

Université de Montréal

**Étude anatomique des neurones cholinergiques mésopontiques chez la lamproie
et la salamandre: relation avec la MLR**

par

Céline Bourcier

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

En sciences neurologiques

Août 2002

© Céline Bourcier, 2002



W
4
U58
2002
v. B1

Identification du jury

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude anatomique des neurones cholinergiques mésopontiques chez la lamproie et la salamandre: relation avec la MLR

Présenté par:

Céline Bourcier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Arlette Kolta

Président rapporteur

Dr Réjean Dubuc

Directeur de recherche

Dr James Lund

Membre du jury

Avant-propos:

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de deux publications:

Nicotinic activation of reticulospinal cells involved in the control of swimming in

lampreys

par

Didier LeRay, Frédéric Brocard, Céline Bourcier-Lucas, François Auclair, Philippe

Lafaille et Réjean Dubuc

En révision à European Journal of Neuroscience

*

Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the

salamander *Notophthalmus viridescens*

par

Jean-Marie Cabelguen, Céline Bourcier-Lucas et Réjean Dubuc

En révision à Journal of Neuroscience

Résumé:

Découverte chez les mammifères il y a plus de 40 ans, la région locomotrice mésencéphalique (MLR) a également été mise en évidence chez la lamproie et la salamandre. Cette structure identifiée physiologiquement à la bordure mésopontique, initie et contrôle la puissance locomotrice. Les neurones réticulospinaux rhombencéphaliques véhiculent les informations descendantes issues de la MLR jusqu'à la moelle épinière. Cependant, peu de choses sont connues concernant le mode d'action de la MLR et ses effets sur les cellules cibles. De récentes données anatomiques et physiologiques obtenues chez la lamproie suggèrent fortement que la MLR active le système réticulospinal rhombencéphalique en partie via des projections cholinergiques. Ce projet a pour but de mettre en évidence des cellules cholinergiques au sein de la MLR identifiée fonctionnellement sur une préparation semi-intacte de lamproie et de salamandre. L'immunohistochimie anti-ChAT confirme la présence de deux populations cholinergiques mésopontiques: le noyau tegmental latéro-dorsal (LDT) et le noyau pédunculo-pontin (PPN) chez la lamproie, le LDT et le noyau isthmique (NI) chez la salamandre. L'analyse anatomique détaillée (représentation 3-D, quantification) révèle que les cellules cholinergiques du LDT font partie de la MLR chez ces deux espèces. D'autre part chez la salamandre, la technique de traçage rétrograde au cobalt indique qu'une partie des cellules cholinergiques situées autour de la MLR pourrait projeter vers le noyau réticulé rhombencéphalique moyen (MRRN). Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer que la MLR envoie des projections cholinergiques vers la formation réticulée chez la salamandre.

Mots clés: lamproie; salamandre; immunohistochimie; choline-acétyltransférase; noyau tegmental latéro-dorsal; noyau pédonculopontin; région locomotrice mésencéphalique; locomotion; traçage rétrograde.

Summary:

First described in mammals 40 years ago, a mesencephalic locomotor region (MLR) has also been shown in lampreys and salamanders. This physiologically identified structure at the mesopontine border, initiates and controls the power of locomotion. Descending inputs from the MLR to the spinal cord are relayed by rhombencephalic reticulospinal neurons. Nevertheless, there is still little known about the detailed connections between the MLR and reticulospinal cells. Recent anatomical and physiological data strongly suggest that cholinergic inputs play a substantial role in the MLR command to reticulospinal cells in lampreys. The present experiments were designed to ask whether cholinergic cells are present in the MLR functionally identified in a semi-intact preparation of lamprey and salamander. ChAT-immunohistochemistry confirms the existence of two populations of mesopontine cholinergic neurons: the laterodorsal tegmental nucleus (LDT) and the pedunclopontine nucleus (PPN) in lampreys, the LDT and the isthmic nucleus (NI) in salamanders. The detailed anatomical study (3-D representation, quantitative analysis) reveals that cholinergic cells of the LDT are located in the MLR-region of lampreys as well as salamanders. Furthermore, retrograde labelling with cobalt-lysine indicates that some cholinergic cells around the MLR of the salamander may project to the medial rhombencephalic reticular nucleus (MRRN). Additional experiments are necessary to test this hypothesis.

Key words: lamprey; salamander; immunohistochemistry; choline-acetyltransferase; laterodorsal tegmental nucleus; pedunclopontine nucleus; mesencephalic locomotor region; locomotion; retrograde labelling.

Table des matières:

<i>Résumé</i>	<i>ii</i>
<i>Summary</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xii</i>
Première partie: Introduction générale	1
Introduction.....	1
I- Le contrôle locomoteur.....	2
II- Les mammifères.....	5
A- Les régions locomotrices supraspinales.....	5
1- Les régions diencephaliques.....	5
2- La MLR.....	8
3- La région bulbaire.....	12
B- Les composantes de la MLR.....	14
1- Le noyau cunéiforme (CNF).....	15
2- Le noyau PPN.....	17
a- Le PPN: un noyau hétérogène.....	17
b- Le PPN = MLR?.....	19
C- Les projections à la MLR.....	22
D- Les efférences de la MLR.....	25
1- La voie MLR-formation réticulée ventro-médiane.....	25

2- Les projections descendantes cholinergiques.....	27
III- Les vertébrés inférieurs.....	31
A- La MLR chez les poissons.....	31
B- La lamproie.....	33
1- La locomotion sensorielle.....	33
2- La locomotion dirigée vers un but.....	34
a- La région locomotrice diencéphalique (DLR).....	34
b- La MLR.....	36
3- La voie MLR-système réticulospinal.....	38
C- La salamandre.....	43
1- La marche et la nage chez la salamandre.....	43
2- La locomotion fictive sur la préparation <i>in vitro</i>	44
3- La MLR.....	45
4- MLR et système réticulospinal.....	48
Deuxième partie: Objectifs.....	50
Troisième partie: Matériel et méthodes.....	52
I- Lésion électrolytique de la MLR.....	52
II- Étude des neurones cholinergiques isthmiques.....	52
A- Protocole pour les coupes au cryostat (adapté de Barber et al., 1984).....	54
B- Protocole pour les coupes flottantes (adapté de Pombal et al., 2001).....	55
C- Analyses et représentation 3-D.....	56
III- Étude des projections cholinergiques entre la MLR et le MRRN.....	56
A- La technique de double marquage fluorescent.....	56
B- Le traçage rétrograde au cobalt.....	58
Quatrième partie: Résultats.....	59

I- Résultats immunohistochimiques.....	59
A- Chez la lamproie.....	59
B- Chez la salamandre.....	69
II- Résultats des études de traçage.....	75
Cinquième partie: Discussion.....	81
I- Étude comparée des systèmes cholinergiques mésopontiques chez les vertébrés inférieurs.....	82
II- Projections cholinergiques entre la MLR et la formation réticulée.....	85
III- Les autres systèmes de neurotransmission.....	89
IV- Problèmes méthodologiques liés au double marquage.....	90
Sixième partie: Bibliographie.....	92

Liste des figures:

Figure 1: Structures du cerveau antérieur et du tronc cérébral impliquées dans l'initiation de la locomotion chez les mammifères.....	7
Figure 2: La MLR chez le chat.....	9
Figure 3: Différence dans l'organisation cytoarchitectonique du PPN chez le chat et le rat.....	21
Figure 4: Les projections descendantes de la MLR.....	28
Figure 5: Structures du cerveau antérieur et du tronc cérébral impliquées dans l'initiation de la locomotion chez la lamproie.....	37
Figure 6: Préparation <i>in vitro</i> versus préparation semi-intacte chez la lamproie.....	39
Figure 7: Localisation des cellules de Müller chez la lamproie adulte <i>Ichthymoyzon unicuspis</i>	41
Figure 8: La marche et la nage générées par la stimulation électrique de la MLR chez la salamandre adulte.....	47
Figure 9: Cellules ChAT-ir à l'intérieur du site de coagulation de la MLR sur une lamproie à l'état larvaire.....	60
Figure 10: Distribution des neurones ChAT-ir à la bordure mésopontique chez la lamproie adulte.....	61
Figure 11: Représentation en trois dimensions de la position des cellules ChAT-ir des deux groupes isthmiques.....	65
Figure 12: Photomicrographies illustrant différents noyaux ChAT-ir du cerveau de la lamproie adulte.....	67
Figure 13: Cellules ChAT-ir autour du site de coagulation de la MLR chez la salamandre adulte.....	70

Figure 14: Distribution des neurones ChAT-ir dans la région isthmique chez la salamandre adulte.....	72
Figure 15: Photomicrographies illustrant différents noyaux ChAT-ir du cerveau de la salamandre adulte.....	74
Figure 16: Photomicrographies de sections transverses fines obtenues après le protocole de double marquage sur un cerveau de lamproie adulte.....	76
Figure 17: Schéma illustrant la distribution des neurones ChAT-ir dans la région isthmique chez la salamandre adulte ainsi que la distribution des neurones marqués de façon rétrograde après l'injection de cobalt dans la région du MRRN.....	79

Liste des abréviations:

ACh: acétylcholine

AChE: acétylcholinestérase

ADT: tegmentum antérodorsal mésencéphalique

Aq: Aqueduc de Sylvius

ARRN: noyau réticulé rhombencéphalique antérieur

AVT: aire ventrale tegmentale

Ax VI: axones de l'abducens

BC: brachium conjunctivum

C: cervelet

CC: canal central

CG: substance grise centrale

ChAT: choline acétyltransférase (ChAT-ir: cellules ChAT-immunoréactives)

CNF: noyau cunéiforme

CPG: central pattern generator (générateur de patrons centraux)

DA: dopamine

DLR: diencephalic locomotor region (région locomotrice diencéphalique)

EMG: électromyogramme (électromyographique)

EN: noyau entopédunculaire

Enk: enképhaline

Fml: fasciculus médian longitudinal

FR: fasciculus retroflexus

FRM: formation réticulée médiane

FRP: formation réticulée pontique

FVL: funiculus ventro-latéral

GABA: acide gamma-aminobutyrique

Glu: acide glutamique

Hist: histamine

I1: cellule de Müller isthmique de l'ARRN

IC: colliculus inférieur

IP: noyau interpédunculaire

LDT: noyau tegmental latéro-dorsal

MB: corps mammillaires

MLR: mesencephalic locomotor region (zone locomotrice mésencéphalique)
MN: motoneurones spinaux
MRN: noyau réticulé mésencéphalique
MRRN: noyau réticulé rhombencéphalique moyen
NADPH-d: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase
NI: noyau isthmique
NLV: noyau latéral de la valvule
NMDA: N-méthyl-D-aspartate
NRG: noyau réticulé gigantocellularis
NRM: noyau réticulé magnocellularis
NRS: noyau réticulé supérieur
NT: neurotensine
NV: nerf du trijumeau
NVS: noyau viscéral secondaire
PAG: substance grise périaqueductale
PLS: pontomedullary locomotor strip (bande locomotrice ponto-bulbaire)
PPN: noyau pedunculopontin (PPNc: partie compacte; PPNd: partie dispersée)
PRRN: noyau réticulé rhombencéphalique postérieur
PV: noyau paraventriculaire
RS: réticulospinal
SC: colliculus supérieur
SLR: subthalamic locomotor region (aire locomotrice sous-thalamique)
SN: substance noire (SNr: SN réticulée)
STN: noyau sous-thalamique
TO: tectum optique
III: noyau oculomoteur
IV: noyau moteur du trochléaire
V: noyau moteur trigéminal
VI: noyau moteur de l'abducens
VII: noyau moteur facial
5-HT: sérotonine

Remerciements:

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Pr. Réjean Dubuc, pour tout l'encadrement et le soutien qu'il a su m'apporter au cours de la réalisation de ce projet de maîtrise. Je remercie également notre technicienne de laboratoire Danielle Veilleux pour le support technique ainsi que François Auclair notre agent de recherche pour son aide et ses nombreux conseils anatomiques.

J'aimerais remercier également Dorothy Barthélemy pour son aide lors de mes premiers mois d'apprentissage en matière de techniques immunohistochimiques, Yvan Breton pour sa disponibilité lors de la réalisation de la figure anatomique en trois dimensions, ainsi que Bastien Fricker pour sa participation au projet.

Enfin, je remercie tous mes collègues de travail, Jean-Charles Guimond, Frédéric Brocard, Tanguy Boutin, Didier LeRay pour leur aide et leur contribution à un agréable climat de travail.

PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION GENERALE

Introduction:

La locomotion est un mouvement propulsif qui permet à un animal de se déplacer dans son environnement. Elle se manifeste de différentes façons, sous la forme de la marche, de la nage ou du vol. Dans certains cas, la locomotion est déclenchée par des stimuli tactiles, auditifs ou visuels. Il s'agit alors d'une locomotion de fuite qui permet à l'animal de s'échapper par exemple devant un prédateur. La locomotion volontaire permet quant à elle d'atteindre un but précis comme par exemple partir à la chasse pour se nourrir. La locomotion est générée par des réseaux d'interneurones situés dans la moelle épinière. Différents centres supraspinaux participent à l'amorce et au contrôle de cette activité locomotrice (revue Grillner et al., 1997). C'est le cas notamment de la formation réticulée du tronc cérébral qui est également responsable du maintien de l'équilibre et de la posture. Chez l'homme et les tétrapodes, un système de coordination visuo-motrice localisé dans le cortex positionne correctement le pied à chaque étape du cycle de la marche et permet ainsi d'éviter les obstacles. Enfin, un troisième système initie et contrôle la locomotion motivationnelle. Il met en jeu les ganglions de la base qui transmettent leurs informations entre autre sur une région du mésencéphale appelée MLR ou zone locomotrice mésencéphalique. Cette structure physiologique reste conservée au cours de l'évolution phylogénétique puisque qu'on la retrouve des poissons primitifs aux vertébrés supérieurs. Elle contrôle la puissance locomotrice de façon à ce que l'amplitude et la fréquence du mouvement locomoteur augmentent avec la force de stimulation de la MLR. Les informations locomotrices sont ensuite véhiculées jusqu'à la moelle épinière via le système réticulospinal du bulbe ventro-médian.

Au cours de ce travail, nous allons étudier les composantes de la MLR, les structures qui projettent à la MLR et les cibles de la MLR générant le rythme locomoteur en commençant par les mammifères pour terminer ensuite par les poissons. Nous nous intéresserons plus particulièrement à deux espèces de vertébrés inférieurs qui se déplacent différemment au sein de leur environnement, la lamproie et la salamandre. Enfin, nous étudierons également les projections cholinergiques descendantes entre la MLR et le système réticulospinal.

I- Le contrôle locomoteur:

Chez les animaux possédant des membres, la locomotion consiste en une activité rythmique alternée des muscles extenseurs/fléchisseurs générée au niveau de la moelle épinière par des réseaux locomoteurs spinaux ou «central pattern generator» (CPG). Ceux-ci sont activés par le système réticulospinal, principale voie descendante impliquée dans l'initiation et le contrôle de la locomotion. Le CPG spinal reçoit en retour des informations sensorielles provenant du membre en mouvement ou du corps, lesquelles modulent l'activité locomotrice et permettent ainsi à l'animal d'adapter son comportement au milieu environnant. La moelle épinière seule est capable de générer une activité locomotrice: en effet, des chatons spinalisés (Forssberg et al., 1975) ou des chats adultes spinalisés au niveau thoracique (Barbeau et Rossignol, 1987) réalisent des mouvements alternés rythmiques semblables à la locomotion. Si l'activité rythmique de base est générée au niveau spinal, l'initiation et le contrôle de la locomotion dépendent de structures supérieures car l'animal doit constamment adapter ses mouvements pour évoluer dans un environnement imprévisible. En absence de cortex cérébral, des chats sont capables d'amorcer spontanément une gamme variée d'activités locomotrices

comme par exemple rechercher de la nourriture ou éviter des obstacles (Bjursten et al., 1976). L'absence de cortex cérébral ne semble donc avoir aucune conséquence sur le comportement locomoteur à tel point qu'il est difficile de faire la différence avec un animal intact; il faut noter cependant l'incapacité des chats décortiqués à marcher sur des surfaces complexes, sur une échelle par exemple, ce qui requiert une coordination visuomotrice réalisée par les voies descendantes corticospinales (Amos et al., 1990; Beloozerova et Sirota, 1993; Drew, 1993). Des chats décérébrés au niveau mésencéphalique de façon chronique ou aiguë peuvent également marcher ou courir après stimulation de certaines régions du tronc cérébral (Grillner, 1985). Toutefois, leurs mouvements restent automatiques, sans logique apparente et ne sont plus adaptés à leur environnement. Il a été montré que les ganglions de la base absents après décérébration sont responsables, du moins en partie, du contrôle de la locomotion et plus particulièrement de la locomotion dirigée vers un but précis. Le contrôle locomoteur passe aussi par le maintien de l'équilibre et la coordination entre les membres. Durant chaque étape du cycle de la marche, le cervelet reçoit une information détaillée sur la progression cinétique de chaque membre en mouvement ainsi qu'une copie des informations provenant du CPG spinal. Après avoir intégré ces données, le cervelet module l'activité motoneuronale par les voies descendantes réticulospinales, rubrospinales et vestibulospinales.

La locomotion sous diverses formes (marche, saut, nage, vol) permet aux mammifères et autres vertébrés de se déplacer d'un point à l'autre dans l'espace. L'activité locomotrice peut être déclenchée par une stimulation sensorielle (la vue ou l'attaque d'un prédateur qui entraîne la fuite). Le contrôle de la locomotion sensorielle est organisé au niveau rhombencéphalique tout au moins chez les vertébrés inférieurs

(Grillner, 1985). L'animal peut aussi se déplacer pour atteindre un but précis (se nourrir, par exemple) ce qui nécessite un contrôle nerveux hiérarchique plus élevé. La locomotion motivationnelle est étudiée d'un point de vue comportemental sur des modèles évolués de vertébrés supérieurs (mammifères, hommes). Une grande partie des données concernant le contrôle locomoteur provient d'études réalisées sur le chat. En plus du modèle de l'animal intact, deux types de préparations réduites, les chats spinalisés ou décérébrés, sont couramment employés. Bien que les afférences sensorielles jouent un rôle important dans la modulation de l'activité locomotrice, il est possible d'étudier le comportement locomoteur en absence de feed-back périphérique en paralysant l'animal par des agents curarisants. De cette façon, les nerfs moteurs des muscles extenseurs et fléchisseurs déchargent rythmiquement et alternativement mais aucun véritable mouvement n'est observé: on parle de **locomotion fictive**. Celle-ci survient spontanément après stimulation de certaines régions du tronc cérébral sur des chats spinalisés (Jordan et al., 1979). Le système nerveux central complexe des mammifères ne permet pas d'expliquer la locomotion sur une base cellulaire. Pour comprendre le fonctionnement du CPG spinal, il est nécessaire de déterminer les propriétés synaptiques et membranaires des neurones constituant le réseau locomoteur, de détailler les interconnexions entre ces neurones et d'expliquer leur modulation en cas d'activité locomotrice. Étant donné que l'organisation générale du système nerveux locomoteur reste très conservée au cours de la phylogenèse, des modèles simplifiés de vertébrés inférieurs sont utilisés afin d'étudier les mécanismes cellulaires responsables de l'activité rythmique locomotrice (lamproie, embryon de xénope, poisson zèbre). Les techniques électrophysiologiques de pointe (cellule attachée, intracellulaire) appliquées sur ces préparations de cerveau isolé *in vitro* ouvrent de nouvelles perspectives quant à

la caractérisation des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle de la locomotion. Ainsi, les réseaux d'interneurones spinaux responsables de la nage chez la lamproie ont déjà été identifiés (Buchanan et Grillner, 1987), de même que les réseaux locomoteurs du xénope (Dale et Roberts, 85). Ultérieurement, des préparations de rat néonatal ont été développées *in vitro* permettant également d'analyser les propriétés intrinsèques des neurones à l'origine du rythme locomoteur chez les mammifères.

II- Les mammifères:

A- Les régions locomotrices supraspinales:

1- Les régions diencephaliques:

Des groupes neuronaux importants pour l'initiation de la locomotion motivationnelle sont situés au niveau préoptique et hypothalamique (Sinnamon, 1993). Sinnamon (1993) utilise un modèle simple de rat légèrement anesthésié, insensible aux stimuli externes, qui présente les mêmes caractéristiques que l'animal éveillé notamment en ce qui concerne les réponses des sites locomoteurs du cerveau antérieur et du tronc cérébral. Des données pharmacologiques indiquent que la région préoptique du cerveau antérieur contient des neurones responsables de l'initiation de la locomotion. Des expériences de stimulations électriques de faible intensité (25 μ A) ont permis de centrer plus précisément ces sites locomoteurs autour de l'aire préoptique latérale, sites regroupés sous le terme de **région locomotrice préoptique**. De la même façon, la locomotion induite par une stimulation électrique de faible intensité appliquée dans l'hypothalamus est médiée par des neurones présents dans sa partie latérale, l'aire périforniculaire et, dans une moindre mesure, la *zona incerta*. Cette région locomotrice

diencephalique correspond à celle décrite par Orlovsky (1970b) appelée **l'aire locomotrice sous-thalamique ou SLR** (subthalamic locomotor region) et projette directement au système locomoteur réticulospinal (Sinnamon et Stopford, 1987). Sinnamon (1993) différencie trois types de comportements locomoteurs spécifiques au contexte environnemental. **La locomotion appétitive** amène l'animal au contact d'un stimulus renforçant positif (la nourriture). **La locomotion défensive** au contraire éloigne l'animal d'un stimulus nocif ou menaçant (un prédateur). **La locomotion d'exploration** rencontrée à un niveau d'évolution plus élevé permet au mammifère de discriminer le milieu ambiant. La stimulation électrique des deux régions locomotrices diencephaliques précédemment décrites produit essentiellement une locomotion motivationnelle de type appétitive. Cependant, de nombreux chevauchements existent. Ainsi, au niveau de la région locomotrice préoptique, il est impossible de différencier la locomotion défensive de la locomotion appétitive. Par contre, les régions responsables du comportement d'exploration se distinguent plus facilement sur des rats éveillés et correspondent à la région subpallidale, située latéralement à l'aire locomotrice préoptique du rat anesthésié. Le circuit subpallidal comprend les ganglions de la base incluant la voie hippocampe – accumbens – pallidum ventral (cf partie projections à la MLR) et projette sur le noyau pédunculo-pontin du mésencéphale. Au niveau hypothalamique, la stimulation électrique de l'hypothalamus latéral et de l'aire périforniculaire génère une locomotion de type appétitive alors que les cellules de l'hypothalamus médian interviennent dans la locomotion de type défensive (fuite, aversion) (cf figure 1).

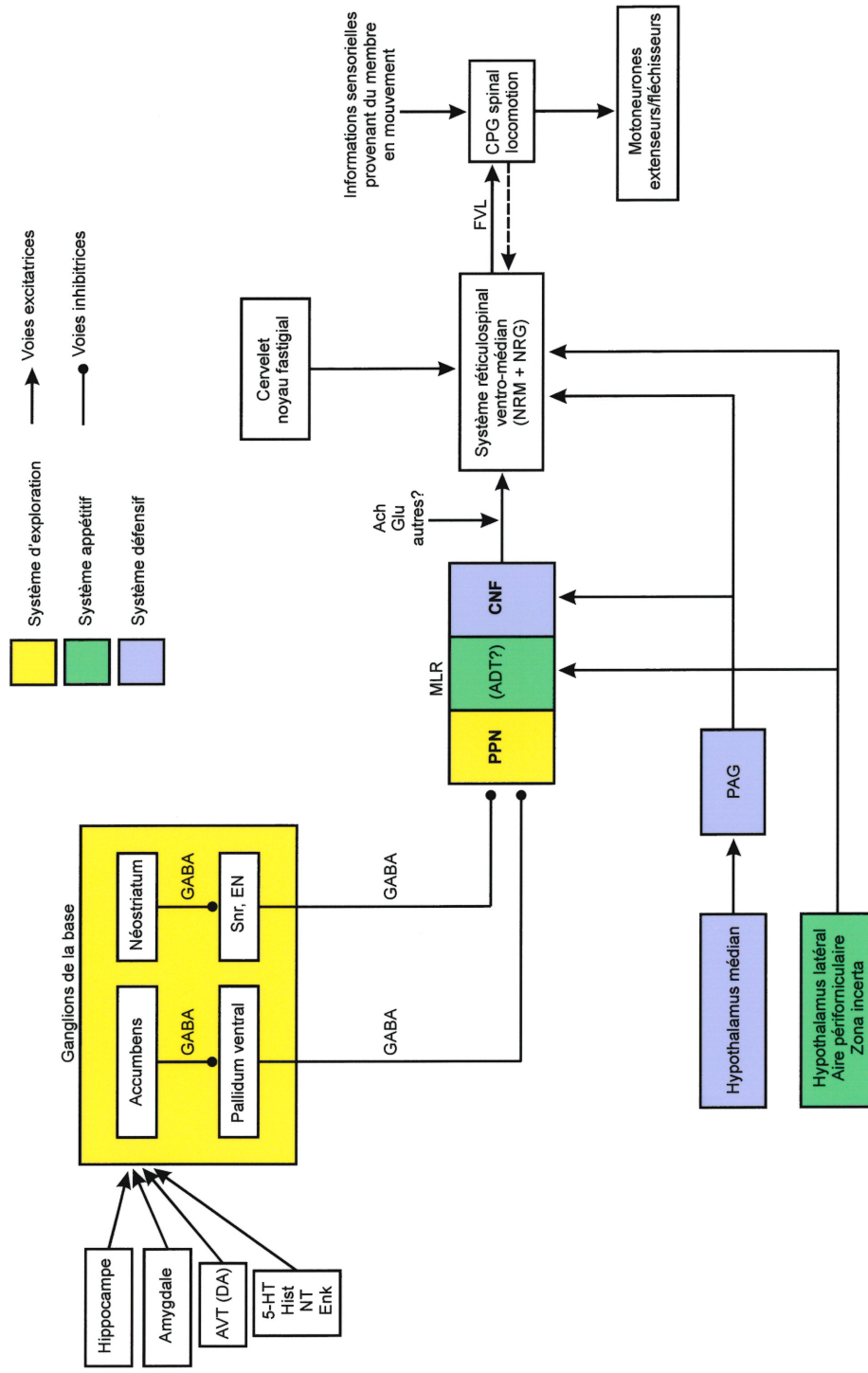


Figure 1

Structures du cerveau antérieur et du tronc cérébral impliquées dans l'initiation de la locomotion chez les mammifères

Cf texte pour les commentaires

Tiré de la revue Jordan (1998)

2- La MLR:

Dans les années soixante, Shik et ses collègues (1966) ont mis en évidence pour la première fois une région locomotrice localisée dans le mésencéphale caudal appelée «**mesencephalic locomotor region**» ou **MLR**. Des chats adultes décérébrés au niveau pré-colliculaire/post-mamillaire sont placés sur un tapis roulant, leur poids étant supporté par un hamac. Une stimulation électrique tonique (20 à 60 Hz), de 10 à 60 μ A localisée au niveau du mésencéphale postérieur déclenche la marche sur le tapis roulant (à noter que la locomotion survient spontanément après une transection pré-colliculaire/pré-mamillaire). Les animaux sont également capables d'adapter leur rythme au changement de vitesse du tapis. La MLR présente la particularité de fonctionner comme un rhéostat: elle contrôle l'intensité de la locomotion de telle sorte que l'animal passe de la marche au trot puis au galop en même temps que l'intensité ou la fréquence de stimulation de la MLR augmente. Par conséquent, la simple stimulation d'une région discrète du tronc cérébral peut initier un comportement locomoteur complexe qui requiert une activation coordonnée d'une centaine de muscles à travers tout le corps (cf figure 2).

