

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

L'importance du système noradrénergique aux niveaux thoracique et lombaire de la moelle
épinière pour la locomotion du chat

par

Hugo Delivet-Mongrain

Département de physiologie. Université de Montréal
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, 2008

© Hugo Delivet-Mongrain, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'importance du système noradrénergique aux niveaux thoracique et lombaire de la moelle
épinière pour la locomotion du chat

Présenté par :
Hugo Delivet-Mongrain

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Pierre Gossard, président-rapporteur
Serge Rossignol, directeur de recherche
Trevor Drew, membre du jury

Résumé

Un réseau d'interneurones situé dans la moelle épinière, nommé CPG (central pattern generator), est responsable de la genèse de la locomotion consistant en un patron de décharges musculaires coordonnées de façon rythmique et alterné entre les muscles fléchisseurs et extenseurs des membres postérieurs. Ce patron est modulé par les afférences supraspinales et périphériques ainsi que par les différents systèmes de neurotransmetteurs. L'activité du CPG est responsable de la récupération de la marche suite à une lésion complète de la moelle épinière. Bien que la localisation et l'organisation du CPG locomoteur ne soient pas clairement définies, nous connaissons l'importance du système noradrénergique pour l'initiation de la marche et nous savons que l'intégrité des segments L3-L4 est cruciale pour l'expression du patron locomoteur chez un chat spinal. Toutefois, nous ne connaissons pas bien l'importance de ces segments et des afférences noradrénergiques chez un chat dont la moelle épinière est intacte. Le but de l'étude présentée ici est donc de déterminer l'effet d'injections intraspinales d'un bloqueur noradrénergique alpha 2, la yohimbine, sur l'expression de la locomotion du chat décérébré marchant spontanément sur tapis roulant. Étant donné que l'administration de la yohimbine à L3 ou L4 pouvait bloquer la marche et que les mêmes injections aux segments adjacents l'altéraient, nous suggérons que l'intégrité des segments L3-L4 est également essentielle à l'expression du patron locomoteur chez le chat décérébré alors que les mécanismes noradrénergiques au niveau des autres segments lombaires et thoraciques y contribuent dans une moindre mesure. Finalement, le rôle spécifique des différentes régions médullaires sera discuté.

Mots-clés : CPG (Central pattern generator), marche, pharmacologie, yohimbine, antagoniste noradrénergique, injections intraspinales, membres postérieurs, électromyographie, cinématique, analyses vidéo

Abstract

A spinal locomotor central pattern generator (CPG) is responsible for the expression of hindlimb locomotion. This interneuronal network generates the pattern of hindlimb muscle activity which is, under normal conditions, modulated by supraspinal inputs and peripheral feedback as well as by different neurotransmitter systems. The importance of this spinal CPG is highlighted by the fact that adult chronic spinal cats can walk with their hindlimbs on a treadmill with intense training some weeks after a complete spinalization. Although the organization and the localization of the CPG are unclear, the noradrenergic input has been identified as an important signal for the initiation of the locomotion and we know that the integrity of L3-L4 is crucial for the expression of the locomotor pattern in spinal cats. However, whether these segments and the noradrenergic inputs also play such a central role in the expression of locomotion in high decerebrate cats with intact spinal cords is unclear. For that reason, yohimbine, a α_2 -noradrenergic blocker, was injected intraspinally to selectively block noradrenergic mechanisms at various thoraco-lumbar segments. Our results indicate that the noradrenergic mechanisms at L3-L4 play a key role in the rhythmogenesis of hindlimb locomotion in the decerebrate cat since their inactivation blocks locomotion. Adjacent segments contribute to a lesser extent to the expression of locomotion since blocking their noradrenergic inputs degraded the locomotor pattern but did not prevent it. The specialisation of different parts of the spinal cord for the expression of the locomotion will be discussed.

Keywords : CPG (Central pattern generator), walking, pharmacology, yohimbine, noradrenergic antagonist, intraspinal injections, hindlimbs, electromyography, kinematics, video analysis

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1. Mis en contexte	1
2. Description de la locomotion	2
2.1 Généralités sur la locomotion.....	2
2.2 Cinématique : paramètres du cycle de marche.....	3
2.3 Électromyographie : patron de décharge musculaire	5
3. Genèse de la locomotion	6
3.1 Notion de CPG	6
3.2 Organisation du CPG locomoteur	8
3.3 Locomotion chez le chat spinal.....	11
4. Modulation de la locomotion	12
4.1 Principales voies supraspinales.....	12
4.2 Afférences sensorielles périphériques.....	18
4.3 Pharmacologie.....	20
5. Localisation du réseau locomoteur.....	26
5.1 Modèle distribué et modèle localisé.....	26
5.2 Importance des segments L3-L4 chez le chat	28
Problématique	31
Chapitre 2 : Article.....	34
Abstract	35
Introduction.....	37

Methods.....	41
Results.....	48
Discussion.....	59
Reference list.....	73
Chapitre 3 : Discussion et conclusion.....	96
Intégration des afférences supraspinales et périphériques au niveau des segments L3-L4	96
Implication des segments lombaires rostraux à L3-L4 et des segments thoraciques dans l'expression du patron locomoteur.....	100
Spécialisation des différentes régions médullaires à l'égard des systèmes sérotoninergique et cholinergique.....	103
Bibliographie.....	I

Liste des tableaux

Chapitre 2: Article

Table 1: Effects of yohimbine injections at different spinal segments tested for each cat

Liste des figures

Chapitre 1: Introduction

Figure 1: Analyse de la locomotion des pattes postérieures chez un chat intact à l'égard des paramètres cinématique et électromyographique.

Figure 2: Représentation des muscles enregistrés lors de nos expériences ainsi que leurs points d'insertion.

Figure 3: Schématisation du CPG produisant le patron locomoteur des pattes postérieures.

Figure 4: Schématisation des structures supraspinales et des différentes décérébrations

Chapitre 2: Article

Figure 1: Experimental set-up.

Figure 2: Sequential injections of yohimbine in the various cats.

Figure 3: Effects of yohimbine (4 x 2.5 µl solution 8 mg/ml) at L3.

Figure 4: Effects of yohimbine injected intraspinally at T8.

Figure 5: Effects of yohimbine injected intraspinally at T10.

Figure 6: Effects of yohimbine injected intraspinally at T13.

Figure 7: Examples of locomotor deficits observed following intraspinally injected yohimbine at L1.

Figure 8: Effects of intraspinal injection of yohimbine in close succession at T13-L1-L2.

Figure 9: Effects of yohimbine intraspinally injected in close succession at L5-L6-L7.

Figure 10: Block diagram of a hypothetical functional organization of the locomotor network and its inputs.

Liste des sigles et abréviations

CPG : central pattern generator

EMG : électromyographie

E¹ : première phase d'extension

E² : deuxième phase d'extension

E³ : troisième phase d'extension

F : phase de flexion

MSIS : microstimulations intraspinales

MTP : l'articulation métatarso-phalangienne

Anatomie

GL : *gastrocnemius lateralis*

Srt : *sartorius*

St : *semitendinosus*

TA : *tibialis anterior*

VL : *vastus lateralis*

C : segment cervical

T : segment thoracique

L : segment lombaire

S : segment sacré

DLF : funicule dorsolatéral

VLF : funicule ventrolatéral

Mm : corps mammillaire
PPN : noyau pedonculopontin
RLM : région locomotrice mésencéphalique
RLS : région locomotrice subthalamique
SC : collicules supérieures

Pharmacologie

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
ACh : acétylcholine
AMT : alpha-methyltyrosine
AP5 : 2-amino-5-phosphonovaleric acid
CNQX : cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
DA : dopamine
GABA : Gamma-aminobutyric acid
HRP : horseradish peroxidase
i.p. : injection intrapéritonéale
i.v. : injection intraveineuse
i.t. : injection intrathécale
L-DOPA : 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
NA : noradrénaline
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
WGA : wheat germ agglutinin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Serge Rossignol, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Me joindre à une équipe si chaleureuse fût un privilège. Merci pour ta disponibilité, ta rigueur et ta patience. Mon séjour ici a été des plus instructif, tant sur le plan scientifique que personnel.

Je remercie également les membres de mon comité de parainage constitué de Jean-François Pflieger et Jean-Pierre Gossard d'avoir prêté attention à mon projet de recherche et à mes questionnements, ainsi que les membres de mon jury, Trevor Drew et Jean-Pierre Gossard d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise.

Je ne remercierai jamais assez Janyne Provencher et Hugues Leblond. Vous m'avez tout montré et votre aide, à toutes les étapes du projet, a été plus que précieuse. Vous avez été toujours disponible pour moi et j'en suis très reconnaissant. Travailler avec vous a été un réel plaisir.

Merci énormément à Alain Frigon et Gregory Barrière pour leur aide lors de l'écriture de l'article. Merci également pour votre support et vos encouragements.

Je tiens également à remercier Philippe Drapeau pour l'aide mathématique et informatique, ainsi que Claude Gauthier pour la création et la mise en pages des figures. Vous avez toujours été prêt à m'aider, j'apprécie beaucoup.

Je salue tout ceux que j'ai rencontrés au laboratoire et au département et qui ont fait de ma maîtrise une étape mémorable de ma vie.

Finalement, je tiens à remercier mes amis proches ainsi que Gilles et Jocelyne pour votre présence et votre soutien dans les moments plus difficiles.

'Pa, ta présence dans ma vie m'est indispensable.

Maman, c'est grâce à toi que je me suis rendu jusqu'ici.

À mes parents

Chapitre 1 : Introduction

1. Mis en contexte

La biologie fascine tant par la fragilité de l'équilibre de ses mécanismes que par la force de ses capacités d'adaptation. Une compression ou une lésion de la moelle épinière peut priver une personne de toute sensation et de toute motricité volontaire des régions de son corps sous cette lésion. Beaucoup d'efforts sont donc investis dans la recherche fondamentale pour mieux comprendre les mécanismes du système nerveux permettant de rétablir, du moins en partie, ces fonctions. Des résultats encourageants ont montré chez plusieurs espèces qu'un réseau de neurones, appelé CPG (central pattern generator), responsable de la genèse de la locomotion, est situé au niveau de la moelle épinière. Ainsi, un chat ayant subi une lésion complète de la moelle épinière au niveau thoracique pourra récupérer une locomotion des pattes postérieures grâce à l'activité de ce CPG. La localisation et l'organisation de ce réseau font encore l'objet de plusieurs interrogations. Les réponses à ces questions nous permettraient ultimement de raffiner les protocoles de réadaptation proposés aux blessés médullaires et, par exemple, cibler des segments spécifiques pour la greffe cellulaire.

Plusieurs expériences chez le chat spinal ont établi l'implication du système noradrénergique dans l'initiation de la marche et le rôle central des segments mi-lombaires de la moelle épinière pour la genèse du patron locomoteur. On ne sait pas par ailleurs si ces niveaux spinaux et ces mécanismes pharmacologiques jouent également un rôle aussi crucial dans la genèse de la marche des membres postérieurs avant une lésion spinale. Le but de l'étude présentée ici est donc de déterminer, à l'aide d'outils pharmacologiques et en évaluant les capacités locomotrices, l'importance relative des différents segments thoraciques et lombaires de la moelle épinière dans la genèse de la locomotion chez le chat décérébré sans lésion spinale. Pour ce faire, les effets d'injections intraspinales de yohimbine, un antagoniste des récepteurs noradrénergiques α_2 , ont été évalués sur l'expression de la locomotion, chez le chat décérébré.

Avant de présenter nos résultats, cette revue de la littérature présentera les paramètres cinématiques et électromyographiques de la locomotion du chat. Ensuite, l'organisation du CPG et sa modulation par les voies supraspinales, les afférences sensorielles périphériques et les différents systèmes de neurotransmetteurs seront abordés en se concentrant principalement sur le chat. Finalement la localisation de ce réseau sera discutée.

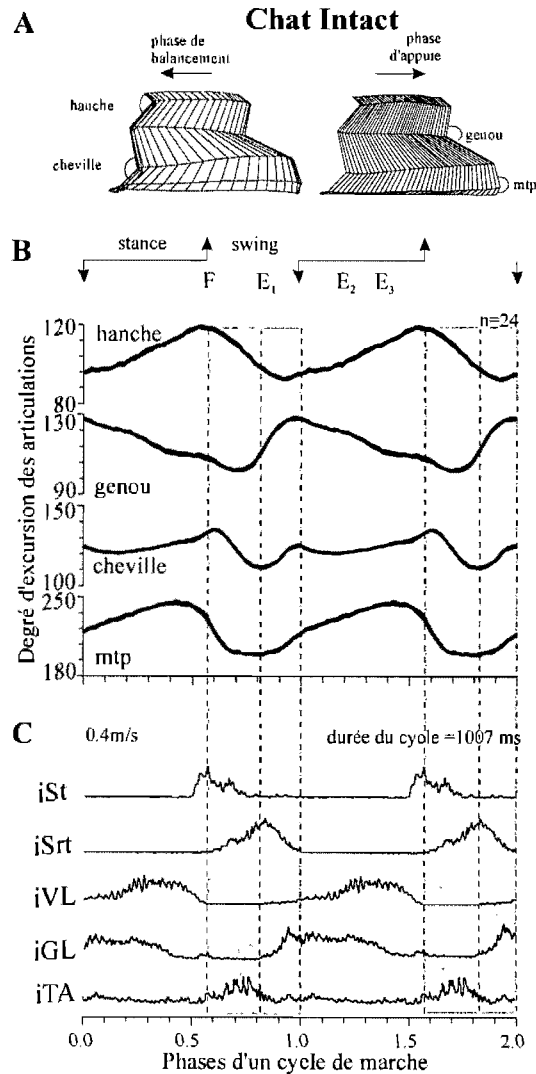
2. Description de la locomotion

2.1 Généralités sur la locomotion

Chez les vertébrés, les différentes formes de locomotion, que ce soit le vol, la nage ou la marche, se définissent comme une séquence plus ou moins complexe de contractions musculaires des membres ou du tronc. Coordinées de façon rythmique et alternée, ces contractions musculaires produisent le déplacement de l'animal en exerçant des forces sur l'environnement externe. La fréquence des contractions déterminera la vitesse de déplacement. Ici, notre attention se portera particulièrement sur la marche du chat et plus précisément au niveau des membres postérieurs. Pour étudier de façon quantitative les caractéristiques de cette locomotion dans différents contextes, les paramètres cinématiques et électromyographiques (EMG) sont mesurés.

