: in vivo microdialysis study. *Neurochem Int.* Aug-Sep;37(2-3):307-16.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44(1): 5-21. Revue.

Marder E (1991) Plateaus in time. *Curr Biol* 1(5): 326-327.

Marder E, Calabrese RL (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation
Physiol Rev 76(3): 687-717.

Marlinskii VV, Voitenko LP (1992) Participation of the medial reticular formation of
the medulla oblongata in the supraspinal control of locomotor and postural
activities in the guinea pig. *Neurosci Behav Physiol* 1992 22(4): 336-342.

Martin RJ (1979) A study of the morphology of the large reticulospinal neurons of
the lamprey ammocoete by intracellular injection of Procion yellow. *Brain
Behav Evol* 16(1): 1-18.

Martin AR, Wickelgren WO (1971) Sensory cells in the spinal cord of the sea
lamprey. *J. Physiol* 212: 65-83.

Masdeu JC, Van Heertum RL, Kleiman A, Anselmi G, Kissane K, Horng J, Yudd A,
Luck D, Grundman M (1994) Early single-photon emission computed
tomography in mild head trauma. A controlled study. *J Neuroimaging* 4(4):
177-181.

Matsushima T, Grillner S (1992) Neural mechanisms of intersegmental coordination

in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord. *J Neurophysiol* 67(2): 373-388.

Matsushima T, Tegnér J, Hill RH, Grillner S (1993) GABAB receptor activation causes a depression of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ currents, postinhibitory rebound, and postspike afterhyperpolarization in lamprey neurons. *J Neurophysiol* 70(6): 2606-2619.

McClellan AD (1984) Descending control and sensory gating of 'fictive' swimming and turning responses elicited in an in vitro preparation of the lamprey brainstem/spinal cord. *Brain Res* 302(1): 151-162.

McClellan AD (1986) Command systems for initiating locomotion in fish and amphibians: parallels to initiation systems in mammals. In: *Neurobiology of Vertebrate Locomotion: Wenner-Gren International Symposium Series*, edited by Grillner S, Stein PSG, Stuart DG, Forssberg H, and Herman RM. London: Macmillan, 1986, vol. 45, p. 3-20.

McClellan AD (1987) In vitro CNS preparations: unique approaches to the study of command and pattern generation systems in motor control. *J Neurosci Methods* 21(2-4): 251-264. Review.

McClellan AD (1988) Brainstem command systems for locomotion in the lamprey:

localization of descending pathways in the spinal cord. *Brain Res* 457(2): 338-349.

McClellan AD, Grillner S (1983) Initiation and sensory gating of 'fictive' swimming and withdrawal responses in an in vitro preparation of the lamprey spinal cord. *Brain Res* 269(2): 237-250.

McClellan AD, Grillner S (1984) Activation of 'fictive swimming' by electrical microstimulation of brainstem locomotor regions in an in vitro preparation of the lamprey central nervous system. *Brain Res* 300(2): 357-361.

McClellan AD, Kovalenko MO, Benes JA, Schulz DJ (2008) Spinal cord injury induces changes in electrophysiological properties and ion channel expression of reticulospinal neurons in larval lamprey. *J Neurosci* 28(3): 650-659.

McClellan AD, Sigvardt KA (1988) Features of entrainment of spinal pattern generators for locomotor activity in the lamprey spinal cord. *J Neurosci* 8(1): 133-145.

McLean DL, Fan J, Higashijima S, Hale ME, Fetcho JR (2007) A topographic map of recruitment in spinal cord. *Nature* 446(7131): 71-75.

Mejia-Gervacio S, Hounsgaard J, Diaz-Muñoz M (2004) Roles of ryanodine and

inositol triphosphate receptors in regulation of plateau potentials in turtle spinal motoneurons. *Neuroscience* 123(1): 123-130.

Meldolesi J (2001) Rapidly exchanging Ca²⁺ stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Prog Neurobiol* 65(3): 309-338. *Revue*.

Ménard A, Grillner S (2008) The diencephalic locomotor region in the lamprey: afferents and efferent control. *J Neurophysiol* Jul 9. [Epub ahead of print]
PMID: 18596192

Ménard A, Auclair F, Bourcier-Lucas C, Grillner S, Dubuc R (2007) Descending GABAergic projections to the mesencephalic locomotor region in the lamprey *Petromyzon marinus*. *J Comp Neurol* 501(2): 260-273.

Mentis GZ, Alvarez FJ, Bonnot A, Richards DS, Gonzalez-Forero D, Zerda R, O'Donovan MJ (2005) Noncholinergic excitatory actions of motoneurons in the neonatal mammalian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 37: 7344-7349.

Merriam LA, Scornik FS, Parsons RL (1999) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release activates spontaneous miniature outward currents (SMOCs) in parasympathetic cardiac neurons. *J Neurophysiol* 82(2): 540-550.

- Milner KL, Mogenson GJ (1988) Electrical and chemical activation of the mesencephalic and subthalamic locomotor regions in freely moving rats. *Brain Res* 452(1-2): 273-285.
- Mills JD, Pitman RM (1997) Electrical properties of a cockroach motor neuron soma depend on different characteristics of individual Ca components. *J Neurophysiol* 78(5): 2455-2466.
- Moore LE, Hill RH, Grillner S (1986) Voltage-clamp analysis of NMDA induced oscillating spinal neurons. *Acta Physiol. Stand* 128: 20A.
- Mori S, Matsui T, Kuze B, Asanome M, Nakajima K, Matsuyama K (1998) Cerebellar-induced locomotion: reticulospinal control of spinal rhythm generating mechanism in cats. *Ann N Y Acad Sci* 860: 94-105. *Revue.*
- Mori S, Matsui T, Kuze B, Asanome M, Nakajima K, Matsuyama K (1999) Stimulation of a restricted region in the midline cerebellar white matter evokes coordinated quadrupedal locomotion in the decerebrate cat. *J Neurophysiol* 82(1): 290-300.
- Mori S, Sakamoto T, Ohta Y, Takakusaki K, Matsuyama K (1989) Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Res* 505(1): 66-74.

- Morrisset V, Nagy F (1996) Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 76(4): 2794-2798.
- Morrisset V, Nagy F (1999) Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci* 19(17): 7309-7316.
- Morton-Jones RT, Cannell MB, Housley GD (2008) Ca²⁺ entry via AMPA-type glutamate receptors triggers Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from ryanodine receptors in rat spiral ganglion neurons. *Cell Calcium* 43(4): 356-366.
- Nagy F, Dickinson PS, Moulins M (1988) Control by an identified modulatory neuron of the sequential expression of plateau properties of, and synaptic inputs to, a neuron in a central pattern generator. *J Neurosci* 8(8): 2875-2886.
- Navarrete, R., Slawinska, U. et Vrbova, G. (2002). "Electromyographic activity patterns of ankle flexor and extensor muscles during spontaneous and L-DOPA-induced locomotion in freely moving neonatal rats." *Exp Neurol* 173: 256-265.
- Newman DB (1985a) Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. I. Medullary nuclei. *J Hirnforsch* 26(2): 187-226.

- Newman DB (1985b) Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by their neuronal morphology. II. Pontine and mesencephalic nuclei. *J Hirnforsch* 26(4): 385-418.
- Ngo-Anh TJ, Bloodgood BL, Lin M, Sabatini BL, Maylie J, Adelman JP (2005) SK channels and NMDA receptors form a Ca²⁺-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat Neurosci* 8(5): 642-649.
- Nieuwenhuys R (1972) Topological analysis of the brain stem of the lamprey *Lampetra fluviatilis*. *J Comp Neurol* 145(2): 165-177.
- Nissanov J, Eaton RC, DiDomenico R (1990) The motor output of the Mauthner cell, a reticulospinal command neuron. *Brain Res* 517(1-2): 88-98.
- Noga BR, Kriellaars DJ, Jordan LM (1991) The effect of selective brainstem or spinal cord lesions on treadmill locomotion evoked by stimulation of the mesencephalic or pontomedullary locomotor regions. *J Neurosci* 11(6): 1691-1700.
- Noga BR, Kettler J, Jordan LM (1988) Locomotion produced in mesencephalic cats by injections of putative transmitter substances and antagonists into the medial reticular formation and the pontomedullary locomotor strip.

J Neurosci 8(6): 2074-2086.

Northcutt RG (1979) Experimental determination of the primary trigeminal projections in lampreys. Brain Res 163(2): 323-327.

Nyberg-Hansen R (1965) Sites and mode of termination of reticulo-spinal fibers in the cat. An experimental study with silver impregnation methods. J Comp Neurol 124:71-99.

O'Malley DM, Kao YH, Fetcho JR (1996) Imaging the functional organization of zebrafish hindbrain segments during escape behaviors. Neuron 17(6): 1145-1155.

Ohta Y, Grillner S (1989) Monosynaptic excitatory amino acid transmission from the posterior rhombencephalic reticular nucleus to spinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey. J Neurophysiol 62(5): 1079-1089.

Okamoto H, Hirate Y, Ando H (2004) Systematic identification of factors in zebrafish regulating the early midbrain and cerebellar development by ordered differential display and caged mRNA technology. Front Biosci 9:93-9. Revue.

Orlovsky GN (1969) Spontaneous and induced locomotion in the thalamic cat. Biophysics 14: 1154-1162.

- Orlovsky GN (1970a) Work of the reticulo-spinal neurons during locomotion. *Biophysics* 15: 761-771.
- Orlovsky GN (1970b) Influence of the cerebellum on the reticulo-spinal neurones during locomotion. *Biophysics* 15: 928-936.
- Orlovsky GN (1972a) The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion. *Brain Res* 40(2): 359-371.
- Orlovsky GN (1972b) Activity of vestibulospinal neurons during locomotion. *Brain Res* 46: 85-98.
- Orlovsky GN (1972c) Activity of rubrospinal neurons during locomotion. *Brain Res* 46: 99-112.
- Orlovsky GN, Deliagina TD, Grillner S (1999) *Neuronal Control of Locomotion*. New-York: Oxford Univ. Press, 1999.
- Orlovsky GN, Deliagina TG, Wallén P (1992) Vestibular control of swimming in lamprey. I. Responses of reticulospinal neurons to roll and pitch. *Exp Brain Res* 90(3):479-488.

- Orlovsky GN, Pavlova GA (1972) Response of Deiters' neurons to tilt during locomotion. *Brain Res* 42(1): 212-214.
- Orlovski GN, Shik ML (1976) Control of locomotion: a neuro-physiological analysis of the cat locomotor system. *Int Rev Physiol Neurophysiol* II. 10: 281-317.
- Overton PG, Clark D (1997) Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25(3): 312-334. *Revue*.
- Paggett KC, Jackson AW, McClellan AD (2004) Organization of higher-order brain areas that initiate locomotor activity in larval lamprey. *Neuroscience* 125(1): 25-33.
- Parker D, Grillner S (2000) The activity-dependent plasticity of segmental and intersegmental synaptic connections in the lamprey spinal cord. *Eur J Neurosci* 12(6): 2135-2146
- Parker SM, Sinnamon HM (1983) Forward locomotion elicited by electrical stimulation in the diencephalon and mesencephalon of the awake rat. *Physiol Behav* 31(5): 581-587.
- Partridge LD, Valenzuela CF (2000) Block of hippocampal CAN channels by flufenamate. *Brain Res* 867(1-2): 143-148.