Cependant, la MLR n'est pas nécessaire pour déclencher une locomotion sur l'animal intact. En effet, après lésion bilatérale de la MLR, le chat est toujours capable de marcher malgré un manque de coordination des pattes postérieures (Shik et Orlovsky, 1976). Dans ce cas, il semble que la SLR, qui projette directement vers le système locomoteur réticulospinal sans passer par la MLR, prenne en charge le contrôle de l'activité locomotrice (cf figure 1). Shik et Orlovsky (1976) suggèrent que la SLR soit davantage impliquée dans l'aspect motivationnel et émotionnel de la locomotion (chasse, défense, recherche de nourriture) tandis que l'activation de la MLR

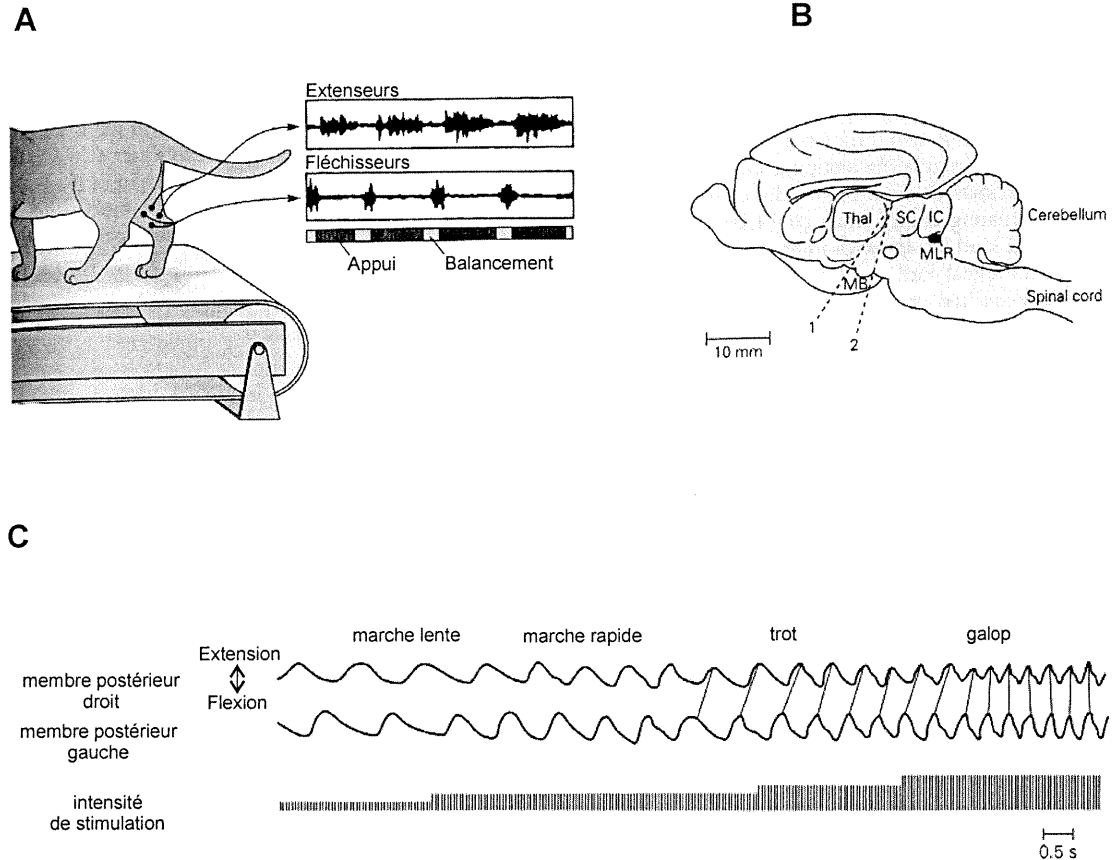


Figure 2

La MLR chez le chat (Shik et al., 1966)

A: Le chat adulte décérébré au niveau précolliculaire/post-mamillaire est placé sur un tapis roulant. L'activité électromyographique (EMG) des muscles extenseurs et fléchisseurs est enregistrée durant la locomotion. B: Dépendamment du niveau exact de la transection du tronc cérébral, la locomotion survient spontanément (niveau 1, précolliculaire/pré-mamillaire) ou après stimulation électrique de la MLR (niveau 2, précolliculaire/post-mamillaire). La MLR est une petite région localisée 6 mm environ sous le colliculus inférieur près du noyau cunéiforme. C: En augmentant la force de stimulation de la MLR, l'animal passe progressivement de la marche lente, au trot puis au galop. A ce moment, il y a synchronisation des flexions et extensions des membres postérieurs. SC: colliculus supérieur; IC: colliculus inférieur; MB: corps mamillaires.

Tiré du Kandel (4^o édition)

augmenterait la puissance locomotrice de l'animal. Par la suite, il a été montré que la locomotion induite par la stimulation de la SLR requiert l'activation de cellules localisées dans le tegmentum antérodorsal mésencéphalique (ADT), lesquelles feraient probablement partie de la MLR (revue Jordan, 1998) (cf figure 1). En effet, l'activité des cellules de l'ADT est corrélée avec le début de la marche due à la stimulation de l'hypothalamus latéral. De plus, l'injection de GABA dans l'ADT bloque de façon réversible la locomotion d'origine hypothalamique (revue Jordan, 1998). Ainsi, contrairement à l'hypothèse de départ, la MLR et la SLR ne fonctionnent pas indépendamment mais sont interconnectées.

La MLR a aussi été identifiée chez d'autres mammifères (revue Grillner et al., 1997). Sur des rats adultes décérébrés au niveau précolliculaire-prénigral, la stimulation électrique de 50 μ A, à forte fréquence (50 à 60 Hz) d'une aire restreinte du mésencéphale caudal produit la marche sur un tapis roulant (Skinner et Garcia-Rill, 1984). Comme chez le chat, l'amplitude de la marche augmente avec l'intensité de stimulation de la MLR jusqu'à obtenir, pour de fortes intensités de stimulation, une activité en phase des muscles extenseurs ipsi et contralatéraux de la patte antérieure caractéristique du galop. Bien que la MLR du rat se situe au même niveau dans le mésencéphale postérieur que la MLR du chat, il faut noter quelques différences quant à son organisation anatomique (cf explication dans la partie composante de la MLR, dans la rubrique PPN). De la même façon, la mobilité des rats en liberté augmente après stimulation électrique ou chimique de la MLR (Milner et Mogenson, 1988). Sur un modèle *in vitro* de rat néonatal (l'ensemble moelle épinière-tronc cérébral reste attaché aux pattes postérieures conservées intactes), et décérébré au niveau précolliculaire, la

stimulation électrique de la région péribrachiale et de l'aire réticulaire ventrolatérale adjacente produit un mouvement alterné rythmique des pattes postérieures (Atsuta et al., 1990). Il faut cependant un courant d'amplitude plus importante pour déclencher la locomotion (40 à 80 μA) par rapport à un rat adulte (15 à 60 μA) suggérant que le contrôle locomoteur mésencéphalique est moins prononcé à ce stade précoce. Sur ce modèle, la MLR agit comme un rhéostat; la fréquence de la marche augmente avec l'intensité de stimulation. Malgré tout, même si l'activité synaptique est potentialisée (absence de magnésium dans le milieu artificiel), le trot ou le galop n'est jamais observé. Par conséquent, la MLR contrôle la locomotion dès la naissance mais les mécanismes responsables du galop se mettent en place plus tard au cours du développement. Un centre locomoteur mésencéphalique existe également chez les singes macaques (Eidelberg et al., 1981). Après avoir effectué une transection thalamique, des trains de stimulations électriques (200 μA , 50 Hz) sont appliqués dans le tegmentum mésencéphalique sous le colliculus inférieur, tandis que les pieds de l'animal sont en contact avec un tapis roulant. Dès l'apparition de mouvement alterné rythmique, le courant électrique est diminué (parfois à 25 μA) jusqu'au seuil de déclenchement de la locomotion. À très faible intensité de stimulation, cette activité rythmique alternée touche d'abord le membre postérieur contralatéral. Puis pour des intensités de stimulations croissantes, les autres membres sont recrutés jusqu'à l'apparition d'un patron de marche lente qui se transforme progressivement en galop. Actuellement, on ignore s'il existe une MLR chez l'homme. Toutefois, un premier cas clinique a été répertorié sur un patient atteint d'une hémorragie à la jonction ponto-mésencéphalique (Masdeu et al., 1994); ce patient est devenu incapable de se tenir debout et de marcher.

La MLR existe également chez d'autres espèces que les mammifères. Sur des canards ou des poulets décérébrés, la stimulation électrique de certaines régions pontiques et de la formation réticulée mésencéphalique produit une locomotion contrôlée (Steeves et al., 1987). En effet, une faible intensité de stimulation (25 à 50 μ A, 30 à 80 Hz) entraîne une marche bipède semblable à celle observée chez l'homme, puis pour des stimulations plus fortes (50 à 100 μ A), l'oiseau se met à voler. L'administration intra-cérébrale de substances pharmacologiques (NMDA, substance P) au sein de cette région induit une locomotion ou réduit le seuil de déclenchement de l'activité locomotrice (Sholomenko et al., 1991). Ainsi, la MLR génère des patrons locomoteurs très variés allant de la marche chez les tétrapodes au vol chez les oiseaux. Comme nous allons le voir en détail plus tard, sa stimulation provoque également la nage chez les poissons et les cyclostomes (Kashin et Feldman, 1974; McClellan et Grillner, 1984; Sirota et al., 2000). La MLR reste donc conservée au cours de l'évolution phylogénétique des vertébrés et sa stimulation produit des mouvements musculaires adaptés à chaque espèce, malgré leurs appendices locomoteurs spécialisés.

3- La région bulbaire:

La stimulation électrique ou chimique de certaines parties du bulbe provoque également une activité locomotrice. C'est le cas notamment, de **la bande locomotrice ponto-bulbaire ou PLS («ponto-medullary locomotor strip»)** qui s'étire dorso-latéralement dans la formation réticulée (Mori et al., 1977). Au niveau pontique, la PLS passe par le noyau mésencéphalique du trijumeau situé ventro-latéralement au noyau moteur du trijumeau, pour se poursuivre dans le bulbe ventralement au noyau spinal du

nerf trijumeau. Elle projette ensuite vers la moelle épinière via le funiculus dorsolatéral pour se terminer sur les deux premiers segments spinaux. Selon Jordan (revue, 1986), la locomotion produite par la stimulation de la PLS serait due à l'activation de fibres sensorielles qui véhiculent les informations provenant de la face. Différentes aires de la **formation réticulée médiane ou FRM du bulbe ou du pont** génèrent également une locomotion contrôlée. En 1978, Mori et ses collègues démontrent que la stimulation électrique de la FRM entraîne une locomotion ou facilite la locomotion induite par la stimulation de la MLR en diminuant les seuils de déclenchement de la marche. De la même façon, l'activation des neurones de la FRM par des agonistes cholinergiques, de la substance P et des acides aminés excitateurs initie une locomotion chez les mammifères (Garcia-Rill et Skinner, 1987a; Kinjo et al., 1990) et les oiseaux (Sholomenko et al., 1991). La FRM regroupe plus précisément les noyaux réticulés gigantocellularis et magnocellularis du bulbe ventro-médian et projette directement sur tous les segments spinaux. Ce système représente la voie descendante réticulospinale véhiculant les informations locomotrices de la MLR jusqu'au CPG spinal (Orlovsky et al., 1970a) (cf partie efférences de la MLR). Enfin, il faut noter que la station debout requiert un certain niveau de tonus postural. Un chat décérébré au niveau précolliculaire-postmamillaire dont le poids est maintenu par un hamac, développe un réflexe spontané de maintien du tonus postural. Alors que la stimulation de la partie dorsale du pont diminue le tonus musculaire extenseur des membres postérieurs, la stimulation de la partie ventrale du pont augmente ce tonus de telle sorte que l'animal reste debout et pourra ainsi commencer à marcher (revue Mori et Ohta, 1986).

B- Les composantes de la MLR:

Dans les années 1960, le groupe de Shik et Orlovsky situe la MLR dans le mésencéphale caudal d'où le terme de «mesencephalic locomotor region» (Shik et al., 1966). Depuis, de nombreuses évidences indiquent que la MLR se situe plus exactement à la bordure mésopontique, latéral à l'aqueduc de Sylvius et ce chez plusieurs espèces de vertébrés. La MLR identifiée fonctionnellement reste cependant difficile à caractériser anatomiquement. Shik et coll. (1966) indiquent qu'une stimulation électrique de la MLR de faible amplitude (10 à 60 μ A) suffit pour amorcer la locomotion suggérant que des cellules au sein de la MLR sont activées et non des axones de passage. Des cellules dans la MLR participent à la génération d'une activité rythmique. En effet, environ 50% des neurones de la MLR enregistrés en extracellulaire déchargent de façon rythmique pendant la locomotion spontanée d'un chat décérébré au niveau précolliculaire-prémamillaire (Garcia-Rill et al., 1983c). Pour la moitié d'entre eux, la fréquence de décharge unitaire est corrélée avec l'activité électromyographique d'un ou plusieurs muscles extenseurs ou fléchisseurs. Cette activité rythmique persiste quand les membres sont attachés c'est-à-dire en absence de retour périphérique provenant du membre en mouvement. Par ailleurs, comme nous allons le voir en détail plus tard, l'injection locale de substances neuroactives (antagonistes GABA chez le chat: Garcia-Rill et al., 1985; antagonistes GABA, substance P, NMDA chez le rat: Garcia-Rill et al., 1990) dans la région de la MLR initie la locomotion. Par conséquent, la MLR regroupe un ensemble de cellules responsable de l'activité rythmique locomotrice. Depuis, de nombreuses études cherchent à caractériser anatomiquement la MLR et bien que toutes soient en accord pour localiser la MLR au même endroit dans le tegmentum mésencéphalique, il reste de nombreuses interrogations quant à sa composition

cellulaire. À l'heure actuelle, on considère que **le noyau cunéiforme ou CNF** et **le noyau pédunculo-pontin ou PPN** sont les principaux composants cellulaires de la MLR. Néanmoins, cette région locomotrice semble également inclure d'autres aires mésencéphaliques comme le noyau du tegmentum antéro-dorsal (ADT) et le noyau mésencéphalique profond (revue Jordan, 1998). La MLR est composée effectivement d'une population cellulaire hétérogène car sa stimulation en différents points produit des comportements locomoteurs variés (d'exploration, de défense, appétitif) comme cela se passe après l'activation des régions locomotrices diencéphaliques (Sinnamon, 1993) (cf figure 1).

1- Le noyau cunéiforme (CNF):

Les premières expériences effectuées sur le chat décérébré situent la MLR sous le colliculus inférieur au voisinage de la terminaison caudale du CNF (Shik et al., 1966). Par la suite, plusieurs études ont montré que les sites effectifs d'une activité locomotrice contrôlée due à une stimulation électrique ou chimique de la MLR sont localisés à l'intérieur ou autour du CNF (Garcia-Rill et al., 1981; Steeves et Jordan, 1984; Coles et al., 1989). Le marquage au 2-déoxyglucose révèle que l'activité autoradiographique dans le CNF augmente de façon bilatérale après stimulation unilatérale de la MLR (Kettler et Jordan, 1984). L'injection locale de procaine, bloqueur des canaux sodiques, dans le CNF, réduit la locomotion induite par l'administration d'amphétamines dans le noyau accumbens (Brudzynski et Mogenson, 1985). Sur des chats intacts, la stimulation électrique d'une aire correspondant au CNF augmente la vitesse de locomotion mesurée par un test comportemental de champ ouvert (Mori et al., 1989). La partie ventro-latérale du CNF est plus sensible pour déclencher une locomotion alors que la stimulation de la

partie antérieure du CNF est sans effet (Garcia-Rill et al., 1981). Le CNF est donc un noyau hétérogène et une partie seulement du noyau peut générer une activité locomotrice. Plus récemment, une étude vient démontrer que le CNF ne fait pas partie de la MLR. Sur des rats entraînés à marcher sur un tapis roulant, la lésion à l'acide iboténique localisée dans le CNF est sans effet sur la locomotion spontanée ou induite par la stimulation du noyau accumbens (Allen et al., 1996). Les auteurs suggèrent que le concept de MLR n'existe pas car selon eux ni le CNF ni le PPN ne font partie de la MLR. Le PPN et le CNF seraient plutôt impliqués dans le renforcement positif et négatif respectivement car le PPN produit des réactions d'approche alors que le CNF produit des réactions de fuite. Ultérieurement, une expérience citée dans la revue de Jordan (1998) indique qu'un grand nombre de cellules du CNF montre une activité c-fos élevée sur des rats entraînés à une tâche locomotrice simple, contrairement au PPN, identifié par histochimie (cf explication dans la partie PPN), où il y a très peu de cellules c-fos. Même si ce genre de marquage activité dépendante ne constitue pas une preuve en soi, cette dernière donnée tend à confirmer que le CNF fait effectivement partie de la MLR. Il faut noter toutefois que cette augmentation d'activité peut s'expliquer par une augmentation de l'excitation issue des afférences projetant au CNF.

Sur des chats libres de se mouvoir, la stimulation électrique du CNF produit une locomotion accompagnée d'une réaction aversive; l'animal se comporte comme s'il voulait éviter un stimulus nocif bien qu'il n'y ait pas de tentative de fuite (Mori et al., 1989). Après injection de glutamate dans le CNF, le rat éveillé reste prostré ou essaie de fuir rapidement (Mitchell et al., 1988). Des rats en liberté adoptent un comportement de défense qui s'accroît avec des intensités de stimulation électrique croissantes du CNF (Depoortere et al., 1990). Si les rats sont entraînés à supprimer ce stimulus en appuyant

sur une barre, la réaction aversive disparaît. Donc le CNF est davantage impliqué dans l'aspect émotionnel (peur, aversion) que dans le comportement locomoteur. De la même façon, la stimulation électrique ou chimique de la substance grise périaqueducatale (PAG) ou de l'hypothalamus médian, éléments associés à la locomotion défensive selon Sinnamon (1993), augmente le marquage activité-dépendante c-fos entre autre dans le CNF (Sandner et Di Scala, 1992; Leite-Silveira et al., 1995). Ainsi, la voie hypothalamus médian-PAG-CNF est associée à un comportement défensif et sa stimulation entraîne la fuite de l'animal (cf figure 1).

2- Le noyau PPN:

On a proposé que le noyau PPN soit impliqué dans l'initiation de la locomotion sur la base de ses connections avec les structures limbiques et les ganglions de la base.

a- Le PPN : un noyau hétérogène:

Le PPN est une structure qui a longtemps été difficile à délimiter de façon cytoarchitectonique. Ce noyau est composé d'une population hétérogène sur le plan neurochimique et morphologique. Newman (1985) a défini les limites du PPN selon des critères morphologiques neuronaux. Au niveau du colliculus inférieur, les cellules sont concentrées en amas à la bordure latéro-ventral du *brachium conjunctivum* et constituent **la pars compacta du PPN ou PPNc**. Au niveau du colliculus supérieur, les cellules sont davantage dispersées ventralement dans la formation réticulée mésencéphalique et représente **la pars dissipatus du PPN ou PPNd**. L'arrivée des techniques immunohistochimiques dirigées contre la choline acétyltransférase ou ChAT, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, a mis en évidence des neurones cholinergiques dans le tegmentum mésopontique (Armstrong et al., 1983; Kimura et al., 1981; Mesulam et al.,

1983; Satoh et al., 1983). Le marquage histochimique à la NADPH diaphorase ou NADPH-d est également utilisé pour identifier les neurones cholinergiques mésopontiques où il y a un niveau élevé de colocalisation ChAT/ NADPH-d (Vincent et al., 1983). Toutefois, le degré de colocalisation varie selon les espèces; il est plus faible chez les oiseaux comparativement aux mammifères (Panzica et Garzino, 1997). Les neurones cholinergiques du PPN et du **noyau tegmental latéro-dorsal ou LDT** chez le rat forment une colonne neuronale plus ou moins continue. Mesulam et coll. (1983) associent les neurones cholinergiques du PPN au **groupe Ch5** et les neurones cholinergiques du LDT au **groupe Ch6**. Selon l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1986), le PPN regroupe un ensemble de cellules cholinestérase-positives. Ce noyau cholinocéptif est composé d'une population neuronale hétérogène. Rye et al. (1987) différencie au sein du PPN les neurones cholinergiques de grosse taille des neurones non cholinergiques de taille plus petite. Par microscopie électronique, il a été montré que les neurones cholinergiques du PPN reçoivent un plus grand nombre de contacts synaptiques d'origine non cholinergique (Honda et Semba, 1995). L'arborisation dendritique des neurones cholinergiques du PPN est très étendue; on peut retracer certains dendrites à plus de 300 μm du corps cellulaire (Jones, 1990). L'identité neurochimique des neurones non cholinergiques du PPN n'est pas clairement définie. Chez le rat, des cellules glutamatergiques se retrouvent dispersées parmi les neurones cholinergiques du PPN et du LDT (Clements et Grant, 1990). Chez le singe, 40% des neurones cholinergiques du PPNc, ChAT et NADPH-d positifs, sont glutamatergiques, alors que les autres neurones du PPN expriment soit le glutamate soit la ChAT (Lavoie et Parent, 1994). De nombreux peptides ont été identifiés sur les neurones

cholinergiques et non cholinergiques du PPN dont la substance P et la bombésine (Vincent et al., 1986). Le PPN est aussi un noyau hétérogène concernant les propriétés intrinsèques membranaires. Il existe trois types de neurones répertoriés selon des critères électrophysiologiques (Leonard et Llinas, 1990). Les neurones de type I caractérisés par un courant calcique entrant à bas seuil qui s'inactive rapidement ont une fréquence de décharge en bouffée. Les neurones de type II portent des canaux potassiques transitoires sortant et déchargent de façon phasique. Les neurones de type III présentent les deux types de courant et déchargent de façon tonique et phasique. L'identité neurochimique de ces trois types de neurones reste à déterminer. En résumé, les deux populations du PPN sont facilement discernables sur de nombreux plans mais en dépit de ces différences il existe une inter-connexion complexe entre ces deux groupes nécessaire au bon fonctionnement du PPN.

b- Le PPN = MLR?

Les données sont plus controversées concernant le PPN. Tout d'abord, le PPN et le CNF sont si près l'un de l'autre qu'il est difficile de dire si les effets locomoteurs obtenus par stimulation électrique ou chimique sont attribués à tel ou tel noyau. Effectivement, la stimulation de la partie ventro-latérale du CNF, qui correspond en fait au PPNc, produit une locomotion. La distribution des neurones cholinergiques du PPN coïncide exactement avec celle des sites locomoteurs obtenus chez le chat et le rat (revue Garcia-Rill, 1986). Parallèlement, une étude réalisée sur un rat décérébré au niveau précolliculaire indique que les neurones cholinergiques du PPN révélés par immunocytochimie dirigée contre la ChAT ou par réaction histochimique contre la NADPH-d font partie de la MLR identifiée physiologiquement sur cette même préparation (Garcia-Rill et al., 1987). La stimulation électrique de faible amplitude

suggère que seuls les neurones du PPN sont activés mais cela n'exclue pas que des neurones non cholinergiques du PPN participent à l'effet locomoteur. Il y a une différence selon les espèces dans l'organisation cytoarchitectonique du PPN (cf figure 3). En effet, la stimulation du PPNd n'entraîne pas de locomotion chez le chat car les cellules sont très dispersées. Au contraire, le PPNd du rat forme un groupe plus compact et la stimulation de cette région recrute suffisamment de neurones pour provoquer une locomotion. Par conséquent, la MLR correspond exactement au PPN du rat alors que seule le PPNc chez le chat peut générer une activité locomotrice. De plus, les projections ascendantes (noyau entopédunculaire ou EN et la substance noire ou SN des ganglions de la base, noyau du centre médian thalamique) et descendantes de la MLR (formation réticulée ventromédiane) coïncident avec celles du PPN renforçant la thèse que le PPN fait partie de la MLR (Garcia-Rill et al., 1986).

On a vu que la locomotion de type explorative fait intervenir la voie hippocampe-accumbens-pallidum ventral et se termine sur le PPN (Sinnamon, 1993) (cf figure 1). Étant donné que le CNF est associé au comportement défensif, le PPN peut être relié à un comportement d'exploration. Cependant, la locomotion explorative active non seulement le PPN mais aussi le PAG et le CNF, éléments du système défensif. En effet, la locomotion due à l'injection de picrotoxine dans le pallidum ventral augmente le marquage c-fos dans le PPN, le CNF et la PAG sur des animaux en liberté par rapport aux témoins (Brudzynski et Wang, 1996). La dichotomie CNF/système défensif-PPN/exploration est donc peut-être à remettre en question. Comme le souligne Jordan dans sa revue (1998), il faut peut-être recruter différents sous-types de groupes neuronaux au sein de la MLR pour initier un comportement locomoteur dans un contexte donné. C'est la raison pour laquelle la lésion du PPN ne bloque pas la locomotion

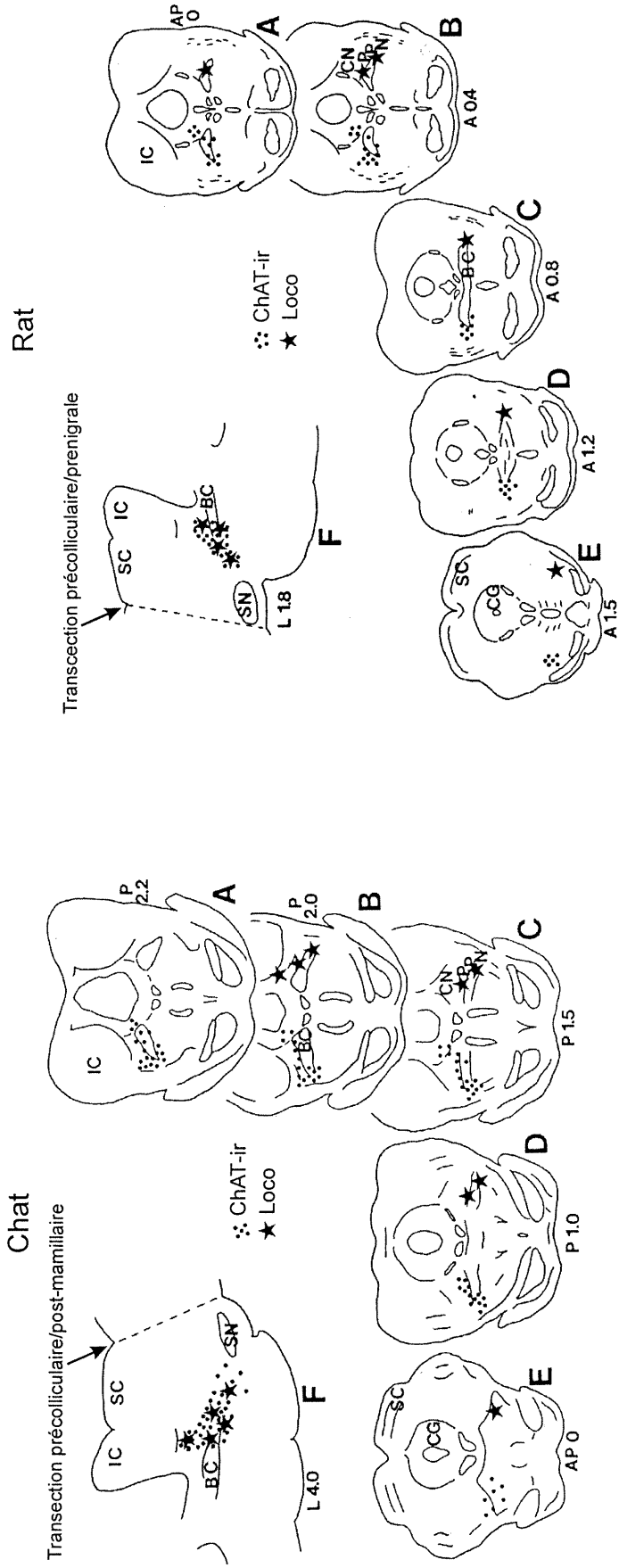


Figure 3

Différence dans l'organisation cytoarchitectonique du PPN chez le chat et le rat

A gauche, sections transverses du mésencéphale chez le chat à différents niveaux stéréotaxiques (A à E) et représentation sagittale (F). Les points représentent les cellules ChAT-ir selon Kimura et al. (1981). Les étoiles correspondent aux sites locomoteurs de la MLR selon Garcia-Rill et al. (1981, 1983a). A droite, sections transverses du mésencéphale chez le rat à différents niveaux stéréotaxiques (A à E) et représentation sagittale (F). Les points représentent les cellules ChAT-ir selon Mesulam et al. (1983) et selon Satoh et al. (1983). Les étoiles correspondent aux sites locomoteurs de la MLR selon Skinner et Garcia-Rill (1984).

Tiré de la revue Garcia-Rill (1986)

spontanée ou induite par l'injection locale d'amphétamines dans le noyau accumbens (revue Inglis et Winn, 1995) car d'autres composantes de la MLR peuvent compenser l'effet de la lésion. Par contre, le blocage de la transmission synaptique dans la région de la MLR incluant le PPN et le CNF réduit de façon significative l'activité locomotrice (Brudzynski et al., 1993). Selon Garcia-Rill (1991), la MLR ne coïncide pas forcément avec les limites histologiques de tel ou tel noyau mais regroupe plutôt un ensemble de sites au niveau du tegmentum mésencéphalique dont la stimulation provoque une locomotion.