2.2 Cinématique : paramètres du cycle de marche

La cinématique permet de quantifier le mouvement dans l'espace et dans le temps. Elle nous permet d'évaluer la position relative de chacune des parties du membre et



l'excursion angulaire des différentes articulations lors d'un cycle de marche. Un cycle locomoteur se définit comme étant l'intervalle contenu entre deux contacts successifs du pied au sol. Le cycle locomoteur est composé de deux parties, soit une phase de balancement et une phase d'appui (Fig. 1A-B)

Figure 1 : Analyse de la locomotion des pattes postérieures chez un chat intact à l'égard des paramètres cinématique et électromyographique. La reconstruction de la patte postérieure gauche (A), l'excursion angulaire (B) et l'activité musculaire moyennée (C) sont représentés en fonction des différentes phases du cycle de marche. Srt : *sartorius*, St : *semitendinosus*, VL : *vastus lateralis*, GL : *gastrocnemius lateralis*, TA : *tibialis anterior*, F : flexion, E¹ : première phase d'extension, E² : deuxième phase d'extension et E³ : troisième phase d'extension.

comme l'a décrit Philippson en étudiant la locomotion au niveau des pattes postérieures du chien (Philippson, 1905). La phase de balancement se subdivise en phase de flexion (F) et en première phase d'extension (E^1). La phase F débute au moment où le pied quitte le sol coïncidant avec la flexion de la hanche, du genou et de la cheville. Vers la moitié de la phase de balancement, alors que la hanche continue sa flexion, le genou, la cheville et l'articulation métatarso-phalangienne (MTP) entrent en extension ramenant ainsi le pied vers l'avant et le bas le préparant à toucher le sol; il s'agit de la première phase d'extension, E^1 . La deuxième partie du cycle locomoteur, la phase d'appui, se subdivise en deuxième (E^2) et troisième (E^3) phase d'extension. La phase E^2 commence au moment où le pied fait contact avec le sol. Il y a alors transfert de poids et il se produit donc une légère flexion passive du genou et de la cheville due au poids de l'animal, alors que la hanche entreprend son extension. Finalement, lors de la phase E^3 , où l'animal est propulsé vers l'avant, toutes les articulations sont en extension jusqu'à ce que le pied redécolle du sol pour un nouveau cycle de marche.

Bien que la séquence de ces événements soit invariable durant la marche, les proportions que représentent chacune des phases à l'intérieur du cycle locomoteur peuvent changer en fonction du contexte, de la condition de l'animal ou de sa vitesse de marche. Ainsi, alors que la durée de la phase de balancement change très peu, la durée de la phase d'appui sera inversement proportionnelle à la vitesse de marche (Halbertsma, 1983; Shik et Orlovsky, 1976). Ici le terme locomotion fera référence, à moins d'indication contraire, à la marche telle que décrite ci-haut. Ainsi, nous qualifions de marche une locomotion à basse vitesse où un minimum de trois des quatre membres est en contact avec le sol. À des vitesses un peu plus élevées le chat passe de la marche au trot où les membres en diagonale sont en contact avec le sol simultanément lors de la phase d'appui. À très grande vitesse, le chat galope. C'est-à-dire que l'alternance du contact au sol se fait entre les pattes antérieures et les pattes postérieures (Rossignol, 1996).

Les coordonnées spatiales de chacun des segments des membres postérieurs peuvent être enregistrées, nous permettant, a posteriori, de calculer, par exemple, la longueur des

pas, la durée du cycle locomoteur ainsi que celle des différentes phases et leur proportion relative à l'intérieur du cycle, l'excursion angulaire au niveau des différentes articulations et le couplage entre les membres. Ainsi, les paramètres cinématiques mesurés nous permettent par exemple d'évaluer de façon quantitative l'influence d'un agent pharmacologique sur la locomotion en fonction du segment dans lequel elle est injectée.

2.3 Électromyographie : patron de décharge musculaire

L'électromyographie mesure l'activité électrique des muscles, nous renseignant ainsi sur l'intensité, la durée et les phases des contractions musculaires. C'est cette activité qui est à l'origine des différentes phases du cycle locomoteur décrites ci-haut (Fig. 1C). Nous nous concentrerons ici sur les muscles des pattes postérieures enregistrés lors de cette étude (Fig. 2), soit le *vastus lateralis* (VL), le *gastrocnemius lateralis* (GL) le *sartorius* (Srt), le *semitendinosus* (St) et finalement le *tibialis anterior* (TA). Le VL est un extenseur du genou qui est activé de façon croissante de la phase E¹ à la phase E³. Le GL, extenseur de la cheville, est activé brusquement, atteignant une activité maximale à la phase E² (Engberg et Lundberg, 1969). Le Srt et le St remplissent une fonction biarticulaire. La partie antérieure du Srt fléchit la hanche et produit une extension du genou alors que la partie médiane de ce muscle fléchit la hanche et le genou. Il est donc actif à la fin de la phase E³ où le genou est en extension, mais

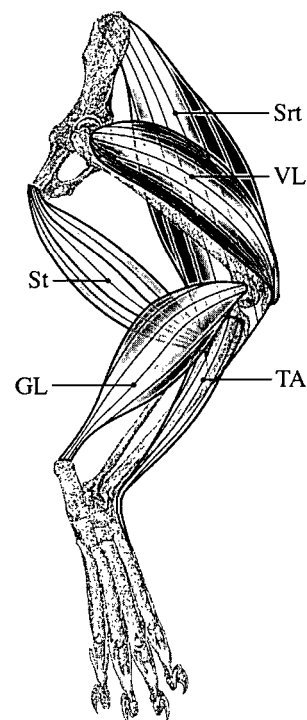


Figure 2 : Représentation des muscles enregistrés lors de nos expériences ainsi que leurs points d'insertion. Srt : *sartorius*, St : *semitendinosus*, VL : *vastus lateralis*, GL : *gastrocnemius lateralis*, TA : *tibialis anterior*.

principalement au début de la phase de balancement soit lors de la phase F (Pratt et Loeb, 1991). Quant à lui, le St est un extenseur de la hanche et fléchisseur du genou. Il est actif à la fin de la phase E³ et durant la phase F et participe à l'élévation du pied. Ce muscle a également une deuxième décharge, surtout à haute vitesse, à la phase E¹ juste avant que le pied touche le sol (Engberg et Lundberg, 1969; Perret et Cabelguen, 1976; English et Weeks, 1987). Finalement le TA est un fléchisseur de la cheville qui est actif durant la phase F (Engberg et Lundberg, 1969).

L'enregistrement et l'analyse EMG vont de pair avec les paramètres cinématiques et nous permettront de calculer la durée, l'intensité et le couplage des décharges musculaires afin d'évaluer le plus objectivement possible la qualité de la locomotion observée afin de déterminer l'influence d'un blocage pharmacologique par un antagoniste noradrénergique, comme la yohimbine, sur le patron locomoteur.

3. Genèse de la locomotion

3.1 Notion de CPG

Comme nous le verrons plus loin, bien que le patron de décharge musculaire complexe décrit ci haut soit modulé par les voies descendantes et les afférences sensorielles périphériques, sa genèse a lieu au niveau médullaire. Nous savons maintenant qu'un réseau spinal d'interneurones nommé CPG (CPG : Central Pattern Generator) est responsable de la genèse de cette activité rythmique et alternée (Fig. 3).

Cette hypothèse s'est articulée suite à différentes observations. Tout d'abord, au début du siècle, Sherrington montra qu'un chat ayant subi une lésion complète au niveau

thoracique (segment T13) de la moelle épinière pouvait récupérer la marche (Sherrington, 1910b; Sherrington, 1910a). De plus, Brown, en 1911, montra que ces mêmes chats, dits spinalisés ou spinaux, ayant également subi une rhizotomie complète, pouvaient générer une alternance entre un fléchisseur et un extenseur des pattes postérieures (Brown, 1911). Ces deux observations suggèrent que les voies descendantes ainsi que les afférences sensorielles périphériques ne sont pas essentielles à l'expression du patron locomoteur de base des pattes postérieures. Finalement, la terminologie

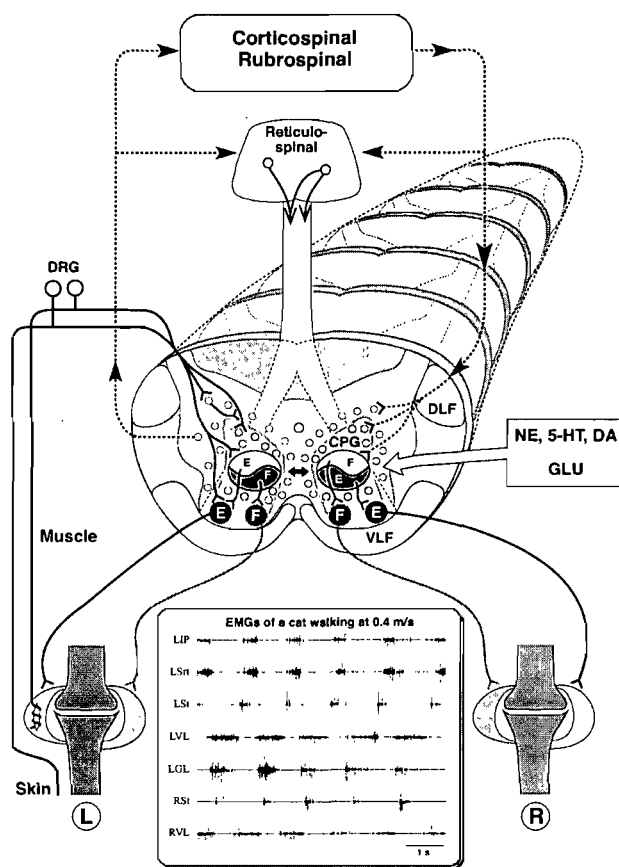


Figure 3 : Schématisation du CPG produisant le patron locomoteur des pattes postérieures. L'activité du CPG est modulée par les afférences supraspinales et périphériques ainsi que par les différents systèmes de neurotransmetteurs. NE : noradrénaline, 5-HT : sérotonine, DA : Dopamine, GLU : glutamate, F : fléchisseur, E : extenseur, DLF : funicule dorsolatéral, VLF : funicule ventrolatéral.

d'un générateur central de patron (CPG : Central Pattern Generator) fût proposée afin d'illustrer la capacité d'un réseau d'interneurones de la moelle épinière à générer de façon intrinsèque une activité rythmique et alternée (Grillner, 1981). Plusieurs mouvements rythmiques tels que le vol, la nage, la respiration, la mastication ou le grattage seraient

généérés par des CPGs. Ici, nous nous réfèrerons à celui de la locomotion. Ce réseau serait présent au niveau médullaire dès la naissance. Des chattons spinalisés (T10-12) une à deux semaines après la naissance peuvent exprimer un patron locomoteur sans avoir préalablement «appris» à marcher, d'où le caractère inné de cette circuiterie spinale (Forssberg et al., 1980a; Forssberg et al., 1980b).

Le CPG locomoteur des pattes postérieures n'est d'ailleurs pas exclusif au chat puisque son existence fut également montrée chez la souris (Leblond et al., 2003) le rat (Gimenez y Ribotta et al., 2000), le lapin (Vidal et al., 1979) et un primate non-humain (Delcomyn, 1980; Fedirchuk et al., 1998; Babu et Namasivayam, 2008). Aussi, bien que moins d'évidences soient disponibles chez l'humain, il semblerait qu'un tel réseau puisse exister chez l'homme (Bussel et al., 1988a; Bussel et al., 1988b; Dimitrijevic et al., 1998; Calancie et al., 1994).

3.2 Organisation du CPG locomoteur

Puisque le CPG locomoteur et son organisation spatiale au niveau spinal est au coeur de la problématique de l'étude présentée ici, il est important de délimiter la compréhension que avons au sujet de son organisation chez le chat. Les théories sur l'agencement des différents éléments responsables de la genèse du patron locomoteur ont évolué au fil des années, mais encore beaucoup de questions demeurent sans réponses.

3.2.1 Demi-Centres

Suite à des expériences montrant que la moelle épinière du chat pouvait générer des rythmes locomoteurs en l'absence d'afférences supraspinales et sensorielles suggérant l'origine centrale de la genèse de la locomotion (Brown, 1911), Brown proposa une théorie où deux réseaux de neurones spinaux, nommés demi-centres, s'inhibent l'un l'autre, en

alternance, contrôlant ainsi l'activité entre les motoneurones fléchisseurs et extenseurs. Plus tard, d'autres expériences ont appuyé cette théorie. L'enregistrement intracellulaire d'interneurones et de motoneurones, durant une locomotion induite par L-DOPA, montrait les interactions inhibitrices entre l'activité rythmique des interneurones générant la flexion et ceux générant l'extension, et ce, avec ou sans la présence d'afférences sensorielles (Jankowska et al., 1967a; Jankowska et al., 1967b; Lundberg, 1981). Ainsi, ce modèle proposait que ces demi-centres génèrent le rythme flexion/extension de base. Toutefois, l'activité musculaire durant la locomotion ne se limite pas à cette alternance. Chacun de ces muscles possède une « signature » spécifique, c'est-à-dire que leur décharge musculaire est caractérisée par une certaine durée, une certaine amplitude et un certain couplage, reflet de l'activité motoneuronale. Il a été proposé que le rythme flexion/extension généré par les demi-centres était façonné par les afférences sensorielles transformant cette alternance de base en un patron locomoteur complexe (Engberg et Lundberg, 1969). Il est vrai que ces afférences modulent l'activité des motoneurones. Pourtant d'autres montrèrent, chez le chat, que des mécanismes centraux pouvaient générer ce patron locomoteur complexe et détaillé, en absence d'afférences sensorielles (Grillner et Zangger, 1975; Grillner et Zangger, 1979). Ces dernières observations amenèrent Grillner à formuler un modèle d'unités rythmiques.

3.2.2 Générateur à unité rythmique

Grillner proposa la théorie du générateur central de patron voulant qu'un réseau neuronal de la moelle soit capable de générer à lui seul un rythme ayant la forme du patron locomoteur complexe tel qu'observé chez l'animal intact (Grillner, 1981). Chaque membre posséderait un générateur de patron subdivisé en unités génératrices de rythmes associées à chacune des articulations. Bien qu'elles soient interconnectées, chacune de ces unités serait en mesure de générer un rythme d'elle-même. Cette organisation beaucoup plus flexible, permet d'expliquer certaines observations. Par exemple, la locomotion à reculons, le

passage du trot au galop ou encore qu'un groupe de muscles continue d'évoquer une activité rythmique alors que d'autres ont cessé. Ceci pourrait être expliqué par un changement d'interaction entre ces différentes unités rythmiques (Grillner, 1975).