- Partridge LD, Müller TH, Swandulla D (1994) Calcium-activated non-selective channels in the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 19(3): 319-325. Revue.
- Pearson KG, Rossignol S (1991) Fictive motor patterns in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 66: 1874-1887.
- Peterson BW, Anderson ME, Filion M (1974) Responses of ponto-medullary reticular neurons to cortical, tectal and cutaneous stimuli. *Exp Brain Res* 21(1): 19-44.
- Perrier JF, Delgado-Lezama R (2005) Synaptic release of serotonin induced by stimulation of the raphe nucleus promotes plateau potentials in spinal motoneurons of the adult turtle. *J Neurosci* 25(35): 7993-7999.
- Perrier JF, Hounsgaard J (1999) Ca(2+)-activated nonselective cationic current (I(CAN)) in turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 82(2): 730-735.
- Perrier JF, Mejia-Gervacio S, Hounsgaard J (2000) Facilitation of plateau potentials in turtle motoneurons by a pathway dependent on calcium and calmodulin. *J Physiol* 528 Pt 1: 107-113.
- Perrier JF, Tresch MC (2005) Recruitment of motor neuronal persistent inward

currents shapes withdrawal reflexes in the frog. *J Physiol* 562(Pt 2): 507-520.

Perrins R, Roberts A (1995a) Cholinergic and electrical motoneuron-to-motoneuron synapses contribute to on-cycle excitation during swimming in *Xenopus* embryos. *J Neurophysiol* 73(3):1005-1012.

Perrins R, Roberts A (1995b) Cholinergic contribution to excitation in a spinal locomotor central pattern generator in *Xenopus* embryos. *J Neurophysiol* 73(3):1013-1019.

Perrins R, Walford A, Roberts A (2002) Sensory activation and role of inhibitory reticulospinal neurons that stop swimming in hatchling frog tadpoles. *J Neurosci* 22(10): 4229-4240.

Peterson BW, Maunz RA, Pitts NG, Mackel RG (1975) Patterns of projection and branching of reticulospinal neurons. *Exp Brain Res* 23(4): 333-351.

Pflieger JF, Dubuc R (2004) Vestibulo-reticular projections in adult lamprey: their role in locomotion. *Neuroscience* 129(3): 817-829.

Philippson M (1905). L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux. *Trav Lab Physiol Inst Solvay* 7: 1-208.

- Pierre J, Repérant J, Ward R, Vesselkin NP, Rio JP, Miceli D, Kratskin I (1992) The serotonergic system of the brain of the lamprey, *Lampetra fluviatilis*: an evolutionary perspective. *J Chem Neuroanat* 5(3): 195-219.
- Pombal MA, El Manira A, Grillner S (1997a) Organization of the lamprey striatum – transmitters and projections. *Brain Res* 766(1-2): 249-254.
- Pombal MA, El Manira A, Grillner S (1997b) Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: a combined tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386(1): 71-91.
- Poon MLT (1980) Induction of swimming in lamprey by L-DOPA and amino acids. *J comp Physiol* 136 : 337-344.
- Protasi F, Paolini C, Nakai J, Beam KG, Franzini-Armstrong C, Allen PD (2002) Multiple regions of RyR1 mediate functional and structural interactions with alpha(1S)-dihydropyridine receptors in skeletal muscle. *Biophys J* 83(6): 3230-3244.
- Rekling JC, Feldman JL (1997) Calcium-dependent plateau potentials in rostral ambiguous neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* 78(5): 2483-2492.

Riout-Pedotti MS (1997) Intrinsic NMDA-induced oscillations in motoneurons of an adult vertebrate spinal cord are masked by inhibition. *J Neurophysiol* 77(2): 717-730.

Roberts A (1980) The function and role of two types of mechanoreceptive “free” nerve endings in the head skin of amphibian embryos. *J comp Physiol A* 135: 341-348.

Roberts A (2000) Early functional organization of spinal neurons in developing lower vertebrates. *Brain Res Bull* 53(5): 585-593. Revue.

Roberts A, Alford ST (1986) Descending projections and excitation during fictive swimming in *Xenopus* embryos: neuroanatomy and lesion experiments. *J Comp Neurol* 250(2): 253-261.

Roberts A, Blight AR (1975) Anatomy, physiology and behavioural role of sensory nerve endings in the cement gland of embryonic *Xenopus*. *Proc R Soc B* 192: 111-127.

Roberts A, Dale N, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1987) The early development of neurons with GABA immunoreactivity in the CNS of *Xenopus laevis* embryos. *J Comp Neurol* 261(3): 435-449.

- Roberts A, Li WC, Soffe SR, Wolf E (2008a) Origin of excitatory drive to a spinal locomotor network. *Brain Res Rev* 57(1): 22-28. Revue.
- Roberts A, Li WC, Soffe SR (2008b) Roles for inhibition: studies on networks controlling swimming in young frog tadpoles. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 194(2): 185-193. Revue.
- Ronan M (1988) Anatomical and physiological evidence for electroreception in larval lampreys. *Brain Res* 448(1):173-177.
- Ronan M (1989) Origins of the descending spinal projections in petromyzontid and myxinoid agnathans. *J Comp Neurol* 281(1): 54-68.
- Ronan M, Northcutt RG (1990) Projections ascending from the spinal cord to the brain in petromyzontid and myxinoid agnathans. *J Comp Neurol* 291(4): 491-508.
- Rossignol S (1996) Neural control of stereotypic limb movements. In: *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc. 1996, sect.12, p. 173-216.
- Rossignol S, Bélanger M, Chau C, Giroux N, Brustein E, Bouyer L, Grenier CA, Drew T, Barbeau H, et Reader T. 2000. The spinal cat. In: *Neurobiology of*

Spinal Cord Injury, édité par Kalb RG et Strittmatter SM. Totowa, NJ: Humana, p. 57-87.

Rossignol S, Brustein E, Bouyer L, Barthélemy D, Langlet C, Leblond H (2004a) Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Can J Physiol Pharmacol* 82(8-9): 617-627. Revue.

Rossignol S, Bouyer L, Langlet C, Barthélemy D, Chau C, Giroux N, Brustein E, Marcoux J, Leblond H, Reader TA (2004b) Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat. *Prog Brain Res* 143: 163-172. Revue.

Rossignol S, Dubuc R, Gossard JP (2006) Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86 p. 89–154.

Rovainen CM (1967a) Physiological and anatomical studies on large neurons of central nervous system of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). I. Müller and Mauthner cells. *J Neurophysiol* 30(5): 1000-1023.

Rovainen CM (1967b) Physiological and anatomical studies on large neurons of central nervous system of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). II. Dorsal cells and giant interneurons. *J Neurophysiol* 30(5):1024-1042.

Rovainen CM (1974a) Synaptic interactions of reticulospinal neurons and nerve cells

in the spinal cord of the sea lamprey. *J Comp Neurol* 154(2): 207-223.

Rovainen CM (1974b) Synaptic interactions of identified nerve cells in the spinal cord of the sea lamprey. *J Comp Neurol*. 1974 Mar 15;154(2):189-206.

Rovainen CM (1976) Regeneration of Müller and Mauthner axons after spinal transection in larval lampreys. *J Comp Neurol* 168(4): 545-554.

Rovainen CM (1978) Müller cells, "Mauthner" cells, and other identified reticulospinal neurons in the lamprey. In: *Neurobiology of the Mauthner cell*. Faber DS and Korn H (Eds). New-York: Raven Press p. 245-269

Rovainen CM (1979) Neurobiology of lampreys. *Physiol Rev* 59(4):1007-1077.
Revue.

Rovainen CM (1982) Neurophysiology. In: *Hardisty MW, Potter IC (Eds). The Biology of Lampreys*. Academic Press, New-York, p. 1-136.

Rovainen CM, Johnson PA, Roach EA, Mankovsky JA (1973) Projections of individual axons in lamprey spinal cord determined by tracings through serial sections. *J Comp Neurol* 149(2): 193-202.

Russell DF, Hartline DK (1978) Bursting neural networks: a reexamination. *Science*

200(4340): 453-456.

Russell DF, Wallen P (1980) On the pattern generator for fictive swimming in the lamprey, *Ichthyomyzon unicuspis*. Acta Physiol Scand 108: 9A.

Russell, D. F., and P. Wallen (1983) On the control of myotomal motoneurons during “fictive swimming” in the lamprey spinal cord *in vitro*. Acta Physiol Scand 117: 161-170.

Russo RE, Hounsgaard J (1996) Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an *in vitro* preparation of the turtle spinal cord. J Physiol 493 (Pt 1): 39-54.

Russo RE, Nagy F, Hounsgaard J (1997) Modulation of plateau properties in dorsal horn neurones in a slice preparation of the turtle spinal cord. J Physiol 499 (Pt 2): 459-474.

Russo RE, Nagy F, Hounsgaard J (1998) Inhibitory control of plateau properties in dorsal horn neurones in the turtle spinal cord *in vitro*. J Physiol 506 (Pt 3): 795-808.

Sah P, Dulhunty A, Junankar P, Stanhope C (1994) Subcellular distribution of

ryanodine receptor-like and calcium ATPase-like immunoreactivity in brainstem and cerebellar neurones of rat and guinea pig. *Neurosci Lett* 166(2):143-148.

Sah P, Francis K, McLachlan EM, Junankar P (1993) Distribution of ryanodine receptor-like immunoreactivity in mammalian central nervous system is consistent with its role in calcium-induced calcium release. *Neuroscience* 54(1): 157-165.

Saitoh K, Ménard A, Grillner S (2007) Tectal control of locomotion, steering, and eye movements in lamprey. *J Neurophysiol* 97(4): 3093-3108.

Sandler VM, Puil E, Schwarz DW (1998) Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil. *Neuroscience* 83(3):891-904.

Sato H, Katoh H, Velez P, Fill M, Bers DM (1998) Bay K 8644 increases resting Ca^{2+} spark frequency in ferret ventricular myocytes independent of Ca influx: contrast with caffeine and ryanodine effects. *Circ Res* 83(12): 1192-1204.

Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78(1): 3-13. *Revue*.

Schmidt BJ, Hochman S, MacLean JN (1998) NMDA receptor-mediated oscillatory properties: potential role in rhythm generation in the mammalian spinal cord.

Ann N Y Acad Sci 860: 189-202. Review.

Schotland J, Shupliakov O, Wikström M, Brodin L, Srinivasan M, You ZB, Herrera

Marschitz M, Zhang W, Hökfelt T, Grillner S (1995) Control of lamprey

locomotor neurons by colocalized monoamine transmitters. Nature 374(6519):

266-268.

Schwanzel-Fukuda M, Morrell JI, Pfaff DW (1984) Localization of forebrain neurons

which project directly to the medulla and spinal cord of the rat by retrograde

tracing with wheat germ agglutinin. J Comp Neurol 226(1): 1-20.

Schwindt P, Crill WE (1977) A persistent negative resistance in cat lumbar

motoneurons. Brain Res 120(1): 173-178.

Schwindt P, Crill W (1980) Role of a persistent inward current in motoneuron

bursting during spinal seizures. J Neurophysiol 43(5): 1296-1318.

Shaw T, Lee RJ, Partridge LD (1995) Action of diphenylamine carboxylate

derivatives, a family of non-steroidal anti-inflammatory drugs, on $[Ca^{2+}]_i$ and

Ca^{2+} -activated channels in neurons. Neurosci Lett 190:121-124.

Sherrington CS (1906) Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol* 34(1-2): 1-50.

Sherrington CS (1910a) Remarks on the reflex mechanism of the step. *Brain* 33: 1-25.

Sherrington CS (1910b) Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J Physiol* 40(1-2): 28-121.

Shik ML, Orlovsky GN (1976) Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol Rev* 56(3):465-501. Revue.

Shick ML, Severin FV, Orlovsky GN (1966) Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics* 11: 756-765.