C- Les projections à la MLR:

Sur une préparation décérébrée au niveau mésencéphalique, l'animal reste immobile tant que la MLR n'est pas stimulée. Puis il se met soudainement à marcher pendant toute la durée de la stimulation. Cela signifie que la MLR est activée de façon tonique pendant le mouvement locomoteur mais qu'en condition de repos cette activité est supprimée par les centres projetant à la MLR. De nombreuses données indiquent que les ganglions de la base, structures impliquées dans le mouvement volontaire, interagissent avec la MLR. Brudzynski et Mogenson (1985) ont montré que l'activation de **la voie hippocampe-accumbens-pallidum ventral** produit une locomotion via la MLR (cf figure 1). La stimulation électrique de l'hippocampe augmente l'activité locomotrice sur le rat intact. Cet effet est bloqué par une anesthésie locale du noyau accumbens. La stimulation du noyau accumbens par des agonistes dopaminergiques (voie dopaminergique issue de l'aire ventrale tegmentale) ou des acides aminés excitateurs (voie excitatrice issue de l'hippocampe ou de l'amygdale) augmente également l'activité locomotrice, effet aboli après l'injection de lidocaïne dans le

pallidum ventral. D'autre part, la locomotion induite par la stimulation du noyau accumbens est supprimée par l'anesthésie locale de la MLR. Le noyau accumbens envoie des projections GABAergiques sur le pallidum ventral qui lui-même projette sur plusieurs aires dont la MLR (Swanson et Mogenson, 1981). Certaines projections du pallidum ventral sont inhibitrices (de type GABAergique) alors que d'autres sont excitatrices (Mogenson, 1991). La MLR semble être sous un contrôle inhibiteur tonique au repos car l'injection d'antagonistes GABAergiques (bicuculline ou picrotoxine) dans la MLR initie la marche sur des chats décérébrés au niveau pré-colliculaire/post-mamillaire (Garcia-Rill et al, 1985). Cet effet est aboli par l'administration locale de GABA ou de muscimol. La MLR pourrait être contrôlée par un circuit doublement inhibiteur de telle sorte que l'activation du noyau accumbens inhiberait le pallidum ventral qui à son tour inhiberait la MLR (revue Grillner et al., 1997) (cf figure 1). Pour cela, il faudrait que les neurones du pallidum ventral aient une fréquence de décharge élevée au repos pour inhiber continuellement la MLR de façon tonique, ce qui reste à déterminer. Or, il existe un puissant contrôle tonique inhibiteur sur les neurones du pallidum dorsal qui projettent vers le colliculus supérieur et le thalamus, et présentent une fréquence de décharge élevée au repos (revue Grillner et al., 1997). La désinhibition de ce circuit provoque divers programmes moteurs (saccades oculaires).

Une deuxième voie parallèle faisant intervenir une autre partie des ganglions de la base semble agir sur la MLR. Au début des années 80, l'équipe de Garcia-Rill (Garcia-Rill et al, 1981 et 1983a) a montré que certaines cellules du noyau entopédunculaire EN (moins de 5%) et de la substance noire SN (moins de 10%), principales voies de sortie des ganglions de la base, répondent de façon antidromique après stimulation de la MLR identifiée fonctionnellement sur une préparation

précolliculaire/post-mamillaire. Des études anatomiques d'injections de traceurs au sein de la MLR confirment l'existence de cellules marquées de façon rétrograde dans le noyau EN et la SN (Garcia-Rill et al, 1981 et 1983a). De plus, la stimulation du noyau EN génère des réponses monosynaptiques de type PPSE et PPSI dans la région de la MLR (Garcia-Rill, 1983). L'administration d'agonistes GABAergiques dans la MLR bloque la locomotion d'origine électrique ou chimique (due à l'injection d'antagonistes GABAergiques dans la MLR) sur un rat décérébré au niveau pré-colliculaire/post-mamillaire, ainsi que la locomotion spontanée sur une préparation pré-colliculaire/pré-mamillaire (Garcia-Rill et al., 1985). Par conséquent, la voie GABAergique qui projette sur la MLR est issue de la SN (et plus précisément la SNr) car ce noyau se retrouve intact sur les deux types de préparations réduites (cf figure 1). Les neurones de la SN ont une fréquence de décharge élevée au repos (Deniau et al, 1978). Par analogie au modèle de la voie accumbens-pallidum ventral-MLR, un circuit parallèle doublement inhibiteur contrôlerait la MLR de façon tonique. Dans sa revue de 1986, Garcia-Rill proposait déjà un modèle. Le noyau sous-thalamique STN inhiberait la SN par des projections GABAergiques qui elle-même inhiberait les cellules de la MLR, désinhibant ainsi les sites locomoteurs à l'origine de l'activité spontanée sur une préparation pré-colliculaire/pré-mamillaire. Après une transection post-mamillaire, l'influence du noyau STN sur la SN n'existe plus. Dans ce cas, la SN bloque continuellement la MLR; il faut la stimuler électriquement ou chimiquement pour générer une locomotion. Depuis, il a été établi que le STN est un des rares noyaux excitateurs des ganglions de la base donc ce modèle de circuit STN-SN-MLR doublement inhibiteur ne peut s'appliquer. Par contre, **la voie GABAergique néostriatum-SNr** semble être impliquée dans le contrôle

de la locomotion via la MLR (cf figure 1). Ce circuit GABAergique établi depuis longtemps (revue Obeso et al., 2000) est reconnu pour faciliter le mouvement.

D- Les efférences de la MLR:

1- La voie MLR-formation réticulée ventromédiane:

Les voies descendantes réticulospinales (RS) véhiculent les informations locomotrices de la MLR jusqu'au CPG spinal. Les études électrophysiologiques d'Orlovsky (1970a) montrent des réponses excitatrices monosynaptiques des cellules RS du bulbe ventro-médian induites par la stimulation de la MLR sur un chat décérébré au niveau précolliculaire. Les cellules RS sont identifiées par la réponse antidromique de latence constante à la stimulation de leurs axones situés dans le funiculus ventral de la moelle épinière lombaire. Au repos, la plupart des neurones RS enregistrés en intracellulaire ne présente aucune activité spontanée. Puis la locomotion due à la stimulation électrique tonique de la MLR à 30 Hz génère des PPSEs monosynaptiques car la latence d'apparition des PPSEs n'excède pas 0.5 ms. Il existe donc un lien excitateur direct entre la MLR et les cellules RS du bulbe ventro-médian. La majorité de ces neurones est active durant la locomotion et leur fréquence de décharge augmente avec l'intensité de stimulation de la MLR (Orlovsky et al., 1970b). Leur stimulation augmente l'activité des muscles extenseurs et fléchisseurs des quatre membres générant un mouvement locomoteur complexe (Drew et Rossignol, 1984; Drew, 1991). Les cellules RS ont une activité phasique qui varie en fonction du cycle de la marche. Il est possible que cette modulation phasique soit d'origine périphérique et provienne des membres en mouvement. Cependant, la locomotion fictive enregistrée sur un chat paralysé obtenue après stimulation de la MLR, active rythmiquement la majorité des

cellules RS du bulbe ventromédian suggérant une modulation d'origine centrale (Perreault et al., 1993). Des données physiologiques confirment que les informations issues de la MLR sont transmises à la moelle épinière via la formation réticulée médiane ou FRM. Un blocage réversible par refroidissement de la FRM supprime la locomotion induite par la stimulation de la MLR (Shefchyk et al., 1984). Des résultats similaires sont obtenus après l'injection locale de GABA (Garcia-Rill et Skinner, 1987a) ou de procaine (Marlinsky et Voitenko, 1991) dans la FRM.

L'étude anatomique de Steeves et Jordan (1984) indique que le principal site de terminaison des cellules de la MLR se situe sur les neurones du **noyau réticulé gigantocellularis ou NRG** et du **noyau réticulé magnocellularis ou NRM** du bulbe ventro-médian, noyaux qui projettent sur la moelle épinière. Le NRM et le NRG sont marqués de façon antérograde après l'injection d'acides aminés triciés dans le noyau cunéiforme. La locomotion fictive générée par la stimulation du noyau CNF augmente le niveau de recapture de 2-déoxyglucose révélé par autoradiographie dans le NRG et le NRM indiquant que ces régions sont actives durant la locomotion. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Garcia-Rill et collaborateurs qui ont montré que les projections descendantes de la MLR se terminent sur la bande locomotrice ponto-bulbaire ou PLS (Garcia-Rill et al., 1983b). Dans cette étude le site de stimulation de la MLR, adjacent au noyau mésencéphalique du trijumeau, est médian par rapport au site de stimulation de Steeves et Jordan (1984) qui est plus latéral. On distingue la partie médiane de la MLR (noyau mésencéphalique du trijumeau) qui projette sur la PLS localisée dans la formation réticulée bulbaire dorso-latérale, et la partie latérale de la MLR (PPN, partie caudale du CNF) qui projette sur le bulbe ventro-médian responsable de la locomotion contrôlée. C'est pourquoi, le refroidissement réversible de la PLS ou de la FRM bloque

la locomotion induite par la stimulation de la partie médiane ou de la partie latérale de la MLR respectivement (Shefchyk et al., 1984). Les projections descendantes de la MLR influencent un grand nombre de cellules RS du bulbe ventromédian. Parmi les cellules RS activées de façon antidromique par la stimulation du funiculus ventrolatéral, la moitié d'entre-elles répondent de façon orthodromique à la stimulation de la MLR (Garcia-Rill et Skinner, 1987b). Cette population de cellules regroupe les parties ventrale et antérieure du NRG et les parties ventrale et postérieure du NRM. L'identité des cellules RS reste à déterminer mais il semble que ce soit surtout des cellules de petite taille qui sont activées par la MLR en raison de leur faible vitesse de conduction axonale. Même s'il y a un grand nombre de projections ipsilatérales, la stimulation unilatérale de la MLR est suffisante pour générer une locomotion symétrique ce qui indique que la MLR projette de façon bilatérale vers les systèmes locomoteurs bulbaires. Enfin, il faut noter que les cellules de la MLR qui projettent sur la FRM sont principalement localisées dans la partie antérieure et postérieure de la MLR (Garcia-Rill et al., 1986) (cf figure 4).

2- Les projections descendantes cholinergiques:

Il reste à déterminer les mécanismes cellulaires par lesquels la MLR agit sur le système RS pour générer la locomotion. Le PPN, composante physiologique de la MLR, contient des neurones cholinergiques révélés par immunocytochimie anti-ChAT ou par réaction histochimique contre la NADPH-d (Armstrong et al., 1983; Kimura et al., 1981; Mesulam et al., 1983; Satoh et al., 1983; Vincent et al., 1983). Des études autoradiographiques ont mis en évidence la présence de récepteurs nicotiniqes et muscariniques dans la région bulbaire (Clarke et al., 1985; Rotter et al., 1979).

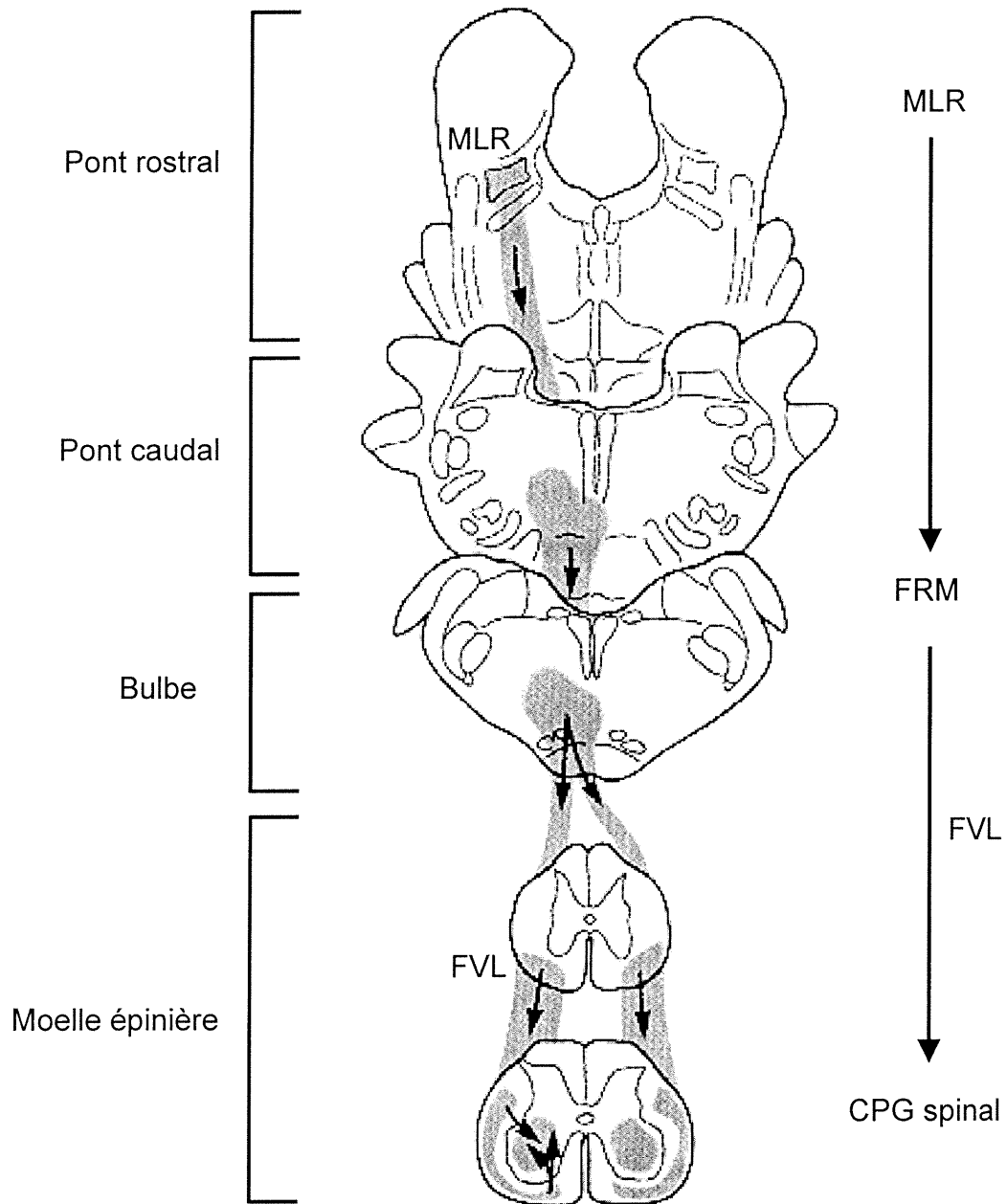


Figure 4

Les projections descendantes de la MLR

La stimulation de la MLR excite les interneurons de la formation réticulée médiane (FRM). Leurs axones rejoignent le CPG spinal via le funiculus ventrolatéral (FVL).

Tiré du Kandel (4^e édition)

Chez le chat et le rat décérébré au niveau précolliculaire, l'application locale d'agonistes cholinergiques (carbachol, métacholine) ou d'inhibiteurs de cholinestérases (edrophonium, éserine) dans le bulbe ventro-médian produit une marche contrôlée (Garcia-Rill et Skinner, 1987a; Kinjo et al., 1990). L'injection d'atropine, un antagoniste cholinergique muscarinique, dans cette région bloque la locomotion d'origine électrique ou chimique, mais également celle induite par la stimulation de la MLR. Chez les oiseaux, l'injection intracérébrale de carbachol (agoniste muscarinique et nicotinique) ou de pilocarpine (agoniste muscarinique) dans la partie ventrale du noyau central bulbaire qui contient les cellules RS, produit une locomotion bloquée par l'atropine (Sholomenko et al., 1991). La drogue n'a aucun effet quand elle est injectée dans la formation réticulée pontique. L'ensemble de ces données suggère fortement que la MLR initie la locomotion via des projections cholinergiques descendantes qui activent le système réticulospinal ventro-médian. Chez le rat, les neurones cholinergiques du PPN et du LDT projettent sur les régions locomotrices bulbaires (Skinner et al., 1990). Dans cette étude, une injection unilatérale de fluorogold est effectuée au niveau du NRM. Après 5 à 7 jours de transport rétrograde, l'animal est décérébré au niveau précolliculaire puis le site d'injection est stimulé électriquement générant ainsi une marche contrôlée sur un tapis roulant. Le traçage rétrograde est révélé en immunofluorescence et les coupes adjacentes sont marquées à la NADPH-d afin d'identifier les cellules cholinergiques mésopontiques. Il apparaît que 9% des cellules cholinergiques du PPN et 11% des cellules cholinergiques du LDT projettent vers le bulbe ventro-médian. De plus, des cellules non cholinergiques dorsales et ventrales aux cellules cholinergiques du PPN et du LDT projettent en plus grand nombre vers le bulbe ventro-médian. Dans son étude anatomique, Jones (1990) décrit une puissante innervation cholinergique dans la

formation réticulée ponto-bulbaire; en effet, des fibres variqueuses ChAT-immunoréactives contactent souvent les somata et les dendrites proximales de grosses cellules réticulaires non cholinergiques. Afin d'identifier l'origine de cette innervation cholinergique, le transport rétrograde (WGA-HRP) est combiné à une réaction immunohistochimique anti-ChAT. En accord avec les données de Skinner et coll. (1990), il s'avère que 10% des cellules cholinergiques du LDT et 15% des cellules cholinergiques du PPN projettent ipsilatéralement sur la FRM, contrairement à 5% et 10% en contralatéral respectivement. L'ensemble de ces résultats indique qu'une part significative des neurones cholinergiques mésopontiques participe à la commande motrice issue de la MLR.

Cependant, il semble que d'autres systèmes de neurotransmetteurs soient aussi impliqués dans le contrôle locomoteur. Chez les oiseaux et les mammifères, l'administration locale dans la FRM d'agents pharmacologiques comme la substance P, l'acide aminé excitateur NMDA ainsi que la picrotoxine ou bicuculline, antagonistes GABAergiques, génère une locomotion (Garcia-Rill et Skinner, 1987a; Kinjo et al., 1990; Sholomenko et al., 1991). D'autre part, l'activation des récepteurs NMDA du NRM augmente le tonus musculaire et produit une activité locomotrice (Lai et Siegel, 1991). Ces données sont en accord avec la présence de glutamate et de substance P sur les neurones cholinergiques et non cholinergiques du PPN et du LDT (Clements et Grant, 1990; Lavoie et Parent, 1994; Vincent et al., 1986). Par contre, il y a très peu de cellules GABAergiques dans la région mésopontique indiquant que l'effet locomoteur produit par l'injection d'antagonistes GABAergiques dans la FRM serait probablement due à des interneurons GABAergiques locaux. Plus récemment, l'étude de double marquage WGA-HRP combinée à l'immunohistochimie contre la ChAT, la NADPH-d ou le

glutamate, révèle qu'une grande partie des projections provenant de la MLR vers le NRM est d'origine glutamatergique (Lai et al., 1999). En effet, 52% des cellules du PPN sont doublement marquées au WGA-HRP/glutamate contre 11% de cellules marquées au WGA-HRP/NADPH-d alors que 15% des projections issues du CNF sont glutamatergiques contre 6% cholinergiques.

III- Les vertébrés inférieurs:

A- La MLR chez les poissons:

Bien qu'elle ait été décrite chez les mammifères il y a plus de 40 ans, peu de choses sont connues concernant le mode d'action de la MLR et ses effets sur les cellules cibles. Plusieurs études ont été réalisées pour identifier la MLR sur des modèles plus simples de vertébrés inférieurs comme les poissons. La raie, espèce cartilagineuse de la sous-classe **des élasmobranches**, a un patron locomoteur très simple par rapport à la marche des mammifères. La nage de ce poisson consiste en une onde alternée d'élévations (muscles dorsal) et de dépressions (muscle ventral) des nageoires pectorales se propageant dans le sens rostro-caudal (Droge et Léonard, 1983). Sur une préparation décérébrée à la jonction méso-diencephalique, des trains de stimulations électriques (50 à 100 μ A, 60 Hz) appliqués dans le mésencéphale génèrent une locomotion fictive enregistrée à partir des nerfs commandant les muscles antagonistes élévateurs et dépresseurs de la même nageoire (Bernau et al, 1991). La vitesse de la nage augmente avec l'intensité et la fréquence de stimulation de la MLR. Celle-ci regroupe la partie caudale du **noyau interstitiel du fasciculus médian longitudinal ou fml** ainsi que la partie caudale du CNF. Les études de lésion et d'injection du traceur rétrograde HRP dans la formation réticulée magnocellularis/gigantocellularis indiquent que la MLR

projette de façon bilatérale sur cette région. Ainsi, la stimulation unilatérale de la MLR suffit pour provoquer le battement des nageoires pectorales ipsi et contralatérale. De par sa composition et ses projections, la MLR de la raie correspond à la partie latérale de la MLR des mammifères. Ces deux espèces ont en commun d'évoluer dans leur environnement (nage ou marche) grâce aux mouvements alternés rythmiques de leurs appendices spécialisés (nageoires pectorales ou membres antérieurs et postérieurs). En général, la nage des poissons se caractérise par un mouvement ondulatoire du corps et de la queue, parfois accompagné de mouvements rythmiques des nageoires. Les ondes de contractions se propagent le long des segments axiaux de la musculature du corps. Dans ce cas, on peut penser que les centres supraspinaux responsables de l'initiation de la locomotion soient organisés différemment. Chez la carpe, poisson osseux de la sous-classe **des téléosts**, la stimulation électrique de la MLR (50 μ A, 50 Hz) localisée dans le tegmentum mésencéphalique dorsocaudal produit un déplacement latéral alterné de la queue (Kashin et Feldman, 1974). Plus récemment, il a été montré qu'une faible stimulation électrique (moins de 20 μ A) du mésencéphale caudal sur le même modèle induit un mouvement rythmique bilatéral du corps et de la queue (Uematsu et Todo, 1997). La microinjection d'acide glutamique 0.1 M dans la région ventrale du troisième ventricule a permis de centrer plus précisément la MLR. Celle-ci regroupe le noyau du fml et le noyau rouge, tous deux projetant directement à la moelle épinière. Les auteurs suggèrent que les informations locomotrices issues de la musculature axiale projettent directement sur la moelle épinière, tandis que les informations provenant des nageoires (exemple de la raie) sont véhiculées jusqu'au niveau spinal via la formation réticulée. Par ailleurs, la stimulation électrique de la MLR chez le poisson rouge regroupant le faisceau axonal de la fml génère une nage caractérisée par une activité rythmique

alternée des segments axiaux ipsi et contralatéraux, et par une propagation rostro-caudale (Fetcho et Svoboda, 1993). Cependant, la théorie développée par Uematsu et Todo (1997) n'est pas valable car comme nous allons le voir plus en détail, il y a un relai MLR-système RS chez la lamproie qui nage uniquement par propagation ondulatoire.

B- La lamproie:

La lamproie est un modèle couramment utilisé par les neurophysiologistes pour étudier les bases cellulaires du comportement locomoteur des vertébrés. Cet animal de la famille des cyclostomes s'est séparé de la chaîne évolutive des vertébrés il y a 450 millions d'années. Son système nerveux contient très peu de neurones par rapport à celui des mammifères, mais conserve une organisation neuronale semblable. La préparation *in vitro* est très résistante et dure plusieurs jours. De plus, certaines cellules RS de la formation réticulée sont très grosses (environ 100 μm de diamètre) et, par conséquent, facilement accessibles aux études électrophysiologiques. Chez la lamproie, les neurones RS sont regroupés dans quatre noyaux réticulaires distribués le long du sulcus médian du mésencéphale rostral au rhombencéphale caudal (Nieuwenhuys, 1972): **le noyau réticulé mésencéphalique (MRN) et les noyaux réticulés rhombencéphaliques antérieur (ARRN), moyen (MRRN) et postérieur (PRRN).**

1- La locomotion sensorielle:

Pour survivre, la lamproie développe une gamme variée d'activités locomotrices allant de la fuite, à l'exploration de son environnement ou à la recherche de nourriture. La nage de fuite due à un stimulus sensoriel (attaque d'un prédateur) active les neurones RS qui à leur tour activent le CPG spinal. Les informations cutanées provenant de la

queue sont transmises par les fibres de la colonne dorsale et produisent une réponse mixte excitatrice glutamatergique et inhibitrice glycinergique sur les cellules RS (Dubuc et al., 1993a,b). Les informations cutanées provenant de la tête sont véhiculées par le système afférent trigéminal; la stimulation du nerf trijumeau excite synaptiquement les neurones RS de façon bilatérale (Viana Di Prisco et al., 1995a). Les mécanismes cellulaires par lesquels la stimulation sensorielle est transformée en réponse motrice ont récemment été décrits (Viana Di Prisco et al., 1997, 2000). Pour de faibles pressions mécaniques de la peau, l'amplitude de la réponse synaptique des cellules RS augmente de façon linéaire avec la force de la stimulation. Par contre, une forte pression mécanique de la peau génère des plateaux de potentiel NMDA et Ca^{2+} dépendants dans les cellules RS du rhombencéphale. Les séquences d'évènements sont les suivantes: une information synaptique excitatrice active les récepteurs NMDA présents sur les cellules RS, le calcium entre dans la cellule et active un courant cationique non sélectif Ca^{2+} -dépendant (ICAN) maintenant les cellules RS dépolarisées pendant une longue période. Par conséquent, il suffit d'un seul stimulus de forte intensité pour produire une réponse rapide qui dure suffisamment longtemps et permettre la fuite de l'animal et donc sa survie. Les régions du cerveau rostrales au rhombencéphale ne sont pas requises pour obtenir cette réponse motrice (Cardin et al., 1999).