3.2.3 Modèle de CPG à deux niveaux

Un autre modèle de CPG locomoteur implique deux réseaux de neurones distincts, soit un générateur de rythme et un générateur de patron (Delcomyn, 1980; Lennard et Hermanson, 1985; McCrea et Rybak, 2008). Les premières observations menant à la formulation de ce modèle furent les délétions qui ne réinitialisent pas le cycle de marche. En effet, tel qu'observé en locomotion fictive chez le chat décérébré, suite à une absence de bouffées d'un fléchisseur ou d'un extenseur spécifique, le cycle de marche reprenait sans que le rythme n'ait été altéré, comme s'il avait persisté (Lafreniere-Roula et McCrea, 2005). En d'autres termes, suite à la délétion d'une bouffée, l'activité rythmique reprend après un laps de temps correspondant à un multiple de la durée du cycle de marche préexistant. Ces observations suggéraient la présence de deux réseaux différents, un générant un rythme et l'autre organisant l'activité des motoneurones selon le rythme dicté par le premier (Rybak et al., 2006). En d'autres termes, le générateur de patron serait responsable de la coordination de l'activité des différents pools de motoneurones, mais le rythme du cycle de marche serait imposé par le générateur de rythmes. Ces réseaux distincts seraient tous deux modulés par les voies descendantes et les afférences sensorielles périphériques. Cette théorie n'est pas tout à fait incompatible avec celle de Grillner. Le réseau responsable du patron musculaire pourrait bien être subdivisé en différentes unités, chacune contrôlant la dépolarisation et l'hyperpolarisation de différentes sous-populations motoneuronales.

3.3 Locomotion chez le chat spinal

Quelle que soit l'organisation intrinsèque du CPG locomoteur, ce dernier peut être mis en évidence chez le chat ayant subi une lésion complète de la moelle épinière. Avant de décrire la modulation du patron locomoteur par les structures supraspinales, il est important de préciser l'implication du CPG dans la récupération de la marche suite à une lésion de la moelle épinière et de comprendre les conséquences de cette interruption des voies descendantes.

La récupération de la locomotion suite aux blessures médullaires est bien connue chez le chat (Rossignol et al., 2002b). Que la lésion soit complète ou partielle, la locomotion du chat en sera altérée (Rossignol et al., 2004b). Cependant, la moelle possède la capacité d'adapter ses sorties motrices en fonction des circuits restants. Plusieurs facteurs, notamment l'entraînement, permettent cette adaptation. En effet, un entraînement quotidien de quelques semaines, permet à un chat ayant subi une lésion complète de la moelle épinière (T13) de retrouver, sur tapis roulant, une locomotion spontanée similaire à celle d'un chat intact, c'est-à-dire avec un placement du pied, support de poids et capacité d'adaptation à la vitesse du tapis (Barbeau et Rossignol, 1987), ce qui fait du chat un excellent modèle pour étudier la récupération des fonctions locomotrices.

Cette récupération de la locomotion ne se fait toutefois pas du jour au lendemain. Le décours temporel de l'amélioration des capacités locomotrices des pattes postérieures, suite à une lésion complète (T13) de la moelle épinière du chat, à l'aide d'un entraînement sur tapis roulant est progressif (Rossignol et al., 2000; Rossignol, 2000; Rossignol et al., 1999). La suppression soudaine des voies descendantes réduit grandement les réflexes spinaux durant quelques heures, il s'agit du choc spinal. Les quelques jours suivants, une stimulation périnéale provoquera l'extension des pattes postérieures. Il faudra presque une semaine pour que cette stimulation puisse induire des mouvements locomoteurs. Le support

de poids et le placement du pied ne sont pas observés à ce stade. De 3 à 4 semaines post-spinalisation la locomotion avec support de poids est robuste, soutenue et déclenchée uniquement par le mouvement du tapis roulant. À ce stade la locomotion des pattes postérieures est semblable à celle observée avant la spinalisation. Par contre, la coordination avec les pattes antérieures est compromise, rendant la marche quadrupède presque impossible et certains déficits peuvent encore être observés, tels qu'une diminution de support de poids par rapport à l'état intact ou le traînement du pied pendant la phase de balancement.

Cette récupération de la locomotion serait possible grâce à une reconfiguration des circuits neuronaux sous-lésionnels (Rossignol et al., 2002a; Rossignol, 2006). Cette reconfiguration ayant lieu tant au niveau synaptique que cellulaire se nomme la plasticité. Cette reconfiguration qui sous-tend la récupération de la locomotion est influencée par plusieurs facteurs dont les plus importants seraient : 1) l'activation et l'entraînement du CPG, 2) les inputs sensitifs, 3) les changements de proportions entre les différents neurotransmetteurs et leurs récepteurs spécifiques et 4) l'intégrité des segments lombaires moyens (Rossignol et al., 2004a). Nous reviendrons sur ces différents aspects tout au long du manuscrit.

4. Modulation de la locomotion

4.1 Principales voies supraspinales

Le CPG locomoteur est capable de générer à lui seul le patron de marche. Toutefois, dans des conditions normales, les afférences supraspinales sont requises pour adapter cette marche stéréotypée en toutes circonstances. Les déficits observés chez un chat suite à une

lésion complète ou une interruption d'une voie descendante spécifique nous renseignent sur les rôles jouer par les différentes structures supraspinales projetant vers la moelle épinière.

Les voies descendantes peuvent être subdivisées en système latéral et système médian. Le premier est impliqué dans le contrôle des modifications volontaires de la marche et des mouvements fin des membres. Il comprend les voies corticospinale et rubrospinale. Ces voies empruntent le funicule dorsolatéral pour rejoindre la moelle épinière. Ainsi, une hémisection dorsale de la moelle épinière provoquera des déficits tel que le traînement du pied et l'incapacité à éviter des obstacles (Jiang et Drew, 1996). Le système médian, pour sa part, est plutôt impliqué dans le maintien de la posture en contrôlant le support de poids, la stabilité latérale de l'animal et la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs. Il comprend les voies réticulospinale et vestibulospinale. Ces voies empruntent le funicule ventral. Une hémisection ventrale de la moelle épinière entraînera donc des déficits posturaux et de coordination (Brustein et Rossignol, 1998).

La voie corticospinale émerge du cortex moteur. La majorité de ces fibres corticales décussent à la jonction entre le bulbe et la moelle épinière (décussation pyramidale) et empruntent le funicule dorsolatéral se dirigeant vers la moelle épinière au niveau des cornes dorsales et des parties latérales de la zone intermédiaire (Kuypers, 1981). Contrairement à cette voie corticospinale latérale, une autre partie des fibres corticales descendent du côté ipsilatéral par le funicule ventral projetant bilatéralement vers les motoneurones et la portion ventromédiane de la zone intermédiaire, formant ainsi la voie corticospinale médiane (Kuypers, 1981). La voie corticospinale, dans son ensemble, est responsable de la motricité volontaire et nécessaire à une locomotion complexe adaptée à un environnement changeant. Elle permet d'adapter le cycle locomoteur aux inputs visuels et auditifs, par exemple. Bien qu'un chat soit capable d'exprimer un patron locomoteur suite à une lésion des voies pyramidales ou du cortex moteur, l'animal aura beaucoup de difficulté à marcher sur une échelle ou éviter des obstacles (Armstrong, 1986; Drew et al., 1996).

La voie rubrospinale débute au noyau rouge, décusse au niveau du mésencéphale et projette via le funicule dorsolatéral vers les interneurons de la zone intermédiaire de la moelle épinière soit au même endroit que la voie corticospinale (Kuypers, 1981). Cette voie est responsable du contrôle de l'activité des muscles distaux des membres (Armstrong, 1986). Une lésion du noyau rouge n'empêchera pas la locomotion, mais la rendra plus instable, particulièrement au niveau des articulations distales (Orlovsky, 1972).

Pour sa part, la voie réticulospinale débute au niveau de la formation réticulée projette vers les motoneurons des muscles axiaux et les interneurons de la partie ventromédiane de la zone intermédiaire (Kuypers, 1981). La voie réticulospinale est impliquée dans l'initiation et la modulation de la locomotion. La voie réticulospinale peut moduler l'activité des muscles fléchisseurs et extenseurs en fonction de la phase du cycle locomoteur (Orlovsky, 1972; Perreault et al., 1994). Aussi, refroidir la formation réticulée ponto-médullaire bloque la locomotion du chat décérébré (Shefchyk et al., 1984). Cette voie est également impliquée, avec la voie corticospinale, dans le contrôle de la posture durant la locomotion (Drew et al., 2004). De plus, elle joue un rôle important dans la coordination des différents membres (Drew et Rossignol, 1984).

La voie vestibulospinale latérale, originaire du noyau vestibulaire latéral (noyau de Deiters), aboutit dans la région médiane de la zone intermédiaire et la partie dorsomédiane de la corne ventrale (Kuypers, 1981). Cette voie n'est pas impliquée dans l'initiation de la locomotion, mais contrôle plutôt l'activité globale des extenseurs durant la phase d'appui et permet, par exemple d'adapter le patron locomoteur à un terrain en pente (Matsuyama et Drew, 2000a; Matsuyama et Drew, 2000b). La destruction du noyau vestibulaire latéral diminue considérablement l'activité des extenseurs durant la locomotion du chat décérébré (Yu et Eidelberg, 1981).

D'autres structures supraspinales forment des boucles motrices régulant l'activité des autres centres moteurs. Par exemple, le cervelet coordonne les mouvements et intègre les

voies réticulo-, vestibulo- et rubro-spinale (Shik et Orlovsky, 1976). L'absence du cervelet entraînerait des pas irréguliers et de fréquentes pertes d'équilibre (Armstrong, 1986).

Il est important de mentionner que la plupart de ces différents inputs supraspinaux modulent le cycle de marche, non pas directement, mais via des interneurons spinaux afin d'assurer l'intégration de leurs commandes aux différentes phases du patron locomoteur (Jankowska, 1992; McCrea, 1996; Drew et Rossignol, 1984). Aussi, la stimulation électrique de plusieurs de ces structures supraspinales (comme la formation réticulée médullaire, le noyau de Deiters ou le faisceau pyramidal) peut réinitialiser le cycle de marche (Perreault et al., 1994; Leblond et al., 2000; Leblond et al., 2001b). Autre indice que les inputs des voies descendantes passent par des interneurons spinaux faisant partie du CPG locomoteur.

4.1.1 Initiation de la locomotion chez le chat décérébré

Plusieurs préparations sont utilisées pour étudier les éléments neuronaux du contrôle de la locomotion. Chacune permettant d'étudier de façon optimale différents aspects de cette organisation.

Les différentes variantes de la préparation du chat décérébré ont permis de mettre en évidence plusieurs structures impliquées dans l'initiation de la locomotion. La stimulation électrique d'une région située dans le tronc cérébral pouvait induire la locomotion chez le chat décérébré. D'abord nommée région locomotrice (locomotor region) par Shik (Shik et al., 1966), cette région est maintenant connue sous le nom de région locomotrice mésencéphalique (RLM ou MLR pour mesencephalic locomotor region). La RLM est une région fonctionnelle du mésencéphale, à proximité du noyau cunéiforme, et est localisée ventralement au collicule inférieur et englobe une portion de neurones cholinergiques du noyau pedonculopontin (PPN) (Whelan, 1996). Cette région est à l'origine de ce que Shik

nomma bande locomotrice (locomotor strip); latérale à la formation réticulée, cette bande est distribuée du mésencéphale jusqu'à la moelle épinière (Shik, 1983). La stimulation électrique de n'importe quel point de cette bande peut déclencher la locomotion.

Chez le chat décérébré et paralysé, une stimulation de la RLM déclenche la marche fictive ou sur tapis roulant (Jordan et al., 1979; Shik et al., 1966). Aussi, il a été montré, chez le chat décérébré, qu'augmenter l'intensité de la stimulation de la RLM augmentait la vitesse de la marche, allant jusqu'au galop (Shik et al., 1966; Mori et al., 1992). Cette voie agirait sur le patron locomoteur par l'intermédiaire d'un réseau d'interneurones puisque l'analyse des réflexes montre qu'elle a une action excitatrice sur les motoneurones extenseurs durant la phase d'appui et inhibitrice durant la phase de balancement (Shefchyk et Jordan, 1985).

La RLM reçoit des projections de plusieurs structures cérébrales dont les ganglions de la base, le cortex sensorimoteur et le système limbique et projette vers la partie médiane de la formation réticulée (Garcia-Rill et al., 1983; Shik, 1983; Steeves et Jordan, 1984). Cette projection de la RLM vers la formation réticulée serait une des voies permettant l'initiation de la locomotion (Steeves et Jordan, 1980). Cette activation des neurones réticulospinaux, qui eux rejoignent la moelle épinière par le funicule ventrolatéral, serait en partie responsable du déclenchement de la marche par la RLM (Garcia-Rill et Skinner, 1987). Une autre voie potentiellement responsable du déclenchement de la locomotion par la RLM impliquerait l'activation de neurones noradrénergiques non-myélinisés de la voie coeruleospinale (Shik, 1983). Nous verrons plus loin que le locus coeruleus est la principale source de noradrénaline projetée vers la moelle épinière.

La région locomotrice subthalamique (RLS ou SLR pour subthalamic locomotor region) joue aussi un rôle dans l'initiation de la locomotion. Il est possible de déclencher la locomotion en stimulant cette région, même si la RLM fut préalablement détruite (Sirota et Shik, 1973; Whelan, 1996). De plus, la RLS désinhibe la RLM. C'est pourquoi une préparation de chat décérébré au niveau pré-colliculaire / pré-mamillaire (Fig. 4), où la

RLS est préservée, peut marcher spontanément alors qu'une préparation de chat décérébré au niveau pré-colliculaire / post-mamillaire, où la RLS est supprimée, aura besoin d'une stimulation électrique de la RLM pour exprimer un patron locomoteur (Whelan, 1996).