Shimamura M, Kogure I, Fuwa T (1984) Role of joint afferents in relation to the initiation of forelimb stepping in thalamic cats. *Brain Res* 297(2): 225-334.

Shimamura M, Tanaka I, Fuwa T (1990) Comparison between spino-bulbo-spinal and propriospinal reflexes in thalamic cats during stepping. *Neurosci Res* 7(4): 358-368.

Sholomenko GN, Funk GD, Steeves JD (1991a) Avian locomotion activated by brainstem infusion of neurotransmitter agonists and antagonists. I.

Acetylcholine excitatory amino acids and substance P. *Exp Brain Res* 85(3): 659-673.

Sholomenko GN, Funk GD, Steeves JD (1991b) Avian locomotion activated by brainstem infusion of neurotransmitter agonists and antagonists. II. Gamma Aminobutyric acid. *Exp Brain Res* 85(3): 674-681.

Siemer C, Gögelein H (1992) Activation of nonselective cation channels in the basolateral membrane of rat distal colon crypt cells by prostaglandin E2. *Pflugers Arch* 420(3-4): 319-328.

Sigvardt KA, Grillner S, Wallén P, Van Dongen PA (1985) Activation of NMDA receptors elicits fictive locomotion and bistable membrane properties in the lamprey spinal cord. *Brain Res* 336(2): 390-395.

Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR (1993) Involvement of intracellular stores in the Ca²⁺ responses to N-Methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 61(2): 760-763.

Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR (1995) Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci* 18(7): 299-306. Review.

Sinnamon HM (1993) Preoptic and hypothalamic neurons and the initiation of

locomotion in the anesthetized rat. *Prog Neurobiol* 41(3): 323-344.

Revue.

Sinning C, Watzer B, De Petrocellis L, Di Marzo V, Imming P. Dopamides, vanillylamides, ethanolamides, and arachidonic acid amides of anti-inflammatory and analgesic drug substances as TRPV1 ligands (2008). *ChemMedChem* 3(12): 1956-1964.

Sipido KR, Stankovicova T, Flameng W, Vanhaecke J, Verdonck F (1998) Frequency dependence of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in human ventricular myocytes from end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 37(2): 478-488.

Sipilä ST, Huttu K, Voipio J, Kaila K (2006) Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na⁺ current and terminated by a slow Ca²⁺-activated K⁺ current. *Eur J Neurosci* 23(9): 2330-2338.

Sirota MG, Di Prisco GV, Dubuc R (2000) Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur J Neurosci* 12(11): 4081-4092.

Skinner RD, Garcia-Rill E (1984) The mesencephalic locomotor region (MLR) in the

rat. Brain Res 323(2): 385-389.

Sirota MG, Shik ML (1973) [Locomotion of the cat on stimulation of the mesencephalon] Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova 59(9): 1314-1321.

Smetana RW, Alford S, Dubuc R (2007) Muscarinic receptor activation elicits sustained, recurring depolarizations in reticulospinal neurons. J Neurophysiol 97(5): 3181-3192.

Smith M, Perrier JF (2006) Intrinsic properties shape the firing pattern of ventral horn interneurons from the spinal cord of the adult turtle. J Neurophysiol 96(5): 2670- 2677.

Smith MT, Thor H, Orrenius S (1981) Toxic injury to isolated hepatocytes is not dependent on extracellular calcium. Science 213:1257–1259.

Soffe SR, Zhao FY, Roberts A (2001) Functional projection distances of spinal interneurons mediating reciprocal inhibition during swimming in *Xenopus* tadpoles. Eur J Neurosci 13(3): 617-627.

Stapley PJ, Ting LH, Hulliger M, Macpherson JM (2002) Automatic postural responses are delayed by pyridoxine-induced somatosensory loss. J Neurosci

22(14): 5803-5807.

Steeves JD, Jordan LM (1980) Localization of a descending pathway in the spinal cord which is necessary for controlled treadmill locomotion. *Neurosci Lett* 20(3): 283-288.

Steeves JD, Sholomenko GN, Webster DM (1987) Stimulation of the pontomedullary reticular formation initiates locomotion in decerebrate birds. *Brain Res* 401(2): 205-212.

Stein PS, Victor JC, Field EC, Currie SN (1995) Bilateral control of hindlimb scratching in the spinal turtle: contralateral spinal circuitry contributes to the normal ipsilateral motor pattern of fictive rostral scratching. *J Neurosci.* 1995 15(6): 4343-4355.

Steinbusch HW, Verhofstad AA, Penke B, Varga J, Joosten HW (1981) Immunohistochemical characterization of monoamine-containing neurons in the central nervous system by antibodies to serotonin and noradrenalin. A study in the rat and the lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Acta Histochem Suppl* 24: 107-122.

Straka H, Baker R, Gilland E (2001) Rhombomeric organization of vestibular pathways in larval frogs. *J Comp Neurol* 437(1): 42-55.

- Svirskis G, Hounsgaard J (1997) Depolarization-induced facilitation of a plateau generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord. *J Neurophysiol* 78(3): 1740-1742.
- Swain GP, Ayers J, Selzer ME (1995) Metamorphosis of spinal-projecting neurons in the brain of the sea lamprey during transformation of the larva to adult: normal anatomy and response to axotomy. *J Comp Neurol* 362(4): 453-467.
- Swain GP, Snedeker JA, Ayers J, Selzer ME (1993) Cytoarchitecture of spinal projecting neurons in the brain of the larval sea lamprey. *J Comp Neurol* 336(2): 194-210.
- Swensen AM, Bean BP (2003) Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons. *J Neurosci* 23(29): 9650-9663.
- Takakusaki K, Saitoh K, Harada H, Kashiwayanagi M (2004) Role of basal ganglia brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neurosci Res* 50(2): 137-151. Review.
- Tanabe M, Gähwiler BH, Gerber U (1998) L-Type Ca²⁺ channels mediate the slow Ca²⁺-dependent afterhyperpolarization current in rat CA3 pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol* 80(5): 2268-2273.

- Tang D, Selzer ME (1979) Projections of lamprey spinal neurons determined by the retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 188(4): 629-645.
- Tell F, Jean A (1993) Ionic basis for endogenous rhythmic patterns induced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors in neurons of the rat nucleus tractus solitarius. *J Neurophysiol* 70(6): 2379-2390.
- ten Donkelaar HJ, de Boer-van Huizen R (1982) Observations on the development of descending pathways from the brain stem to the spinal cord in the clawed toad *Xenopus laevis*. *Anat Embryol (Berl)* 163(4): 461-473.
- Teräväinen H (1971) Anatomical and physiological studies on muscles of lamprey. *J Neurophysiol* 34(6): 954-973.
- Teräväinen H, Rovainen CM (1971) Electrical activity of myotomal muscle fibers, motoneurons, and sensory dorsal cells during spinal reflexes in lampreys. *J Neurophysiol* 34(6): 999-1009.
- Thompson RH, Ménard A, Pombal M, Grillner S (2008) Forebrain dopamine depletion impairs motor behavior in lamprey. *Eur J Neurosci* 27(6): 1452-1460.

- Thorn P, Petersen OH (1993) Nonselective cation channels in exocrine gland cells. EXS 66: 185-200. Revue.
- Toescu EC (1999) Apoptosis and cell death in neuronal cells: where does calcium fit in. Cell Calcium 24: 387-403.
- Trendelenberg W (1911) Untersuchungen über reizlose vorübergehende Aussaltung am Zentralnervensystem. III. Die extermitäten Region der Grosshirnrinde. Pflügers Arch 137: 515-544.
- Tretjakoff D (1909) Das Nervensystem von Ammocoetes I. Das Rückenmark. Arch mikrosk Anat Entwmech 73: 607-680.
- Turrigiano G, Abbott LF, Marder E (1994) Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. Science 264(5161): 974-977.
- Ullén F, Deliagina T, Orlovsky G, Grillner S (1995a) Spatial orientation in the lamprey. I. Control of pitch and roll. J Exp Biol 198(Pt 3): 665-673.
- Ullén F, Deliagina T, Orlovsky G, Grillner S (1995b) Spatial orientation in the lamprey. II. Visual influence on orientation during locomotion and in the attached state. J Exp Biol 198(Pt 3): 675-681.

Ullén F, Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S (1997) Visual pathways for postural control and negative phototaxis in lamprey. *J Neurophysiol* 78(2): 960-976.

Vaughan CL (2003) Theories of bipedal walking: an odyssey. *J Biomech* 36(4): 513-23. Revue.

Verkhatsky A (2002) The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium* 32(5-6): 393-404. Revue.

Viala G, Buser P (1969). Activités locomotrices rythmiques stéréotypées chez le lapin sous anesthésie légère. Etude de leur caractéristiques spéciales. *Exp Brain Res* 8(4): 346-63.

Viala G et Buser P (1974) Inhibition des activités spinales à caractère locomoteur par une modalité particulière de stimulation somatique chez le lapin. *Exp Brain Res* 21(3): 275-284.

Viala G, Orsal D, Buser P (1978) Cutaneous fiber groups involved in the inhibition of fictive locomotion in the rabbit. *Exp Brain Res* 33(2): 257-267.

Viana Di Prisco G, Boutin T, Petropoulos D, Brocard F, Dubuc R (2005) The

trigeminal sensory relay to reticulospinal neurones in lampreys. *Neuroscience* 131(2): 535-546.

Viana Di Prisco GV, Dubuc R, Grillner S (1994) 5-HT innervation of reticulospinal neurons and other brainstem structures in lamprey. *J Comp Neurol* 342(1): 23-34.

Viana Di Prisco G, Dubuc R, Wallén P, Grillner S (1992) 5-Hydroxytryptamine modulates spike frequency regulation in reticulospinal neurons involved in the control of locomotion in lamprey. *Neurosci Lett* 134(2): 279-283.

Viana Di Prisco G, Ohta Y, Bongianini F, Grillner S, Dubuc R (1995) Trigeminal inputs to reticulospinal neurones in lampreys are mediated by excitatory and inhibitory amino acids. *Brain Res* 695(1): 76-80.

Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Le Ray D, Robitaille R, Dubuc R (2000) A cellular mechanism for the transformation of a sensory input into a motor command. *J Neurosci* 20(21): 8169-8176.

Viana Di Prisco G, Pearlstein E, Robitaille R, Dubuc R (1997) Role of sensory evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science* 278(5340): 1122-1125.

Viana Di Prisco G, Wallén P, Grillner S (1990) Synaptic effects of intraspinal stretch receptor neurons mediating movement-related feedback during locomotion. *Brain Res* 530(1): 161-166.

Vinay L, Grillner S (1993) The spino-reticulo-spinal loop can slow down the NMDA activated spinal locomotor network in lamprey. *Neuroreport* 4(6): 609-612.

Vinay L, Bongiani F, Ohta Y, Grillner S, Dubuc R (1998a) Spinal inputs from lateral columns to reticulospinal neurons in lampreys. *Brain Res* 808(2): 279-293.

Vinay L, Bussi eres N, Shupliakov O, Dubuc R, Grillner S (1998b) Anatomical study of spinobulbar neurons in lampreys. *J Comp Neurol* 397(4): 475-492.

Vinay L, Padel Y (1990) Spatio-temporal organization of the somesthetic projections in the red nucleus transmitted through the spino-rubral pathway in the cat. *Exp Brain Res* 79(2): 412-426.

Vinay L, Barthe JY, Grillner S (1996) Central modulation of stretch receptor neurons during fictive locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* 76(2): 1224-1235.

Vinay L, Padel Y, Bourbonnais D, Steffens H (1993) An ascending spinal pathway transmitting a central rhythmic pattern to the magnocellular red nucleus in the

cat. Exp Brain Res 97(1): 61-70.