2- La locomotion dirigée vers un but:

a- La région locomotrice diencéphalique (DLR):

La locomotion dirigée vers un but met en jeu des structures hiérarchiques plus élevées. Il existe deux régions locomotrices dans le tronc cérébral de la lamproie dont la stimulation provoque une nage. Tout d'abord, **la région locomotrice diencéphalique ou**

DLR («diencephalic locomotor region») décrite par El Manira et coll. (1997) correspond chez la lamproie au **thalamus ventral**. D'après l'auteur, le thalamus ventral de la lamproie coïncide approximativement à la *zona incerta* des mammifères, structure impliquée dans l'initiation de la locomotion (Sinnamon, 1993). Des cellules du thalamus ventral sont marquées de façon rétrograde de chaque côté du tronc cérébral suite à l'injection unilatérale de dextran-amines fluorescentes dans les noyaux réticulés du MRRN et du PRRN. Après l'injection du traceur dans le thalamus ventral, des axones marqués de façon antérograde sont distribués dans la plaque basale du rhombencéphale où ils peuvent établir des connexions synaptiques en passant avec les dendrites des cellules RS du MRRN et du PRRN (El Manira et al., 1997). La même étude indique que la stimulation électrique à haute fréquence (25 Hz) du thalamus ventral génère des PPSEs monosynaptiques dans les cellules du MRRN et du PRRN car ils apparaissent toujours à la même latence en présence d'une forte concentration de Ca^{2+} et de Mg^{2+} qui bloque la transmission polysynaptique. Cette réponse monosynaptique est glutamatergique car elle est bloquée en présence d'acide kynurénique, un antagoniste glutamatergique. L'activation du thalamus ventral produit également des PPSEs polysynaptiques et des PPSIs dans les cellules RS du MRRN et du PRRN. L'activité de ces cellules due à la stimulation de la DLR génère une locomotion fictive enregistrée à partir des racines ventrales spinales sur une préparation *in vitro* (El Manira et al., 1997). La DLR reçoit des projections axonales des ganglions de la base, lesquels ont une organisation neuronale très proche de celle observée chez les mammifères. En effet, le striatum envoie des projections GABAergiques au pallidum ventral qui lui-même envoie des projections GABAergiques au thalamus ventral (Pombal et al, 1995). Donc la DLR est sous le contrôle d'un circuit doublement inhibiteur comme cela se produit chez les

mammifères. Enfin, le thalamus ventral reçoit des informations visuelles et olfactives (cf figure 5).

b- La MLR:

Une étude préliminaire réalisée sur une préparation *in vitro* de lamproie a montré que la stimulation électrique d'une bande de cellules parallèle à la ligne médiane qui s'étend du mésencéphale caudal à l'obex produit une nage fictive enregistrée à partir des racines ventrales spinales (McClellan et Grillner, 1984). Le patron locomoteur est caractérisé par une activité rythmique alternée des racines ventrales ipsi et contralatérale au niveau du même segment axial, souvent accompagnée d'une propagation rostro-caudale ipsilatérale. En général, une stimulation de 4 μ A à 20 Hz suffit pour générer cette activité rythmique mais cela dépend beaucoup du niveau d'excitabilité de la préparation. L'intensité et la fréquence de ces bouffées augmentent avec l'intensité de stimulation de la région locomotrice. Celle-ci correspond en fait à la formation réticulée médiane contenant les cellules RS, bien qu'elle devienne de plus en plus ventrale au niveau du bulbe caudal. Récemment l'équipe du Professeur Dubuc a mis en évidence la présence d'une **MLR** chez la lamproie en utilisant un modèle de **préparation semi-intacte** (Sirota et al., 2000). Le tronc cérébral décérébré au dessus du mésencéphale et la partie rostrale de la moelle épinière sont exposés *in vitro* tandis que le reste du corps et la queue sont laissés intacts permettant à l'animal de nager librement dans un bain rempli de Ringer. Grâce à cette préparation, la nage active peut être étudiée en enregistrant l'activité EMG le long de la musculature axiale. De plus, un enregistrement vidéo permet une analyse cinématique de la nage. La stimulation tonique (2-10 Hz, 0.1-5 μ A) de la région périventriculaire localisée dans le mésencéphale caudal et rostral à l'isthme génère une **nage active**. Cette nage consiste en un déplacement latéral

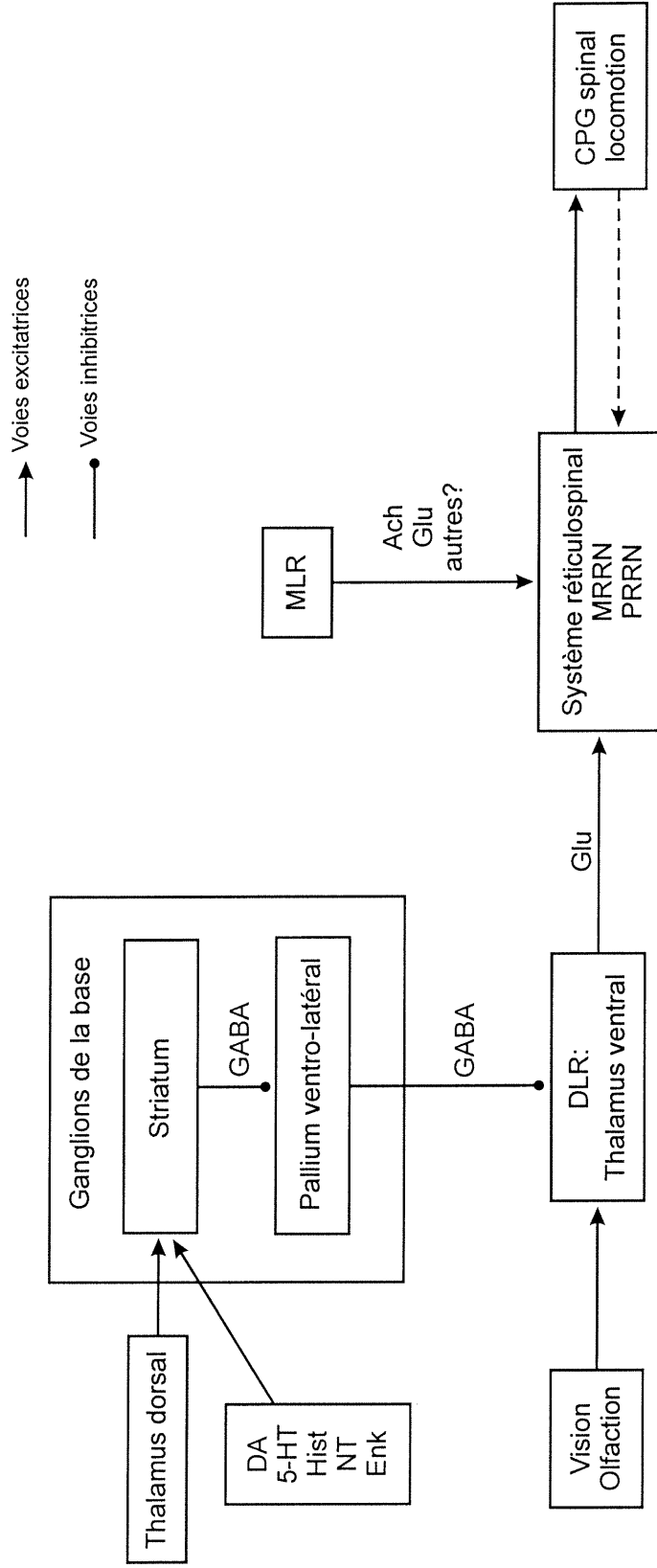


Figure 5

Structures du cerveau antérieur et du tronc cérébral impliquées dans l'initiation de la locomotion chez la lamproie
 Cf texte pour les commentaires

Tiré de la revue Grillner et al. (1998)

symétrique de gauche à droite du corps et de la queue, l'amplitude de déplacement étant maximale à l'extrémité caudale. Elle se caractérise également par une activité alternée des EMGs à chaque segment, et un délai rostro-caudal semblable à celui de la nage chez un animal intact. Si l'électrode de stimulation est déplacée de seulement 50 μm par rapport à la MLR, il n'y a plus d'onde de propagation latérale du corps malgré le fait qu'il y ait toujours une activité EMG rythmique. La fréquence de la nage, c'est-à-dire l'amplitude du déplacement latéral ainsi que la fréquence et l'amplitude des bouffées EMGs, augmente avec l'intensité et la fréquence de stimulation de la MLR. La stimulation du MRRN produit de courts épisodes locomoteurs mais qui ne sont pas contrôlés par la force de stimulation de la MLR. On comprend alors la pertinence du modèle semi-intact car il donne une meilleure appréciation concernant la qualité de la nage. Au contraire, le modèle *in vitro* utilisé par McClellan et Grillner (1984) montre juste une activité rythmique alternée enregistrée sur une section de la moelle épinière. Or un rythme alterné ipsi-contralatéral ne suffit pas pour déterminer s'il s'agit d'une locomotion coordonnée tout le long du corps (cf figure 6).

3- La voie MLR-système réticulospinal:

La même étude réalisée par Sirota et collaborateurs (2000) montre également que la stimulation électrique de la MLR à faible fréquence (<1 Hz) génère des PPSEs de forte amplitude sur les cellules RS du MRRN. Suite à l'injection iontophorétique de cobalt-lysine dans le noyau du MRRN, des petites cellules de 10 à 20 μm de diamètre sont marquées bilatéralement autour du site de la MLR identifiée histologiquement par électrolésion (5 μA , 10 secondes). Cela suggère qu'il existe des connexions monosynaptiques entre la MLR et les cellules RS du MRRN. Après avoir stimulé la

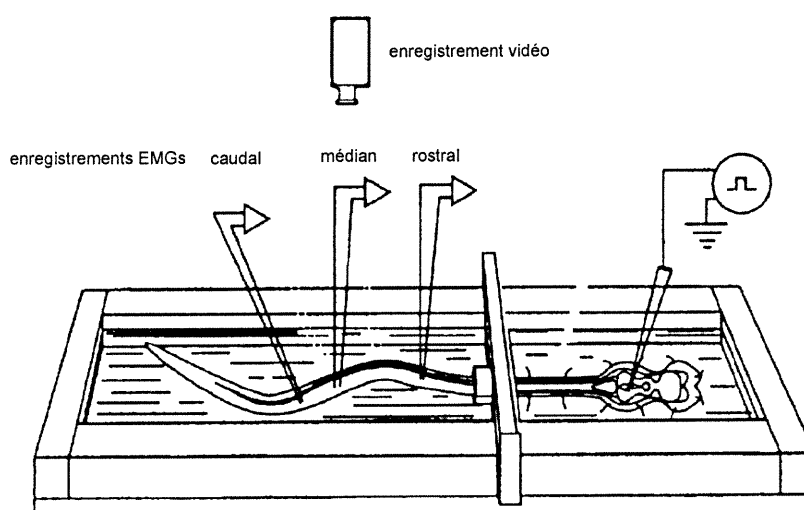
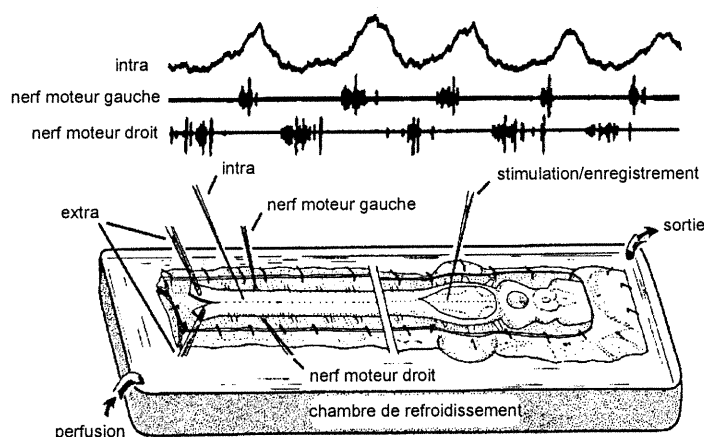


Figure 6

Préparation *in vitro* versus préparation semi-intacte chez la lamproie

En haut, l'ensemble tronc cérébral-moelle épinière peut être maintenu plusieurs jours en condition *in vitro*. La stimulation de certaines régions du tronc cérébral génère une activité locomotrice enregistrée à partir des racines ventrales (nerfs moteurs gauche et droit). Sur la trace du haut, l'enregistrement intracellulaire d'un neurone du réseau locomoteur montre des oscillations membranaires en phase avec l'activité du nerf moteur gauche. Tiré de Grillner et al. (1998).

En bas, sur une préparation semi-intacte de lamproie, le tronc cérébral et la partie rostrale de la moelle épinière sont exposés *in vitro*, tandis que le reste du corps laissé intact nage librement dans un bain rempli de ringer. Une barrière en plastique sépare les deux compartiments pour empêcher la queue d'atteindre les parties exposées. L'enregistrement vidéo ainsi que les EMGs permettent de caractériser la nage active. Tiré de Sirota et al. (2000).

MLR, il faut attendre quelques secondes avant de voir apparaître une nage, laquelle persiste quelques secondes encore même après la fin de la stimulation. On peut penser alors que la MLR agit en recrutant suffisamment de cellules RS pour initier un rythme locomoteur. Enfin, il semble que la MLR, comme chez les mammifères, regroupe un ensemble de cellules et non des fibres de passage car la microinjection d'AMPA, agoniste des acides aminés excitateurs, produit des bouffées dépolarisantes sur les cellules RS du MRRN accompagnées d'une nage de la partie caudale du corps.

Chez la lamproie, le système RS représente la principale voie descendante qui projette sur tous les segments spinaux alors que le système vestibulospinal ne projette que sur la moelle épinière rostrale (Rovainen, 1979; Ronan, 1989). Le système RS est constitué d'environ 2500 cellules, dont la taille varie de 5 à 150 μm , regroupées dans les quatre noyaux réticulaires précédemment décrits. Les plus grosses cellules appelées **cellules de Müller** sont facilement identifiables et chacune a une position bien spécifique: il y a trois cellules de Müller mésencéphaliques dans le MRN (M1, M2, M3), deux cellules isthmiques dans l'ARRN (I1, I2) et quatre cellules bulbaires dans le MRRN (B1, B2, B3, B4) selon la nomenclature de Rovainen (1982) (cf figure 7). L'activité de la majorité des cellules RS est modulée phasiquement durant la locomotion fictive (Dubuc et Grillner, 1989; Kasicki et al., 1989). Celle-ci est induite pharmacologiquement sur une préparation *in vitro* par l'application de 100 μM de NMDA sur la moelle épinière ou en stimulant le nerf trijumeau. Les oscillations membranaires d'une cellule RS du PRRN enregistrée en intracellulaire montrent que les ondes de dépolarisation sont en phase avec les bouffées des racines ventrales ipsilatérales alors que les ondes de repolarisation sont en phase avec les bouffées contralatérales. La modulation rythmique des neurones RS est également observée

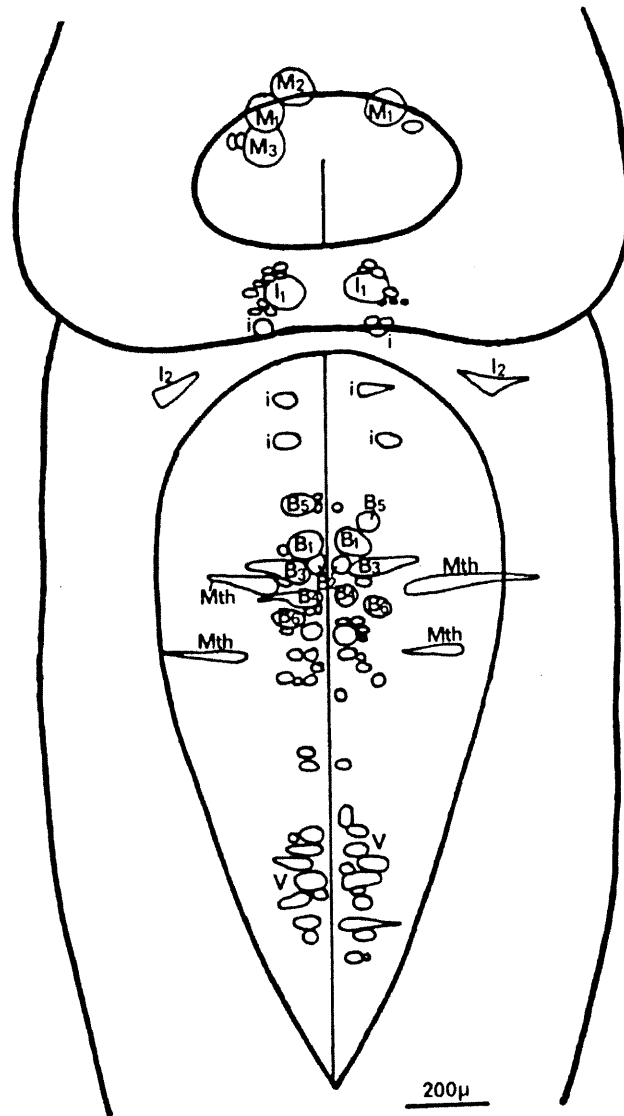


Figure 7

Localisation des cellules de Müller chez la lamproie adulte *Ichthyomyzon unicuspis*

Tiré de Rovainen (1982)

durant la locomotion active sur une préparation semi-intacte (Viana Di Prisco et al., 1995b) ou même sur la lamproie en liberté (Deliagina et al., 2000). Après la stimulation de la MLR, les cellules RS sont dépolarisées jusqu'à atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action, lesquels vont activer le CPG spinal du côté ipsilatéral. Les axones réticulospinaux contactent les interneurons pré moteurs générant le patron locomoteur via des synapses excitatrices glutamatergiques (Buchanan, 1982). Étant donné que les cellules RS des quatre noyaux réticulaires ont des effets variés sur le CPG spinal que ce soit sur la fréquence locomotrice ou sur l'asymétrie segmentaire (Wannier et al., 1998), on peut penser que la MLR va agir différemment en activant spécifiquement certains groupes de cellules RS. Des données préliminaires indiquent que la MLR exerce des effets différentiels sur les cellules RS car sa stimulation produit des PPSEs de large amplitude dans la partie rostrale du MRRN qui diminuent progressivement dans le sens rostro-caudal pour devenir de faibles réponses au niveau du PRRN (Brocard et al., 2001). Ces réponses excitatrices sont probablement monosynaptiques car elles apparaissent à la même latence après une double stimulation de la MLR à 25 Hz en présence d'une forte concentration de cations divalents. Il semble que les cellules RS du MRRN soient les premières à être recrutées pour produire le rythme locomoteur car elles sont plus excitables après avoir stimulé la MLR (contacts synaptiques plus efficaces entre la MLR et le MRRN) que les cellules RS du PRRN.

De récentes études réalisées au laboratoire du Professeur Dubuc ont montré que l'application locale d'acétylcholine (1 mM) ou de nicotine (1-2 mM) sur les cellules RS du MRRN ou du PRRN produit des réponses dépolarisantes dose-dépendantes (LeRay et al., en révision). La perfusion de l'antagoniste nicotinique D-tubocurarine bloque complètement la réponse excitatrice. L'activation cholinergique des cellules RS

provoque la nage fictive sur une préparation *in vitro*, la nage active sur une préparation semi-intacte et accélère également le rythme locomoteur après l'application de NMDA sur la moelle épinière. Enfin, la perfusion de D-tubocurarine réduit partiellement les PPSEs des cellules RS du MRRN générés par la stimulation électrique de la MLR (réduction d'environ 20%). Le reste de la réponse est abolie si on ajoute des antagonistes des récepteurs au glutamate (CNQX et AP5). L'ensemble de ces résultats physiologiques suggère fortement que la transmission synaptique entre la MLR et les cellules RS du rhombencéphale est médiée en partie via des projections cholinergiques, comme cela se produit chez les mammifères (cf figure 5). Cependant, il semble que des voies excitatrices glutamatergiques soient également impliquées dans la commande motrice. Ces résultats physiologiques sont en accord avec les données anatomiques présentées plus tard dans la partie résultats, qui montrent la présence de cellules cholinergiques autour de la MLR.

C- La salamandre:

1- La marche et la nage chez la salamandre:

La salamandre est un tétrapode primitif qui présente la particularité de pouvoir exprimer spontanément à l'âge adulte deux modes locomoteurs différents: la marche et la nage. Cet animal constitue donc un modèle expérimental idéal pour explorer les réseaux neuronaux générateurs de ces deux modes locomoteurs et les mécanismes nerveux qui contrôlent le passage d'un mode à l'autre. La marche et la nage ont été caractérisées comme telles à la fois par l'enregistrement de l'activité EMG le long de la musculature épaxiale responsable de la courbure du corps et par l'enregistrement de l'activité EMG des membres antérieurs et postérieurs chez le triton adulte *Pleurodeles*

waltl (Delvolvé et al., 1997). Durant la marche sur le sol, les myomères ipsilatéraux de la partie moyenne du tronc s'activent en phase, en alternance avec les myomères contralatéraux. Les déplacements latéraux du tronc sont accompagnés de mouvements rythmiques alternés des membres caractéristiques du trot ou de la marche rapide. Durant la nage, le rythme est beaucoup plus rapide et les bouffées EMGs sont plus intenses surtout à l'extrémité caudale. Cette fois, les myomères ipsilatéraux s'activent séquentiellement dans le sens rostro-caudal toujours en alternance avec l'activation des myomères contralatéraux. La nage est également caractérisée par une activité tonique des muscles des membres, lesquels adoptent une position allongée le long du corps. Enfin, il faut noter que le cycle de la nage est de plus courte durée que celui de la marche. Les auteurs suggèrent que le patron de la marche et celui de la nage soient produits par les mêmes CPGs spinaux. Toutefois, les réseaux neuronaux responsables des mouvements des membres seraient activés de façon tonique durant la nage et de façon rythmique durant la marche (Delvolvé et al., 1997).

2- La locomotion fictive sur la préparation *in vitro*:

Tout comme la lamproie, la salamandre présente l'avantage d'avoir un système nerveux résistant plusieurs heures en condition *in vitro* et devient donc accessible à l'emploi de techniques électrophysiologiques. De plus, son cerveau reste peu spécialisé en raison du caractère embryonnaire persistant à l'âge adulte. L'application dans le bain de NMDA (100 μM) + Mg^{2+} (1.8 mM) génère la marche sur une préparation isolée tronc cérébral-moelle épinière-membres antérieurs (Wheatley et al., 1992). Même si l'effet est potentialisé en présence de glycine (1 μM), la nage n'est jamais observée. Plus

récemment, sur une préparation *in vitro* réduite uniquement au tronc cérébral décérébrée au niveau mésencéphalique et à la moelle épinière, les patrons locomoteurs caractéristiques de la marche lente et de la nage ont pu être générés après la perfusion d'un mélange NMDA (2.5 à 10 μ M) + D-sérine (10 μ M) (Delvolvé et al., 1999). En effet, les deux patrons locomoteurs enregistrés à partir des racines ventrales montrent une activité alternée gauche-droite, avec une propagation rapide rostro-caudale pour l'un caractéristique de la nage et une propagation caudo-rostrale plus lente pour l'autre, caractéristique de la marche. Sur une préparation *in vitro* décérébrée, les rythmes locomoteurs générés pharmacologiquement restent plus lents par rapport à ceux observés sur l'animal intact. En effet après avoir stimulé la MLR, la fréquence des mouvements locomoteurs varie en fonction des conditions externes qui seront différentes s'il s'agit d'un animal intact qui touche le sol avec ses membres postérieurs ou s'il s'agit d'une préparation réduite paralysée.

3- La MLR:

Jusqu'à maintenant, on connaissait très peu de choses concernant les mécanismes supraspinaux responsables de l'initiation et du contrôle de la marche et de la nage chez la salamandre. Or dernièrement, une étude physiologique réalisée en collaboration avec le Pr Dubuc démontre que la salamandre possède également une MLR (Cabelguen et al., en révision). Les expériences sont effectuées sur une préparation semi-intacte: le tronc cérébral et la moelle épinière rostrale (les deux premiers segments) sont exposés *in vitro* tandis que la queue et les membres postérieurs sont laissés intacts et peuvent ainsi se mouvoir librement dans le bain. La stimulation électrique tonique (15 Hz) d'une région restreinte du mésencéphale caudal et rostrale à l'isthme déclenche deux types d'activités

locomotrices caractérisées à partir de l'enregistrement EMG de la musculature épaxiale et par l'enregistrement vidéo (cf figure 8). À faible intensité de stimulation (0.5-3.5 μA), les myomères ipsilatéraux s'activent en phase en alternance avec les myomères contralatéraux. L'enregistrement vidéo montre des déplacements latéraux du tronc de faible amplitude et un mouvement rythmique des membres postérieurs. Ces caractéristiques EMGs et cinématiques sont typiques de la marche. À plus forte intensité de stimulation (2.0-5.5 μA), la fréquence et l'amplitude des bouffées EMGs augmentent, les myomères ipsilatéraux s'activent rostro-caudalement toujours en alternance avec les myomères contralatéraux. L'enregistrement vidéo montre des déplacements latéraux de la queue de forte amplitude tandis que les pattes postérieures s'allongent le long du corps. Ces caractéristiques EMGs et cinématiques sont celles de la nage. Des résultats similaires sont obtenus pour des fréquences de stimulation croissantes de la MLR mais d'intensité constante. Par conséquent, le degré d'activation de la MLR détermine le type de programme locomoteur: la marche lors d'un bas niveau d'activation et la nage pour un niveau plus élevé. La salamandre étant très mal adaptée à la marche terrestre en raison de la courte taille de ses membres, la nage représente le mode de locomotion le plus rapide (Ashley-Ross, 1994). Il semble donc logique que cela nécessite une plus forte intensité de stimulation de la MLR pour que l'animal se mette à nager. Précédemment, une étude comportementale réalisée sur la *Necturus* décérébrée a montré que la stimulation électrique répétée d'une zone localisée dans le tegmentum latéral mésencéphalique provoque des mouvements rythmiques du corps, de la queue et des membres dans différentes combinaisons (Shik, 1997). Cependant ses résultats sont en contradiction avec les nôtres puisque l'auteur observe un mouvement rythmique du

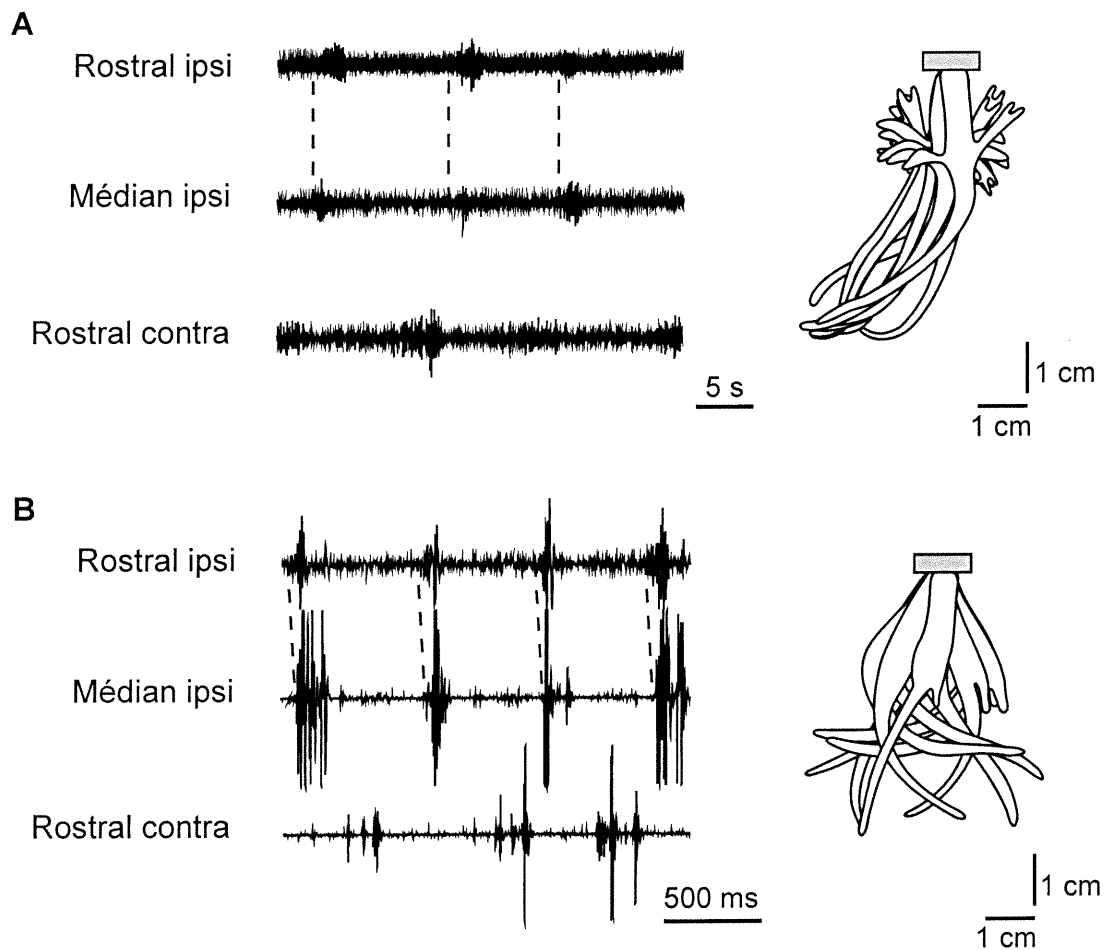


Figure 8

La marche et la nage générées par la stimulation électrique de la MLR chez la salamandre adulte

A: A gauche, l'activité EMG enregistrée le long de la musculature épaxiale durant la marche induite par la stimulation de la MLR ($2.8 \mu\text{A}$, 15 Hz). Les myomères s'activent en phase du côté ipsilatéral et en alternance avec les myomères contralatéraux. A droite, les contours du corps durant un cycle montrent des déplacements latéraux du tronc de faible amplitude ainsi qu'un mouvement alterné des pattes postérieures.

B: A gauche, l'activité EMG enregistrée le long de la musculature épaxiale durant la nage induite par la stimulation de la MLR ($3.8 \mu\text{A}$, 15 Hz). Un délai rostro-caudal pour les EMGs ipsilatéraux est clairement visible. A droite, les mouvements du corps durant un cycle indiquent des déplacements de la queue de forte amplitude alors que les pattes postérieures s'allongent le long du corps.

Tiré de Cabelguen, Bourcier-Lucas et Dubuc, en révision dans *J. Neuroscience*.

corps et de la queue caractéristique de la nage pour de faibles intensités de stimulation puis pour des intensités de stimulation plus élevées, il observe un mouvement alterné du corps, des membres et de la queue typique de la marche. Ces seules observations comportementales sans avoir caractérisé la coordination inter-segmentaire de la musculature axiale, ne permettent pas d'affirmer si les mouvements alternés sont semblables à une locomotion. De plus, la MLR ne semble pas clairement définie et reste diffuse. Dans ce cas, les effets observés sont probablement non spécifiques.