Dans l'étude présentée ici, une des différentes préparations de chat décérébré a été choisie. Plus précisément, une lésion au niveau pré-colliculaire, pré-mamillaire a été effectuée. Ainsi, suite à une décortication, tout ce qui est rostral à la ligne imaginaire allant de l'extrémité rostrale des collicules supérieurs

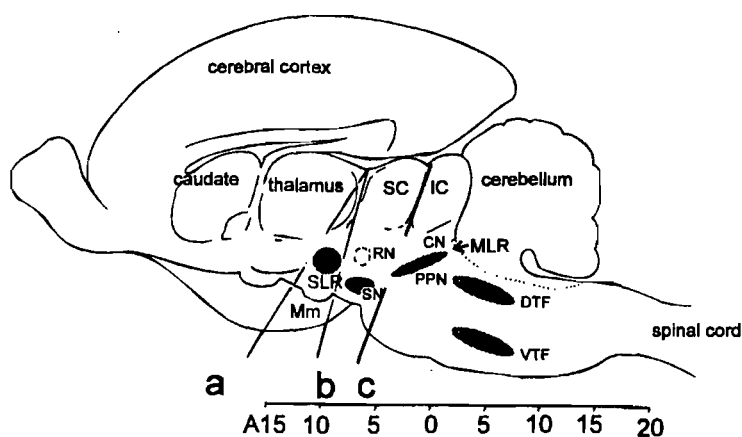


Figure 4 : Schématisation des structures supraspinales et des différentes décérébrations (a), (b) et (c). La décérébration pré-colliculaire / pré-mamillaire (a) préserve la RLS (région locomotrice subthalamique) et la RLM (région locomotrice mésencéphalique). SC : collicules supérieures, Mm : corps mammillaire, PPN : noyau pedonculopontin.

jusqu'à l'extrémité rostrale des corps mammillaires a été enlevée (Hinsey et al., 1930; Armstrong, 1986). Cette préparation aigüe a été choisie car l'ensemble des structures du tronc cérébral et des afférences périphériques est préservé. Aussi, la RLS ainsi que la RLM restent intactes, ce qui permet l'expression spontanée de la locomotion au niveau des pattes postérieures en réponse au mouvement d'un tapis roulant. Cette locomotion avec support de poids est stéréotypée, mais peut s'adapter à différentes vitesses de tapis roulant, sans toutefois être modulée en réponse aux stimuli visuels (Hinsey et al., 1930; Orlovsky et Shik, 1976; Armstrong, 1986). De plus, les mécanismes posturaux sont conservés mais l'animal ainsi décérébré perd toutes sensations nociceptives. Ainsi, suite à une chirurgie nous permettant d'exposer la moelle épinière, la décérébration permet le retrait de

l'anesthésie, essentiel à l'observation de mouvements moteurs. En résumé, cette préparation, viable durant plusieurs heures, est ce qui se rapproche le plus d'un animal intact tout en nous permettant d'injecter un agent pharmacologique directement dans la moelle épinière et d'en étudier les effets sur une locomotion spontanée qui n'est pas sous le contrôle volontaire de l'animal.

4.2 Afférences sensorielles périphériques

Tout comme les afférences supraspinales, les afférences sensorielles périphériques, du système somatosensoriel, régulent elles aussi le patron locomoteur en l'adaptant aux différentes contraintes environnementales.

Deux types d'afférences sensorielles ont été initialement décrites par Sherrington (Sherrington, 1910a) : celles provenant des extérocepteurs et celles provenant des propriocepteurs. Les extérocepteurs situés dans la peau sont à l'origine des afférences cutanés et encodent les stimuli externes. Les propriocepteurs situés au niveau des muscles et des articulations, sont, quant eux, à l'origine des afférences musculaires et articulaires et encodent la position et le mouvement des membres. Jumelées aux interneurons spécifiques de la moelle épinière, ces afférences sont à l'origine des réflexes cutanés et musculaires permettant d'initier et de moduler l'activité musculaire directement ou via le CPG locomoteur (McCrea, 2001; Jankowska, 1992; Jankowska, 2008; Rossignol et al., 2006).

Les extérocepteurs ont une grande influence sur le patron locomoteur. Parmi ceux-ci on retrouve les disques de Merkel, les corpuscules de Pacini et de Meissner qui sont à l'origine des réflexes cutanés. Ces réflexes sont important pour l'expression du patron locomoteur puisqu'ils contrôlent en partie la transition entre les différentes phases du cycle de marche (Rossignol et al., 2006) et jouent un rôle important lors de la correction des

mouvements locomoteurs suite au trébuchement (« stumbling corrective response ») (Forssberg et al., 1977). Ces afférences sont préservées dans le type de préparation utilisée lors de notre étude et assureront l'expression d'un patron locomoteur adéquat. De plus, dans certaines conditions, des stimuli cutanés seront appliqués à différentes parties du corps afin d'initier la marche. Par exemple, il a été montré qu'une stimulation périnéale est très efficace pour déclencher la locomotion (Sherrington, 1910a).

Au sujet des propriocepteurs, notons que le fuseau neuromusculaire, à l'origine des afférences musculaires primaires de type Ia, perçoit la longueur et la vitesse d'étirement des muscles et est responsable du réflexe d'étirement. Durant la locomotion, ce réflexe stabilise la trajectoire des pattes et aide à générer la force musculaire pendant la phase d'appui. L'organe de Golgi, à l'origine des afférences musculaires primaires de type Ib, qui perçoit la contraction musculaire, est un autre exemple de propriocepteurs. Associé aux interneurons spécifiques, le réflexe dont il est responsable (« load receptor reflex ») participe au support de poids durant la phase d'appui ainsi qu'au rythme et à la synchronisation du cycle de marche (Whelan et al., 1995). Ces propriocepteurs à l'origine des afférences de type I permettent à un chat spinal de s'adapter à différentes vitesses d'un tapis roulant en régulant la durée de la phase d'appui (Whelan et al., 1995; Rossignol et al., 2006). Un dernier exemple d'information proprioceptive, les afférences de type II ayant pour origine le fuseau neuromusculaire, mesurent la longueur du muscle et seraient également impliquées dans la locomotion, par exemple, lors de la transition entre la phase d'appui et la phase de balancement (Shefchyk et al., 1990).

Ces exemples ne constituent qu'un survol des implications des propriocepteurs durant la marche, mais pertinents dans la mesure où les afférences sensorielles périphériques représentent un input important au contrôle de la locomotion, particulièrement pour la préparation utilisée dans la présente étude. En effet, chez le chat décérébré au niveau pré-colliculaire / pré-mammillaire marchant spontanément sur tapis roulant, le feedback sensoriel participe au déclenchement et à la modulation de la marche. De plus, comme nous le verrons plus loin, plusieurs de ces afférences sensorielles sont modulées par le système

noradrénergique. Ces connexions pourraient donc être affectées par nos injections de yohimbine.

4.3 Pharmacologie

4.3.1 Rôle des principaux systèmes de neurotransmetteurs

Les afférences, qu'elles soient supraspinales ou sensorielles, modulent l'expression du patron locomoteur en libérant des neurotransmetteurs sur des récepteurs spécifiques. L'utilisation d'agents pharmacologiques, agonistes ou antagonistes de ces récepteurs, permet d'étudier ces interactions.

Nous nous concentrerons ici sur les principaux acteurs impliqués dans l'initiation et la modulation du patron locomoteur, à savoir les systèmes glutamatergique, sérotoninergique, dopaminergique, cholinergique et noradrénergique (Jordan et al., 2008). En plus des expériences portant sur l'influence de ces différents types de neurotransmetteurs chez le chat, nous porterons attention à celles réalisées sur une préparation *in vitro* de moelle épinière isolée de rats nouveau-nés où des électrodes accolées aux racines ventrales des segments lombaires ou directement dans les pools de motoneurones permettent d'enregistrer de façon extracellulaire ou intracellulaire la réponse motrice de la moelle. Il est important de préciser l'implication de ces différents systèmes chez le rat puisque, comme nous en discuterons plus loin, cette préparation a largement servi à localiser différents éléments du réseau locomoteur immature via l'application d'agents pharmacologiques (Cazalets, 2000).

Le système glutamatergique est impliqué dans l'initiation de la locomotion. Le glutamate, un acide aminé exciteur, est un des neurotransmetteurs de la voie

réticulospinale. Chez le rat nouveau-né l'activité locomotrice fictive des pattes postérieures peut être induite par administration de NMDA (N-méthyl-D-aspartate) un agoniste glutamatergique (Kudo et Yamada, 1987; Cazalets et al., 1990). L'induction de la marche par ce même agoniste a également été montrée chez le chat décérébré (Douglas et al., 1993). Cette étude montrait également que l'AP5 (2-amino-5-phosphonovaleric acid), antagoniste des récepteurs NMDA, et le CNQX (cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), antagoniste des récepteurs non-NMDA, pouvait bloquer la locomotion fictive ou sur tapis roulant évoqué par des stimulations électriques de la RLM (Douglas et al., 1993). Par contre, chez le chat spinal chronique, le NMDA ne déclenche pas la locomotion tôt après la spinalisation. En contre partie, une fois qu'il a récupéré la marche, l'AP5 peut l'abolir et le NMDA peut renverser cet effet, alors que le blocage des récepteurs NMDA ne cause que de légers déficits chez le chat intact (Chau et al., 1994; Rossignol et al., 2001; Giroux et al., 2003).

La sérotonine (5-HT ou 5-hydroxytryptamine) est également impliquée dans l'initiation de la locomotion et origine principalement du noyau raphé, mais est également utilisée par la voie réticulospinale (Jordan et al., 2008). Des études sur des rats néonataux ont montré qu'un patron de locomotion fictive pouvait être évoqué dans les racines ventrales de la moelle grâce à un agoniste de différents sous-types de récepteurs sérotoninergiques (5-HT₁, 5-HT₂, 5HT₃) de façon dose-dépendante (Cazalets et al., 1990; Cazalets et al., 1992). Toutefois, l'application d'un mélange de sérotonine et d'un agoniste glutamatergique (5-HT/NMDA), s'est avérée être encore plus efficace pour obtenir une activité locomotrice persistante (Sqalli-Houssaini et al., 1993). Par contre, chez le chat spinal, le système sérotoninergique semble plutôt jouer un rôle modulateur dans l'expression du patron locomoteur. La quipazine un agoniste sérotoninergique, peut augmenter l'amplitude et la durée des EMGs fléchisseurs et extenseurs, mais ne peut pas induire à elle seule la locomotion (Barbeau et Rossignol, 1991).

La dopamine (DA) peut également initier des rythmes locomoteurs chez le rat nouveau-né (Kiehn et Kjaerulff, 1996) et moduler des rythmes induits par le NMDA (Barrière et al., 2004). La modulation dopaminergique est aussi observée chez le chat. Comme la sérotonine, la dopamine seule ne pourrait pas induire de locomotion chez le chat spinal, mais modulerait l'activité musculaire en diminuant l'amplitude des EMGs extenseurs et augmentant celle des fléchisseurs (Barbeau et Rossignol, 1991).

L'acétylcholine (ACh), couplée à un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, peut induire chez le rat nouveau-né des rythmes locomoteurs (Cowley et Schmidt, 1994; Cowley et Schmidt, 1997). Un réseau de cellules propriospinales cholinergiques a également été mis en évidence (Jordan et Schmidt, 2002). Il en sera question dans la discussion.

4.3.2 Système noradrénergique

Le système noradrénergique sera traité plus en détail puisqu'il est au centre de la problématique présentée dans cette l'étude. La noradrénaline est impliquée dans les réflexes autonomes et la modulation de la douleur, mais nous nous concentrerons ici sur l'influence locomotrice de ce neurotransmetteur et particulièrement sur le sous-type de récepteurs noradrénergiques alpha-2 puisqu'un antagoniste noradrénergique alpha-2, la yohimbine (Goldberg et Robertson, 1983; Lambert et al., 1978) sera utilisé dans ce projet.

Les noyaux médial et parabrachial, le noyau de Kolliker-Fuse, mais surtout le locus coeruleus et sub-coeruleus sont les principales sources de noradrénaline que l'on retrouve dans la moelle épinière (Dahlstrom et Fuxe, 1964). Alors que les noyaux Kolliker-Fuse et sub-coeruleus projettent vers la moelle épinière par les parties dorsale et ventrale du funicule latéral, le locus coeruleus emprunte la partie ventrale (Stevens et al., 1985). Le locus coeruleus se situe à proximité de la RLM, suggérant son implication potentielle lors de la locomotion induite par stimulation de la RLM (Steeves et al., 1975). D'ailleurs, des

projections noradrénergiques directes aboutissant au niveau lombaire en provenance du locus coeruleus ont été identifiées chez le chat (Fung et al., 1994).

Il a été montré que le rôle prépondérant du système noradrénergique pour le déclenchement de la locomotion est indéniable chez le chat. Bien qu'une déplétion partielle de noradrénaline spinale (jusqu'à 14% de valeur contrôle au niveau lombaire de la moelle épinière) par l'administration de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et d'alpha-méthyltyrosine (AMT) n'abolit pas la locomotion induite par stimulation de la RLM chez le chat décérébré (Steeves et al., 1980), plusieurs études ont confirmé que la noradrénaline (ou ces agonistes) pouvait induire à elle seule la locomotion chez le chat.

Tout d'abord, des rythmes locomoteurs chez le chat spinal peuvent être obtenus sous l'effet de la L-DOPA potentialisée par la nialamide (Grillner et Zangger, 1979; Pearson et Rossignol, 1991). La L-DOPA est un précurseur noradrénergique transformé au niveau des terminaisons axonales en noradrénaline qui agit sur les récepteurs noradrénergiques post-synaptiques. L'activation des récepteurs noradrénergiques alpha-2 serait responsable de l'induction de ce rythme locomoteur. À elle seule la yohimbine, antagoniste noradrénergique alpha-2, ne bloquera pas la locomotion d'un chat spinal (Giroux et al., 2001). Par contre, l'administration intrapéritonéale (i.p.), intraveineuse (i.v.) ou intrathécale (i.t.) de clonidine, un agoniste noradrénergique alpha-2, peut déclencher la locomotion d'un chat sur tapis roulant quelques jours seulement après une lésion complète de la moelle épinière (Forssberg et Grillner, 1973; Barbeau et al., 1987; Barbeau et Rossignol, 1994; Rossignol, 1996; Chau et al., 1998a; Chau et al., 1998b). Aussi, quelques jours après une spinalisation, (suite au choc spinal), l'administration quotidienne de clonidine combinée à un entraînement sur tapis roulant quotidien permet au chat de récupérer ses capacités locomotrices beaucoup plus rapidement. De cette façon l'animal récupérera une marche avec support de poids et placement du pied 6 à 11 jours après l'opération, plutôt que 3 à 4 semaines avec l'entraînement seul (Chau et al., 1998a). Le système noradrénergique semble donc jouer un rôle central dans l'initiation et la réorganisation du réseau locomoteur suite à une spinalisation.

La clonidine n'aura toutefois pas le même effet chez le chat spinal chronique ayant récupéré ses capacités locomotrices. À ce stade (1 à 3 mois suivant la spinalisation), l'administration de clonidine n'améliore pas la locomotion, mais augmente plutôt le traînement du pied, diminue le support de poids et allonge le cycle locomoteur en augmentant la durée des EMGs, contrairement aux agonistes alpha-1 qui améliorent le support de poids en augmentant l'activité des extenseurs (Chau et al., 1998b; Barbeau et al., 1987; Barbeau et Rossignol, 1991).