Wannier T, Orlovsky G, Grillner S (1995) Reticulospinal neurones provide monosynaptic glycinergic inhibition of spinal neurones in lamprey. Neuroreport 6(12): 1597-1600.

Wannier T, Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S (1998) Differential effects of the reticulospinal system on locomotion in lamprey. J Neurophysiol 80(1): 103-112.

Wallén P, Grillner S (1985) The effect of current passage on N-methyl-D-aspartate induced, tetrodotoxin-resistant membrane potential oscillations in lamprey neurons active during locomotion. Neurosci Lett 56(2): 87-93.

Wallén P, Grillner S (1987) N-methyl-D-aspartate receptor-induced, inherent oscillatory activity in neurons active during fictive locomotion in the lamprey. J Neurosci 7(9): 2745-2755.

Wallén P, Lansner A (1983) Are the motoneurons part of the central network generating the swimming rhythm in lamprey? Acta Physiol Scand 118: 6A.

Wallén P, Lansner A (1984) Do the motoneurons constitute a part of the spinal

network generating the swimming rhythm in the lamprey? *J Exp Biol* 113: 493-497.

Wallén P, Williams TL (1984) Fictive locomotion in the lamprey spinal cord in vitro compared with swimming in the intact and spinal animal. *J Physiol* 347: 225-239.

Wallén P, Grillner S, Feldman JL, Bergelt S (1985) Dorsal and ventral myotome motoneurons and their input during fictive locomotion in lamprey. *J Neurosci* 5(3): 654-661.

Wang D, Grillner S, Wallén P (2006) Effects of flufenamic acid on fictive locomotion, plateau potentials, calcium channels and NMDA receptors in the lamprey spinal cord. *Neuropharmacology* 51(6): 1038-1046.

Wang J, Akaike T, Sokabe M (1999) Spatiotemporal properties of neural activity propagation from the subicular complex to the posterior cingulate cortex in rat brain slices detected by the optical recording technique. *Jpn J Physiol* 49(5): 445-455.

Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H (2001) Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature* 410(6828): 592-596.

- Watanabe A, Obara S, Akiyama T, Yumoto K (1967) Electrical properties of the pacemaker neurons in the heart ganglion of a stomatopod, *Squilla oratoria*. *J Gen Physiol* 50(4): 813-838.
- Webster DM, Steeves JD (1991) Funicular organization of avian brainstem-spinal projections. *J Comp Neurol* 312(3):467-476.
- Whelan PJ (1996) Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog Neurobiol* 49(5): 481-515. Review.
- Whiting HP (1948) Nervous structure of the spinal cord of the young larval brook lamprey. *Q J Microsc Sci* 89(Pt. 4): 359-383.
- Whiting HP (1957) Mauthner Neurones in Young Larval Lampreys (*Lampetra* spp.). *Quart J Micro Sci* 98: 163-178.
- Wickelgren WO (1977) Physiological and anatomical characteristics of reticulospinal neurons in lamprey. *J Physiol* 270(1): 89-114.
- Wiersma CA, Ikeda K (1964) Interneurons commanding swimmeret movements in the crayfish, *Procambarus Clarki* (Girard). *Comp Biochem Physiol* 12:509-525.

- Wikström MA, El Manira A (1998) Calcium influx through N- and P/Q-type Channels activate apamin-sensitive calcium-dependent potassium channels generating the late afterhyperpolarization in lamprey spinal neurons. *Eur J Neurosci* 10(4): 1528-1532.
- Williams JH, Kauer JA (1997) Properties of carbachol-induced oscillatory activity in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 78(5): 2631-2640.
- Williams TL, Sigvardt KA, Kopell N, Ermentrout GB, Remler MP (1990) Forcing of coupled nonlinear oscillators: studies of intersegmental coordination in the lamprey locomotor central pattern generator. *J Neurophysiol* 64(3): 862-871.
- Wilson GF, Richardson FC, Fisher TE, Olivera BM, Kaczmarek LK (1996) Identification and characterization of a Ca(2+)-sensitive nonspecific cation channel underlying prolonged repetitive firing in *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 16(11): 3661-3371.
- Wilson WA, Wachtel H (1974) Negative resistance characteristic essential for the maintenance of slow oscillations in bursting neurons. *Science* 186(4167): 932-934.
- Wischnitzer S (1993) *Atlas and Dissection Guide for Comparative Anatomy*. Fifth

Edition, Long Island University, 1993, 320 pages.

Yoshida M, Roberts A, Soffe SR (1998) Axon projections of reciprocal inhibitory interneurons in the spinal cord of young *Xenopus* tadpoles and implications for the pattern of inhibition during swimming and struggling. *J Comp Neurol* 400(4): 504-518.

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007) Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* 76: 367-385. *Revue*.

Zelenin PV, Grillner S, Orlovsky GN, Deliagina TG (2003) The pattern of motor coordination underlying the roll in the lamprey. *J Exp Biol* 206(Pt 15):2557-2566.

Zelenin PV, Orlovsky GN, Deliagina TG (2007) Sensory-motor transformation by individual command neurons. *J Neurosci* 27(5): 1024-1032.

Zhang B, Harris-Warrick RM (1995) Calcium-dependent plateau potentials in a crab stomatogastric ganglion motor neuron. I. Calcium current and its modulation by serotonin. *J Neurophysiol* 74(5): 1929-1937.

Zhang B, Wootton JF, Harris-Warrick RM (1995) Calcium-dependent plateau

potentials in a crab stomatogastric ganglion motor neuron. II. Calcium-activated slow inward current. *J Neurophysiol* 74(5): 1938-1946.

Zhu ZT, Munhall A, Shen KZ, Johnson SW (2004) Calcium-dependent subthreshold oscillations determine bursting activity induced by N-methyl-D-aspartate in rat subthalamic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 19(5): 1296-1304.

Zhu ZT, Munhall A, Shen KZ, Johnson SW (2005) NMDA enhances a depolarization-activated inward current in subthalamic neurons. *Neuropharmacology* 49(3): 317-327.

Zompa IC, Dubuc R (1996) A mesencephalic relay for visual inputs to reticulospinal neurones in lampreys. *Brain Res* 718(1-2): 221-227.

Zweig RM, Whitehouse PJ, Casanova MF, Walker LC, Jankel WR, Price DL (1987) Loss of pedunculopontine neurons in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 22(1): 18-25.

CHAPITRE 5:

ANNEXE

The transformation of a unilateral locomotor command into a symmetrical bilateral activation in the brainstem

by

Frédéric Brocard ^{2§}, Karine Fénelon ², Raja Hatem ², Delphine Gonzales², François Auclair², and Réjean Dubuc ^{1,2}

¹*Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec) Canada, H3C 3P8*

²*Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Département de physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, H3C 3J7*

[§] *Present address : Lab. Plasticité et Physio-Pathologie de la Motricité, UMR 6196 CNRS - Université de la Méditerranée 31 chemin Joseph Aiguier. F-13402 Marseille cx 20, France*

Running title: symmetrical bilateral command

Keywords: supraspinal, brainstem, locomotor control, Mesencephalic Locomotor Region, reticulospinal cells.

To whom correspondence should be addressed:

Dr Réjean Dubuc
 Université du Québec à Montréal,
 Département de Kinanthropologie,
 C.P. 8888, Succ. Centre-Ville,
 Montréal (Québec), Canada H3C 3P8
 Tel: (514) 343 5729
 Fax: (514) 343 6611
 Email: REJEAN.DUBUC@GMAIL.COM

ABSTRACT

A unilateral activation of the mesencephalic locomotor region (MLR) produces symmetrical bilateral locomotion in all animal species tested to date. How this occurs remains unresolved. This study examined the possibility that it resulted from symmetrical bilateral inputs onto reticulospinal (RS) cells from the MLR on one side. Semi-intact preparations of larval sea lamprey were used to investigate the bilateral recruitment pattern of RS cells by the MLR. Paired intracellular recordings of homologous RS cells on both sides were performed and their responses to electrical stimulation of the MLR on one side were examined. Highly similar excitatory postsynaptic potentials at fixed latency were elicited in homologous RS cells on both sides. The threshold intensity was the same for homologous RS cells on both sides and symmetrical increases in the magnitude of bilateral responses occurred as the stimulation intensity of the MLR was increased. Micro-injection of AMPA into the MLR also elicited symmetrical recruitment on both sides. Calcium imaging experiments confirmed the bilateral activation of smaller RS cells in size. In a high-divalent cationic solution, the synaptic responses elicited in homologous RS cells persisted and exhibited a constant latency during high frequency stimulation at 25 Hz. Moreover during the perfusion of a Ca^{2+} -free solution replacing normal Ringer's, the magnitude of responses showed a gradual reduction with a similar time course in the homologous RS cells. These results support the idea that the MLR projects monosynaptically to RS cells on both sides and provides symmetrical inputs to them. During locomotion of the semi-intact preparation, the discharge pattern was also very

similar in homologous bilateral RS cells. We conclude that the symmetry of the MLR command is organized at the brainstem level.

INTRODUCTION

The mesencephalic locomotor region (MLR) is well conserved throughout vertebrate phyla (Grillner et al. 1997; Dubuc et al, 2008). It produces muscle synergies underlying different forms of locomotion such as swimming in cyclostomes and fishes, flying in birds, and stepping in tetrapods, including mammals. Despite the diverse forms of locomotion elicited by the MLR, one striking feature of this brainstem region is its ability to initiate perfectly symmetrical locomotor movements on both sides in response to stimulation of one side only. Although, the MLR has been identified some 40 years ago (Shik et al. 1966), the neural mechanisms underlying symmetrical output of the MLR remain unknown.

The MLR is known to initiate locomotion by activating reticulospinal (RS) cells that in turn project to the spinal cord locomotor networks (for reviews see: Grillner et al. 1997; Jordan 1998; Orlovsky et al. 1999). Whether the symmetry results from a balanced activation of RS cells or downstream to them is still an open question. Previous studies have shown that stimulation of the MLR on either side could elicit excitatory responses in RS cells of both sides (Orlovsky, 1970; Garcia-Rill and Skinner, 1987), but it was not possible to determine whether the identical inputs were provided to RS cells of both sides. Small differences in the position or the impedance of the stimulating electrodes on both sides could have resulted in changes in the ability of the stimuli to evoke synaptic responses. The lamprey brainstem is uniquely organized with pairs of identifiable RS cells on the basis of their positions, sizes, and shapes (Rovainen, 1967; Rovainen et al., 1973; Rovainen, 1978). Their

large size (up to 150 μm) combined with their easy access for microelectrode impalement under visual guidance, make the brainstem of lampreys an excellent model for examining the bilateral symmetry pattern in the MLR command. Taking advantages of this, we describe for the first time with dual intracellular recordings of bilaterally homologous RS cells symmetrical MLR inputs to RS cells on both sides. During locomotion in a semi-intact preparation, there was a bilaterally symmetrical recruitment of RS cells on both sides. Using calcium imaging, we confirmed that this was also true for smaller RS cells that are less accessible for dual intracellular recordings. Unilateral injections of anatomical tracers in the reticular formation revealed the presence of retrogradely labelled MLR neurones on both sides. Some of these results have been previously published in preliminary form (Brocard et al. 2005).

METHODS

The experiments were all performed on sea lampreys (*Petromyzon marinus*) collected from streams entering Lake Champlain in southern Québec or purchased from ACME Lamprey Co. (Harrison, ME). Electrophysiological (n = 18) and Ca²⁺-imaging (n = 4) experiments were performed on larval animals (9-14 cm in total body length), and anatomical experiments on newly-transformed animals (n = 14; 14-15.5 cm in total body length). Electrophysiological experiments were carried out on an *in vitro* semi-intact preparation, while Ca²⁺-imaging and anatomical experiments were carried out on an *in vitro* brainstem-spinal cord preparation (see below). All surgical and experimental procedures conformed to guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and were approved by the Animal Care and Use Committees at the Université de Montréal and the Université du Québec à Montréal.