4- MLR et système réticulospinal:

Comme nous l'avons vu précédemment, la MLR des mammifères et même de la lamproie regroupe un ensemble de cellules et non des fibres de passage. L'étude de Cabelguen et coll. (en révision) ne permet pas de déterminer si la stimulation de la MLR chez la salamandre active des corps cellulaires ou des axones de passage. Cependant, la stimulation de la partie rostrale du mésencéphale ne produit pas de locomotion suggérant que ce ne sont pas des éléments projetant à la MLR qui génèrent le mouvement mais plutôt des cellules au cœur même de la MLR qui sont responsables de l'initiation de la locomotion. En accord avec cette idée, comme nous allons le voir en détail dans la partie résultats, des cellules cholinergiques révélées par immunohistochimie anti-ChAT ont été mises en évidence autour du site de la MLR identifiée histologiquement sur une préparation semi-intacte (Cabelguen et al., en révision). Chez de nombreuses espèces, la MLR active le CPG spinal via le système RS. Récemment, il a été montré que des cellules RS du rhombencéphale qui participent à l'effet locomoteur déchargent de différentes façons après avoir stimulé la MLR (Bargad et al., 1999). Le courant et les intervalles entre les trains de stimulation de la MLR

sont délivrés de telle sorte que la locomotion ne débute que 10 secondes plus tard. De cette façon, les potentiels d'action des neurones RS du rhombencéphale sont enregistrés en extra-cellulaire avant que le mouvement ne commence. Cela permet d'étudier le comportement de ces cellules durant la transition de l'état de repos à la locomotion. Certains neurones déchargent durant toute la durée de la stimulation alors que d'autres ne déchargent que de façon sporadique. Il semble donc qu'il existe un lien entre la MLR et le système RS. Des études anatomiques et électrophysiologiques supplémentaires sont nécessaires afin d'établir la nature des connections entre la MLR et les cellules RS. Par ailleurs, il reste à déterminer si la MLR recrute différentes populations de cellules RS pour générer la marche et la nage ou si des propriétés intrinsèques différentes des cellules RS sont responsables d'un mode locomoteur ou de l'autre. Étant donné que des cellules cholinergiques existent dans la région de la MLR (cf résultats), on peut penser que la MLR exerce ses effets sur les cellules RS via des projections cholinergiques comme cela se passe chez les vertébrés supérieurs et même chez la lamproie.

DEUXIEME PARTIE: OBJECTIFS

Comme chez les vertébrés supérieurs, la lamproie possède une MLR qui contrôle la locomotion et active le CPG spinal via le système RS. Récemment, des travaux électrophysiologiques réalisés au laboratoire du Pr. Dubuc ont montré une dépolarisation des cellules RS du MRRN suite à l'injection d'acétylcholine ou de nicotine au sein de cette même région provoquant la nage, ce qui suggère la présence de récepteurs à l'acétylcholine au niveau du MRRN (LeRay et al., en révision). De plus, l'antagoniste nicotinique D-tubocurarine réduit en partie la composante PPSE des cellules RS du MRRN après avoir stimulé la MLR; le reste de la réponse est aboli par des antagonistes glutamatergiques. Par conséquent, chez la lamproie la MLR semble envoyer des projections cholinergiques et glutamatergiques vers la formation réticulée. Dernièrement, la MLR a également été mise en évidence physiologiquement chez la salamandre par le Pr. Cabelguen en collaboration avec le Pr. Dubuc (Cabelguen et al., en révision). Chez cette espèce, la force d'activation de la MLR déclenche deux types d'activités locomotrices: la marche pour un faible niveau d'activation et la nage pour un niveau plus élevé. C'est à notre connaissance la première fois qu'une telle dépendance est démontrée.

Mon projet d'étude consiste en premier lieu à révéler par immunohistochimie dirigée contre la ChAT la présence de cellules cholinergiques mésopontiques dans la région de la MLR identifiée physiologiquement sur une préparation semi-intacte de lamproie et de salamandre. Deux types de populations isthmiques cholinergiques seront analysés en détail: le nombre ainsi que la taille des cellules de chacun des deux noyaux seront établis chez la lamproie. Une étude comparée concernant l'organisation des

populations isthmiques cholinergiques sera effectuée entre les deux espèces ainsi qu'avec d'autres espèces de vertébrés inférieurs. La deuxième partie de mon projet a pour but de visualiser les projections cholinergiques issues de la MLR vers la formation réticulée et plus particulièrement vers le MRRN de la lamproie. Pour cela, un protocole de double marquage est utilisé en combinant le traçage rétrograde aux dextran-amines couplées à la fluorescéine à l'immunofluorescence anti-ChAT révélée au texas-red. Cependant, aucune cellule doublement marquée n'a pu être obtenue en raison de problèmes méthodologiques. Par la suite toujours dans la même optique, la localisation de cellules marquées de façon rétrograde après l'injection de cobalt-lysine dans le MRRN sera comparée avec celle des cellules isthmiques cholinergiques révélées par immunohistochimie anti-ChAT chez la salamandre. Les résultats obtenus ne prouvent pas la présence de voies cholinergiques entre la MLR et le MRRN mais permettent tout au moins de conclure si de telles projections peuvent exister.

TROISIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES

I- Lésion électrolytique de la MLR:

L'identification physiologique de la MLR est effectuée sur une préparation semi-intacte. Celle-ci est obtenue en exposant *in vitro* le tronc cérébral et la partie rostrale de la moelle épinière (les deux premiers segments) perfusés continuellement avec du Ringer frais et oxygéné, alors que le reste du corps est conservé intact permettant ainsi à l'animal de nager librement dans le bain. Pour la lamproie, les deux tiers caudaux du corps et la queue sont laissés tel quel, alors que pour la salamandre cela inclut également les membres postérieurs. Les préparations sont ensuite décérébrées au niveau mésencéphalique. La MLR est stimulée électriquement à l'aide d'une microélectrode de tungstène (5 M Ω , 10 μ m de diamètre) à 1-10 μ A, 1ms, 5-10 Hz pour la lamproie et 0.1-10 μ A, 2ms, 5-15 Hz pour la salamandre. La MLR est identifiée comme telle car sa stimulation génère des mouvements symétriques qui augmentent avec l'intensité de la stimulation. À la fin de l'expérience, la région stimulée est identifiée histologiquement par lésion électrolytique en envoyant un courant DC de 5 μ A pendant 10 secondes. Les neurones cholinergiques sont ensuite révélés par immunohistochimie anti-ChAT.

II- Étude des neurones cholinergiques isthmiques:

La réaction immunohistochimique contre la ChAT, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, est utilisée pour étudier en détail la distribution des neurones cholinergiques au niveau isthmique chez la lamproie *Petromyzon marinus* à différents stades du développement (larvaire, jeune adulte, pondreuse) et chez la salamandre adulte

Notophtalmus viridescens. Les animaux sont profondément anesthésiés par immersion dans une solution aqueuse de méthylsulfonate de tricaine (MS222) à 0.1%. La dissection s'effectue dans une solution fraîche (6°C) et oxygénée de Ringer de lamproie (LeRay et al., en révision) ou de salamandre (Delvolvé et al., 1997), de telle sorte que le système nerveux soit rapidement exposé *in vitro*. Les cerveaux sont fixés par immersion dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% + acide picrique (AP) 0.4% diluée dans du tampon phosphate (TP) 0.1 M pH 7.4 pendant environ 20 h. Après une nuit de cryoprotection dans du sucrose 30%, les cerveaux sont congelés à - 55°C et coupés à 20 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat dans différents plans; transverse, sagittal ou horizontal. Les sections sont ensuite montées sur des lames gélatinées avant de procéder à la réaction immunohistochimique. Dans ce cas, la réaction s'effectuera sur un seul côté de la coupe. La qualité du tissu obtenue à partir des coupes en congélation peut être altérée (aspect granuleux). Dans le but d'améliorer la qualité histologique, l'immunohistochimie anti-ChAT est également effectuée sur des coupes flottantes sans passer par l'étape de congélation. Étant donné que cette méthode préserve davantage le tissu, il sera plus facile de visualiser les fibres et les terminaisons. Après enrobage dans une solution d'agarose à 1.5%, le tissu fixé dans la PFA 4% + AP 0.4% est coupé au vibratome à 40 ou 50 µm d'épaisseur. Les tranches sont récupérées dans du TP 0.1 M pH 7.4. De cette façon, la réaction immunohistochimique s'effectuera sur les deux faces de la coupe flottante. On utilise deux protocoles différents de réaction immunohistochimique pour chacune des techniques histologiques. En effet, le protocole de Barber et al. (1984) est mieux adapté pour les coupes de 20 µm obtenues au cryostat,

alors que le protocole de Pombal et al. (2001) convient davantage aux coupes flottantes de 40 ou 50 μm .

A- Protocole pour les coupes au cryostat (adapté de Barber et al., 1984):

Les sections sont rincées 3 fois 5 min au tampon phosphate salin (PBS) 0.1 M pH 7.4 plus saponine 0.1% afin de perméabiliser le tissu. Elles sont ensuite traitées pendant 30 min au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 0.3% avec du méthanol 10% dans du PBS + saponine 0.1% afin de réduire l'activité des peroxydases endogènes. Après 3 nouveaux rinçages dans le PBS + saponine 0.1%, les sections sont incubées dans les solutions suivantes: **1)** serum de cheval normal (SCN, Gibco) 4% dans le PBS + saponine 0.1% pendant 30 min à 4°C (cette étape de préincubation sert à saturer les sites de liaisons non spécifiques); **2)** l'anticorps primaire purifié de chèvre anti-ChAT (code AB144P, Chemicon) dilué au 1/200 dans une solution de SCN 4% et PBS + saponine 0.1% pendant 20 h à 4°C; **3)** 3 rinçages au PBS à température ambiante; **4)** l'anticorps secondaire biotinylé de cheval anti-chèvre (code BA9500, Vector) dilué au 1/200 dans du SCN 4% et du PBS pendant 1 h à température ambiante; **5)** 3 rinçages au PBS à température ambiante; **6)** le réactif avidin-horseradish peroxydase (kit ABC, code PK6100, Vector) dilué comme indiqué par le fabricant dans le PBS pendant 1 h à température ambiante. Ce complexe ABC sert à amplifier le signal. Enfin, le marquage immunohistochimique est visualisé en présence de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB), de H_2O_2 et de nickel en utilisant les concentrations indiquées par le fabricant (kit DAB, code SK4100, Vector) pendant environ 10 min. Après avoir rincé plusieurs fois dans une solution de NaCl à 0.9% et laissé sécher les lames une nuit,

les sections sont déshydratées dans des concentrations croissantes d'alcool puis les lames sont montées avec de l'entellan. Il y a un contrôle négatif pour chaque expérience; une série de lames réagit sans l'anticorps primaire de telle sorte qu'il n'y aura aucun marquage spécifique.

B- Protocole pour les coupes flottantes (adapté de Pombal et al., 2001):

La présence de ChAT est révélée en suivant le protocole de Pombal et al. (2001) avec cependant quelques modifications. En effet, la révélation peroxydase-antiperoxydase (PAP) utilisée par ces auteurs est remplacée par la méthode du complexe avidin-biotine. Après avoir rincé les coupes flottantes au PBS 0.1 M (3x10 min), les sections sont incubées dans les solutions suivantes: **1)** 30 min de traitement au H₂O₂ 1% dilué dans le PBS dans le but de réduire l'activité des peroxydases endogènes; **2)** PBS 0.1 M (3x10 min); **3)** 1 h de préincubation dans une solution de SCN 15%, de triton 0.5%, de serum albumine bovine (SAB) 2% diluée dans du PBS; **4)** 40 h de réaction avec l'anticorps primaire purifié de chèvre anti-ChAT dilué au 1/100 dans le même tampon que l'étape 3 à 4°C; **5)** PBS 0.1 M (3x10 min); **6)** 1 h de réaction avec l'anticorps secondaire biotinylé de cheval anti-chèvre dilué au 1/50 toujours dans le même tampon à température ambiante; **7)** PBS 0.1 M (3x10 min); **8)** 1 h avec le kit ABC dilué comme indiqué par le fabricant dans le PBS à température ambiante; **9)** PBS 0.1 M (3x10 min). Puis les cellules cholinergiques sont révélées avec la méthode de glucose oxidase qui optimise le marquage des fibres et des terminaisons d'après la technique de Shu et al., 1988. Cependant afin de mieux contrôler la durée de la réaction, les concentrations de chaque réactif sont réduites de moitié par rapport au protocole original. Brièvement, les sections

réagissent dans l'ordre avec les solutions suivantes: **1)** 10 min dans le tampon acétate (TA) 0.1M pH 6; **2)** 0.025% DAB, 0.001% glucose oxydase, 1.25% sulfate de nickel ammonium, 0.1% D-glucose et 0.02% chlorure d'ammonium dans le TA 0.1M pH 6 jusqu'à obtenir une coloration noirâtre (environ 5 min de réaction); **3)** TA 0.1M pH 6 (2x10 min); **4)** plusieurs rinçages au tampon Tris-HCl 0.05 M pH 7.6. Finalement, les coupes flottantes sont montées sur des lames gélatinées. La suite de l'expérience se déroule comme indiquée précédemment.

C- Analyses et représentation 3-D:

Le comptage des cellules marquées est effectué à partir de coupes transverses sur un côté du tronc cérébral au niveau du tegmentum mésencéphalique. Les cellules ChAT-ir sont comptées en utilisant la méthode de dissection optique (West et al., 1991). A partir d'un animal, le diamètre du soma est mesuré sur l'axe le plus long pour chaque coupe transverse. Les photographies sont prises avec une caméra digitale (Coolpix 995, Nikon) adaptée sur le microscope (Optiphot-2, Nikon). Toutes les figures sont réalisées en utilisant le logiciel Coreldraw 9. Une reconstruction en 3 dimensions représentant la distribution des neurones isthmiques ChAT-ir est effectuée grâce au logiciel Autocad 12.

III- Étude des projections cholinergiques entre la MLR et le MRRN:

Pour cela deux approches expérimentales différentes sont utilisées.

A- La technique de double marquage fluorescent:

Afin de caractériser les projections cholinergiques issues de la MLR, une microinjection de cristaux de dextran-amines (3000 Da) couplés à la fluorescéine est effectuée dans un premier temps. En effet, les cristaux sont rapidement absorbés par

capillarité par les axones coupés au niveau du MRRN. Puis, le traceur est transporté de façon rétrograde pendant une période de survie d'environ 40 h, période durant laquelle le cerveau est continuellement perfusé avec du Ringer oxygéné frais. Après fixation dans la PFA 4% + AP 0.4%, les neurones cholinergiques sont révélés par la technique d'immunofluorescence sur des sections transverses de 20 μm d'épaisseur. Après 3x10 min de rinçage au PBS à 4°C, les sections sont séquentiellement incubées dans les solutions suivantes: **1)** 1 h à température ambiante dans une solution de SCN 10%, triton 0.4% dans du PBS; **2)** 24 h à 4°C avec l'anticorps primaire de chèvre anti-ChAT dilué au 1/20 dans une solution de SCN 4% + triton 0.4% dans le PBS; **3)** PBS 0.1 M (3x10 min); **4)** 2 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire biotinylé de cheval anti-chèvre dilué au 1/200 dans le même tampon que l'anticorps primaire; **5)** 2 rinçages de 10 min au PBS suivis d'un rinçage de 10 min au tampon salin bicarbonate (BBS) 0.1 M pH 8.5; **6)** 1 h à température ambiante avec le texas red couplé à l'avidin dilué au 1/100 dans le BBS. Ce réactif tertiaire permet d'amplifier le signal fluorescent. Après avoir rincé les coupes plusieurs fois au BBS, les lames sont ensuite montées en milieu aqueux. Au microscope à fluorescence, on peut différencier les cellules marquées de façon rétrograde en utilisant un filtre approprié à la fluorescéine (longueur d'onde entre 450 et 490 nm) des cellules cholinergiques en utilisant un filtre adapté au texas-red (longueur d'onde entre 530 et 585 nm). Une cellule doublement marquée signifie que la projection vers le MRRN est de nature cholinergique.

B- Le traçage rétrograde au cobalt:

Pour localiser les cellules du tronc cérébral qui projettent au MRRN, une solution de cobalt-lysine est injectée par iontophorèse dans le noyau MRRN. Cette technique de traçage est couramment utilisée dans notre laboratoire. Le fait que le cobalt entraîne une dégénérescence locale plus importante, le traceur est mieux capté par les axones fins comparativement aux molécules de dextran-amines. Après avoir lésé le tissu localement, une micropipette de verre (extrémité de 15 μm de diamètre) remplie de cobalt-lysine est immédiatement insérée au niveau de la lésion. Le traceur rétrograde est injecté en envoyant un courant positif de 1 μA (pulse de 500 ms, 1 Hz) pour être capté par les axones coupés. Le temps de transport varie entre 40 et 48 h. Le cobalt est ensuite précipité en plongeant le cerveau dans une solution de TP 0.1M pH 7.4 saturée en H_2S puis dans des concentrations croissantes d'éthanol pour le déshydrater. Le traitement au méthylsalicylate éclaircit le tissu en vue de photographier le cerveau en entier et de visualiser ainsi le site d'injection. Le tissu est enrobé dans un bloc de paraffine pour ensuite être coupé à 10 μm d'épaisseur au microtome dans le sens transverse. Le marquage au cobalt est révélé en utilisant la technique d'intensification à l'argent (Dubuc et al., 1993b). La disposition et le nombre de cellules marquées de façon rétrograde autour de la région isthmique sont ensuite comparés avec ceux des cellules cholinergiques marquées à la ChAT.

QUATRIEME PARTIE: RESULTATS

I- Résultats immunohistochimiques:

A- Chez la lamproie:

Des cellules cholinergiques sont présentes au sein de la MLR identifiée physiologiquement sur une préparation semi-intacte de lamproie à l'état larvaire (figure 9). En effet, des cellules ChAT-ir localisées dans la région isthmique près de la surface ventriculaire de l'Aqueduc de Sylvius se retrouvent à l'intérieur ou autour du site de coagulation correspondant à la MLR (Fig 9A). La représentation schématique illustre la zone lésée qui s'étend rostro-caudalement sur environ 140 μm (Fig 9B). À fort grossissement, on peut voir des cellules ovoïdes fortement marquées du côté intact (Fig 9C) et du côté lésé (Fig 9D). Le tissu d'aspect granuleux peut être dû au caractère immature larvaire de l'animal mais aussi à la technique histologique de congélation qui a pu altérer le tissu.

Dans le but d'identifier les groupes cholinergiques de la MLR, l'immunohistochimie anti-ChAT est effectuée sur des lamproies intactes à l'âge adulte. Deux populations de neurones ChAT-ir sont observées dans le tegmentum à la bordure mésopontique dans une aire qui inclut l'isthme et le mésencéphale caudal (Figure 10, voir aussi Pombal et al., 2001). Le premier groupe est situé au même niveau rostro-caudal que le noyau moteur du trochléaire (IV), lequel adopte une position dorsale caractéristique chez la lamproie (Fig 10A). Le groupe en question consiste en un amas compact de cellules fortement marquées localisées médialement dans la substance grise périaqueductale.

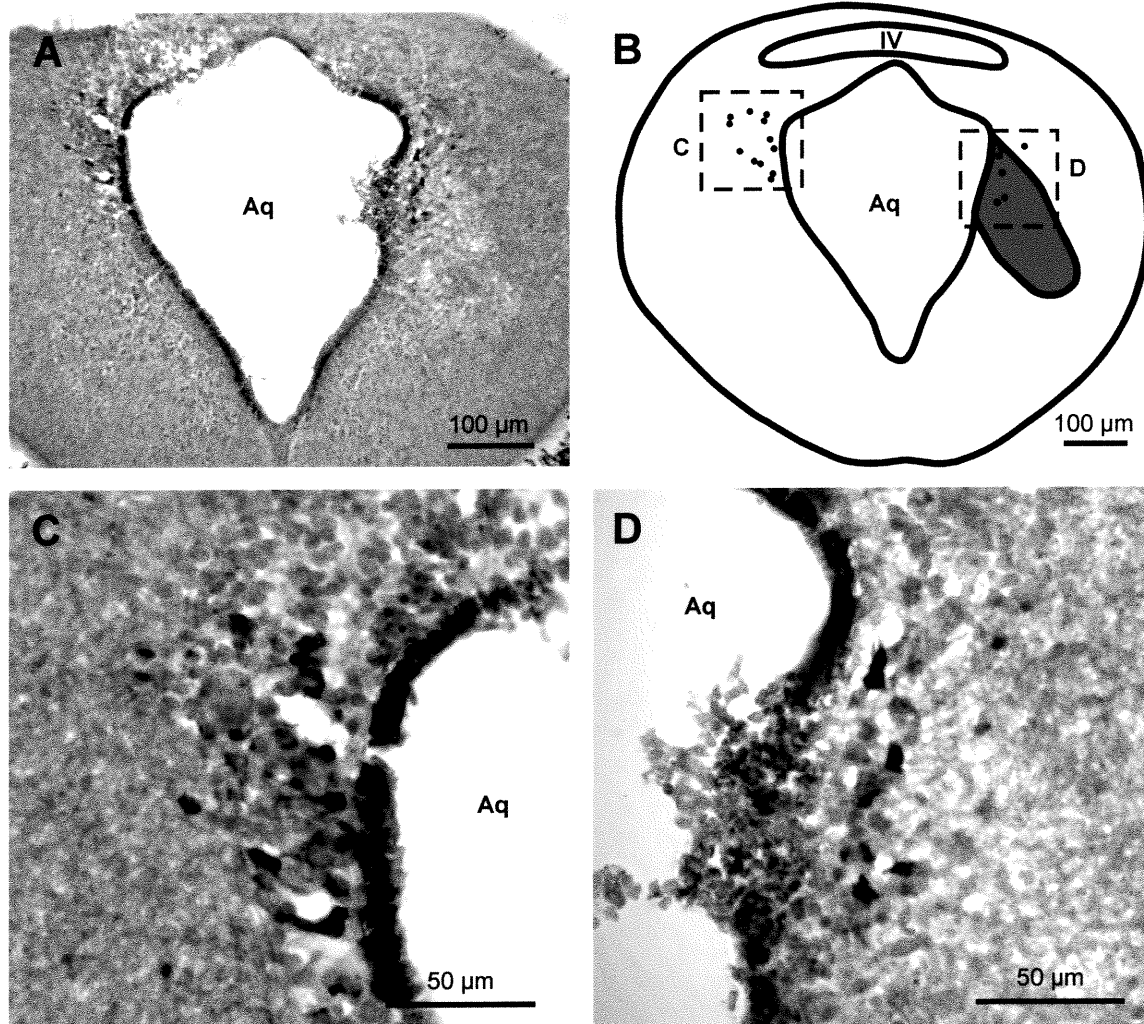


Figure 9

Cellules ChAT-ir à l'intérieur du site de coagulation de la MLR sur une lamproie à l'état larvaire

A et B: photomicrographie et représentation schématique d'une section transverse de 20 µm d'épaisseur au niveau de l'isthme illustrant le côté intact (à gauche) et le côté lésé (à droite, cf l'aire grise sur la section schématique). C: agrandissement de la zone représentée en B montrant des cellules ovoïdes ChAT-ir dans la substance grise périaqueductale. D: agrandissement de la zone représentée en B montrant des cellules ChAT-ir à l'intérieur du site de coagulation.

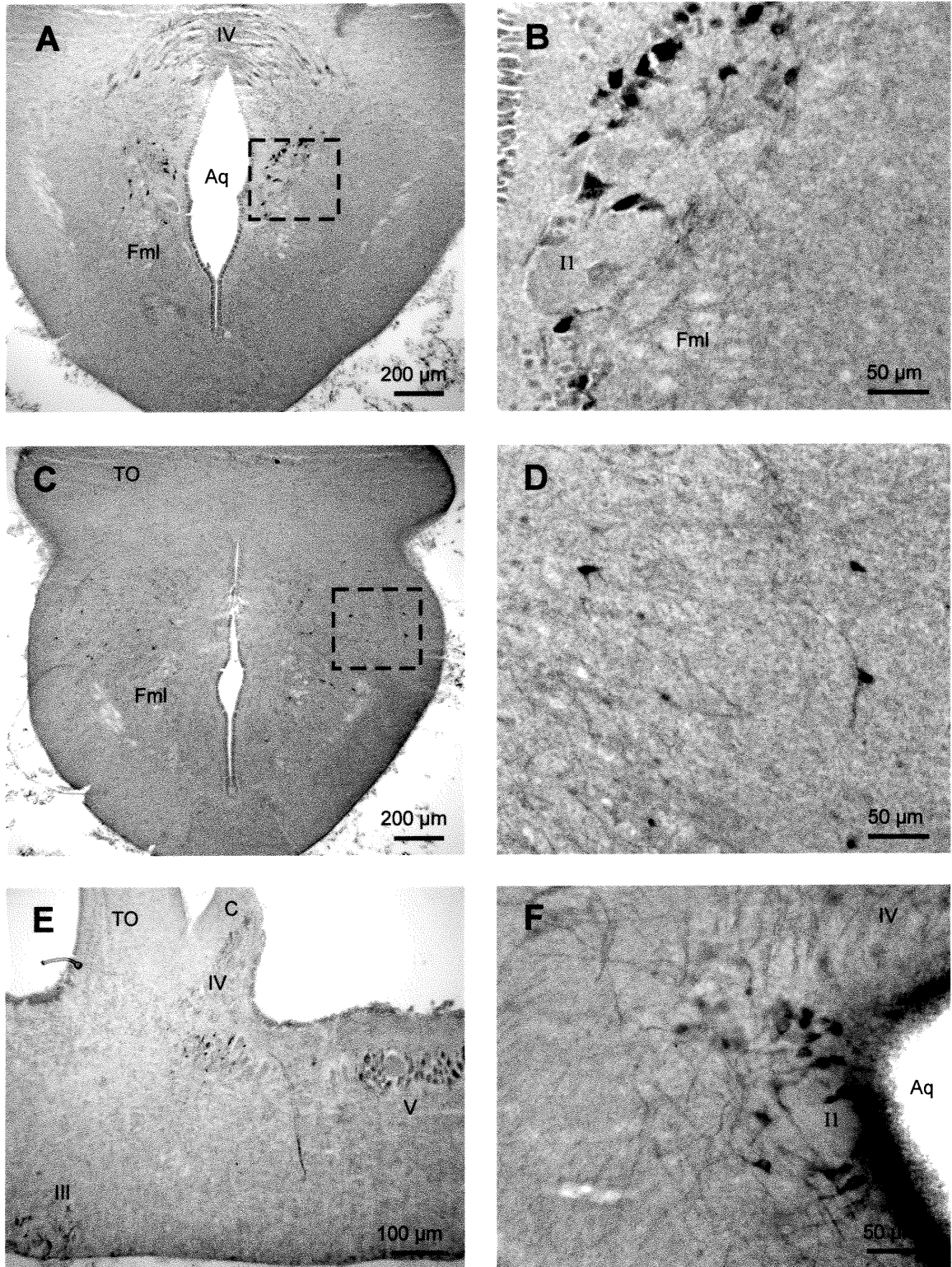


Figure 10
(cf légende page 62)

Légende Figure 10

Distribution des neurones ChAT-ir à la bordure mésopontique chez la lamproie adulte
(voir Pombal et al., 2001)

A: photomicrographie d'une section transverse de 20 μm d'épaisseur illustrant le groupe caudal périventriculaire de cellules ChAT-ir. Noter l'immunoréactivité du noyau moteur du IV en position dorsale. B: agrandissement de la zone représentée en A montrant des cellules ChAT-ir autour de la cellule de Müller isthmique (I1) de l'ARRN. C: photomicrographie d'une section transverse de 20 μm d'épaisseur illustrant le groupe rostro-latéral de cellules ChAT-ir dispersées dans le tegmentum mésencéphalique. D: agrandissement de la zone représentée en C. E: photomicrographie d'une section sagittale de 20 μm d'épaisseur représentant l'étendue rostro-caudale du groupe mésopontique caudal entremêlé de cellules RS non marquées. Noter l'immunoréactivité plus faible des noyaux moteurs du III, du IV et du V. F: photomicrographie d'une section transverse de 50 μm d'épaisseur révélée à la glucose oxidase, illustrant plusieurs cellules ChAT-ir du groupe mésopontique caudal autour de I1. Noter l'intense ramification dendritique et axonale.

Certains de ces neurones entourent une grosse cellule RS identifiée comme étant la cellule de Müller isthmique I1 du noyau ARRN selon la nomenclature de Rovainen (1982) (Fig 10B). Le deuxième groupe plus rostral, c'est-à-dire rostral au noyau moteur du IV, est composé de cellules dispersées latéralement dans le tegmentum mésencéphalique (Fig 10C). A fort grossissement, on constate que ces cellules également très marquées semblent plus petites par rapport à celles du groupe caudal (Fig 10D). La représentation sagittale illustre l'étendue rostro-caudale du groupe mésopontique caudal précédemment décrit (Fig 10E). Les cellules ChAT-ir s'entremêlent parmi plusieurs cellules RS non marquées. Elles sont plus foncées par rapport aux motoneurones du noyau moteur du trijumeau (V), du IV et du noyau oculomoteur (III). Les résultats anatomiques décrits jusqu'à présent sont obtenus à partir de coupes en congélation de 20 μm d'épaisseur. La figure 10F illustre le groupe mésopontique caudal d'une coupe de 50 μm d'épaisseur après révélation à la glucose oxydase. Bien que le marquage soit moins intense pour les corps cellulaires, on distingue plus facilement les ramifications dendritiques et axonales (comparer avec la figure 10B). Le comptage cellulaire réalisé sur six animaux varie de 545 à 781 cellules pour le groupe caudal avec une médiane de 628. Les cellules sont moins nombreuses dans le groupe rostral puisque le comptage varie de 253 à 403 cellules ($n=5$) avec une médiane de 352. Par ailleurs, comme nous avons pu l'observer anatomiquement, les neurones ChAT-ir du groupe rostral ont effectivement une taille moyenne ($10.7 \pm 3.1 \mu\text{m}$) significativement plus petite ($p<0.01$) que les cellules ChAT-ir du groupe caudal ($11.8 \pm 3.95 \mu\text{m}$).