Chez le chat intact, l'administration i.t. de clonidine n'aura que très peu d'effet mis à part une diminution de la durée du cycle de marche (Giroux et al., 2001). Cependant, chez ce même chat l'administration i.t. de yohimbine (800-1600 µg/100µl) causera des déficits majeurs se traduisant par une locomotion asymétrique, des trébuchements et une mauvaise stabilité latérale, sans toutefois abolir complètement la marche. A plus faible dose (400 µg/100µl), seuls quelques déficits mineurs, tel que l'abduction d'une des deux pattes postérieures, ont pu être observés. Des résultats similaires ont récemment été observés chez le rat intact où une administration i.t. de yohimbine perturbait la locomotion de façon dose-dépendante, allant d'une instabilité posturales (50 µg/20 µl) jusqu'à une paralysie complète des pattes postérieures (200 µg/20 µl) (Majczynski et al., 2006). Par contre, le système noradrénergique du rat ne semble être en mesure à lui seul d'initier la locomotion, mais de plutôt moduler l'activité locomotrice. L'administration de noradrénaline sur une préparation de rat nouveau-né, provoque une alternance gauche-droite de l'activité des motoneurones fléchisseurs et extenseurs, mais ce rythme est beaucoup trop lent (période de 60 s) pour être compatible avec celui d'une activité locomotrice. Elle peut tout de même moduler l'activité du réseau locomoteur. Les agonistes alpha-1 accélèrent la fréquence des activités locomotrices induites par le NMDA, alors que les agonistes alpha-2 et beta la diminuent (Sqalli-Houssaini et Cazalets, 2000; Kiehn et al., 1999).

À la lumière de ces résultats les récepteurs noradrénergiques alpha-2 semblent donc être une cible de choix pour initier et moduler la locomotion. Les récepteurs

noradrénergiques alpha-2 seront ciblés dans l'étude présentée ici par des injections intraspinales de yohimbine afin d'en étudier l'effet sur le patron locomoteur du chat décérébré. Pour cette raison, il est nécessaire de connaître la distribution de ces récepteurs dans la moelle épinière.

Les terminaisons des fibres noradrénergiques se retrouvent à tous les niveaux de la moelle épinière. Chez le rat nous savons que ces terminaisons aboutissent principalement au niveau de la corne dorsale superficielle, de la corne ventrale, de la colonne intermédiolatérale et autour du canal central (Commissiong et al., 1978; Westlund et al., 1982; Westlund et al., 1983). La localisation de ces terminaisons est corrélée à la distribution des récepteurs alpha-2 (Roudet et al., 1994a). Chez le chat, les récepteurs noradrénergiques alpha-2 sont aussi distribués à tous les niveaux de la moelle épinière avec une forte concentration au niveau de la lamina II et autour du canal central (lamina X) et une concentration modérée dans les lamina III et IX. Suite à une spinalisation, on observe, 15 à 30 jours après la lésion, une augmentation de la densité de ces récepteurs dans les laminae II, III, IV et X avant de revenir à des niveaux de base (Giroux et al., 1999).

La distribution rostro-caudale de ces récepteurs est beaucoup moins bien connue. Chez le chat intact la distribution des récepteurs noradrénergiques alpha-2 est inconnue au niveau thoracique, mais a été étudié au niveau lombo-sacré (L1-S3) et leur densité était plus élevée aux segments S2 et S3 (Rossignol et al., 2002b). Aussi des études préliminaires chez le chat ont montré que 30 jours après la spinalisation ce sous-type de récepteurs était ajusté à la hausse (up-regulated) dans les segments L3-L5 (laminae II, III, V and X) et ajusté à la baisse (down-regulated) dans les segments L6 à S3 (laminae II, III, V, VI, VII and X) (Chau et al., 2000). Une augmentation de la densité des récepteurs noradrénergiques alpha-2 au niveau lombaire, suite à une lésion de la moelle, a également été observée chez le rat (Roudet et al., 1994a). Ces observations suggèrent l'implication de ces récepteurs lors de la réorganisation du réseau locomoteur suite à une blessure médullaire et confirme leur importance dans l'expression du patron locomoteur.

5. Localisation du réseau locomoteur

5.1 Modèle distribué et modèle localisé

La localisation du CPG locomoteur n'est pas clairement définie et fait encore l'objet de divergences d'opinions à savoir s'il est distribué tout au long de la moelle lombo-sacrée ou localisé dans quelques segments et distribuant ses commandes vers les niveaux plus caudaux. Des expériences réalisées sur une préparation *in vitro* de moelle épinière de rat nouveau-né ont donné lieu à deux modèles de distribution rostro-caudale du réseau responsable de la genèse de la locomotion. Différentes drogues ont été utilisées comme outils pharmacologiques pour supporter l'un ou l'autre de ces modèles. Nous savons que chez le rat, les motoneurones des pattes postérieures se retrouvent principalement aux segments L4-L5, mais s'étendent de L1 à L6. Mais quels segments sont responsables de la commande locomotrice agissant sur ces populations de motoneurones ?

Le premier modèle propose que ce réseau est distribué dans plusieurs segments de la moelle épinière thoracique et lombaire avec une excitabilité accrue des segments plus rostraux (Kiehn et Butt, 2003; Kiehn, 2006). Cette hypothèse fût articulée suite aux expériences montrant que tous les segments de la moelle thoracique et lombaires exprimaient une rythmicité en présence de 5-HT seule (Cowley et Schmidt, 1997) ou d'un cocktail de 5-HT et de NMDA (Kremer et Lev-Tov, 1997). Toutefois, la capacité de générer des rythmes rapides et réguliers en réponse à l'administration d'un mélange 5-HT / NMDA diminuait graduellement vers les segments plus caudaux (Kjaerulff et Kiehn, 1996). Aussi, des connexions inhibitrices croisées (cross-inhibitory connections) impliquées dans l'élaboration de ce rythme étaient présentes entre chacun des segments

allant de T12 à L4 (Kremer et Lev-Tov, 1997), bien qu'une transection sagittale allant de la jonction thoraco-lombaire jusqu'au cône terminal n'abolit pas les rythmes locomoteurs induits par la 5-HT (Cowley et Schmidt, 1997). Afin d'isoler les segments essentiels à la genèse du patron locomoteur des transections transversales ont été réalisées sur ce même type de préparation. Une première transection à la jonction des segments T4/T5 ne bloquait pas le patron locomoteur enregistré au niveau des nerfs tibial et péronier activés par l'application de sérotonine (5-HT), pas plus qu'une deuxième transection à la jonction T12/T13. Par contre, une troisième transection de la moelle à la jonction entre T13/L1 bloquait tout rythme locomoteur entre ces deux nerfs (Cowley et Schmidt, 1997). Aussi, une section à L3 abolissait les rythmes caudaux induit par le NMDA, bien des rythmes plus lents réapparaissait si l'on doublait la concentration de ce dernier (Kremer et Lev-Tov, 1997). Nous retiendrons que ces expériences chez le rat nouveau-né montraient que tous les segments de la moelle épinière thoracique et lombaire pouvaient exprimer des rythmes locomoteurs avec un gradient rostro-caudal d'excitabilité, suggérant que le CPG locomoteur du rat nouveau-né est distribué le long de la moelle thoracique et lombaire.

Contrairement au modèle précédent, le laboratoire du Dr Cazalets a réalisé plusieurs études, sur cette même préparation, et suggère que les éléments essentiels à la rythmogénèse de la locomotion étaient localisés dans quelques segments rostraux de la moelle épinière lombaire (Cazalets, 2000). L'application d'un mélange 5-HT / NMDA restreinte aux segments L1-L2 uniquement, permettait d'enregistrer un patron locomoteur dans les racines ventrales de tous les segments lombaires et dans les pools de motoneurones du segment L5, alors que ces mêmes applications de neurotransmetteurs aux segments caudaux à L2 ne provoquait aucun rythme (Cazalets et al., 1995). Les segments lombaires plus caudaux semblent donc recevoir une commande rythmique des segments plus rostraux (L1-L2). Pour vérifier cette hypothèse, une hémisection de la moelle fut réalisée à la jonction L2/L3 (Bertrand et Cazalets, 2002). Le rythme locomoteur enregistré dans les segments caudaux à l'hémisection (L5) persistait du côté controlatéral et était abolit du côté

ipsilatéral. La section complète abolissait complètement tout rythme locomoteur enregistré caudalement. Les segments lombaires rostraux semblent donc essentiels à l'établissement du patron locomoteur, bien que des rythmes gauche / droite aient été observés dans les régions isolées de la moelle épinière thoracique, lombaire ou caudale en présence de 5-HT / NMDA (Falgairolle et Cazalets, 2007). Nous retiendrons que ces segments, dits pré-motoneuronaux, semblent être, à eux seuls, en mesure de générer le rythme et d'organiser le patron locomoteur et ainsi envoyer cette commande motrice spécifique aux motoneurons situés dans les segments caudaux de la moelle lombaire, suggérant que le CPG locomoteur du rat nouveau-né est localisé dans ces quelques segments.

Le débat sur la localisation du réseau locomoteur chez le rat nouveau-né n'est pas encore tout à fait clos. Toutefois des expériences chez le rat adulte confirment l'importance des capacités rythmogènes des segments de la moelle lombaire rostrale, appuyant l'hypothèse d'un CPG localisé. Une blessure médullaire au niveau des segments T13-L2 altérerait d'avantage le patron locomoteur du rat que ces mêmes blessures au niveau thoracique ou au niveau des segments L3-L4 (Garcia-Alias et al., 2006a; Magnuson et al., 2005b). Ces déficits peuvent être corrélés à une atteinte à des éléments cellulaires plutôt qu'aux fibres de la matière blanche. Effectivement, une destruction de matière grise par injection i.t. d'acide kaïnique, une excitotoxine, au niveau thoracique (T8) n'aura aucun effet sur la locomotion du rat alors que la même administration de cette drogue au niveau des segments lombaire rostraux (L2) provoquera des déficits majeurs du patron locomoteur (Magnuson et al., 1999).

5.2 Importance des segments L3-L4 chez le chat

La distribution rostro-caudale du CPG locomoteur n'est pas clairement définie chez le chat non plus. Certaines expériences chez le chat spinal (T12) curarisé ont montré que les

capacités rythmogènes s'étendaient sur plusieurs segments du renflement lombaire (L3-S1). Une deuxième transection au niveau rostral du segment L5, isolant la région L6-S1, n'empêchait pas des rythmes alternés, induit par la L-DOPA, enregistrés entre les nerfs tibial antérieur et gastrocnémien latéral, respectivement responsable de l'extension et la flexion de la cheville. Ce rythme avait une période d'une seconde, donc compatible avec le rythme locomoteur (Grillner et Zangger, 1979). D'autres expériences chez le chat curarisé, suggèrent que les segments L3-L5 jouent un rôle central dans la rythmogénèse du grattage, autre rythme généré au niveau de la moelle épinière, bien que plusieurs autres segments lombaires aient aussi la capacité de générer ce rythme (Deliagina et al., 1983).

Depuis, plusieurs expériences ont montré le rôle prépondérant des segments mi-lombaire de la moelle épinière, à savoir L3-L4, pour la genèse et l'expression du patron locomoteur chez le chat. Ces segments sont dits pré-motoneuronaux puisque les pools de motoneurones innervant les muscles des pattes postérieures, et donc actif durant la locomotion, sont principalement situés entre L5 et S1 (Vanderhorst et Holstege, 1997; Yakovenko et al., 2002). En effet, ces segments contiennent des interneurones ayant des projections directes sur les pools de motoneurones des pattes postérieures. Une technique de marquage rétrograde utilisant, par exemple, du WGA-HRP (wheat germ agglutinin avec horseradish peroxidase) consiste à injecter ce marqueur au niveau des nerfs musculaires pour qu'il soit transporté jusqu'au corps cellulaire des motoneurones et de façon transneuronale jusqu'aux interneurones qui innervent ces derniers. Il a été montré chez le chat, par l'intermédiaire de ce processus, que des interneurones des segments L3-L4 étaient marqués si, suite à l'injection du marqueur, le chat était éveillé et actif (après le retrait de l'anesthésie) ou lorsque la voie corticospinale était stimulée (sous anesthésie), suggérant que ces interneurones de dernier ordre relaient des commandes supraspinales (Jankowska et Skoog, 1986).

Connaissant l'importance de la noradrénaline chez le chat spinal pour l'initiation et la récupération de la locomotion, plusieurs agonistes et antagonistes noradrénergiques, particulièrement ceux des récepteurs de sous-type alpha-2, ont été administrés de façon

localisée pour montrer l'importance des segments mi-lombaires dans ces processus chez le chat spinal. Tout d'abord, l'administration i.t. de clonidine où l'extrémité de la canule se terminait au dessus des segments L3-L4 induit la locomotion chez le chat spinal (T13) chronique (Chau et al., 1998b; Chau et al., 1998a). Cependant, plusieurs autres segments ont pu être affectés par la clonidine suite à la diffusion de cette drogue. La clonidine fût donc administrée à l'aide de bains isolant les segments L3-L4 et les segments L5-L7 afin de restreindre la diffusion de la drogue lors d'expériences aigues chez le chat une semaine après sa spinalisation. Des bains de clonidine au niveau des segments L3-L4 ou L5-L7 induisaient une locomotion qui pouvait être bloquée par des bains de yohimbine, aux mêmes segments (Marcoux et Rossignol, 2000). Cette même étude a eu recours à des injections intraspinales, afin de minimiser, à 1 mm de diamètre, la diffusion de la drogue. Ainsi, des microinjections intraspinales de clonidine dans un ou deux segments de L3-L5 déclenchait de la locomotion, alors que des microinjections intraspinales de yohimbine à L3, L4 ou L5, mais pas L6 inhibaient la locomotion déclenchée précédemment par l'administration de clonidine i.v. Ces résultats ont également été obtenus en locomotion fictive (Leblond et al., 2001a). Toutefois la clonidine ne sera plus en mesure de déclencher la locomotion si une deuxième lésion est effectuée à L3 ou L4 (Marcoux et Rossignol, 2000). L'importance des segments L3-L4 a également été démontrée à l'aide de microstimulations électriques intraspinales capables d'induire une locomotion bilatérale chez le chat spinal. Ces stimulations, combinées à l'administration de clonidine i.v., n'étaient plus efficaces à l'induction de la locomotion si la yohimbine était micro-injectée ou encore si une deuxième lésion était effectuée au niveau des segments L3 ou L4 (Barthelemy et al., 2007). Ces segments mi-lombaires sont aussi essentiels à la locomotion du chat spinal chronique ayant récupéré pleinement ses capacités locomotrices. Une deuxième transection au niveau L2 ou à la jonction L2-L3 n'empêche pas cette marche. Toutefois, une deuxième lésion complète à L3 ou L4 abolit définitivement l'expression du patron locomoteur, même après plusieurs semaines d'entraînement supplémentaire (Langlet et al., 2005). Suite à cette dernière lésion, le secouement rythmique de la patte (fast paw

shake) est toujours observé, en réponse à un pincement du pied ou à son contact avec l'eau, suggérant que l'intégrité du réseau de motoneuronies est conservée. Il est donc clair que l'intégrité des segments L3-L4 est cruciale à l'expression de la marche chez le chat spinal.