Semi-intact and brainstem-spinal cord preparations

All animals were first anesthetized with tricaine methanesulphonate (MS 222, 100 mg/L) and transferred for dissection in cold oxygenated Ringer's (8-10°C) with the following composition (in mM): 130 NaCl, 2.1 KCl, 2.6 CaCl₂, 1.8 MgCl₂, 4 HEPES, 4 Dextrose, 1 NaHCO₃, at pH 7.4. To obtain the semi-intact preparation, the cranium was completely dissected free of surrounding tissues and cut open dorsally to expose the brain and rostral spinal cord, whereas the rest of the body and tail was left completely intact to swim freely (Fig. 1). The prosencephalon was removed after a complete transverse section. The preparation obtained was placed dorsal side up in a

recording chamber continually perfused with Ringer's at a rate of approximately 4 ml/min. The brainstem-spinal cord preparation was obtained in the same fashion except that the intact portion comprising the body and tail was completely removed after a complete transverse section.

Electrophysiological experiments

Using sharp glass microelectrodes filled with 4M potassium acetate (80-130 M Ω), paired intracellular recordings were made from bilateral RS neurones recorded in the middle (MRRN) and the posterior (PRRN) rhombencephalic reticular nucleus (Fig. 1). The signals were amplified by an Axoclamp 2A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA; sampling rate: 2-10 kHz). Only RS neurones with a stable membrane potential lower than -70 mV for more than 15 minutes were included in the study.

Unilateral stimulation of the MLR (Fig. 1) was performed with a glass-coated tungsten microelectrode (4-5 M Ω with a 10 μ m tip exposure). Single stimuli of different intensities were delivered every 30 s to examine the synaptic inputs from the MLR to RS cells. In semi-intact preparations, swimming was induced by repeated electrical stimulation of the MLR (1.5 ms square-wave pulses, 0.5-15 μ A, at a frequency of 2 Hz, see Sirota et al. 2000; Brocard and Dubuc 2003). Each stimulation bout lasted ~ 40 s and the interval between successive trials was at least 3 min. The stimulus artefacts were clipped on the intracellular traces using a homemade

software. Chemical stimulation of the MLR was also performed by local pressure injection of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA).

Locomotion was monitored using electromyographic (EMG) recordings. Pairs of Teflon coated stainless steel wires (diameter 50 μ m; California Fine Wire Company, Grover Beach, CA) were inserted into the myotomes between segments 20 and 25 (Fig. 1). The EMG signals were amplified ($\times 1000$), filtered (bandwidth: 30Hz-1 kHz) and acquired with a sampling rate of 5 kHz.

The data were acquired through a Digidata 1322A interface with Clampex 9 software (Axon Instruments). Intracellular signals were analyzed with Clampfit 9.0 software. The peak amplitude of the evoked postsynaptic potentials (PSPs) was measured as the largest voltage deflection from the resting membrane potential. The latency was measured from the stimulus artefact to the onset of the response. Data are presented in the text and in the table as mean \pm SEM. A Student's *t*-test was employed for statistical analysis when two groups were compared. Groups of data having a P value less than 0.05 were considered significantly different.

Ca²⁺-imaging experiments

Application of crystals of the Calcium Green-dextran-amine conjugate (10 000 MW, Molecular Probes, Eugene, Oregon) over the cut end of the spinal cord was used to label RS cells retrogradely. The preparations were perfused with cold Ringer's overnight in the dark to allow dye transport. Labelled RS cells were imaged on a Nikon epifluorescent microscope equipped with a $\times 20$ (0.75 NA) objective. A fluorescein isothiocyanate (FITC) excitation/emission filter set was used to visualize

the neurones labelled with Calcium Green-dextran. The emitted light was captured with an intensified CCD video camera (Photometrics CoolSNAP HQ, Roper Scientific, NJ) at a rate of one to two images per second.

Analysis of the imaging data was performed on a computer using Metafluor imaging software (Molecular Devices, Downingtown, PA). Recording sites were identified and delineated for measurement on the monitor under mouse control. Attention was focused on fluorescence changes in the cell bodies. Ca^{2+} responses were expressed as relative changes in fluorescence $\Delta F/F$ (%), whereas the changes in Ca^{2+} dynamics were assessed by the time course of the signals. To quantify and compare Ca^{2+} responses between cells, the time series were imported in a spreadsheet, and the corresponding peaks, expressed as $\Delta F/F$ (%), and areas, expressed in arbitrary units, were calculated.

Anatomical experiments

Some newly-transformed lampreys were injected unilaterally in the MRRN with either Alexa Fluor 594-dextran amines (10,000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR; $n = 7$) or Biocytin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON; $n = 3$). Other animals ($n = 4$) were injected in the MRRN with Alexa Fluor 594-dextran amines on one side and Alexa Fluor 488-dextran amines (10,000 MW, Molecular Probes) on the other side. The injections proceeded as follows: The MRRN cells were disrupted with a glass micropipette both superficially and deep in the medial tegmentum, where many of their dendrites are located. The tracers were dissolved in distilled water, recrystallized on the tip of insect pins and deposited into the injection site and kept there for at least

10 min. In cases of bilateral injections, the second injection was made at least 4 hours after the first one, increasing chances of axons lesioned by the first injection to repair and close, and a homemade breath-controlled device with tubing and a micropipette attached was used to prevent the second tracer to leak into the first injection site. The latter was then thoroughly rinsed with fresh Ringer's and the preparation transferred to a chamber continuously perfused with fresh oxygenated Ringer's at 7-9°C. In addition to MRRN afferents, the medial longitudinal fasciculus and other medial longitudinal "en passant" fibres coursing deep in the tegmentum were inevitably lesioned by this injection method.

From 18 to 42 hours after tracer injection, the preparations were immersed in a solution of 4% paraformaldehyde and 16% (v/v) picric acid in phosphate buffered saline (PBS, 0.1M, pH 7.4) for 5-6 hours and then transferred into a 30% sucrose solution overnight. The next day, the preparations were quickly frozen with 2-methylbutane (Fisher Scientific, Ottawa, ON) at -45°C and serially cut in a cryostat at 25 µm thickness. The sections were collected on ColorFrost Plus microscope slides (Fisher Scientific) and allowed to dry overnight on a warming plate at 37°C. The sections containing Biocytin were then rinsed with PBS, incubated for 1 hour in streptavidin conjugated to Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) diluted 1:200 in PBS, rinsed again with PBS and air-dried for 30 min. All sections were coverslipped with Vectashield-DAPI mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and observed under an Eclipse 600 epifluorescence microscope equipped with a DXM1200 digital camera (Nikon Canada, Montréal, QC).

All labelled neurones in the tegmentum on every second section from the isthmus Müller cell I1 to the decussation of the lateral octavomesencephalic tract (oml) in the mesencephalon were included in the analysis. Skipping sections inevitably lead to underestimation of the total number of retrogradely labelled neurones, but the goal here was simply to identify the location and distribution of these neurones. On the other hand, this method rendered double counting of single cells very unlikely, given that the largest cells had a diameter of less than 20 μm and that section thickness was 25 μm . The rostrocaudal extent of the brain segment included in the analysis was based on previous studies showing the anatomical localization of the physiologically identified MLR (Sirota et al., 2000; Le Ray et al., 2003; Brocard et al., 2005; Ménard et al., 2007). Low power photomicrographs of the sections were imported in CorelDraw software (Corel, Ottawa, Canada), where their contours were drawn and the location of labelled neurones indicated. These drawings were printed, taken back to the microscope, and used to positively identify and precisely locate neurones. The labelling of cell nuclei with DAPI helped in identifying the labelled neurones and the presence of a DAPI-labelled nucleus was necessary for a neurone to be included in the analysis. Figures were designed using CorelDraw or Illustrator (Adobe Systems inc., San Jose, CA) softwares.

RESULTS

Symmetrical MLR inputs to homologous RS cells on both sides

Reticulospinal cells on both sides (18 pairs) were recorded intracellularly in 18 preparations. Of these, 12 paired recordings were performed in the MRRN (Fig. 2, *top*) and 6 in the PRRN (Fig. 2, *bottom*). The connectivity between the MLR and pairs of homologous RS cells on both sides was first investigated with single shot stimulation of the MLR. The stimulus/response relationship was established as illustrated in Figure 2. Although the latencies of postsynaptic responses elicited in ipsilateral RS cells were significantly shorter compared to contralateral RS cells ($P < 0.05$, Paired *t*-test; see Table 1), the most stunning observation was the marked similarities in the stimulus/response relationships for homologous RS cells (Fig. 2B). In addition to the similar threshold stimulating currents for evoking depolarizing responses in homologous RS cells (Fig. 2C1 and Table 1; $P > 0.05$, Paired *t*-test), there was a symmetrical increase in the area of bilateral responses (Fig. 2B). A linear regression analysis performed in the first part of relationships ($r > 0.95$), demonstrates similar slopes between homologous RS cells of the two reticular nuclei (Fig. 2C2 and Table 1, $P > 0.05$, Paired *t*-test). As the stimulus current increased, the slopes began to flatten, and the magnitude of bilateral responses reached a plateau as previously shown by us (Brocard and Dubuc, 2003) that was smaller in RS cells of the PRRN ($P < 0.05$; Unpaired *t*-test), but remain similar in area between homologous RS cells (Fig. 2C3 and Table 1; $P > 0.05$, Paired *t*-test).

Because the sampling with paired intracellular recordings was limited to the large RS cells, calcium imaging was used to examine bilateral responses in smaller RS cells of the MRRN (Fig. 3A1) and RS cells in the PRRN (Fig. 3B1). To achieve this, RS cells were retrogradely loaded with Calcium Green Dextran and imaged using fluorescence microscopy. As for intracellular recordings, the smaller homologous RS neurones on both sides also displayed a symmetrical bilateral increase in relative fluorescence. This was true for smaller RS cells in the MRRN (Fig. 3A2,3) as well as for RS cells in the PRRN (Fig. 3B2,3). Altogether, these results strongly suggest that MLR inputs to RS cells on both sides are highly symmetrical within the entire reticular formation, at least for the MRRN and PRRN comprising 90% of all RS cells in lampreys.

Monosynaptic connectivity between the MLR and RS cells on both sides.

We previously demonstrated that the largest part of the MLR inputs onto ipsilateral RS cells is monosynaptic (Brocard and Dubuc, 2003). Because the onset of the MLR induced synaptic responses was independent on the stimulation current intensity (see Fig. 2A), it is not unlikely that the MLR inputs and contralateral RS cells may also correspond to monosynaptic transmission.