La représentation en 3 dimensions, réalisée à partir d'un cerveau adulte, permet de positionner les deux populations isthmiques l'une par rapport à l'autre dans l'espace

mésopontique à l'aide de plans orthogonaux (figure 11). Le groupe caudal représenté par les sphères jaunes forme un amas de cellules concentré autour de la cellule I1 (sphère verte) (Fig 11A,11B). Rostralement, les cellules se dispersent davantage et prennent une position de plus en plus ventrale (Fig 11C). À ce niveau, il y a une zone de transition où s'entremêlent les cellules ChAT-ir du groupe caudal avec les cellules ChAT-ir du groupe rostro-latéral représentées par les sphères rouges. Ce dernier groupe évolue dorsalement dans le sens caudo-rostral (Fig 11C). Cette disposition des deux groupes mésopontiques cholinergiques a été confirmée sur plusieurs cerveaux. D'après les précédentes données anatomiques obtenues chez d'autres espèces de vertébrés (chat: Mitani et al., 1988; rat: Jones, 1990; amphibien: Marin et al., 1997), le groupe caudal est identifié comme étant le LDT alors que le groupe rostral correspond au PPN. Après avoir décrit anatomiquement les deux populations isthmiques, on peut conclure que les cellules cholinergiques du groupe mésopontique caudal correspondant au LDT font partie de la MLR identifiée physiologiquement sur la préparation semi-intacte (cf figure 9).

Outre les deux groupes isthmiques, l'immunohistochimie anti-ChAT marque également d'autres noyaux du tronc cérébral (figure 12). Au niveau hypothalamique, on peut observer un groupe de petites cellules rondes intensément marquées organisé en colonne (Fig 12A). Certaines cellules contactent le liquide cébrospinal. D'après Pombal (2001), ce groupe correspondrait au noyau paraventriculaire (PV). Au niveau mésencéphalique, les motoneurones du noyau III fortement immunoréactifs représentent une population déjà bien caractérisée (Fritsch et al., 1990). Sur la coupe horizontale, on distingue les motoneurones de grosse taille très foncés situés à la sortie du nerf et des motoneurones de taille plus petite faiblement marqués (Fig 12B).

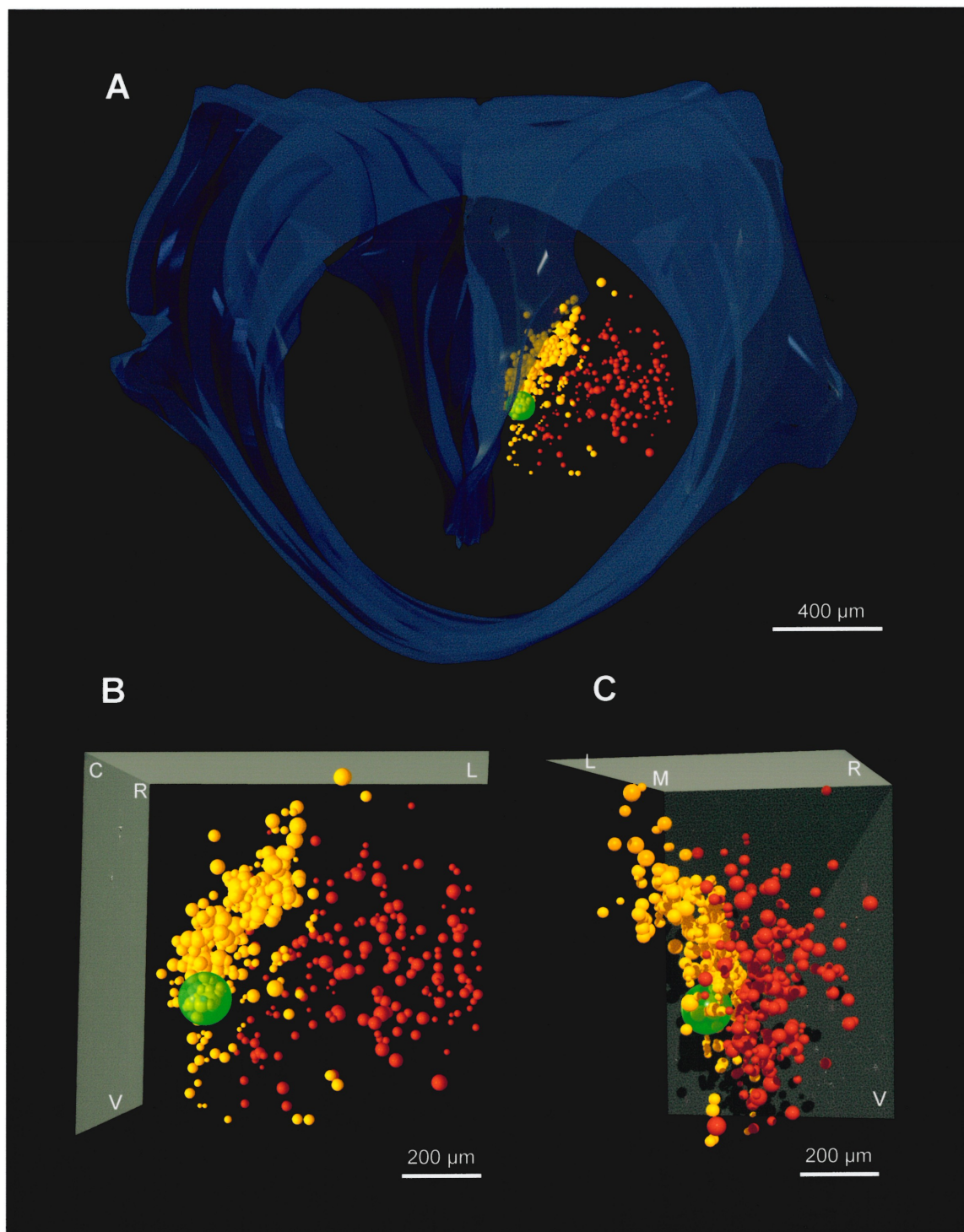


Figure 11
(cf légende page 66)

Légende Figure 11

Représentation en trois dimensions de la position des cellules ChAT-ir des deux groupes isthmiques

Chaque sphère, dont le véritable diamètre a été doublé pour améliorer la clarté du schéma, correspond à un neurone ChAT-ir. A: reconstruction 3-D à partir de 29 sections transverses de 20 μm d'épaisseur (distance totale = 580 μm) illustrant le groupe compact périventriculaire (sphères jaunes) entourant la grosse cellule I1 (sphère verte) et le groupe rostro-latéral au niveau du tegmentum (sphères rouges). Les deux populations neuronales sont montrées à fort grossissement en vue transverse (B) et sagittale (C). Deux plans orthogonaux ont été ajoutés pour l'observation en perspective. En B, la direction caudale est vers l'observateur. En C, la direction latérale est vers l'observateur. V: ventral; R: rostral; C: caudal; L: latéral.

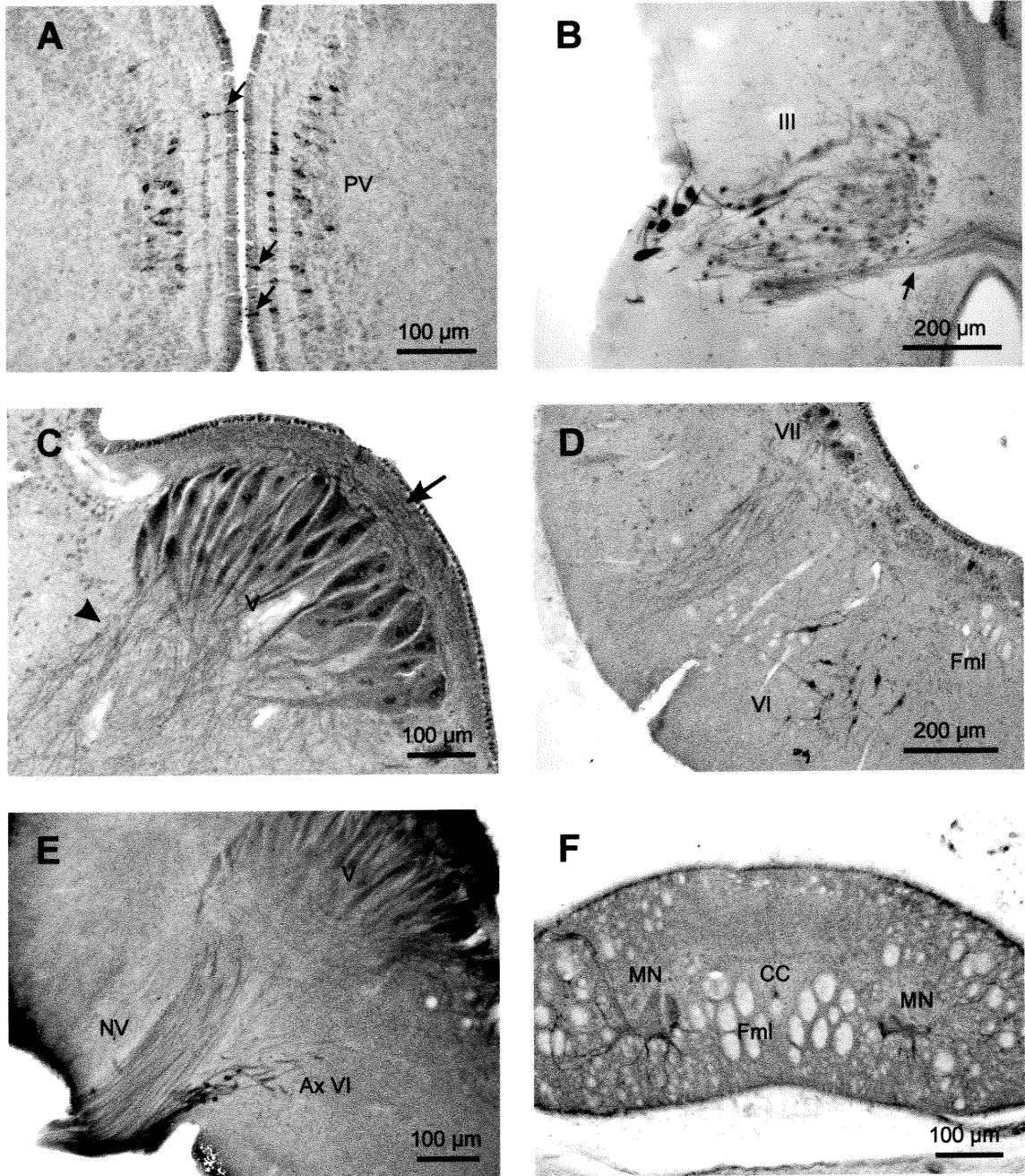


Figure 12
(cf légende page 68)

Légende Figure 12

Photomicrographies illustrant différents noyaux ChAT-ir du cerveau de la lamproie adulte

A: section transverse fine représentant des petites cellules rondes ChAT-ir du groupe hypothalamique PV. Noter la présence de quelques cellules contactant le liquide cérebrospinal (flèches). B: section horizontale épaisse illustrant les motoneurones du III. Noter le faisceau axonal motoneuronal qui projette en contralatéral (flèche). C: section transverse fine montrant le noyau moteur du V. Noter la ramification axonale des motoneurones du V s'étendant ventro-latéralement dans le tegmentum (flèche sans queue) ainsi que les dendrites apicaux sous l'éminence trigéminale (flèche). D: section transverse fine représentant le noyau moteur du VI et dorsalement le noyau moteur du VII. E: section transverse épaisse illustrant les axones du VI qui sortent du tronc cérébral en rejoignant le nerf V. F: section transverse fine montrant des motoneurones multipolaires au niveau de la moelle épinière rostrale.

Grâce à la technique de glucose oxidase utilisée sur cette préparation, on distingue clairement un faisceau axonal issu des motoneurons du III qui projette en contralatéral. Postérieur au LDT, le noyau moteur du V est formé de cellules allongées de grande taille disposées radialement (Fig 12C). On remarque la profusion des axones motoneuronaux au niveau du tegmentum ventro-latéral ainsi que des dendrites apicaux concentrées en périventriculaire le long de l'éminence trigéminale. Au niveau du tegmentum rhombencéphalique, les motoneurons multipolaires du noyau moteur de l'abducens (VI) sont intensément marqués (Fig 12D). On distingue également des motoneurons faciaux (VII) plus faiblement marqués localisés dorsalement au noyau moteur du VI. En utilisant la technique de révélation à la glucose oxidase, on peut suivre les axones fortement marqués du VI qui évoluent rostralement jusqu'à sortir du tronc cérébral en rejoignant le nerf V (Fig 12E). Les motoneurons des noyaux moteurs du vague (X) et du grand hypoglosse (XII) sont également ChAT-ir (non illustré). Enfin, l'immunohistochimie anti-ChAT a montré la présence de motoneurons de forme multipolaire au niveau de la moelle épinière rostrale (Fig 12F).

B- Chez la salamandre:

Dans le but de déterminer la présence de cellules cholinergiques au sein de la MLR chez la salamandre, l'immunohistochimie anti-ChAT est effectuée après avoir lésé le site de stimulation reconnu comme étant la MLR (figure 13). Chez la salamandre, les neurones marqués sont systématiquement révélés avec la méthode de glucose oxidase. La figure 13A illustre le site de coagulation au niveau isthmique sur une coupe épaisse de 40 μm .

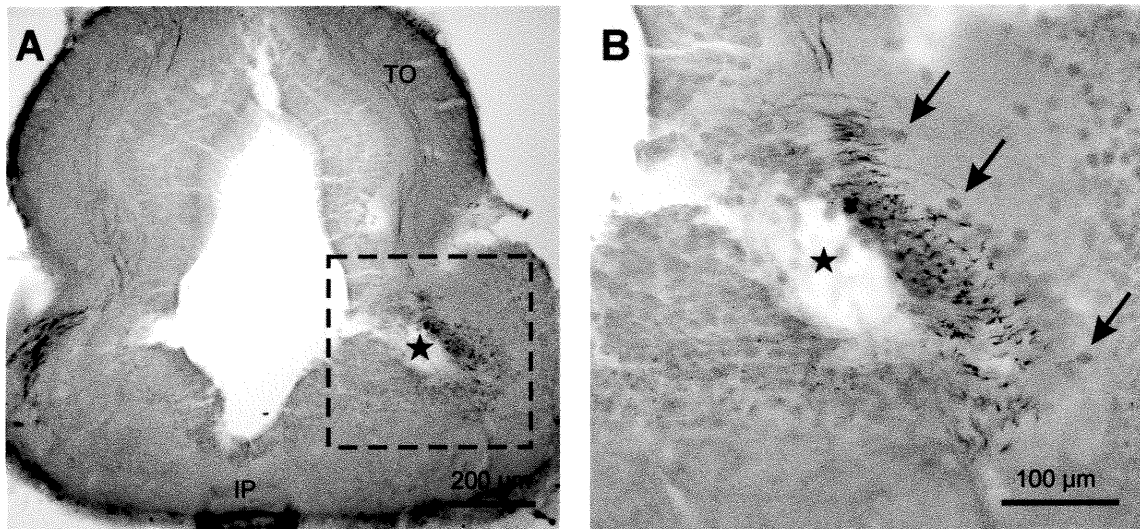


Figure 13

Cellules ChAT-ir autour du site de coagulation (★) de la MLR chez la salamandre adulte

A: section transverse de 40 µm d'épaisseur au niveau de l'isthme illustrant le coté intact (à gauche) et le coté lésé (à droite). Noter l'intense réseau fibreux ChAT-ir du noyau IP. B: agrandissement de la zone représentée en A montrant des cellules ovoïdes faiblement marquées (flèches) et de nombreuses fibres fortement ChAT-ir autour du site de coagulation.

A fort grossissement, on constate que ce site est entouré de nombreuses fibres fortement immunoréactives mais aussi de quelques cellules plus faiblement marquées (Fig 13B).

Dans le but d'identifier les groupes cholinergiques présents dans la région de la MLR, la réaction immunohistochimique est réalisée sur des cerveaux intacts de salamandre en utilisant des tranches fines de 20 μm d'épaisseur (figure 14). Comme décrit précédemment par Marin et coll. (1997), il y a deux groupes distincts de cellules ChAT-ir au niveau du tegmentum isthmique. Le premier groupe est composé d'un grand nombre de cellules ChAT-ir (Fig 14A). Leurs axones forment un gros faisceau que l'on peut suivre jusqu'au mésencéphale rostral (Fig 14B). D'après Marin, ce groupe représente le LDT. Le deuxième groupe localisé plus caudalement et latéralement dans le tegmentum est formé d'un nombre plus réduit de cellules organisées en une seule rangée (Fig 14B). Ce groupe correspond quant à lui au noyau isthmique (NI). Il est intéressant de noter que toutes les cellules immunoréactives ont une morphologie semblable c'est-à-dire rondes et approximativement de la même taille. Cette caractéristique particulière est probablement due au caractère immature du système nerveux de la salamandre. Un troisième groupe compact, dorsal et latéral au NI, formé d'un petit nombre de cellules ChAT-ir a été mis en évidence dans l'étude de Marin chez l'espèce *Pleurodeles waltl*. Nos résultats indiquent que ce groupe est absent chez l'espèce *Notophthalmus viridescens* mettant ainsi en évidence des différences dans l'organisation anatomique des noyaux cholinergiques mésopontiques au sein d'un même groupe d'amphibiens (cf discussion). La MLR identifiée sur la figure 13A se retrouve approximativement au même niveau rostro-caudal que la coupe représentée sur la figure 14C.

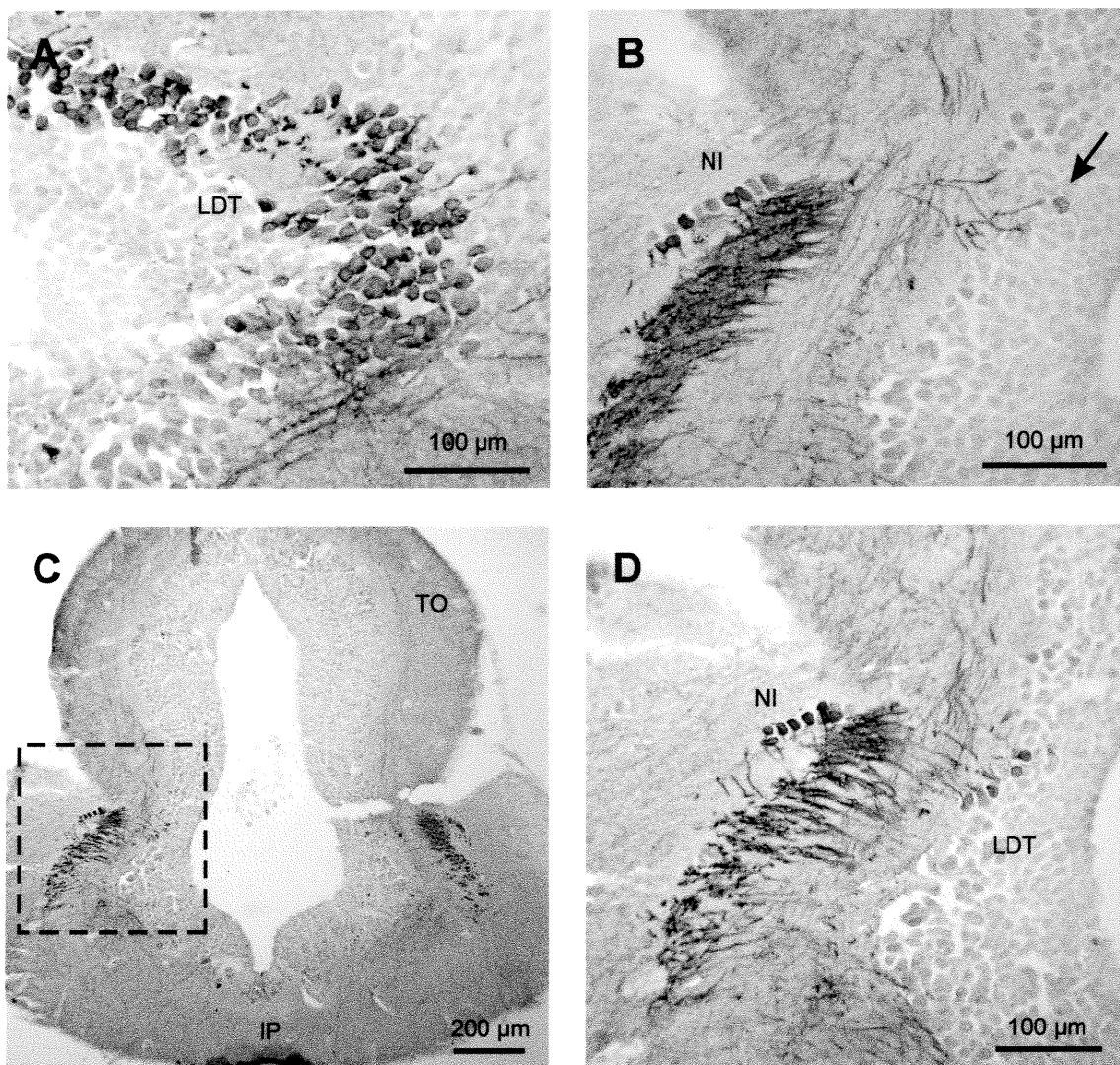


Figure 14

Distribution des neurones ChAT-ir dans la région isthmique chez la salamandre adulte
(voir Marin et al., 1997)

A: photomicrographie d'une section transverse de 20 µm d'épaisseur illustrant le groupe caudal correspondant au LDT. B: photomicrographie d'une section transverse de 20 µm d'épaisseur illustrant le groupe rostro-latéral correspondant au NI. Noter l'intense faisceau axonal provenant du LDT caudal. Noter également la présence d'une cellule isolée du LDT rostral (flèche). C: photomicrographie de la région isthmique (section transverse de 20 µm d'épaisseur) au même niveau rostro-caudal que la MLR représentée sur la figure 13A. Noter l'intense réseau fibreux ChAT-ir du noyau IP. D: agrandissement de la zone représentée en C montrant les deux groupes mésopontiques ChAT-ir, le LDT et le NI.

En effet, à fort grossissement, on constate une organisation neuronale similaire entre la figure 14D et la figure 13B. Par conséquent, on peut conclure que les neurones cholinergiques de la partie rostrale du LDT font probablement partie de la MLR chez la salamandre.

L'immunohistochimie anti-ChAT révèle d'autres noyaux cholinergiques en plus des populations mésopontiques (figure 15). A titre d'exemple, le noyau moteur du III localisé dans le tegmentum ventral mésencéphalique est composé de nombreuses cellules ChAT-ir fortement marquées (Fig 15A). On remarque une intense arborisation dendritique des motoneurones du III recouvrant la presque totalité de la partie ventrale du mésencéphale. Plus caudalement, les cellules ChAT-ir du noyau moteur du IV forment un groupe compact localisé dans la partie ventrale isthmique (Fig 15B). Contrairement aux motoneurones du III, l'arborisation dendritique des motoneurones du IV est beaucoup plus restreinte. On constate également des fibres ChAT-ir intenses au niveau du *fasciculus retroflexus* (Fig 15A) et du noyau interpédunculaire (Fig 15B).

Il est intéressant de noter que le marquage immunohistochimique utilisant le même anticorps anti-ChAT, est de façon générale plus intense chez la salamandre que celui obtenu chez la lamproie. L'anticorps polyclonal anti-ChAT purifié chez le rat n'est peut-être pas assez spécifique pour marquer les neurones cholinergiques chez la lamproie, alors qu'il semble être mieux adapté pour la salamandre. Malgré l'utilisation de la technique de révélation à la glucose oxydase, méthode qui optimise le marquage des fibres et des terminaisons, nous n'avons pas pu mettre en évidence une innervation cholinergique autour des cellules RS rhombencéphaliques, ceci dans le but de montrer que des projections cholinergiques axonales entre la MLR et le MRRN pourraient exister chez la lamproie (cf deuxième partie du projet).

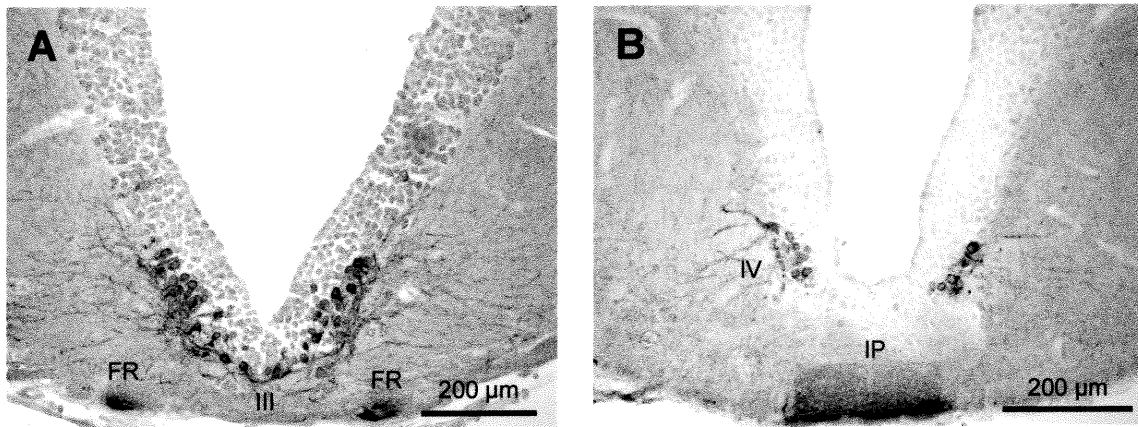


Figure 15

Photomicrographies illustrant différents noyaux ChAT-ir du cerveau de la salamandre adulte

A: section transverse fine représentant le noyau oculomoteur (III) et l'étendue de son arborisation dendritique dans le tegmentum ventral mésencéphalique. B: section transverse fine représentant le groupe compact du noyau moteur du trochléaire (IV). Noter la présence de fibres fortement immunoréactives au niveau du FR (en A) et du noyau IP (en B).

II- Résultats des études de traçage:

Pour tenter de visualiser des projections cholinergiques entre la MLR et le MRRN, une injection de DA-FITC au niveau du MRRN a été combinée à une réaction immunofluorescente anti-ChAT chez la lamproie (figure 16). Malgré un bruit de fond important, on distingue aisément les deux groupes isthmiques cholinergiques précédemment décrits, à savoir le groupe compact périventriculaire ou LDT (Fig 16A) et le groupe rostro-latéral plus diffus ou PPN (Fig 16B). Le groupe PV déjà décrit en figure 12A est également marqué en immunofluorescence (Fig 16C). Cependant, par la technique de double marquage, aucune cellule doublement marquée n'a pu être obtenue. En effet, à titre d'exemple, on distingue des cellules ChAT-ir du LDT regroupées médialement le long de la bordure ventriculaire (Fig 16D). La même section photographiée avec le filtre FITC révèle quelques cellules marquées de façon rétrograde très ventrales par rapport aux cellules ChAT-ir du LDT (Fig 16E). L'absence de cellule doublement marquée peut être liée aux limites techniques concernant le traçage rétrograde *in vitro* (cf discussion).

De précédentes données anatomiques ont mis en évidence des connexions monosynaptiques entre la MLR et le MRRN (Sirota et al., 2000). Les résultats physiologiques de LeRay et coll. (en révision) suggèrent fortement qu'une partie de ces voies soit de nature cholinergique. Il s'avère que les cellules marquées de façon rétrograde après l'injection de cobalt dans le MRRN sont situées autour de la MLR, au même endroit que les cellules ChAT-ir mésopontiques. En vue d'établir si de telles connexions peuvent exister chez la salamandre, le traceur cobalt-lysine est injecté par iontophorèse dans la région du MRRN sur un animal.