Problématique

Comme nous l'avons vu, l'intégrité des segments L3-L4 est essentielle à l'expression du patron locomoteur chez le chat spinal. De plus, les récepteurs noradrénergiques alpha-2 y jouent un rôle central au niveau de l'initiation de la locomotion. Toutefois, bien que nous sachions que la locomotion du chat intact puisse être altérée en bloquant ce sous-type de récepteurs, nous ne connaissons pas l'importance relative des différents segments pour l'établissement du patron locomoteur. Est-ce que les récepteurs noradrénergiques alpha-2 au niveau des différents segments thoraciques et lombaires sont nécessaires à l'expression de la locomotion chez l'animal n'ayant pas subi de lésion de la moelle épinière, sachant que les afférences supraspinales et par conséquent les autres systèmes de neurotransmetteurs sont préservés ?

Pour répondre à cette question, nous avons choisi la préparation de chat décérébré (pré-colliculaire, pré-mamillaire) où la plupart des voies descendantes originaires du tronc cérébral sont préservées. Cette préparation donne lieu à l'expression spontanée d'une marche sur tapis roulant, que nous tenterons de moduler ou de bloquer à l'aide de micro-injections intraspinales de yohimbine. En bloquant les récepteurs noradrénergiques alpha-2 au niveau de différents segments spécifiques de la moelle épinière thoracique et lombaire nous établirons leur importance relative à l'établissement du patron locomoteur dans l'axe rostro-caudal. Les paramètres cinématiques et électromyographiques seront mesurés et analysés afin de quantifier les modifications de la locomotion suite aux injections. Ces expériences nous permettront de mieux comprendre la distribution des éléments

responsables de la rythmogenèse de la locomotion du chat avant une blessure médullaire. Ce travail a été publié dans le *Journal of Neurophysiology* (Delivet-Mongrain et al., 2008).

Chapitre 2 : Article

Effects of localized intraspinal injections of a noradrenergic blocker on locomotion of high decerebrate cats

Hugo Delivet-Mongrain, Hugues Leblond and Serge Rossignol

Affiliation: Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

Running head: Intraspinal yohimbine on decerebrate locomotion

Contact information:

Dr. Serge Rossignol
Department of Physiology,
Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central,
Faculty of Medicine,
Université de Montréal,
P.O Box 6128, Station Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7
Tel.: [information retirée /
information withdrawn]
Fax: [information retirée /
information withdrawn]
E-mail: [information retirée / information withdrawn]

Article in press. J Neurophysiol (June 11, 2008). doi:10.1152/jn.90454.2008
Used with permission.

Abstract

Previous studies demonstrated that neuronal networks located in mid-lumbar segments (L3-L4) are critical for the expression of locomotion in cats following complete spinalization. In the present study the importance of several thoraco-lumbar segments (T8-L7) for the generation of spontaneous hindlimb locomotion in decerebrate cats was evaluated. Experiments were performed in high decerebrate cats (n=18) walking spontaneously. Yohimbine, an alpha2-noradrenergic antagonist, was microinjected intraspinally in various thoraco-lumbar segments. Locomotor performance was evaluated with kinematics and electromyographic (EMG) recordings before and after each injection. When and if spontaneous locomotion (SL) was abolished, skin or perineal stimuli (exteroceptive stimuli) were used to trigger locomotion (exteroceptive-induced locomotion or EL). Yohimbine injections at L3 or L4 completely inhibited SL and EL. In contrast, injections at T8 did not interfere with SL or EL. Injections at T10, T11, T12, L5, L6 and L7 inhibited SL but EL could still be evoked. Injections at T13, L1, and L2 had similar effects except that the quality of locomotion evoked by exteroceptive stimulation declined. Combined injection at T13, L1 and L2 abolished SL and EL, in contrast to injections restricted to the same individual segments. Simultaneous injections at L5, L6 and L7 also abolished SL but EL could still be induced. These results suggest that noradrenergic mechanisms in L3-L4 segments are involved in the expression of locomotion in decerebrate cats while antagonizing noradrenergic inputs in individual rostral or caudal segments may alter the

expression and overall quality of the locomotor pattern without abolishing locomotion.

Introduction

Following a complete section of the spinal cord several species can recover hindlimb locomotion (Rossignol, 2000; Orlovsky et al., 1999; Delcomyn, 1980). The re-expression of locomotion depends on the presence of a spinal locomotor central pattern generator (CPG) (Grillner, 1981; Rossignol et Dubuc, 1994; Rossignol, 1996; Rossignol, 2006). This propriospinal network that generates the pattern of hindlimb muscles activity is, under normal conditions, modulated by supraspinal inputs (Armstrong, 1986) and peripheral feedback (Rossignol et al., 1988; Rossignol et al., 2006). The importance of this spinal CPG is highlighted by the fact that adult chronic spinal cats can walk with their hindlimbs on a treadmill some weeks after a complete spinalization at the last thoracic segment (T13) with intense treadmill training (Rossignol et al., 2004a; Barbeau et Rossignol, 1987; Rossignol et al., 2002b). Hindlimb locomotion can also be evoked in adult cats, immediately after spinalization, with intraperitoneal, intravenous (i.v.) or intrathecal (i.t.) administration of clonidine, an alpha2-noradrenergic agonist (Forssberg et Grillner, 1973; Barbeau et al., 1987; Barbeau et Rossignol, 1994; Rossignol, 1996; Chau et al., 1998a; Chau et al., 1998b). Furthermore, a locomotor pattern can be evoked after administering 3, 4-dihydrophenylalanine (L-DOPA), a noradrenergic precursor (Grillner et Zangger, 1979) and recorded on peripheral nerves in curarized cats spinalized at T13 showing clearly the existence of a spinal CPG at the lumbar level.

Although the existence of locomotor CPGs for the hindlimbs is well established in the cat, its localization within the thoraco-lumbar spinal cord is unclear. Experiments on adult cats suggest that L3-L5 segments play a leading role during fictive scratching although the generation of rhythmic oscillations was distributed throughout the lumbosacral spinal cord (Deliagina et al., 1983). Such potential for segmental rhythmogenesis of a reduced number of lumbar segments was also shown using intravenous L-DOPA in fictive conditions (Grillner et Zangger, 1979).

Pharmacological tools were used to study the segmental localization of circuits important for the generation of locomotion in the cat, by restricting the effects of noradrenergic agonists or antagonists to specific spinal segments. For example, intraspinal microinjections of the alpha2-noradrenergic antagonist yohimbine restricted to L3, L4 or L5 segments but not in L6 blocked locomotion induced by an i.v. injection of clonidine in spinal cats (Marcoux et Rossignol, 2000). It was also shown, in the same cats, that lesioning L3 or L4 segments permanently abolished the expression of locomotion by i.v. clonidine. The importance of these mid-lumbar segments was confirmed later in chronically spinalized (T13) cats. Indeed, after these cats recovered spontaneous hindlimb locomotion, a second complete transection at L2 or rostral L3 did not block the expression of spinal locomotion but a second transection at caudal L3 or L4 completely and irreversibly abolished the capacity to trigger hindlimb locomotion even several weeks after the section (Langlet et al., 2005). Finally, recent work with intraspinal microstimulation (ISMS), also showed that, in spinal cats (T13), locomotion induced by electrical stimulation and

clonidine depended on the integrity of the L3-L4 segments (Barthelemy et al., 2007). Indeed, microinjections of yohimbine in L3 or L4 segments or a complete second spinal lesion at L3-L4 abolished all locomotor activity evoked by intraspinal microstimulation ISMS applied at more caudal segments.

Altogether, these results indicate that the integrity of noradrenergic mechanisms at L3-L4 spinal segments is required for the expression of spinal locomotion in cats with a complete spinal section at T13. These mid-lumbar segments contain interneurons that are active during brainstem-evoked fictive locomotion (Shefchyk et al., 1990) and as such should be considered as pre-hindlimb motoneurons segments since most of the hindlimb muscles are innervated by motoneurons located at L5-S1 segments, thus caudal to these mid-lumbar segments (Vanderhorst et Holstege, 1997). Therefore, it may be suggested that these pre-motoneuronal segments play a major role in hindlimb locomotion of spinal cats by driving motoneurons located in more caudal segments.

However whether these segments play such a crucial role also in the expression of locomotion in high decerebrate walking cats, in which all forebrain structures are removed but descending pathways originating from brainstem motor areas are intact, is unclear. It is well established that high decerebrate cats (section at a precollicular-premamillar level) can walk spontaneously on a treadmill (Shik et Orlovsky, 1976; Orlovsky, 1969).

In the present work, we assessed the role of different thoraco-lumbar segments in the generation of spontaneous hindlimb locomotor movements on the treadmill in high decerebrate cats. To this end, yohimbine was injected intraspinally to selectively block

noradrenergic mechanisms at various thoraco-lumbar segments (T8-L7). Our results indicate that the L3-L4 segments play a key role in the expression of hindlimb locomotion in decerebrate cat as is the case for complete spinal cats since their inactivation blocks spontaneous locomotion even with exteroceptive stimulation. Other segments (above and below) contribute to a lesser extent to the actual rhythmogenesis since even though spontaneous locomotion can be blocked by their inactivation, locomotion can still be triggered by exteroceptive stimuli, even though the quality of walking is degraded. Preliminary results were published in abstract form (Leblond et Rossignol, 2003; Delivet-Mongrain et al., 2006).

Methods

General protocol

For this study, 18 adult cats of either sex (3.0 – 7.3 kg) were used to perform acute experiments in which yohimbine, an alpha2-nadrenergic antagonist, was injected intraspinally in individual segments of the spinal cord from T8 to L7, or in some cases, in multiple segments simultaneously. Electromyographic (EMG) recordings and kinematic analyses were used to quantify various aspects of hindlimb locomotion before and after each injection.

Surgery

All surgical procedures were performed in aseptic conditions and approved by the Comité de Déontologie pour l'Expérimentation Animale from the Université de Montréal. Before each surgery, cats were pre-anaesthetized using acepromazine maleate (Atravet; 0.001 mg/kg), glycopyrrolate (0.01 mg/kg) and ketamine (10 mg/kg) administered intra-muscularly. Thereafter, isoflurane 2 %-O₂ 95% was initially administered through a mask and then, after a tracheotomy, through an endotracheal tube. End tidal pCO₂ was continuously monitored (Datex – Normocap® 200) and maintained between 3.5 and 4.5% by adjusting the frequency and volume of a respiratory pump when needed. A feedback-

controlled heating pad, wrapped around the thorax, was servo-controlled using a rectal thermometer to maintain body temperature at around 38 °C. A cannula was inserted in the urethra and maintained throughout the experiment to drain urine. The left carotid artery was cannulated to monitor blood pressure and the right carotid was ligatured just prior to decerebration. The right jugular vein was also cannulated for administration of fluids. A laminectomy was performed at two or three selected thoracic or lumbar vertebrae (T8-L7). The animal was then placed in a spinal fixation unit mounted over a motor-driven treadmill belt and was stabilized with pairs of lateral pins inserted in the iliac fossae as well as on the vertebral bodies of L2 and L4 (Fig. 1). The vertebral fixation served to restrain movements of the vertebral canal and the spinal cord to ensure the accuracy of intraspinal injections, especially when repeated injections at the same site were needed. The head of the cat was fixed in a stereotaxic frame with ear bars and a mouth piece. After craniotomy, a careful decerebration was performed using cauterization of cortical vessels and aspiration of all nervous tissue rostral to the precollicular-premammillar level.

Evaluation of locomotor capabilities

The capacity of cats to walk with the hindlimbs was tested before drug injections. Usually, within the first 150 minutes after decerebration, cats walked spontaneously on the motor driven treadmill belt without any drugs and, most of the time, without exteroceptive stimulation (except that provided by the treadmill belt). Such exteroceptive stimuli

consisted in touching or pinching the skin areas around the ears (pinna stimulation), neck, thorax, shoulder, back, abdomen or perineal region. These stimulations were used in two circumstances. First, when the cat did not walk spontaneously, these stimuli were used to trigger locomotion to ensure that locomotor movements could still be triggered. Secondly, these stimuli were also used when the cat walked spontaneously, to assess their effects on locomotion, as a baseline value, with the aim of comparing locomotor sequences before and after injection with the same stimuli. The locomotion triggered by exteroceptive stimulation was termed EL, for exteroceptive locomotion. Only 2 of the 18 cats (cat M and cat P) never walked spontaneously before the injections. However, because the general excitability of the cats generally diminished several hours after decerebration, 23 of the 62 drug injections were performed on cats walking while using exteroceptive stimulation (see table 1). These trials were performed to confirm previous observations on the effects of yohimbine in the same cat. After each yohimbine injection, sequences of spontaneous locomotion (SL), when present, and exteroceptive-induced locomotion (EL), when present, were then re-evaluated.

The evaluation of the locomotor capabilities of the animal were tested throughout the post decerebration period and injections were stopped when some significant deterioration occurred such as a major decrease in cardiac or respiratory rhythms, blood pressure, pCO₂ or responsiveness to exteroceptive stimulations.

Intraspinal microinjections protocol

Before injecting yohimbine, the dura was cut over the spinal cord at the desired segmental levels and a bath of warm paraffin oil was made to prevent desiccation. The spinal cord was first punctured at four different sites in the targeted segment by the tip the needle to ascertain that such mechanical damage did not prevent SL. Locomotion was at that time re-evaluated. Yohimbine was then microinjected intraspinally (2.5 μ l/injection, 4 injections/segment bilaterally of yohimbine 8mg/ml) in the four sites using a titanium Hamilton syringe with a flexible needle (FlexiFil™ Microsyringe) inserted at a depth of 2 mm paramedially in one of the selected segments (T8-L7). Exceptionally, 6 or 8 injections of yohimbine were performed per segment to make sure that the whole segment was infiltrated by the drug. After yohimbine administration, SL, when present, was first re-evaluated followed by EL, when present. As such, locomotion was tested immediately after the injections and re-evaluated usually at intervals of 10 minutes until the cat recovered a spontaneous locomotor pattern that was similar to that obtained before the injections.

The same protocol of yohimbine injections (4 x 2.5 μ l, 8 mg/ml injected bilaterally per segments) was applied in some cases to more than one segment in close succession (within 15 minutes). These simultaneous injections were performed at T13/L1/L2 (n=6 trials/ 3 cats) and L5/L6/L7 (n=4 trials / 2 cats) to observe the effect of noradrenergic receptors inactivation in several adjacent segments. Identical intraspinal micro-injections of a physiological saline solution (2.5 μ l/injection, 4 injections/segment bilaterally) were also performed as sham trials at T13-L1-L2 to make sure that the observed effects following

yohimbine injections was not due to mechanical damage of the cord. In some experiments, clonidine (10 mg/ml), an alpha2-noradrenergic agonist, was micro-injected intraspinally (2.5 µl/injection, 4 injections/segment bilaterally) to reverse the effects of yohimbine and ensure that the observed effects of yohimbine administration were due to the inactivation of noradrenergic receptors on cellular elements of the selected segment (Marcoux et Rossignol, 2000). Figure 2 illustrates the sequence and the time (in minutes post-decerebration) of yohimbine (individual or simultaneously), clonidine or sham injections in each cat. On average, injections were separated by about 93 ± 52 minutes.