To assess this possibility, maximal subthreshold responses were recorded in the presence of high concentrations of divalent cations (10.8 mM Ca^{2+} / 7.2 mM Mg^{2+}) to abolish polysynaptic while keeping the monosynaptic inputs (Brocard and Dubuc, 2003). As shown in Figure 4A, bilateral responses elicited in the MRRN and PRRN were reduced, but still persisted. The postsynaptic potentials were reduced in area by

37 ± 15.2% and 44 ± 17.9% in ipsi- and contralateral RS cells of the MRRN (Fig. 4B1) and by 35 ± 7.2% and 41 ± 1.9% in ipsi- and contralateral RS cells of the PRRN (Fig. 4B2), respectively. The bilateral responses remained symmetrical when the concentrations of Ca²⁺ and Mg²⁺ were raised (P>0.05, *t*-test). Stimulation of the MLR at frequencies up to 25 Hz continued to elicit one-for-one at a constant latency postsynaptic potential in homologous RS cells (Fig. 4C1-C2). Further indication of a monosynaptic connection was provided by examining the time course of the synaptic transmission between the MLR and RS cells during perfusion with a Ca²⁺- free solution replacing the normal Ringer's. Figure 5A compares the time course of the reduction of postsynaptic potentials from homologous RS cells as the Ca²⁺- free solution was perfused. The synaptic responses on both sides showed a highly symmetrical gradual reduction without the appearance of failure in the graph (Fig. 5B). This was true for RS cells in the MRRN and PRRN. Together, these results suggest that most, if not all the projections from the MLR to the reticular formation on both sides are monosynaptic.

Projections from the isthmic region to RS cells

The bilateral recruitment of RS cells of the MRRN from unilateral stimulation of the MLR raises questions about the anatomical substrate for this phenomenon. Experiments were designed to know whether single cells on one side of the MLR projected to the MRRN on both sides or whether some cells in the MLR projected ipsilaterally while others projected contralaterally. First, unilateral retrograde tracer

injections were made in the MRRN and the distribution of labelled cells in the isthmus region was analysed. Although cell distribution was mostly asymmetrical in the isthmus region, a large number of cells were labelled on both sides (Fig. 6, red dots for example). We then injected the MRRN with two retrograde tracers of different colors, one on each side, to see whether single cells in the isthmus region would be labelled with both tracers. Double-labelled neurones were rare, only two being found in the animal illustrated in Fig. 6 (green dots in 6F and H).

Homologous RS cells display similar recruitment pattern

Experiments were carried out to determine whether homologous RS cells provide a symmetrical excitatory drive to spinal networks as swimming is generated. The recruitment pattern of homologous RS cells was examined during MLR-induced locomotion in 6 semi-intact preparations. Paired intracellular recordings (3 pairs) were carried out from homologous MRRN cells.

In the 3 semi-intact preparations tested, a symmetrical bilateral recruitment pattern was observed during repetitive electrical stimulation of the MLR (Fig. 7A1-A2). Swimming of the tail was induced by electrical stimulation of the MLR. In most cases, the two recorded RS cells displayed spiking activity superimposed on rhythmic depolarisations in tune with the swimming activity (see however example in Fig 7B). The rhythmic bursts of discharges were antiphasic in the homologous RS cells from both sides (Fig. 7A3). The firing frequencies of the 3 pairs of RS cells were calculated at a stimulation intensity equal to 3 times the threshold intensity needed to induce swimming. The firing frequencies did not show any statistical difference

(23.6 ± 4.8 Hz vs. 21 ± 2.1 Hz for ipsi- and contralateral RS cells, respectively; $P > 0.05$; Paired *t*-test).

In 3 additional semi-intact preparations, a brief AMPA injection was used instead of electrical stimulation in the MLR (Fig. 7B1). The two RS cells displayed a large symmetrical bilateral depolarisation accompanied by action potentials (Fig. 7B2-B3). Again, the firing frequencies between homologous RS cells was the same (18.4 ± 5.3 Hz vs. 17.4 ± 2.1 Hz for ipsi- and contralateral RS cells, respectively; $P > 0.05$; Paired *t*-test).

Collectively, these results showed that the initiation of swimming by the MLR is associated with a strong symmetrical bilateral activation of the RS system.

DISCUSSION

The main finding of this study was the striking symmetry of the monosynaptic MLR inputs to RS cells. This symmetrical activation of RS cells on both sides is likely to provide in turn a strong bilateral excitatory drive to the spinal locomotor networks. Forty years after the discovery of the MLR (Shik et al. 1966), we are now providing the first direct evidence that the symmetry of the MLR command is organized, at least partly, at the level of the brainstem within the reticular formation.

Synaptic inputs from the MLR to contralateral RS cells

Our previous investigation showed that the MLR stimulation elicits monosynaptic inputs in ipsilateral RS cells located in two different reticular nuclei of the rhombencephalon, the MRRN and PRRN (Brocard et al. 2003). The present results now indicate that the MLR projects monosynaptically to RS cells not only on the ipsilateral but also on the contralateral side. This conclusion arises from converging lines of evidence: (1) the responses evoked by the MLR exhibit an invariant latency as the stimulus intensity is increased. (2) perfusion of Ca^{2+} -free solution shows a gradual reduction of the MLR-induced responses without failure. (3) stimulation of the MLR in the presence of high-divalent ion concentrations still elicits synaptic responses at a fixed latency. Altogether, these observations suggest the presence of monosynaptic inputs and that oligosynaptic transmission if present is likely to be of small importance. The somewhat longer latency of MLR-induced synaptic responses on the contralateral side is likely to result from the longer pathway compared to the ipsilateral one.

The present study stresses a bilateral projection from the MLR and the same organisation could be present in other species. Indeed, the bilateral activation of RS cells through monosynaptic MLR projections has previously been suggested in cats using intracellular recordings (Orlovsky, 1970). Extracellular recordings of medullary RS cell activity performed in cats (Iwakiri et al., 1995), rats (Garcia-Rill and Skinner, 1987), newts (Bar-Gad et al., 1999) and salamanders (Kagan and Shik, 2004) have also reported that the MLR evokes short latency excitations, expected to be monosynaptic, but in a smaller proportion as compared to the present study. This difference in monosynaptic responsiveness may result from species specificity or from the greater sensitivity of intracellular recordings to detect subthreshold synaptic inputs.

Origin of the symmetry of the MLR command

Our study outlines the similarities of the monosynaptic MLR inputs to homologous RS cells on each side. Direct coupling between RS cells from both sides unlikely contribute to the symmetry of the MLR command in lampreys. We found no evidence of spike-triggered synaptic responses elicited by spike trains in one RS cell into contralateral RS cells. Anatomical experiments also argued against the possibility that bilateral RS neurones are coupled. The dendrites (Martin, 1979) and branching axons (Rovainen et al., 1973) of large RS cells do not cross the midline. The symmetrical bilateral recruitment of RS cells after a microinjection of AMPA into the MLR makes it more likely that the symmetry of the MLR command were from neural elements and not from activation of caudally projecting axons. The symmetry

probably occurs from activation of the soma of MLR neurones with axons projecting to contralateral RS cells. This assumption is supported by the present anatomical findings and by a previous study where a unilateral injection of cobalt-lysine in the MRRN retrogradely labelled MLR neurones on both sides (Sirota et al., 2000). In the same way, anterogradely labelled fibres from the MLR were distributed bilaterally in the reticular formation of cats and rats (Steeves and Jordan, 1984; Garcia-Rill et al., 1986).

The MLR provides a symmetrical bilateral output to RS cells supporting the idea that both ipsi- and contralateral RS cells receive a common input. The anatomical results show that only rare MLR neurones seem to project to both the ipsi- and contralateral MRRN RS cells, the vast majority projecting to one or the other. On the other hand, the two populations of ipsi- and contralaterally-projecting neurones of the MLR on one side intermingled at most levels, except perhaps rostrally. Leakage of the tracer from the second injection site to the first can be ruled out as most neurones were single-labelled.

Surprisingly, the rare double-labelled MLR neurones were mostly found on the side of the second injection, although one could expect to find them equally on both sides. One explanation could be that axons arising from some of the isthmic neurones cross the midline at the level of the MRRN instead of the MLR. The first injection would have then lesioned the axons of these contralaterally-projecting cells and prevented their labelling from the second injection. It does not apply for the side of the second injection because it was made four hours after the first, allowing enough time for the tracer of the first injection to diffuse past the site where the

lesion was made for the second injection, hence the presence of double-labelled neurones on that side. This is an inevitable downside of the anatomical paradigm used in the present study. It also implies that some of the ipsilaterally-projecting MLR neurones labelled from the first injection could in fact be contralaterally-projecting neurones, or at least ipsilaterally-projecting neurones with a collateral crossing to the contralateral MRRN. Series of experiments using a unilateral MRRN injection and a secondary lesion of the contralesional brainstem in the rostral rhombencephalon just caudal to the MLR could help see whether some of the MLR neurones usually labelled by such injections still are. . The similar stimulation threshold needed to evoke a synaptic response in homologous RS cells indirectly suggests that MLR neurones branch to innervate the RS cells of both sides. This is also supported by similar stimulus/response relationships in homologous RS cells of the MRRN and PRRN. However, it may also be assumed that RS cells are recruited by a simultaneous activation of two intermingled populations of MLR-projecting cells, one exciting contralateral RS cells and the other ipsilateral RS cells.

A symmetry of MLR inputs to reticulospinal cells has not been established in mammals. Responses recorded in an individual RS cells and elicited by alternate single stimulation of the ipsi- and contralateral MLR revealed, in most cases, an asymmetry in the stimuli threshold between MLRs (Orlovsky, 1970; Garcia-Rill and Skinner, 1987). However, small differences either in the position and/or the impedance between the two stimulating electrodes to activate homologous MLRs might result in profound changes in the ability of the stimuli to evoke synaptic

responses. In the present study, these methodological difficulties are avoided with dual intracellular recordings of RS cells during unilateral stimulation of the MLR.

Functional implications

The reticular formation is bilaterally located in the brainstem. An asymmetric modulation of the reticular formation activity occurs in postural alignment and the maintenance of balance in lampreys (for review see Deliagina et al. 2002). The present data would suggest that the initiation and maintenance of swimming by the MLR stimulation is associated with a powerful bilateral activation of RS cells, which in turn display antiphasic membrane oscillations. Irrespective of the modality and laterality of the applied sensory stimulus to induce linear swimming, such symmetrical bilateral activation of the RS system has also previously been observed in lampreys (Deliagina et al., 2002). One important functional implication of the symmetrical monosynaptic MLR command to RS cells is that it provides substrate for the initiation of the well-coordinated bilateral locomotion. This aspect associated with the differential recruitment of reticular nuclei and the regulation in firing rate of RS cells by the MLR (Brocard and Dubuc, 2003) are likely to constitute fundamental neuronal mechanisms underlying the initiation of locomotion and the control of the speed of well-coordinated bilateral locomotor movements. Goal-directed changes in swimming direction may require additional inputs from the periphery and other locomotor centers. A diencephalic locomotor region was shown to project monosynaptically to RS cells (El Manira et al. 1997). It could interact with the MLR

(Ménard et al. 2005) and also provide other inputs that would change the balance of symmetry in RS cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Québec) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central). F.B. received a fellowship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, Institute of Musculoskeletal Health and Arthritis), and the Center for Research in Neurological Sciences of the Université de Montréal (Jasper Fellowship). K.F. received a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We are grateful to Danielle Veilleux for her technical assistance.

Table 1: Characteristics of postsynaptic potentials evoked in homologous RS cells of the MRRN and the PRRN following focal stimulation of the MLR.

	MRRN		PRRN	
	(n=12)		(n=6)	
	Ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral
Latency (ms)	4.7 ± 0.32	5.8 ± 0.36 ***	7.1 ± 0.68	8.2 ± 1.05 *
Threshold (µA)	2.8 ± 0.52	3.1 ± 0.54	2.9 ± 0.68	3.4 ± 0.61
Max. Area (mV×ms)	830 ± 96	779 ± 78	699 ± 119	700 ± 109
Slope (mV×ms/µA)	146 ± 26	149 ± 28	45 ± 9	47 ± 10

N= NUMBER OF PAIR RECORDINGS. IPSI- AND CONTRALATERAL VALUES WERE COMPARED WITH PAIRED T-TESTS. * P<0.05, * P<0.001.**

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The left panel represents a schematic representation of the semi-intact preparation as described in the text. It also shows the approximate location of electromyographic (EMG) recordings along the intact portion of the body of the animal. The right hand side represents an enlargement of the boxed area on the left and shows how the prosencephalon was removed and the location of the mesencephalic locomotor region (MLR, encircled with a solid line) on both sides of the brain, and the middle (MRRN) and posterior (PRRN) rhombencephalic reticular nuclei. Scale bars are approximations.