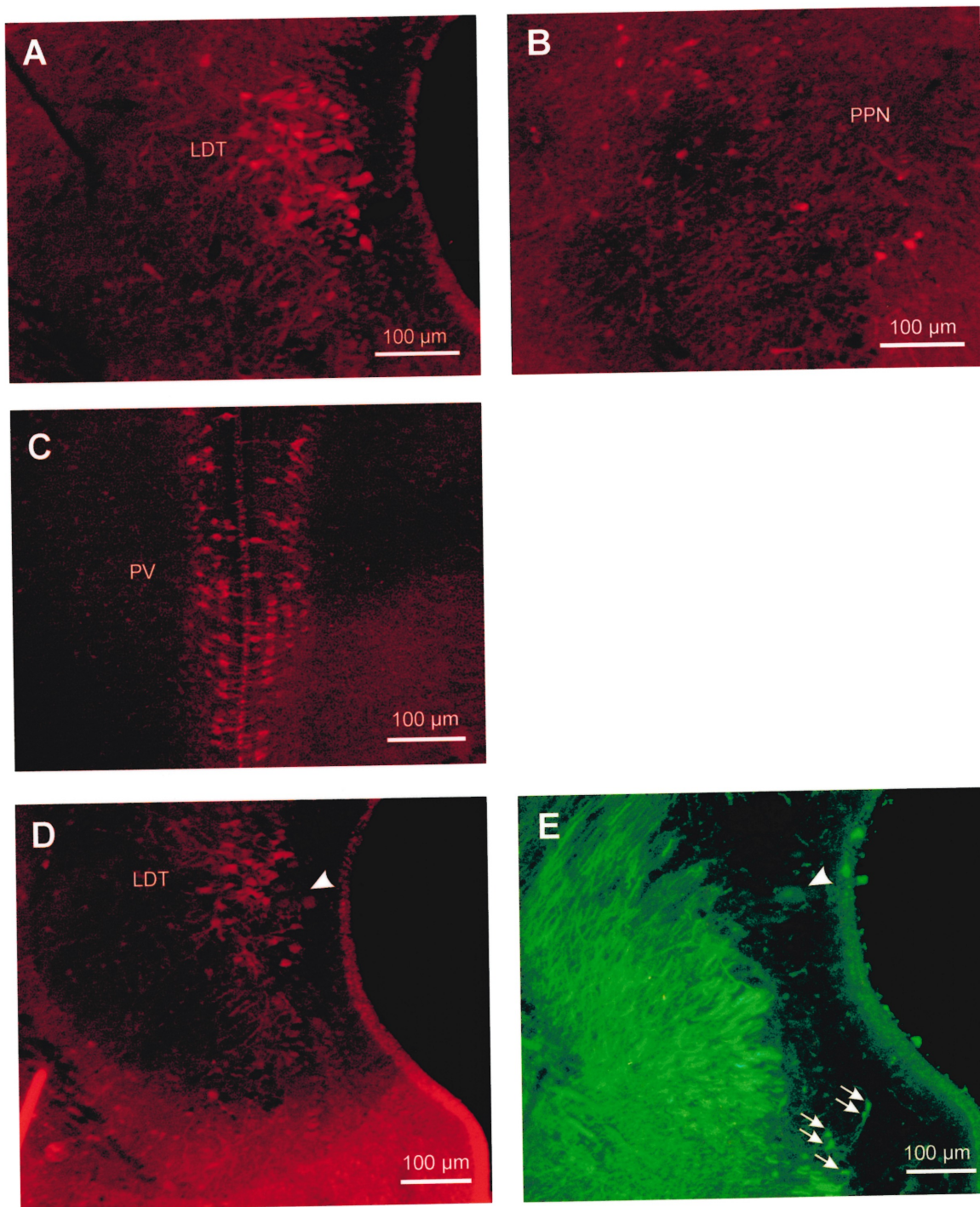


Figure 16
(cf légende page 77)

Légende Figure 16

Photomicrographies de sections transverses fines obtenues après le protocole de double marquage sur un cerveau de lamproie adulte

Cellules ChAT-ir (filtre Texas-Red) illustrant le groupe compact périventriculaire du LDT (A), le groupe rostro-latéral du PPN (B) et le groupe hypothalamique PV (C). D: exemple d'une section transverse fine après le double marquage illustrant les cellules ChAT-ir du LDT (filtre Texas-Red). E: même section photographiée avec le filtre FITC montrant des cellules marquées de façon rétrograde très ventrales par rapport au LDT (flèches). En D et E, la flèche sans queue représente un amas de cellules RS.

Les cellules marquées de façon rétrograde sont cartographiées puis comparées avec les cellules cholinergiques mésopontiques d'un autre animal. Comme indiquée sur la figure 17, la distribution des neurones cholinergiques du LDT et du NI coïncide en partie seulement avec celle des cellules marquées de façon rétrograde. Par exemple, des chevauchements existent au niveau de la partie dorso-latérale du tegmentum des sections B' et C'; certaines cellules rétrogrades peuvent être de bons candidats pour représenter des cellules cholinergiques de la partie médio-dorsale du LDT rostral sur les coupes B et C. Par ailleurs, il est important de noter que le cerveau utilisé pour le marquage au cobalt n'a pas été coupé dans un plan exactement symétrique ce qui donne une certaine distorsion par rapport à la disposition des cellules rétrogrades. Enfin, on constate que la zone d'injection du cobalt bien que circonscrite dans la formation réticulée est peut-être trop ventrale par rapport au noyau MRRN.

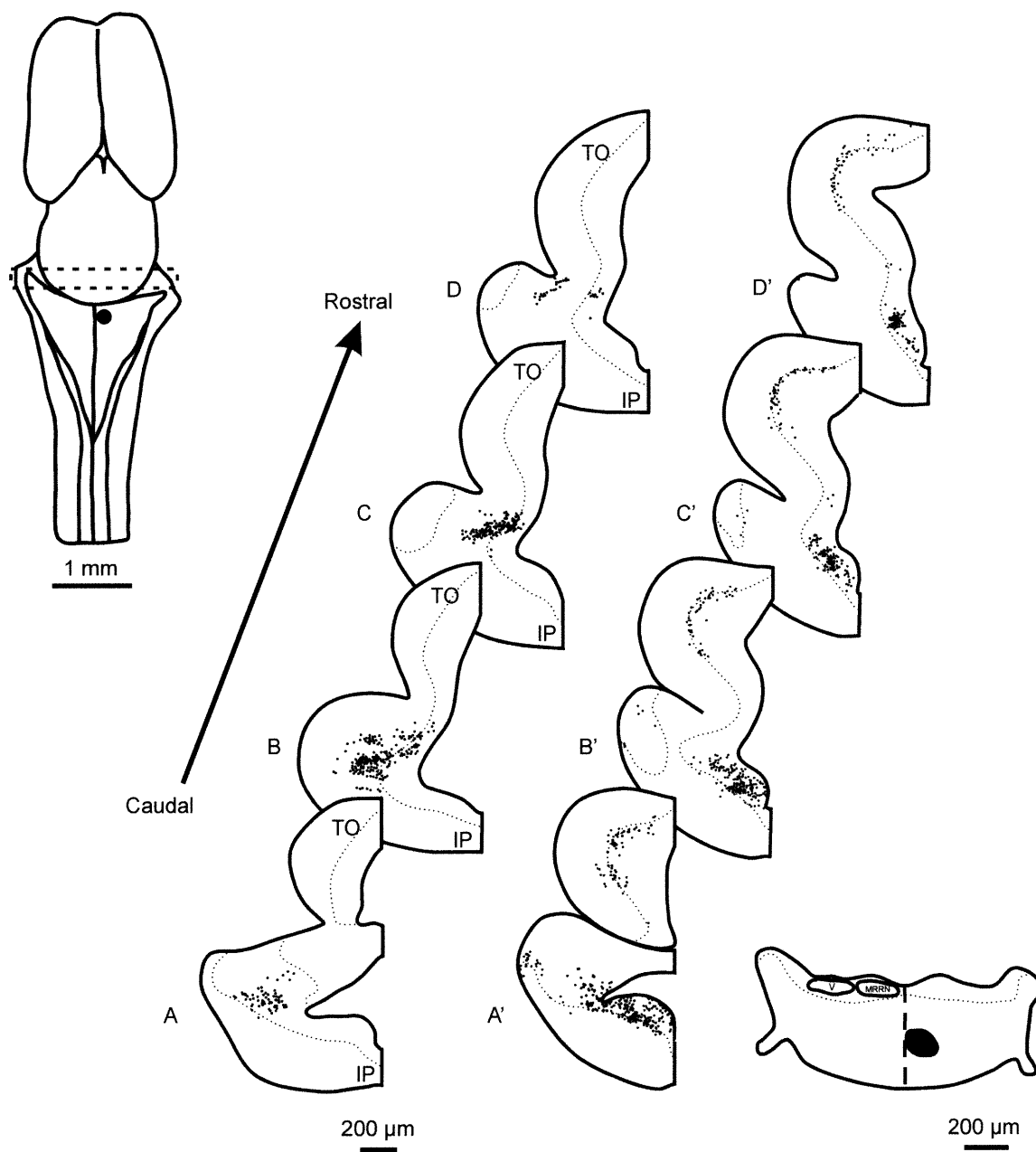


Figure 17
 (cf légende page 80)

Légende Figure 17

Schéma illustrant la distribution des neurones ChAT-ir dans la région isthmique chez la salamandre adulte (A, B, C, D) ainsi que la distribution des neurones marqués de façon rétrograde après l'injection de cobalt dans la région du MRRN (A', B', C', D')

Chaque coupe représentée en A, B, C et D correspond à 3 coupes consécutives de 20 μm d'épaisseur. Chaque coupe représentée en A', B', C' et D' correspond à 5 coupes de 12 μm d'épaisseur. Distance totale = 240 μm . Le point d'injection est remplacé sur un cerveau entier et sur une coupe transverse située à environ 300 μm caudalement.

CINQUIEME PARTIE: DISCUSSION

Les données présentées dans ce travail démontrent pour la première fois l'existence de cellules cholinergiques mésopontiques dans la MLR identifiée fonctionnellement sur une préparation semi-intacte chez deux espèces de vertébrés inférieurs la lamproie et la salamandre. L'immunohistochimie contre la ChAT confirme la présence de deux populations cholinergiques au niveau isthmique: le LDT et le PPN chez la lamproie (Pombal et al., 2001; LeRay et al., en révision), le LDT et le NI chez la salamandre (Marin et al., 1997; Cabelguen et al., en révision). Une analyse plus poussée a été effectuée chez la lamproie; en effet, les deux populations isthmiques ont été quantifiées et leur organisation spécifique l'une par rapport à l'autre, a été représentée sous la forme de schémas tridimensionnels. L'ensemble de cette description anatomique démontre que les cellules cholinergiques du LDT font clairement partie de la MLR chez la lamproie et la salamandre. Par la suite, un protocole de double marquage a été utilisé chez la lamproie dans le but de visualiser des projections cholinergiques entre la MLR et la formation réticulée comme cela a déjà été démontré chez les mammifères. Aucune projection de nature cholinergique entre la MLR et le MRRN n'a pu être mise en évidence avec cette méthode anatomique. Nous verrons plus tard qu'il s'agit fort probablement de problèmes liés à la technique utilisée. Cependant, des données physiologiques et anatomiques suggèrent fortement l'existence de telles voies cholinergiques chez la lamproie (Sirota et al., 2000; LeRay et al., en révision). Dans cette optique, la distribution des neurones cholinergiques mésopontiques chez la salamandre a été comparée avec celle des cellules projetant au MRRN. Il s'avère qu'une partie des cellules cholinergiques située autour de la MLR pourrait projeter vers le

MRRN. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'hypothèse que la MLR envoie des projections cholinergiques vers la formation réticulée chez la salamandre. Des études physiologiques similaires à celles de LeRay et coll. (en révision) seraient indiquées.

I- Étude comparée des systèmes cholinergiques mésopontiques chez les vertébrés inférieurs:

Avant les années 80, la cartographie des systèmes cholinergiques du système nerveux des vertébrés s'effectuait par réaction histochimique contre l'acétylcholinestérase ou AChE, enzyme de dégradation de l'acétylcholine. Cependant, l'AChE n'est pas un marqueur spécifique puisqu'il révèle tous les neurones cholinocéptifs incluant des neurones non cholinergiques. De plus, cette enzyme pourrait participer à la dégradation de neurotransmetteurs autre que l'acétylcholine comme la substance P (Chubb et al., 1980). L'arrivée des techniques immunohistochimiques anti-ChAT, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, a permis de faire des progrès considérables dans l'étude des systèmes cholinergiques chez de nombreuses espèces de vertébrés. Par ailleurs, le marquage histochimique à la NADPH-d peut être utilisé pour identifier les neurones cholinergiques mésopontiques. En effet, les groupes isthmiques identifiés comme étant cholinergiques sont NADPH-d positifs que ce soit chez les mammifères (Vincent et al., 1983), chez les amphibiens (Gonzalez et al., 1996; Moreno et al., 2002) et chez les cyclostomes (Schober et al., 1994). Ces derniers présentent une caractéristique particulière: en plus du LDT, la réaction NADPH-d effectuée sur la lamproie à l'état larvaire marque également les cellules de Müller. Les systèmes cholinergiques dans le cerveau de différentes espèces de poissons ont été comparés dans

un récent article passant en revue l'ensemble des données anatomiques actuellement disponibles (Rodriguez-Moldes et al., 2002). Il en ressort que le système habenulo-interpédunculaire ou les noyaux des nerfs crâniens constituent des groupes cholinergiques hautement conservés au cours de l'évolution puisqu'on les retrouve inchangés depuis les vertébrés inférieurs jusqu'aux mammifères. Au contraire, la présence ou non de cellules cholinergiques dans le tectum optique varie en fonction de l'espèce, indiquant que cette caractéristique apparaît de façon aléatoire durant la phylogenèse.

D'après cette étude comparative, la distribution des neurones cholinergiques dans la région isthmique est identique chez plusieurs espèces de poissons mais également chez les tétrapodes (Rodriguez-Moldes et al., 2002). Ainsi, on distingue trois noyaux cholinergiques non moteurs au niveau de l'isthme chez les vertébrés non mammifériens: le NI, le LDT et le PPN. Le NI est caractérisé par ses connections réciproques avec le tectum optique et la nature cholinergique de ses cellules que ce soit chez les amphibiens (Marin et al., 1997), chez les téléosts (Ekström, 1987) ou chez les reptiles (Medina et al., 1993). Par la technique de double marquage (traçage rétrograde combiné à l'immunofluorescence anti-ChAT), il a été montré que le NI constitue la principale source de l'innervation cholinergique du tectum optique chez les amphibiens (Marin et Gonzalez, 1999). Les groupes cholinergiques LDT/PPN participent substantiellement à cette innervation. Chez les mammifères, on retrouve les groupes mésopontiques cholinergiques du LDT (groupe Ch6), du PPN (groupe Ch5) et le noyau parabigéminale (groupe Ch8), homologue du NI des vertébrés inférieurs, qui projette vers le colliculus supérieur (tectum optique des non mammifériens). Toutefois, il existe certaines différences dans l'organisation anatomique des groupes cholinergiques mésopontiques

parmi les différentes classes de vertébrés inférieurs. Alors que le PPN est clairement défini chez la grenouille *Rana perezi*, ce groupe semble absent chez la salamandre *Pleurodeles waltl* (Marin et al., 1997). En réalité, les auteurs décrivent un petit groupe compact rostral au NI et projetant au tectum optique, sans pour autant le nommer. Ce groupe correspondrait vraisemblablement au PPN. D'après nos résultats, ce noyau est totalement absent chez la salamandre *Notophthalmus viridescens* mettant ainsi en évidence des différences dans l'organisation anatomique des noyaux cholinergiques mésopontiques au sein d'un même groupe d'amphibiens. De la même façon, chez le poisson téléost *Porichthys notatus*, le NI est décrit comme un petit groupe compact incluant le noyau latéral de la valvule ou NLV (Brantley et Bass, 1988) alors que ces deux noyaux sont décrits séparément chez une autre espèce de poisson téléost, *Phoxinus phoxinus* (Ekström, 1987). Au contraire, le NI des élasmobranches (poisson chien), qui paradoxalement ne projette pas au tectum optique, est très difficile à définir anatomiquement (Anadon et al., 2000). Comparer des groupes mésopontiques cholinergiques devient une tâche complexe quand les nomenclatures utilisées ou les interprétations anatomiques varient en fonction des espèces. Par exemple, trois noyaux isthmiques de nature cholinergique ont été décrits chez l'esturgeon au même niveau rostro-caudal que le noyau moteur du IV (Adrio et al., 2000): le noyau viscéral secondaire ou NVS s'étend jusqu'au noyau moteur du V en adoptant une position de plus en plus ventrale caudalement. Latéral au NVS, le NI représente un noyau de grosse taille qui projette au tectum optique, et dorso-latéral au NVS se situe le petit groupe compact appelé NLV. D'après leur disposition relative, on peut penser que le NVS est l'équivalent du LDT et que le NLV correspond quant à lui au PPN. Toutefois, des études de traçage sont nécessaires pour confirmer de telles homologues. De la même façon,

plusieurs groupes isthmiques ont été décrits chez la truite (Pérez et al., 2000). Le plus gros noyau est composé d'interneurones cholinergiques regroupés dans le NI. Le LDT localisé latéralement au NI s'étend rostralement jusqu'au noyau moteur du III. D'après sa position, le LDT de la truite pourrait être l'homologue du PPN des amphibiens (Marin et al., 1997). Ventral et caudal au NI, le noyau réticulaire supérieur ou NRS constitue le troisième groupe cholinergique qui s'étend jusqu'à l'extrémité rostrale du noyau moteur du V. Sa disposition par rapport aux autres noyaux suggère fortement que le NRS pourrait correspondre au LDT des amphibiens (Marin et al., 1997). Au contraire, sur la base de ses projections, le NRS chez l'anguille semble être l'homologue du PPN des mammifères (Molist et al., 1993). En résumé, on retrouve approximativement les mêmes groupes cholinergiques mésopontiques d'une espèce à l'autre malgré des appellations anatomiques différentes.

II- Projections cholinergiques entre la MLR et la formation réticulée:

Chez les mammifères, de nombreuses données anatomiques et physiologiques indiquent que la MLR initie la locomotion via des projections cholinergiques descendantes qui activent les régions locomotrices réticulospinales ou RS du bulbe ventro-médian. En effet, des études de traçages anatomiques ont montré qu'une part significative des neurones cholinergiques du PPN, composante physiologique de la MLR, et du LDT projette vers la formation réticulée bulbaire ventro-médiane (Skinner et al., 1990; Jones, 1990; Lai et al., 1999). De plus, chez le chat et le rat décérébrés au niveau précolliculaire, la locomotion induite par la stimulation de la MLR est bloquée après l'injection locale d'un antagoniste cholinergique, l'atropine, dans le bulbe ventro-médian (Garcia-Rill et Skinner, 1987a; Kinjo et al., 1990). Bien qu'elle ait été décrite

chez les mammifères il y a plus de 40 ans, peu de choses sont connues concernant le mode d'action de la MLR et ses effets sur les cellules cibles. Dans cette optique, la MLR a également été identifiée sur des modèles plus simples de vertébrés inférieurs comme les poissons (raie: Droge et Léonard, 1983; carpe: Kashin et Feldman, 1974; Uematsu et Todo, 1997; poisson rouge: Fetcho et Svoboda, 1993). Récemment, l'équipe du Pr. Dubuc a mis en évidence la présence de la MLR chez la lamproie localisée à la bordure mésopontique, en utilisant un modèle de préparation semi-intacte (Sirota et al., 2000). La stimulation électrique de la MLR à faible fréquence génère des PPSEs de forte amplitude sur les cellules RS du MRRN. Par ailleurs, des études de traçage rétrograde au cobalt ont montré l'existence de connexions monosynaptiques entre la MLR identifiée histologiquement par électrolésion et le MRRN. De récents travaux électrophysiologiques réalisés au laboratoire du Pr. Dubuc ont montré que l'activation cholinergique des cellules RS rhombencéphaliques initie la nage chez la lamproie (LeRay et al., en révision). En effet, l'application locale d'acétylcholine ou de nicotine sur les cellules RS du MRRN ou du PRRN produit des dépolarisations dose-dépendantes, provoquant la nage active sur une préparation semi-intacte ou la nage fictive enregistrée à partir des racines ventrales sur une préparation *in vitro*. Bien que réduite en amplitude, la réponse cholinergique persiste en présence de TTX, indiquant que l'acétylcholine a un effet direct sur les cellules RS. Cet effet est bloqué par la D-tubocurarine, antagoniste nicotinique, alors que la physostigmine, inhibiteur des cholinestérases, potentialise la réponse. Enfin, la stimulation électrique de la MLR initiant la nage sur la préparation semi-intacte, produit des PPSEs, lesquels sont partiellement bloqués après la perfusion de D-tubocurarine. L'ensemble de ces résultats physiologiques suggère fortement que la transmission synaptique entre la MLR et le

système RS rhombencéphalique est médié en partie via des projections cholinergiques comme cela se produit chez les mammifères. Ces résultats sont en accord avec les données anatomiques présentées dans ce travail démontrant la présence de cellules cholinergiques à l'intérieur de la MLR identifiée fonctionnellement sur une préparation semi-intacte de lamproie. D'autre part, il faut mentionner que le glutamate joue un rôle important dans la commande motrice issue de la MLR chez la lamproie. En effet, alors que la D-tubocurarine ne réduit que de 20% environ la réponse dépolarisante générée par la MLR, les antagonistes glutamatergiques NMDA et non-NMDA diminuent le PPSE de 39%. Concernant la salamandre, les données connues à l'heure actuelle indiquent que la MLR active le CPG spinal via le système RS rhombencéphalique (Bar-Gad et al., 1999). Puisqu'il y a des cellules ChAT-ir autour de la MLR, on peut envisager l'hypothèse d'une voie cholinergique entre la MLR et la formation réticulée. Des expériences anatomiques et électrophysiologiques supplémentaires sont nécessaires afin d'établir la nature de ces connections.

Chez les mammifères, les noyaux mésopontiques LDT/PPN activent les neurones de la formation réticulée pontique ou FRP via des projections cholinergiques. La FRP des mammifères, qui correspond approximativement au MRRN de la lamproie, est responsable de la production de mouvements rapides des yeux et de l'atonie musculaire observés durant le sommeil paradoxal. La libération d'acétylcholine est augmentée dans la FRP (Kodama et al., 1990) et les neurones de cette région sont dépolarisés pendant le sommeil paradoxal (Ito et McCarley, 1984). De nombreuses études réalisées chez le chat et le rat ont montré que l'infusion d'agonistes cholinergiques restreint au niveau de la FRP médiane dépolarise les neurones de cette région (Greene et al., 1989) et déclenche rapidement le sommeil paradoxal (Baghdoyan et al., 1984). Il semble donc que la FRP

médiane, dépourvue de neurones cholinergiques, reçoit des informations cholinergiques provenant des centres supérieurs. L'étude anatomique de Mitani et coll. (1988) effectuée chez le chat démontre que le LDT et le PPN envoient des projections cholinergiques vers la région tegmentaire gigantocellulaire de la FRP ou FRP antérieure. Cette région médiane au noyau trigéminal est très semblable de par sa localisation au sein du tronc cérébral au MRRN de la lamproie. L'immunohistochimie anti-ChAT est combinée à la technique de traçage rétrograde au WGA-HRP injecté au niveau de la FRP gigantocellulaire. Il s'avère que 6.9% des neurones du LDT sont doublement marqués contre 3.1% pour le PPN avec une prédominance de projections ipsilatérales dans les deux cas. Des données physiologiques confirment l'existence de voies cholinergiques excitatrices entre les groupes mésopontiques et la FRP. La stimulation des neurones cholinergiques du LDT génère des PPSEs de longue latence enregistrés sur les neurones de la FRP médiane chez le chat (Imon et al., 1996). Cette réponse est bloquée suite à l'administration intra-veineuse de scopolamine, antagoniste des récepteurs muscariniques. De la même façon, la stimulation électrique du PPN active les neurones de la FRP caudale correspondant à la région tegmentaire gigantocellulaire pontique précédemment décrite (Garcia-Rill et al., 2001). Les réponses enregistrées en intracellulaire et extracellulaire sur un chat décérébré au niveau précolliculaire-postmammillaire varient en fonction du protocole de stimulation du PPN. Des trains de stimulation de courte durée (1 sec) à 60 Hz, semblable à la fréquence de stimulation de la MLR utilisée chez les mammifères, génèrent des réponses de longue durée (plus de 12 sec) sur les neurones réticulés pontiques caudaux. Au contraire, des stimulations de faible fréquence (10 Hz) ou de haute fréquence (100 Hz) ne produisent que de brèves réponses ou aucune réponse. De récents travaux électrophysiologiques ont permis de

caractériser les réponses neuronales de la FRP caudale après stimulation du PPN sur une préparation *in vitro* de rat (Homma et al., 2002). Après avoir stimulé le PPN, les réponses de longue durée des neurones de la FRP caudale sont diminuées ou bloquées en présence de scopolamine, un antagoniste muscarinique. Des effets semblables sont obtenus après avoir utilisé un bloqueur des canaux potassiques. Les auteurs proposent que l'activation muscarinique des neurones de la FRP caudale agit via la fermeture d'une conductance potassique, augmentant ainsi l'excitabilité cellulaire. Le modèle proposé est le suivant: la stimulation du PPN à 60 Hz, fréquence connue pour provoquer une locomotion sur une préparation réduite, active la plupart des interneurones de la FRP caudale via des récepteurs cholinergiques qui à leur tour activent les neurones RS du bulbe ventro-médian. Au contraire, une faible proportion des neurones de la FRP caudale sont hyperpolarisée inhibant le tonus musculaire. Cependant, la préparation *in vitro* utilisée dans cette étude ne permet pas de faire la différence entre les cellules RS et les interneurones.

III- Les autres systèmes de neurotransmission:

Que ce soit chez les vertébrés supérieurs ou chez la lamproie, l'acétylcholine n'est pas le seul neurotransmetteur impliqué dans la commande motrice issue de la MLR. Chez les oiseaux et les mammifères, l'administration localisée au niveau des régions locomotrices de la formation réticulée ventro-médiane d'agents pharmacologiques comme la substance P, le NMDA ou des antagonistes GABAergiques génère une locomotion (Garcia-Rill et Skinner, 1987a; Kinjo et al, 1990; Sholomenko et al., 1991). Ces données sont en accord avec la présence de glutamate et de substance P sur les neurones cholinergiques et non cholinergiques du PPN et du LDT (Clements et

Grant, 1990; Lavoie et Parent, 1994; Vincent et al., 1986). L'étude anatomique de double marquage au WGA-HRP combinée à l'immunohistochimie contre la ChAT, la NADPH-d ou le glutamate, révèle qu'une grande partie des projections provenant de la MLR vers le NRM est d'origine glutamatergique (Lai et al., 1999). Chez la lamproie, la dépolarisation des cellules du MRRN induite par la stimulation de la MLR est partiellement bloquée par des antagonistes cholinergiques (LeRay et al., en révision). Le reste de la réponse est aboli par des antagonistes des récepteurs au glutamate. Il semble cependant qu'une petite composante persiste malgré tout. Par conséquent, l'initiation et le contrôle de la locomotion dirigée vers un but est un mécanisme complexe qui requiert l'activation de plusieurs commandes motrices issues de la MLR incluant des voies cholinergiques, glutamatergiques mais aussi d'autres voies neurochimiques dont l'identité reste à déterminer.

IV- Problèmes méthodologiques liés au double marquage:

Pour tenter de visualiser des projections cholinergiques entre la MLR et le MRRN, un protocole de double marquage (traçage rétrograde aux dextran-amines combiné à l'immunofluorescence anti-ChAT) a été utilisé chez la lamproie. L'absence de cellules mésopontiques doublement marquées résulte en partie du fait que les molécules de dextran-amines nécessitent un temps de transport plus long depuis la formation réticulée rhombencéphalique jusqu'à la MLR, que celui utilisé sur une préparation *in vitro* où le temps de survie est limité à 60 h maximum. Des expériences de double marquage fluorescent en condition *in vivo* sont donc nécessaires. C'est de cette façon que les projections cholinergiques isthmotectales ont été révélées chez les amphibiens (Marin et Gonzalez, 1999). Dans cette étude, le marqueur rétrograde injecté

au niveau du tectum optique est transporté *in vivo* durant environ une semaine. Chez la lamproie, les expériences d'injection *in vivo* restent difficiles à réaliser dans ce contexte car les injections du traceur rétrograde au niveau du MRRN risquent d'endommager les centres respiratoires situés à proximité et par conséquent de tuer l'animal. D'autre part, étant donné que l'anticorps polyclonal anti-ChAT mammiférien est moins spécifique pour marquer les neurones cholinergiques chez la lamproie (comparativement à ce qui est observé chez la salamandre), il est probable que l'immunofluorescence utilisée en combinaison avec le traçage rétrograde ne révèle qu'une partie et non la totalité des cellules cholinergiques mésopontiques. De ce fait, le manque de spécificité immunohistochimique couplé aux problèmes méthodologiques de traçage décrits précédemment peut être à l'origine de l'absence de cellules doublement marquées.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois l'existence de cellules cholinergiques dans la région de la MLR identifiée physiologiquement chez deux espèces de vertébrés inférieurs, la lamproie et la salamandre. Par immunohistochimie anti-ChAT, nous pouvons distinguer deux populations cholinergiques mésopontiques distinctes: le LDT et le PPN chez la lamproie, le LDT et le NI chez la salamandre. Ces observations étayent l'hypothèse selon laquelle l'acétylcholine joue un rôle important dans l'amorce et le contrôle de la locomotion.