Recordings and analysis

Locomotor capabilities of the cats were evaluated at a speed of 0.3 m/s with EMG recordings synchronized to video recordings. Reflective markers were placed on the skin of the left hindlimb at the level of the iliac crest, the femoral head, the knee joint, the lateral malleolus, the metatarsophalangeal (MTP) joint and the tip of the third toe (Fig. 1) for kinematic measurements and movement reconstruction. Walking sequences were captured by a digital camera (NTSC Panasonic WV-CL920) with a shutter speed of 1/1000s at 30 frames/s and recorded on DVD (Sony RDR-GX315). Frames were then de-interlaced to obtain 60 fields/s and a temporal resolution of 16.6 ms between fields. Custom-made software was used to detect the reflective markers. The X and Y coordinates served to reconstruct hindlimb locomotor movements and calculate the time course of angular

excursion of the various joints (hip, knee, ankle, and MTP). These measurements were synchronized with visually detected step cycle events such as paw contact (left contact, right contact) or paw lift (left lift, right lift). Three flexor muscles were acutely implanted (semitendinosus (St), sartorius anterior (Srt) and tibialis anterior (TA)) and two extensor muscles (vastus lateralis (VL) and gastrocnemius lateralis (GL)) of both hindlimbs. The muscles were implanted with enamel-insulated copper wires (32AWG) and the signals were amplified by AC-coupled amplifiers (Neuralynx lynx-8) (bandwidth of 300 Hz to 10 kHz) digitized (data acquisition board: National Instruments PCI-6071E) at 1 kHz using custom-made acquisition software and recorded on-line on a computer. EMG activity was synchronized to the recorded video by a digital Society for Motion Picture and Television Engineers (SMPTE) time code generator-reader.

A complete step cycle consists of stance and swing phases. The stance phase starts when the foot strikes the treadmill belt and terminates when the foot starts its forward movement. The swing phase begins at this point and terminates as soon as the foot contacts the treadmill belt. Activity was considered to be locomotor only when there was an alternation between flexor and extensor muscles of the same hindlimb and an out-of-phase alternation between homologous muscles of both hindlimbs for a minimum of five (5) consecutive step cycles.

Many parameters were measured to evaluate the locomotor characteristics of a given walking sequence. Step cycle duration was defined as the time elapsed between successive contacts of the same foot and step length as the distance traveled between these

two events. The values of interlimb coupling correspond to the phase value of the onset of the foot contact relative to the onset the foot contact of the other limb. The peak-to-peak angle amplitude for each joint was obtained by subtracting the mean values of the minimum and maximum joint angles of the excursion for each step cycle in a given walking sequence. Custom-made interactive software was used to determine the onset and offset of EMG bursts in each of the ten implanted muscles and to measure burst duration, amplitude and phase. In order to represent the mean EMG activity of different episodes of locomotion, the EMG signals of each step cycle, synchronized on the contact of the left foot, were extracted and normalized to 1024 bins and then averaged. Differences between these different measurements were compared using a multiple-way-ANOVA (test post-hoc: Tukey) and were considered to be significant if the probability of an α type error was ≤ 0.05 .

Results

The following describes the effects of micro-injecting yohimbine in different segments of the spinal cord on the locomotion of decerebrate cats and groups the results according to different segmental sections: L3-L4, T8-L2 and L5-L7. Table 1 summarizes these effects and indicates the number of times yohimbine was injected (trials) in each segment as well as the number of experimental cats, which are identified by a capital letter.

L3-L4 segments

Injections at L3 were performed 8 times in 5 different cats (A, B, C, D, E cats) (see Table 1). In all cases, spontaneous locomotion (SL) and exteroceptive-induced locomotion (EL) was completely blocked 5 minutes after yohimbine injections. The EL was reinstated within an average of 75 ± 20 minutes (60-130 minutes) and, when recovered, SL was observed within an average of 101 ± 16 minutes (85-115 minutes) after the injection. Figure 3 illustrates such an injection at L3 in cat C. This cat walked spontaneously on the treadmill 110 minutes after decerebration. Before injecting yohimbine the needle was inserted in 4 sites bilaterally at rostral and caudal L3 to ensure that mechanically puncturing the spinal cord did not prevent locomotion. Locomotion was unaffected as illustrated in the stick diagrams (Fig. 3A), the averaged angular excursions (Fig. 3B) and the rectified

averaged EMGs (Fig. 3 C) of selected muscles of both hindlimbs during consecutive step cycles ($n = 22$). Yohimbine was then injected at L3 in the same 4 abovementioned sites. Approximately five minutes after injecting yohimbine, SL and EL were abolished (Fig. 3 D-F) and even strong exteroceptive stimulation could not induce locomotion. About 30 minutes post-injection, some faint rhythmical movements (e.g. erratic alternating bursts between flexor and extensor) were observed with strong skin stimulation but there was no SL (not shown). At 70 minutes post- injection EL was observed but became more robust at 80 minutes (Fig. 3 G-I). As seen in the stick figures (Fig. 3G), joint angular excursions (Fig. 3H) and EMG bursts (Fig. 3I), the locomotor pattern was similar to pre-yohimbine even though there were still slight differences such as reduced excursion of the MTP joint. A full recovery of SL was observed 115 minutes post-injection (Fig. 3 J-L) with a different but consistent EMG pattern. In all trials locomotion recovered except for 2 trials (last trial for cats A and B, see Fig. 2) where no recovery was observed after more than 140 minutes. Note that cat B had previously recovered a proper SL after a first trial.

The effect of yohimbine on locomotion was also tested at L4 for a total of 4 trials in 2 different cats (C and G cats) (see Table 1). Similarly to L3, yohimbine injections completely blocked locomotion in all cases. EL was reinstated in both cats after 35 and 50 minutes in cats G and C, respectively. A full SL recovery was observed 85 minutes post-injection in cat G. To ascertain the effects of yohimbine, a second series of injections were performed in cat C after the recovery of EL (e.g. before the recovery of SL). Again

yohimbine blocked locomotion but, in this case, a recovery of locomotion was not observed because of the general deterioration of the preparation late in the experiment.

In one cat, yohimbine was injected at L4 on the right side only (4 injections of 2.5 μ l of yohimbine, 8mg/ml). Five minutes after the injection, SL was observed exclusively in the left hindlimb (e.g. contralateral to the injections) but perineal stimulation induced bilateral walking. During this EL if the right hindlimb was mechanically fixed in a vertical position the left hindlimb could still walk. However, if the left leg was restrained, the right leg could not make any locomotor movement.

Thus, injecting yohimbine at L3-L4 completely abolished locomotion (SL and EL) for a period of 30-60 minutes. Thereafter, strong exteroceptive stimulation could trigger locomotion and SL eventually returned.

Segments T8-L2

Individual T8-T12 segments

Effects of intraspinal injections of yohimbine on locomotion were studied in segments rostral to L3-L4: T8 (n = 4 trials in 2 cats), T10 (n = 2 in 2 cats), T11 (n = 3 in 1 cat), T12 (n = 4 in 2 cats) and T13 (n = 6 in 4 cats), L1 (n = 4 in 3 cats) and L2 (n = 6 in 2 cats).

Injections at T8 were tested 4 times in 2 cats walking spontaneously (cats G and H) (see table 1). In all cases injections at T8 had no effect on SL, as illustrated for cat H in Fig. 4. Indeed, the stick figures of one representative step cycles of SL before (Fig. 4 A) and 5 minutes after (Fig. 4 D) yohimbine are similar, with good foot placement in front or under the hip. The angular excursions before (Fig. 4 B) and after yohimbine (Fig. 4 E) were also similar. The small standard deviation reflects the stability of walking during these consecutive step cycles. Selected EMG bursts before (Fig. 4 C) and after yohimbine (Fig. 4 F) were also similar. The SL remained unaffected over time following injections at T8 (not shown).

Although there were differences between the effects produced by injections at individual segments from T8 to T12 (as shown in table 1 for 3 cats), they were similar enough to justify the regrouping of the data obtained for these segments. First of all, yohimbine at T10, T11 and T12 only blocked SL but not EL. Indeed, exteroceptive stimulation could reinstate a locomotor pattern similar to that generated spontaneously before the injection. Cat M never walked spontaneously contrary to cat H and cat L. In each case, SL, when present, was blocked by yohimbine injections but exteroceptive stimuli remained effective. The SL recovered 10 minutes post-yohimbine at T10 and 18 minutes post-yohimbine at T12 in cat H and 14, 170 and 45 post-yohimbine at T12 for the three trials on cat L. Locomotion of cat H before yohimbine injection at T10 is illustrated in Figure 5 (Fig. 5 A-C). SL was completely blocked from 5-10 minutes post-injection. However, during this time interval, EL similar to that obtained before injections could be

induced (Fig. 5 D-F); but with slight differences, such as the angular excursions of the left knee joint which ranged from 119.7 ± 1.4 to 151.2 ± 3.4 degrees pre-injection compared to 123.3 ± 2.1 to 135.9 ± 2.2 degrees post-injection ($p < 0.05$) (Fig. 5 B-E). However, yohimbine injections at T10 did not affect the locomotor capabilities of the cat during EL in terms of consecutive step cycle (> 20 in both case), step cycle length (32.75 ± 2.23 cm pre and 31.16 ± 1.80 cm post-yohimbine) ($p = 0.059$) of the left leg and the timing between right and left foot contact (0.488 ± 0.036 pre and 0.474 ± 0.026 post-yohimbine) ($p = 0.238$). The SL recovered ten minutes post-injections.

Thus, although yohimbine at T10, T11 or T12 blocked SL for a minimum of 10 minutes a proper EL could be induced during that time.

Individual T13-L2 segments

Yohimbine injections at T13, L1 or L2 also abolished SL but contrary to what was observed at T10, T11 or T12 EL was significantly altered or exceptionally blocked. Microinjection of yohimbine at T13 was tested 6 times on 4 cats (cats D, E, H and L) that all walked spontaneously except for cat D that needed exteroceptive stimulation. Cat E will be discussed separately. In cats H and L yohimbine injection blocked SL in all cases for 40 and 55 minutes, respectively. EL was altered in cats D, H and L and blocked in one trial in cat D. Figure 6 illustrates this effect in cat H, the same cat illustrated in Figure 4 and Figure 5 for the effect of yohimbine injection at T8 and T10 (see Fig. 2). The SL observed (Fig. 6

A-C) was completely blocked 5 minutes post-injections at T13. Exteroceptive stimulation could produce some alternating rhythmical movements in the hindlimbs 5 minutes post-yohimbine (Fig. 6 D-F). These faint movements with no foot placement can be seen in the small amplitude of the stick diagram of the stance and swing phases of a typical step cycle (Fig 6 D) and in the angular excursions of the joints (Fig 6 E). Nevertheless, some rhythmical movements are apparent in the averaged EMGs, especially between bursts in GL and TA in both hindlimbs (Fig. 6 F). These small movements were also observed in cat D after yohimbine injection. However, the deficits observed in cat L after the injections were different. The EL was robust and sustained but the cycle period was diminished (1036 ± 44 ms before and 839 ± 76 ms after the injection) ($p < 0.05$) as well as the step length on the left side (from 32.60 ± 0.94 cm before to 26.72 ± 1.98 after the injection) ($p < 0.05$). The excitability of the cat and the EMG amplitude was also reduced (maximum amplitude of the averaged EMG of LGL and LSt was 25 % reduced and RGL and RSt 45 % reduced). Proper EL recovered after 120 and 100 minutes for cat D, 40 minutes for cat H (Fig. 6 G-I) and 55 minutes for cat L.

In cat E that initially walked spontaneously, yohimbine completely abolished SL and EL and no recovery was observed, even 60 minutes post-injections. Interestingly, 150 minutes post-yohimbine injection, since there was no recovery of locomotion, intraspinal micro-injections of clonidine were performed at T13 as an attempt to re-initiate locomotion to ensure that the inability to walk was not due to a deterioration of the preparation. After 40 minutes, locomotion was observed again with exteroceptive stimulation. At 100 minutes

post-clonidine injections, yohimbine was re-injected at T13 and locomotion was again completely abolished. No recovery was observed 55 minutes later so clonidine was once again applied and EL was reinstated 20 minutes later.

Overall, yohimbine injections at T13 abolished SL and altered or blocked EL.

Similar effects were observed after yohimbine injections at L1 and L2 segments. Intraspinal injections of yohimbine at L1 were tested 4 times in 3 different cats (cats I, K and L) and 6 times in two different cats for L2 (see table 1). When present, SL was always abolished during 57.0 ± 15.6 minutes post-injection (42-80 minutes), although during this time interval, very strong and intense exteroceptive stimulation could induce locomotion. The overall excitability of the cat greatly diminished. Contrary to segments T10-T12 the EL after injections at L1 and L2 was erratic and cats could not make more than a few consecutive steps without showing significant locomotor deficits. Figure 7 illustrates some of these deficits observed during locomotion from 5-75 minutes post-yohimbine injections at L1 in cat L. For instance, the timing between stance of the right and left hindlimbs was irregular as shown by the duty cycles (Fig. 7 C). During those consecutive steps, excursions at the hip and knee were also variable (Fig. 7 D). In addition, the feet rarely made contact in front of the hip (Fig. 7 G). Other EMG (amplitude and duration) and kinematic (percentage of the swing in the step cycle) parameters of locomotion were measured and varied in often different manners after yohimbine injection, so no significant trends were found. Overall,

the effects of yohimbine restricted to T13, L1 or L2 segments blocked SL and strongly altered EL.

In summary, yohimbine injection at segments T8-L2 had different effects on the locomotion of decerebrate cats. There was no effect when injected at T8. However, injections at T10 to T12 blocked SL but EL continued relatively unaltered. Finally, when injected in single segments from T13 to L2, yohimbine blocked SL and strongly altered EL.

Simultaneous injections at T13-L1-L2

Injections were done in succession (less than 5 minutes from each other) in segments T13, L1 and L2 to determine if simultaneously inactivating these adjacent segments had a cumulative effect. Locomotion was assessed immediately after injections at each segment before targeting the next one. Successive injections at T13, L1 and L2 segments, in different orders, were tested 6 times on 3 different cats (cats P, Q and R) with two trials per cats (see Table 1). Locomotion was completely abolished in all trials except in one case (cat R) where locomotion could still be evoked with very strong exteroceptive stimulation albeit with important deficit. The recovery of a proper locomotion as seen before the injection was observed 80.0 ± 17.3 (70-100 minutes) minutes post-injections except for two trials (last trials of cats P and R) in which there was a deterioration of the preparation.