Figure 2. Simultaneous synaptic responses recorded from homologous RS cells in the MRRN (*top*) and the PRRN (*bottom*), ipsilateral (RS ipsi) and contralateral (RS contra) to the MLR stimulation. A: Typical bilateral graded responses recorded at resting membrane potential from homologous RS cells to increasing stimulus intensity of the MLR. All traces are averages of 3 sweeps. B: Relationship between the stimulus intensity of the MLR and the area of synaptic responses elicited in ipsi- (*squares*) and contralateral (*circles*) RS cells. C1: Graph depicting the MLR stimulation threshold needed to induce synaptic responses in homologous RS cells. C2: Graph depicting the initial slope of the stimulus/response relationship in homologous RS cells. C3: Graph depicting the area of the maximal subthreshold responses in homologous RS cells. Paired intracellular recordings from the MRRN and the PRRN were performed in two different preparations.

Figure 3. Symmetrical bilateral Ca^{2+} responses in small RS cells following electrical stimulation of the MLR. A represents MRRN data, B, PRRN data. A1, B1: Schematic representations of the dorsal view of the brainstem of a larval lamprey with photomicrographs illustrating calcium green dextran-labelled RS cells in the MRRN (A1) and in the PRRN (B1) from the same preparation. Pairs of homologous RS cells are delineated and labelled as ipsilateral (RS ipsi) and contralateral (RS contra) to the stimulation. A2, B2: MLR stimulation of different intensities was used to elicit Ca^{2+} responses in both the ipsi and contralateral cells. Each trace was obtained at the following stimulation intensities: 0.5, 0.7, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 for the MRRN (A2, top), and 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 4.0 for the PRRN (B2, top). The relationship between the intensity of MLR stimulation and the area of the Ca^{2+} responses is similar for all pairs of RS cells (A2, B2, bottom). A3, B3: In four other preparations, pairs of small RS cells were identified. For all pairs, the mean area (with SEM) of the ipsi and contralateral Ca^{2+} responses obtained by MLR stimulation is illustrated.

Figure 4. Effects of a high-divalent cationic solution (10.8 mM Ca^{2+} /7.2 mM Mg^{2+}) on bilateral responses induced in MRRN (left panel) and PRRN (right panel) RS cells after MLR stimulation. A: Typical bilateral responses recorded from homologous RS cells, ipsilateral (RS ipsi) and contralateral (RS contra) to the MLR stimulation, under standard (black traces) and high-divalent cationic solutions (gray traces). All traces are averages of 5 sweeps. B: Histograms depicting the mean area of bilateral synaptic responses. The values were expressed in percentage of the control value. C: Bilateral

responses in high-divalent cationic solution during high-frequency stimulation (25 Hz). The recordings from the MRRN (C1) and the PRRN (C2) were performed in two different preparations.

Figure 5. Effects of Ca^{2+} -free Ringer's on bilateral responses induced in MRRN (left panel) and PRRN (right panel) RS cells after MLR stimulation. A: Typical gradual reduction of bilateral responses recorded from homologous RS cells, ipsilateral (RS ipsi) and contralateral (RS contra) to the MLR stimulation, after switching to Ringer's depleted of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{E}}$. B: time course (relative to control value) of the bilateral responses areas during exposure to the Ca^{2+} -free saline. The recordings from the MRRN (A1, B1) and the PRRN (A2, B2) were performed in two different preparations.

Figure 6. Distribution of retrogradely labelled cell bodies in the isthmus region after injection of two fluorescent dextran amine tracers in the MRRN, one on each side. A. Schematized dorsal view of the whole brain of a newly-transformed animal showing the MRRN (yellow), the injection pipettes containing the fluorescent tracers, and the level of the cross sections from B to H. B. Schematized cross section at the level of the injections. Lesioned areas are indicated in red and blue, the areas containing the MRRN cell bodies are in yellow. The entry point of the injection pipette through the ventricular surface was visualized on the next caudal section for both injections. C-H. Schematized 25 μm thick cross sections from rostral (C) to caudal (H) illustrating the distribution of single-labelled (red and blue dots) and of two double-labelled (green

dots in F and H) cell bodies. Areas with red and blue hatching contained retrogradely labelled neurones considered well outside of the MLR; these neurones were not included in the analysis. Note that the brain was not sectioned in the exact transverse plane, rendering each section asymmetrical and giving the impression that the distribution of the red- and blue-labelled neurones are different. The number in μm refer to the distance from the most rostral level. All neurones from any given section are illustrated. Note that one section was skipped between each illustrated ones.

ARRN, anterior rhombencephalic reticular nucleus; Di, diencephalon; I1, Müller isthmus cell I1; mlf, medial longitudinal fasciculus; MRRN, medial rhombencephalic reticular nucleus; nlla, anterior lateral line nerve; nVIII, vestibular nerve; OB, olfactory bulb; OLA, octavolateral area; oml, lateral octavomesencephalic tract; OT, optic tectum; pc: posterior commissure; Pi, pineal gland; Rh, rhombencephalon; SC, spinal cord; Tel, telencephalon; V, trigeminal motor nucleus. Scale bars in A = 500 μm and in H (applies to B-H) = 100 μm .

Figure 7. Bilateral recruitment pattern of RS cells during MLR-induced swimming in a semi-intact preparation. A1 and B1: Paired intracellular recordings from homologous MRRN cells, ipsilateral (RS ipsi) and contralateral (RS contra) to the MLR stimulation, obtained after either repeated electrical stimulation (A1) or by local injection of AMPA (B1). Electromyograms (EMGs) were recorded from myotomes between segments 20 and 25 on the side of the body ipsilateral to the MLR stimulation. In A1, the duration of the electrical stimulation applied to the MLR is indicated by a horizontal bar below, whereas in B1 the arrow indicates the AMPA

injection. Shaded areas in A1 and B1 indicate parts of the recordings shown at a faster time scale in A2 and B2.

Figure 1

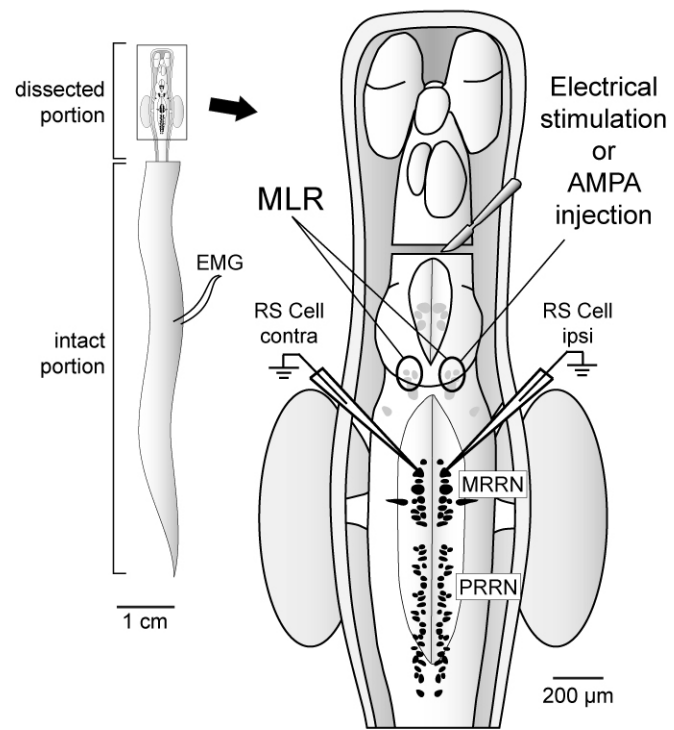
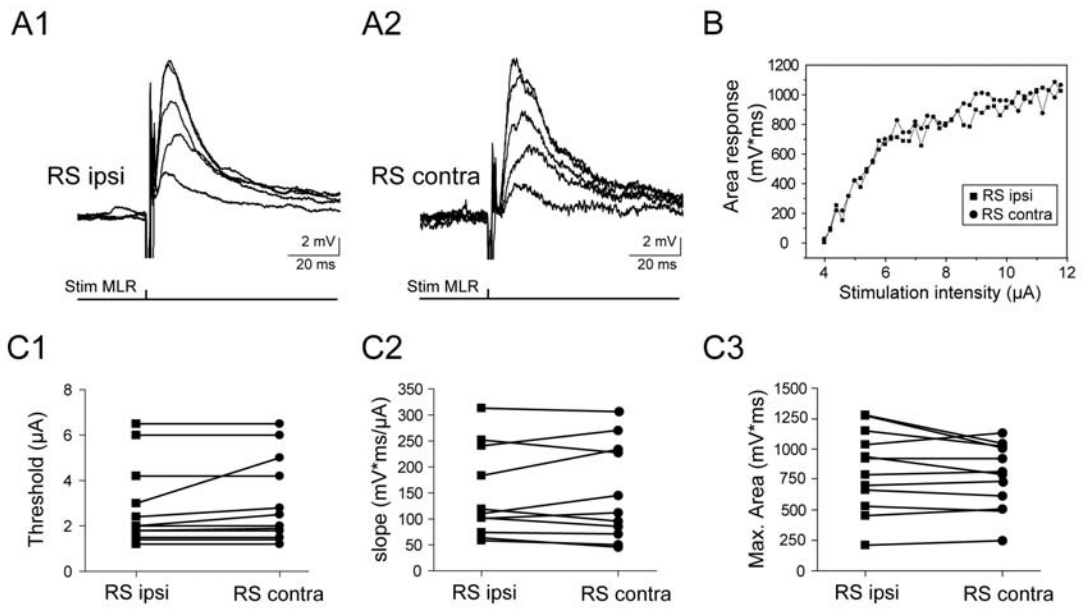