SIXIEME PARTIE: BIBLIOGRAPHIE

- Adrio, F., Anadon, R. and Rodriguez-Moldes, I. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the central nervous system of a chondrosteian, the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J. Comp. Neurol.* 426: 602-621, 2000.
- Allen, L.F., Inglis, W.L. and Winn, P. Is the cuneiform nucleus a critical component of the mesencephalic locomotor region? An examination of the effects of excitotoxic lesions of the cuneiform nucleus on spontaneous and nucleus accumbens induced locomotion. *Brain Res. Bull.* 41: 201-210, 1996.
- Amos, A., Armstrong, D.M. and Marple-Horvat, D.E. Changes in the discharge patterns of motor cortical neurons associated with volitional changes in stepping in the cat. *Neurosci. Lett.* 109: 107-112, 1990.
- Anadon, R., Molist, P., Rodriguez-Moldes, I., Lopez, J.M., Quintela, I., Cervino, M.C., Barja, P. and Gonzalez, A. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of an elasmobranch, the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *J. Comp. Neurol.* 420: 139-170, 2000.
- Armstrong, D.M., Saper, C.B., Levey, A.I., Wainer, B.H. and Terry, R.D. Distribution of cholinergic neurons in rat brain demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* 216: 53-68, 1983.
- Ashley-Ross, M. Hindlimb kinematics during terrestrial locomotion in a salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *J. Exp. Biol.* 193: 255-283, 1994.
- Atsuta, Y., Garcia-Rill, E. and Skinner, R.D. Characteristics of electrically induced locomotion in rat in vitro brain stem-spinal cord preparation. *J. Neurophysiol.* 64: 727-735, 1990.

- Baghdoyan, H.B., Rodrigo-Angulo, R.W., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.* 306: 39-52, 1984.
- Bar-Gad, I., Kagan, I. and Shik, M.L. Behavior of hindbrain neurons during the transition from rest to evoked locomotion in a newt. *Prog. Brain Res.* 123: 285-294, 1999.
- Barbeau, H. and Rossignol, S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res.* 412: 84-95, 1987.
- Barber, R.P., Phelps, P.E., Houser, C.R., Crawford, G.D., Salvaterra, P.M. and Vaughn, J.E. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 229: 329-346, 1984.
- Beloozerova, I.N. and Sirota, M.G. The role of the motor cortex in the control of accuracy of locomotor movements in the cat. *J. Physiol.* 461: 1-25, 1993.
- Bernau, N.A., Puzdrowski, R.L. and Leonard, R.B. Identification of the midbrain locomotor region and its relation to descending locomotor pathways in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Brain Res.* 557: 83-94, 1991.
- Bjursten, L.M., Norrsell, K. and Norrsell, U. Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy. *Exp. Brain Res.* 25: 115-130, 1976.
- Brantley, R.K. and Bass, A.H. Cholinergic neurons in the brain of a teleost fish (*Porichthys notatus*) located with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* 275: 87-105, 1988.
- Brocard, F., Bourcier-Lucas, C., LeRay, D. and Dubuc, R. Inputs from the mesencephalic locomotor region to reticulospinal neurons in lampreys. *Soc. Neurosci. Abstr.* 306-4, 2001.

- Brudzynski, S.M. and Mogenson, G.J. Association of the mesencephalic locomotor region with locomotor activity induced by injection of amphetamine into nucleus accumbens. *Brain Res.* 334: 77-84, 1985.
- Brudzynski, S.M. and Wang, D. C-Fos immunohistochemical localization of neurons in the mesencephalic locomotor region in the rat brain. *Neuroscience.* 75: 793-803, 1996.
- Brudzynski, S.M., Wu, M. and Mogenson, G.J. Decreases in rat locomotor activity as a result of changes in synaptic transmission to neurons within the mesencephalic locomotor region. *Can. J. Physiol. Pharmac.* 71: 394-406, 1993.
- Buchanan, J.T. Identification of interneurons with contralateral, caudal axons in the lamprey spinal cord: synaptic interactions and morphology. *J. Neurophysiol.* 47:961-975, 1982.
- Cabelguen, J.M., Bourcier-Lucas, C. and Dubuc, R. Bimodal locomotion elicited by electrical stimulation of the midbrain in the salamander *Notophthalmus viridescens*. *J. Neurosci.* In revision.
- Cardin, S., LeRay, D., Robitaille, R. and Dubuc, R. Motor responses elicited by skin stimulation in lampreys. *Soc. Neurosci. Abstr.* Vol 25, Part 2, p. 1906, 1999.
- Chubb, I.W., Hodgson, A.J. and White, G.H. Acetylcholinesterase hydrolysis of substance P. *Neuroscience.* 5: 2065-2072, 1980.
- Clarke, P.B.S., Schwartz, R.D., Paul, S.M., Pert, C.B. and Pert, A. Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [³H]acetylcholine, [³H]nicotine, and [¹²⁵I]α-bungarotoxin. *J. Neurosci.* 5: 1307-1315, 1985.
- Clements, J.R. and Grant, S. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci. Letters.* 120: 70-73, 1990.

- Coles, S.K., Iles, J.F. and Nicolopoulos-Stourmaras, S. The mesencephalic centre controlling locomotion in the rat. *Neuroscience*. 28: 149-157, 1989.
- Dale, N. and Roberts, A. Dual-component amino-acid-mediated synaptic potentials: excitatory drive for swimming in xenopus embryos. *J. Physiol.* 363: 35-59, 1985.
- Deliagina, T.G., Zelenin, P.V., Fagerstedt, P., Grillner, S. and Orlovsky, G.N. Activity of reticulospinal neurons during locomotion in the freely behaving lamprey. *J. Neurophysiol.* 83: 853-863, 2000.
- Delvolvé, I., Bem, T. and Cabelguen, J.M. Epaxial and limb muscle activity during swimming and terrestrial stepping in the adult newt, *Pleurodeles waltl*. *J. Neurophysiol.* 78: 638-650, 1997.
- Delvolvé, I., Branchereau, P., Dubuc, R. and Cabelguen, J.M. Fictive rhythmic motor patterns induced by NMDA in an in vitro brain stem-spinal cord preparation from an adult urodele. *J. Neurophysiol.* 82: 1074-1077, 1999.
- Deniau, J.M., Hamond, C., Rizk, A. and Feger, J. Electrophysiological properties of identified output neurons of the rat substantia nigra (pars compacta and pars reticulata): evidences for the existence of branched neurons. *Exp. Brain. Res.* 32: 409-422, 1978.
- Depoortere, R., Sandner, G. and Di Scala, G. Aversion induced by electrical stimulation of the mesencephalic locomotor region in the intact and freely moving rat. *Physiol. Behav.* 47: 561-567, 1990.
- Drew, T. Functional organization within the medullary reticular formation of the intact unanaesthetized cat. III. Microstimulation during locomotion. *J. Neurophysiol.* 66: 919-938, 1991.
- Drew, T. Motor cortical activity during voluntary gait modifications in the cat. I. Cells related to the forelimbs. *J. Neurophysiol.* 70: 179-199, 1993.

- Drew, T. and Rossignol, S. Phase dependent responses evoked in limb muscles by stimulation of the medullary reticular formation during locomotion in thalamic cats. *J. Neurophysiol.* 52: 653-675, 1984.
- Droge, M.H. and Leonard, R.B. Swimming pattern in intact and decerebrate stingrays. *J. Neurophysiol.* 50: 162-177, 1983.
- Dubuc, R. and Grillner, S. The role of the spinal cord inputs in modulating the activity of reticulospinal neurons during fictive locomotion in the lamprey. *Brain Res.* 483: 196-200, 1989.
- Dubuc, R., Bongianni, F., Ohta, Y. and Grillner, S. 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, 1993a.
- Dubuc, R., Bongianni, F., Ohta, Y. and Grillner, S. Anatomical and physiological study of brainstem nuclei relaying dorsal column inputs in lampreys. *J. Comp. Neurol.* 327: 260-270, 1993b.
- Eidelberg, E., Walden, J.G. and Nguyen, L.H. Locomotor control in macaque monkeys. *Brain.* 104: 647-663, 1981.
- Ekström, P. Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the brain of a cyprinid teleost (*Phoxinus phoxinus L.*). *J. Comp. Neurol.* 256: 494-515, 1987.
- El Manira, A., Pombal, M.A. and Grillner, S. Diencephalic projection to reticulospinal neurons involved in the initiation of locomotion in adult lampreys *Lampetra fluviatilis*. *J. Comp. Neurol.* 389: 603-616, 1997.
- Fetcho, J.R. and Svoboda, K.R. Fictive swimming elicited by electrical stimulation of the midbrain in Goldfish. *J. Neurophysiol.* 70: 765-780, 1993.

- Forsberg, H., Grillner, S. and Rossignol, S. Phase dependent reflex reversal during walking in chronic spinal cats. *Brain Res.* 85: 103-107, 1975.
- Fritsch, B., Sonntag, R., Dubuc, R., Ohta, Y. and Grillner, S. Organization of the six motor nuclei innervating the ocular muscles in lamprey. *J. Comp. Neurol.* 294: 491-506, 1990.
- Garcia-Rill, E. Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). III. Intracellular recordings. *Brain Res. Bull.* 10: 73-81, 1983.
- Garcia-Rill, E. The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res. Rev.* 11: 47-63, 1986.
- Garcia-Rill, E. The pedunculopontine tegmental nucleus. *Prog. Neurobiol.* 36: 363-389, 1991.
- Garcia-Rill, E., Houser, C.R., Skinner, R.D., Smith, W. and Woodward, D.J. Locomotion-inducing sites in the vicinity of the pedunculopontine nucleus. *Brain Res. Bull.* 18: 731-738, 1987.
- Garcia-Rill, E., Kinjo, N., Atsuta, Y., Ishikawa, Y., Webber, M. and Skinner, R.D. Posterior midbrain-induced locomotion. *Brain Res. Bull.* 24: 499-508, 1990.
- Garcia-Rill, E. and Skinner, R.D. The mesencephalic locomotor region. I. Activation of a medullary projection site. *Brain Res.* 411: 1-12, 1987a.
- Garcia-Rill, E. and Skinner, R.D. The mesencephalic locomotor region. II. Projections to reticulospinal neurons. *Brain Res.* 411: 13-20, 1987b.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Conrad, C., Mosley, D. and Campbell, C. Projections of the mesencephalic locomotor region in the rat. *Brain Res. Bull.* 17: 33-40, 1986.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D. and Fitzgerald, J.A. Activity in the mesencephalic locomotor region during locomotion. *Exp. Neurol.* 82: 609-622, 1983c.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D. and Fitzgerald, J.A. Chemical activation of the mesencephalic locomotor region. *Brain Res.* 330: 43-54, 1985.

- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D. and Gilmore, S.A. Pallidal projections to the mesencephalic locomotor region (MLR) in the cat. *Am. J. Anat.* 161: 311-321, 1981.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Gilmore, S.A. and Owings, R. Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). II. Afferents and efferents. *Brain Res. Bull.* 10: 63-71, 1983b.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Jackson, M.B. and Smith, M.M. Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). I. Substantia nigra afferents. *Res. Bull.* 10: 57-62, 1983a.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R.D., Miyazato, H. and Homma, Y. Pedunculopontine stimulation induces prolonged activation of pontine reticular neurons. *Neuroscience.* 104: 455-465, 2001.
- Gonzalez, A., Munoz, A., Munoz, M., Marin, O., Arevalo, R., Porteros, A. and Alonso, J.R. Nitric oxide synthase in the brain of a urodele amphibian (*Pleurodeles waltl*) and its relation to catecholaminergic neuronal structures. *Brain Res.* 727: 49-64, 1996.
- Greene, R.W., Gerber, U. and McCarley, R. Cholinergic activation of medial pontine reticular formation neurons in vitro. *Brain Res.* 476: 154-159, 1989.
- Grillner, S. Neurobiological bases on rhythmic motor acts in vertebrates. *Science.* 228: 143-149, 1985.
- Grillner, S., Ekeberg, O., El Manira, A., Lansner, A., Parker, D., Tegner, J. and Wallen, P. Intrinsic function of a neuronal network - a vertebrate central pattern generator. *Brain Res. Rev.* 26: 184-197, 1998.
- Grillner, S., Georgopoulos, A.P. and Jordan, L.M. Selection and initiation of motor behavior. In *Neurons, Networks, and Motor Behavior*. Stein, P.S.G., Grillner, S., Selverston, A.I. and Stuart, D.G. Eds. MIT Press. Cambridge, MA. 1-19, 1997.

- Homma, Y., Skinner, R.D. and Garcia-Rill, E. Effects of pedunculo pontine nucleus (PPN) stimulation on caudal pontine reticular formation (PnC) neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 87: 3033-3047, 2002.
- Honda, T. and Semba, K. An ultrastructural study of cholinergic and non-cholinergic neurons in the laterodorsal and pedunculo pontine tegmental nuclei in the rat. *Neuroscience.* 68: 837-853, 1995.
- Imon, H., Ito, K., Dauphin, L. and McCarley, R.W. Electrical stimulation of the cholinergic laterodorsal tegmental nucleus elicits scopolamine-sensitive excitatory postsynaptic potentials in medial pontine reticular formation neurons. *Neuroscience.* 74: 393-401, 1996.
- Inglis, W.L. and Winn, P. The pedunculo pontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Prog. Neurobiol.* 47: 1-29, 1995.
- Ito, K. and McCarley, R. Alterations in membrane potential and excitability of cat medial pontine reticular formation neurons during changes in naturally occurring sleep-wake states. *Brain Res.* 292: 169-175, 1984.
- Jones, B.E. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295: 485-514, 1990.
- Jordan, L.M. Initiation of locomotion from the mammalian brainstem. In *neurobiology of vertebrate locomotion*. Stein, S., Stuart, D.G., Forssberg, H. and Herman, R.M. Eds.: 21-37, 1986.
- Jordan, L.M. Initiation of locomotion in mammals. Neuronal mechanisms for generating locomotor activity. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 860: 83-93, 1998.

- Jordan, L.M., Pratt, C.A. and Menzies, J.E. Locomotion evoked by brainstem stimulation: occurrence without phasic segmental afferent input. *Brain Res.* 177: 204-207, 1979.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, M. *Principles of neural science*. Fourth edition, McGraw-Hill Eds., 2000.
- Kashin, S.M. and Feldman, A.G. Locomotion of fish evoked by electrical stimulation of the brain. *Brain Res.* 82: 41-47, 1974.
- Kasicki, S., Grillner, S., Ohta, Y., Dubuc, R. and Brodin, L. Phasic modulation of reticulospinal neurones during fictive locomotion and other types of spinal motor activity in lamprey. *Brain Res.* 484: 203-216, 1989.
- Kettler, J. and Jordan, L.M. Metabolic mapping of the brainstem during fictive locomotion. *Soc. Neurosci. Abst.* 10: 633, 1984.
- Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.* 200: 151-201, 1981.
- Kinjo, N., Atsuta, Y., Webber, M., Kyle, R., Skinner, R.D. and Garcia-Rill, E. Medioventral medulla-induced locomotion. *Brain Res. Bull.* 24: 509-516, 1990.
- Kodama, T., Takahashi, Y. and Honda, Y. Enhancement of acetylcholine release during paradoxical sleep in the dorsal tegmental field of the cat brain. *Neurosci. Lett.* 114: 277-282, 1990.
- Lai, Y.Y., Clements, J.R., Wu, X.Y., Shalita, T., Wu, J.P., Kuo, J.S. and Siegel, J.M. Brainstem projections to the ventromedial medulla in cat: retrograde transport horseradish peroxidase and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.* 408: 419-436, 1999.

- Lai, Y.Y. and Siegel, J.M. Pontomedullary glutamate receptors mediating locomotion and muscle tone suppression. *J. Neurosci.* 11: 2931-2937, 1991.
- Lavoie, B. and Parent, A. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 344: 190-209, 1994.
- LeRay, D., Brocard, F., Bourcier-Lucas, C., Auclair, F., Lafaille, P. and Dubuc, R. Nicotinic activation of reticulospinal cells involved in the control of swimming in lampreys. *Eur. J. Neurosci.* In revision.
- Leite-Silveira, M.C., Sandner, G., Di Scala, G. and Graeff, F.G. C-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res.* 674: 265-274, 1995.
- Leonard, C.S. and Llinas, L.L. Electrophysiology of the mammalian pedunculopontine and laterodorsal tegmental neurons *in vitro*: implications for the control of REM sleep. In: *Brain cholinergic systems.* 205-223. Eds M. Steriade and D. Biesold. Oxford University Press: Oxford, 1990.
- Marin, O., Smeets, W.J.A.J. and Gonzalez, A. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltl*) amphibians. *J. Comp. Neurol.* 382: 499-534, 1997.
- Marin, O. and Gonzalez, A. Origin of tectal cholinergic projections in amphibians: a combined study of choline acetyltransferase immunohistochemistry and retrograde transport of dextran amines. *Vis. Neurosci.* 16: 271-283, 1999.
- Marlinsky, V.V. and Voitenko, L.P. The effect of procaine injection into the medullary reticular formation on forelimb muscle activity evoked by mesencephalic locomotor

- region and vestibular stimulation in the decerebrated guinea-pig. *Neuroscience*. 45: 753-759, 1991.
- Masdeu, J.C., Alampur, U., Cavaliere, R. and Tavoulareas, G. Atasia and gait failure with damage of the pontomesencephalic locomotor region. *Ann. Neurol.* 35: 619-621, 1994.
- McClellan, A.D. and Grillner, S. 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, 1984.
- Medina, L., Smeets, W.J.A.J., Hoogland, P.V. and Puelles, L. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J. Comp. Neurol.* 331: 261-285, 1993.
- Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H. and Levey, A.I. General cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternate nomenclature. *Neuroscience*. 10: 1185-1201, 1983.
- Milner, K.L. and Mogenson, G.J. Electrical and chemical activation of the mesencephalic and subthalamic locomotor regions in freely moving rats. *Brain Res.* 452: 273-285, 1988.
- Mitani, A., Ito, K., Hallanger, A.E., Wainer, B.H., Kataoka, K. and McCarley, R.W. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunclopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res.* 451: 397-402, 1988.
- Mitchell, I.J., Dean, P. and Redgrave, P. The projection from the superior colliculus to cuneiform area in the rat. II. Defence-like responses to stimulation with glutamate in cuneiform nucleus and surrounding structures. *Exp. Brain Res.* 72: 626-639, 1988.
- Mogenson, G.J. The role of mesolimbic dopamine projections to the ventral striatum in response initiation. In: *Neurobiological basis of human locomotion* (Shimamura, M., grillner, S. and Edgerton, V.R., eds). Tokyo: Japan Scientific Societies. 33-44, 1991.

- Molist, P., Maslam, S., Velzing, E. and Roberts, B.L. The organization of cholinergic neurons in the mesencephalon of the eel, *Anguilla anguilla*, as determined by choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase enzyme histochemistry. *Cell Tissue Res.* 271: 555-566, 1993.
- Moreno, N., Lopez, J.M., Sanchez-Camacho, C., Crespo, M., Munoz, M. and Gonzalez, A. Early development of NADPH diaphorase-expressing neurons in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Brain Res. Bull.* 57: 409-412, 2002.
- Mori, S., Nishimura, H., Kurakami, C., Yamamura, T. and Aoki, M. Controlled locomotion in the mesencephalic cat: distribution of facilitatory and inhibitory regions within pontine tegmentum. *J. Neurophysiol.* 41: 1580-1591, 1978.
- Mori, S. and Ohta, Y. Interaction of posture and locomotion and initiation of locomotion in decerebrate cats and freely moving intact cats. In *neurobiology of vertebrate locomotion*, edited by Grillner, S., Stein, P.S.G., Stuart, D.G., Forssberg, H. and Herman, R.M. Macmillan, New York. 55-72, 1986.
- Mori, S., Sakamoto, T., Ohta, Y. and Takakusaki, K.M.K. Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Res.* 505: 66-74, 1989.
- Mori, S., Shik, M.L. and Yagodnitsyn, A.S. Role of pontine tegmentum for locomotor control in mesencephalic cat. *J. Neurophysiol.* 40: 284-295, 1977.
- Newman, D.B. Distinguishing rat brainstem reticulospinal nuclei by neuronal morphology. II. Pontine and mesencephalic nuclei. *J. Hirnforsch.* 26: 385-418, 1985.
- Nieuwenhuys, R. Topological analysis of the brain stem of the lamprey *Lampetra fluviatilis*. *J. Comp. Neurol.* 145: 165-178, 1972.

- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N. and Olanow, C.W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23: S8-S19, 2000.
- Orlovsky, G.N. Connexions of the reticulospinal neurons with the locomotor sections of the brain stem. *Biofizica.* 15: 171-177, 1970a.
- Orlovsky, G.N. Work of reticulospinal neurones during locomotion. *Biofizica.* 15: 728-737, 1970b.
- Panzica, G.C. and Garzino, A. Anatomically specific colocalization of NADPH-diaphorase and choline acetyltransferase in the quail brainstem. *Neurosci. Letters.* 231: 151-154, 1997.
- Paxinos, G. and Watson, C. *The rat brain in stereotaxic co-ordinates*, 2nd edition. Academic Press: New York, 1986.
- Perez, S.E., Yanez, J., Marin, O., Anadon, R., Gonzalez, A. and Rodriguez-Moldes, I. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J. Comp. Neurol.* 428: 450-474, 2000.
- Perreault, M.C., Drew, T. and Rossignol, S. Activity of medullary reticulospinal neurons during fictive locomotion. *J. Neurophysiol.* 69: 2232-2247, 1993.
- Pombal, M.A. El Manira, A., Orlovsky, G. and Grillner, S. Identification of the striatum and its inputs, and the role of the ventral thalamus in the control of reticulospinal neurons and locomotion in lamprey. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 142, 1995.
- Pombal, M.A., Marin, O. and Gonzalez, A. Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive structures in the lamprey brain. *J. Comp. Neurol.* 431: 105-126, 2001.

- Rodriguez-Moldes, I., Molist, P., Adrio, F., Pombal, M.A., Perez, S.E., Yanez, J., Mandado, M., Marin, O., Lopez, J.M., Gonzalez, A. and Anadon, R. Organization of cholinergic systems in the brain of different fish groups: a comparative analysis. *Brain Res. Bull.* 57: 331-334, 2002.
- Rotter, A., Birdsall, N.J.M., Field, P.M. and Raisman, G. Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. II. Distribution of binding of [³H]propylbenzilylcholine mustard in the midbrain and hindbrain. *Brain Res. Rev.* 1 : 167-183, 1979.
- Ronan, M. Origins of the descending spinal projections in petromyzontid and myxinoid agnathans. *J. Comp. Neurol.* 281: 54-68, 1989.
- Rovainen, C.M. Electrophysiology of vestibulospinal and vestibuloreticulospinal systems in lampreys. *J. Neurophysiol.* 42: 745-766, 1979.
- Rovainen, C.M. Neurophysiology. In Hardisty, M.W. & Potter, I.C. (eds), *The Biology of Lampreys*, volume 4A. Academic Press, London.1-136, 1982.
- Rye, D.B., Saper, C.B., Lee, H.J. and Wainer, B.H. Pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J. Comp. Neurol.* 259: 483-528, 1987.
- Sandner, G. and Di Scala, G.R. C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. *Brain Res.* 573: 276-283, 1992.
- Satoh, K., Armstrong, D.M. and Fibiger, H.C. A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and acetyltransferase immunohistochemistry. *Brain Res. Bull.* 11: 693-720, 1983.

- Schober, A., Malz, C.R., Schober, W. and Meyer, D.L. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the larval lamprey (*Lampetra planeri*). *J. Comp. Neurol.* 345: 94-104, 1994.
- Shefchyk, S.J., Jell, R.M. and Jordan, L.M. Reversible cooling of the brainstem reveals areas required for mesencephalic locomotor region evoked treadmill locomotion. *Exp. Brain Res.* 56: 257-262, 1984.
- Shik, M.L. Locomotor patterns elicited by electrical stimulation of the brain stem in the mudpuppy. *Motor control.* 1: 354-368, 1997.
- Shik, M.L. and Orlovsky, G.N. Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol. Rev.* 56: 456-501, 1976.
- Shik, M.L., Severin, F.V. and Orlovsky, G.N. Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics.* 11: 756-765, 1966.
- Sholomenko, G.N., Funk, G.D. and Steeves, J.D. Avian locomotion activated by brainstem infusion of neurotransmitter agonists and antagonists. *Exp. Brain Res.* 85: 659-673, 1991.
- Shu, S.Y., Ju, G. and Fan, L.Z. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci. Lett.* 85: 169-171, 1988.
- Sinnamon, H.M., Stopford, C.K. Locomotion elicited by lateral hypothalamic stimulation in the anesthetized rat does not require the dorsal midbrain. *Brain Res.* 402: 78-86, 1987.
- Sinnamon HM (1993) Preoptic and hypothalamic neurons and the initiation of locomotion in the anesthetized rat. *Prog. Neurobiol.* 41:323-344.
- Sirota, M.G., Viana Di Prisco, G. and Dubuc, R. Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur. J. Neurosci.* 12: 4081-4092, 2000.

- Skinner, R.D. and Garcia-Rill, E. The mesencephalic locomotor region (MLR) in the rat. *Brain Res.* 323: 385-389, 1984.
- Skinner, R.D., Kinjo, N., Ishikawa, Y., Biedermann, J.A. and Garcia-Rill, E. Locomotor projections from the pedunculopontine nucleus to the medioventral medulla. *Neuroreport.* 1: 207-210, 1990.
- Steeves, J.D. and Jordan, L.M. Autoradiographic demonstration of the projections from the mesencephalic locomotor region. *Brain Res.* 307: 263-276, 1984.
- Steeves, J.D., Sholomenko, G.N. and Webster, D.M.S. Stimulation of a pontomedullary reticular formation initiates locomotion in decerebrate birds. *Brain Res.* 401: 205-212, 1987.
- Swanson, L.W. and Mogenson, G.J. Neural mechanisms for the functional coupling of autonomic, endocrine and somatomotor responses in adaptive behavior (review). *Brain Res.* 228: 1-34, 1981.
- Uematsu, K. and Todo, T. Identification of the midbrain locomotor nuclei and their descending pathways in the teleost carp, *Cyprinus carpio*. *Brain Res.* 773: 1-7, 1997.
- Viana Di prisco, G., Ohta, Y., Bongiani, F., Grillner, S. and Dubuc, R. Trigeminal inputs to reticulospinal neurones in lampreys are mediated by excitatory and inhibitory amino acids. *Brain Res.* 695: 76-80, 1995a.
- Viana Di Prisco, G., Sirota, M. and Dubuc, R. The activity of reticulospinal neurons during active swimming in semi-intact lampreys. In Stein, P.S.G., Gillman, S., Selverston, A.I. and Stuart, D.G. (eds). *Proceedings of the international symposium on neurons, networks and motor behavior.* University of Arizona, Tucson, Az. 63, 1995b.

- Viana Di Prisco, G., Pearlstein, E., Robitaille, R. and Dubuc R. Role of sensory-evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science*. 278: 1122-1125, 1997.
- Viana Di Prisco, G., Pearlstein, E., LeRay, D., Robitaille, R. and Dubuc, R. A cellular mechanism for the transformation of a sensory input into a motor command. *J. Neurosci*. 20: 8169-8176, 2000.
- Vincent, S.R., Satoh, K., Armstrong, D.M. and Fibiger, H.C. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation. *Neurosci. Lett*. 43: 31-36, 1983.
- Vincent, S.R., Satoh, K., Armstrong, D.M., Panula, P., Vales, W. and Fibiger, H.C. Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat. *Neuroscience*. 17: 167-182, 1986.
- Wannier, T., Deliagina, T.G., Orlovsky, G.N. and Grillner, S. Differential effects of the reticulospinal system on locomotion in lamprey. *J. Neurophysiol*. 80: 103-112, 1998.
- West, M.J., Slomianka, L. and Gundersen, H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec*. 231: 482-497, 1991.
- Wheatley, M., Edamura, M. and Stein, R.B. A comparison of intact and in-vitro locomotion in an adult amphibian. *Exp. Brain Res*. 88: 609-614, 1992.