Figure 2

MRRN



PRRN

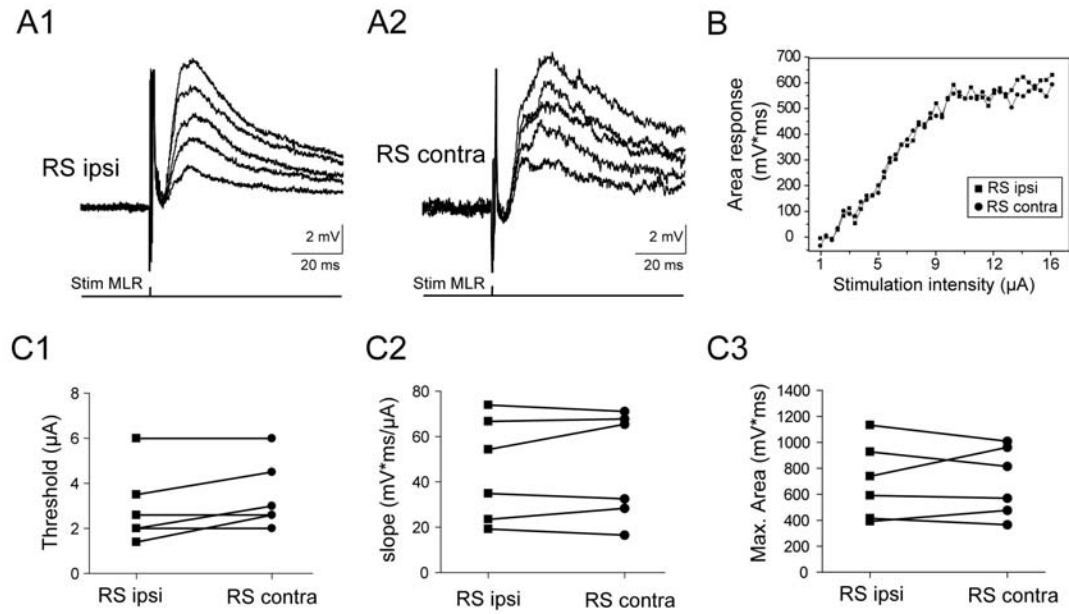


Figure 3

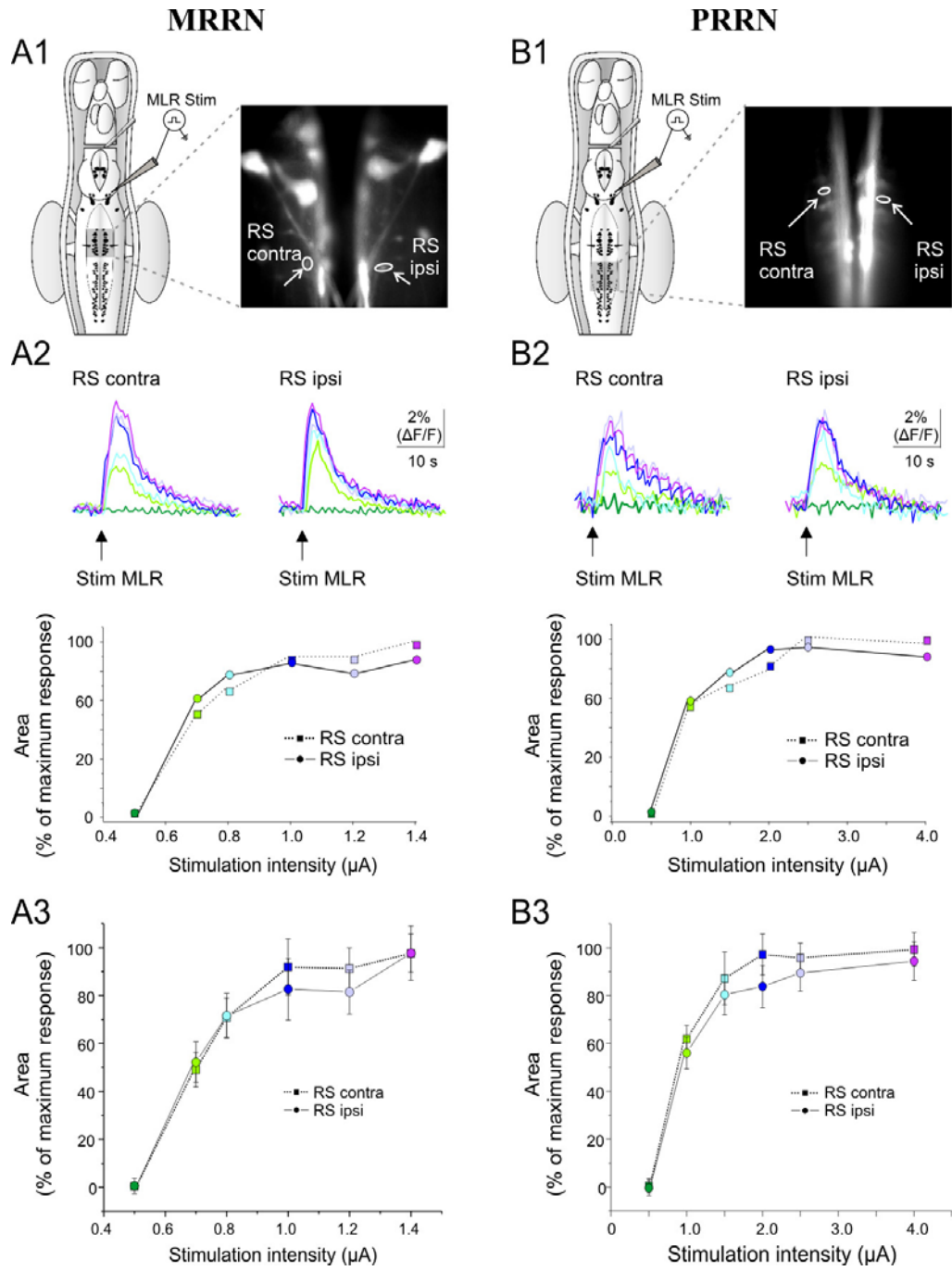


Figure 5

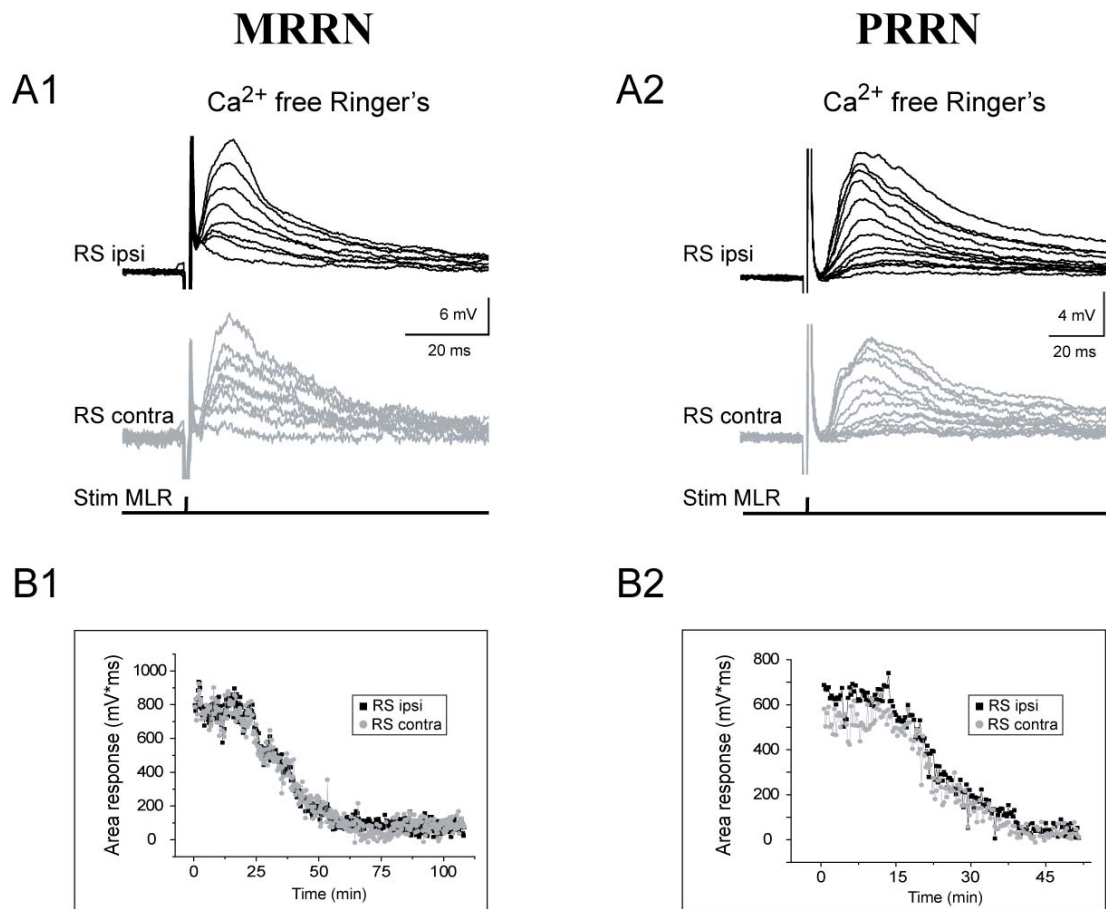


Figure 6

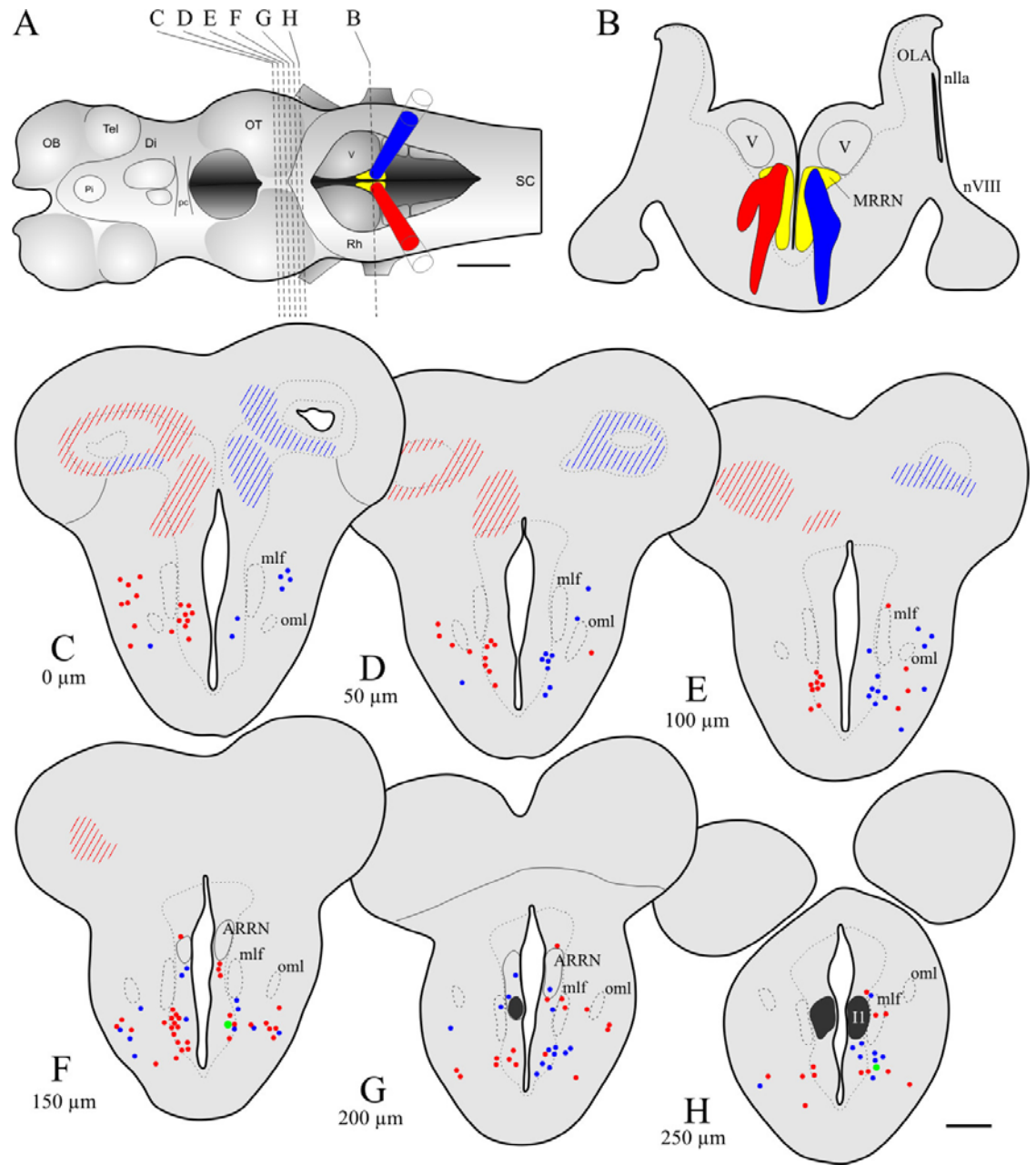


Figure 7