Figure 8 illustrates the effect of yohimbine injections in close succession at T13, L1 and L2 in cat Q that walked with exteroceptive stimulation before yohimbine injections (Fig. 8 A-B). Five minutes after the injections, locomotion ceased and rhythmic activity in all muscles was completely abolished (Fig. 8 C-D) despite exteroceptive stimulation. The EL recovered 60 minutes after the final injections and SL, which was not observed before yohimbine injections, was expressed 70 minutes after the end of injections (Fig. 8 E-F). Fifty minutes later, a second series of injections with the order L2, L1 and T13 was performed (not shown). Both SL and EL were immediately abolished but no recovery was observed. To test whether this was due to an inability to generate locomotion, clonidine was injected at T13, L1 and L2, 200 minutes after the end of the final series of yohimbine injections. EL recovered 10 minutes after clonidine injections and the walking pattern was more robust for the right hindlimb. However, at this point, the vital signs of the animal declined.

In summary, injecting yohimbine in close succession at T13, L1 and L2 completely abolished locomotion, contrary to individual targeting of these same segments. It is important to recall that injections of physiological saline solution at T13, L1 and L2 simultaneously were performed on a spontaneously walking cat (cat R) and no effect on either SL or EL was observed.

Segments L5-L7

Intraspinal injections of yohimbine were also tested in segments caudal to L3-L4: L5 (n = 4 trials in 2 cats), L6 (n = 4 in 2 cats) and L7 (n = 3 in 2 cats), as shown in table 1.

After yohimbine injections at L5, L6 or L7 performed in cat G and N, SL was generally blocked but EL remains. For cat G, yohimbine injection at L5, L6 or L7 blocked systematically SL for a minimum of 15 minutes. During this time, EL was always observed but sometimes with some differences. Note that cat G was the same cat used to test yohimbine injection at T8 where locomotion was unaffected and yohimbine injection at L4 where locomotion was completely abolished (see Fig. 2). For cat N, after yohimbine injection at L5, L6 or L7, SL and EL were always observed. Although the locomotion was robust and sustained for prolonged periods foot drag and a reduction of the step cycle length and duration was observed for the left hindlimb. This alteration of the left hindlimb pattern cannot be conclusively attributed to yohimbine administration because no full recovery was observed. Thus yohimbine injections at L5, L6 or L7 abolished SL but did not block EL.

Simultaneous injections at L5-L6-L7

Three series of injections at L5, L6 and L7 were also performed in close succession 4 times in cats S and once in cat T (see Fig. 2). In all cases SL was blocked but EL was always observed, even when the quantity of yohimbine was doubled (i.e. 8 x 2.5 μ l, 10

mg/ml injected bilaterally per segments) for the last trial in cat S. Figure 9 illustrates SL of cat S before the injection (Fig. 9 A) and EL without locomotor deficits 5 minutes after injecting yohimbine at L5, L6 and L7 (Fig. 9 B). SL recovered 40 to 100 minutes and 17 minutes post-injections for cats S and T, respectively.

Thus, contrary to what was observed after targeting T13, L1 and L2 simultaneously, yohimbine injections at L5, L6 and L7 in close succession did not abolish locomotion.

Discussion

The aim of the present study was to assess the importance of noradrenergic mechanisms of spinal thoraco-lumbar segments in the generation and modulation of hindlimb treadmill locomotion in high decerebrate cats. For this purpose we injected yohimbine, an alpha2-noradrenergic receptor antagonist, directly into different spinal segments and assessed the locomotor ability of the cats. Injecting yohimbine in individual L3 or L4 segments completely abolished the ability of decerebrate cats to generate spontaneous locomotion (SL) and even exteroceptive stimuli could not induce locomotion (EL), suggesting that noradrenergic mechanisms in these segments are important for locomotor rhythmogenesis of decerebrate cats. Inactivating the noradrenergic drive of other individual segments above or below L3-L4 produced variable effects. For instance, injections at T8 had no effect on SL or EL whereas injections at T0-T12 and L5-L7 blocked SL but exteroceptive stimuli could induce a proper EL. Injections in individual T13-L2 segments blocked SL but EL could always be evoked, albeit with some deficits. Simultaneous injections from T13-L2 also abolished SL and EL but combined injections of L5-L7 abolished SL but not EL. Overall our results indicate the importance of the alpha2-noradrenergic receptors at L3-L4 segments for the expression of locomotion in the decerebrate cat while noradrenergic inputs to other individual segments contribute to a variable extent to expression of the locomotor pattern.

Methodological aspects justifying our conclusions will first be discussed and then noradrenergic mechanisms will be considered before proposing a model of the segmental organization of the thoraco-lumbar region implicated in the generation of hindlimb locomotion in decerebrate cats.

Methodological considerations

As this work is based on the effect of intraspinal yohimbine injection in different segments of the spinal cord, it is important to justify why we think the results are solely attributable to the drug administration and not to unspecific effects of the injections themselves. Firstly, inserting the needle or injecting physiological saline solution intraspinally did not affect the locomotor abilities of the cats on the treadmill. Secondly, injecting yohimbine at different individual segments in the same cat did not modulate the locomotor expression in the same manner. For example, in cat H yohimbine injection at T13 dramatically altered the locomotor pattern while it had no effect at T8. Thirdly, when injections perturbed or abolished locomotion, the cat could spontaneously recover in most cases a locomotor pattern similar to that obtained before the injections. Fourth, when it was tried, the effect of yohimbine could be reversed by the intraspinal injection at the same site of clonidine, a specific agonist of the alpha₂-noradrenergic receptors.

Intraspinal administration of the drug was made to minimize diffusion of the drug into adjacent segments, as would be the case with a bath application. When assessed with a Fast green dye, such intraspinal injections diffused approximately 1 mm from the injection site (Marcoux et Rossignol, 2000). In cat G, in which bilateral injections of yohimbine at L4 completely abolished locomotion, a subsequent unilateral injection of yohimbine at this same segment (L4) only affected the ipsilateral hindlimb locomotion indicating that the drug did not diffuse significantly to the contralateral side. In addition, targeting the L5 segment did not block the expression of locomotion suggesting that the drug did not diffuse to the L4 segment, which would have blocked locomotion.

Consequently, if yohimbine altered or blocked hindlimb locomotion when applied to a restricted segment of the spinal cord, this segment must therefore contain noradrenergic elements important for the generation and/or modulation of the hindlimb locomotor pattern in decerebrate cats. On the other hand, the lack of effect of yohimbine injections in a specific segment does not necessarily mean that this segment is not involved in the control of hindlimb locomotion. Its contribution could implicate other neurotransmitter systems such as serotonergic or glutamatergic.

In the present study, when SL was reduced or abolished, EL was used to determine whether the spinal network could still generate hindlimb locomotion. For instance, after injecting yohimbine at T10 (Fig. 5) SL was blocked, but EL could be evoked. Although

yohimbine injection decreased the excitability of the spinal network and hence SL, the locomotor circuitry could still be activated with exteroceptive stimulation. This differs from injections at L3 or L4 in which case it was impossible to generate hindlimb locomotion even with strong exteroceptive stimulation.

Noradrenergic mechanism

To understand the organisation and the mechanism of the central pattern generator (CPG) of locomotion many studies explored different neurotransmitter systems implicated in its modulation in different species (Grillner, 1981; Rossignol et Dubuc, 1994; Rossignol, 1996; Rossignol, 2006). The noradrenergic system is known to influence somatosensory, autonomic and motor functions. The main source of noradrenaline (NA) to the spinal cord are cell groups located in the locus coeruleus and sub-coeruleus, the medial and parabrachial nuclei and the Kolliker-Fuse nucleus (Dahlstrom et Fuxe, 1964). Within the lumbar spinal cord, alpha2-noradrenergic receptors are distributed at all levels, with the highest concentration in lamina II and around the central canal (lamina X), and a moderate density in lamina III and IX (Giroux et al., 1999). In intact cat, the segmental distribution of alpha2-noradrenergic receptors is unclear for the thoracic segments but was studied in lumbosacral spinal segments (L1-S3) and their density was higher in S2 and S3 segments (Rossignol et al., 2002b). However, preliminary unpublished data in spinal cats indicate

that 30 days following spinalization, alpha2-noradrenergic receptors are up-regulated in segments L3-L5 (lamina II, III, V and X) and down-regulated from L6 or L7 to S3 segments (lamina II, III, V, VI, VII and X) suggesting the importance of these receptors in mid-lumbar segments in the expression of spinal locomotion (Chau et al., 2000). In intact rats, alpha2-noradrenergic receptors were correlated with the distribution of NA terminals and were found at all rostro-caudal levels of the spinal cord throughout the whole grey matter with a preferential location in the superficial dorsal horn (Roudet et al., 1994b).

The noradrenergic system was found to activate locomotor activity in cats with complete spinal lesion as mentioned in the introduction and summarized elsewhere (Rossignol et al., 1996). In the present study we showed that the noradrenergic system is important for the expression of locomotion in decerebrate cat, even though other neurotransmitter systems are also most likely involved. On the other hand, it was shown that depletion of brain stem and spinal cord noradrenaline (maximal depletions of NA up to 14% of control in lumbar cord) by administering 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and alpha-methyltyrosine (AMT) did not prevent coordinated locomotion evoked by stimulation of the mesencephalic locomotor region (MLR) in mesencephalic cats (Steeves et al., 1980). This could mean that NA release in the lumbar spinal cord may still have been sufficient or that other neurotransmitter system could trigger locomotion in the absence of noradrenergic inputs, with an effective stimulation. Our present results in the decerebrate cats are in concordance with the role that the noradrenergic system may play even in

locomotion of intact cats since i.t. injections of yohimbine at mid-lumbar segments caused major walking deficits such as asymmetric stepping, stumbling and poor lateral stability during voluntary quadrupedal treadmill walking (Giroux et al., 2001). Similar results were found in intact rats, where i.t. administration of yohimbine in segments T12 to L5 produced dose-dependent impairments of hindlimb locomotion, which varied from a transient trunk instability (50 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) to transient hindlimb paralysis (200 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) (Majczynski et al., 2006).

In the present study, yohimbine could have interacted with sensory and/or supraspinal inputs by acting on interneurons implicated in the integration of inputs necessary for the expression of locomotion. Activity of both Ia and Ia/Ib-inhibitory interneurons is depressed by ionophoresis administration of clonidine in mid-lumbar segments (L3-L5) in adult anaesthetized cats (Hammar et Jankowska, 2003). Furthermore, the activation of commissural interneurons that coordinate left-right muscle activity by group II afferents is depressed by NA (Hammar et al., 2004). It has also been suggested that the activation of these same commissural interneurons by reticulospinal fibres was depressed by clonidine (Hammar et al., 2007). In addition, it has been shown that clonidine decrease the excitability of motoneurons (Bedard et al., 1987). However, our work demonstrates that injecting yohimbine at L5, L6 and L7 segments individually or simultaneously did not prevent locomotion.

Localization

Based on *in vitro* preparations of the neonatal rat spinal cord, two different models of rostro-caudal distribution of the locomotor network have been proposed. The first model suggests that the locomotor-generating network is distributed over the caudal thoracic segments and the entire lumbar cord with a higher excitability of the most rostral segments (Kjaerulff et Kiehn, 1996; Cowley et Schmidt, 1997). The second model suggests a more restricted localization of the locomotor circuitry in rostral lumbar segments (L1-L2) which would project to and drive flexor and extensor motoneurons located in more caudal segments (Cazalets et al., 1995). In the present work we have evidence for the crucial role played by restricted segments L3-L4 but also for a more distributed input from other segments feeding into these L3-L4 segments.

In the cat, the evidence suggesting the importance of L3 and L4 segments for the generation of spinal locomotion is as follows: 1- i.t. injections of clonidine in chronic spinal cats is very effective in evoking locomotion, even when the site of the cannula is at L3-L4; (Chau et al., 1998b; Chau et al., 1998a); 2- intraspinal clonidine and yohimbine at L3-L4 in spinal cats can trigger or abolish locomotion (Marcoux et Rossignol, 2000); 3- lesioning L3-L4 in acute or chronic spinal cats (Marcoux et Rossignol, 2000; Langlet et al., 2005) abolishes the ability of spinal cats to walk; 4- locomotion induced by intraspinal

microstimulation is abolished by intraspinal yohimbine injections at L3-L4 or a by lesioning these segments (Barthelemy et al., 2007).

The present study further proposes that these premotoneuronal L3-L4 spinal segments are important as well for the expression of locomotion in decerebrate cats. However, some experiments in decerebrate cats suggested that the rhythm generator capacity is distributed along the lumbosacral spinal cord although with L3-L5 as the leading segments. Decerebrate curarized cats were used to show that fictive scratch reflex could still be evoked after the gray matter of L3-L4 segments was destroyed (Deliagina et al., 1983). Nevertheless, these mid-lumbar segments contain interneurons receiving inputs from group II afferents (Edgley et Jankowska, 1987a) and having direct excitatory or inhibitory action upon hindlimb motoneurons (Edgley et Jankowska, 1987b) that must be involved in locomotion of the cat (Edgley et al., 1988) since they are active during MLR-evoked fictive locomotion in decerebrate cats (Shefchyk et al., 1990). Also, interneurons receiving inputs from reticulo and/or vestibulospinal neurons that influence the activity of the contralateral hindlimb muscles were found in L3-L5 segments (Krutki et al., 2003).

The key role of pre-motoneuronal segments in the expression of the locomotion is also observed in rats. As is the case for L3-L4 in cats, the L1-L2 segments in rats, which correspond to spinal regions above the main hindlimbs motoneuronal pools, are largely responsible for generating the rhythmic alternating pattern of locomotion which has given

rise to a localized rhythm generating network model. Indeed, recordings of lumbar ventral roots of the isolated rat neonatal spinal cord have shown that bath application of a mixture of serotonin (5-HT) and N-methyl-D,L-aspartate (NMDA) restricted to L1-L2 induced rhythmic locomotor-like activity in all lumbar segment (L1-L5) (Cazalets et al., 1995). Moreover, sectioning the spinal cord between segments L2 and L3 suppressed this rhythmic activity recorded in caudal segments but not at L2 (Bertrand et Cazalets, 2003). In addition, it was shown that injuries in the upper lumbar segments (L2) had more severe consequences on locomotor output of the hindlimbs than injuries targeting thoracic segments (Garcia-Alias et al., 2006b; Magnuson et al., 2005a). These effects can be attributed to cellular elements within the spinal cord and not to white matter tracts since a loss of mid-thoracic gray matter (by intraspinal administration of the excitotoxin kainic acid) had no effect on locomotion whereas a loss of gray matter in the rostral lumbar segments provoked major locomotor deficits (Magnuson et al., 1999). These studies confirm that, as is the case for decerebrate and spinal cats, interneurons at pre-motoneuronal level of the spinal cord are critical for locomotion in rats.

However, our results suggest that these midlumbar segments should be considered as the end points of a chain of more rostral segments which, although individually less important for locomotion, exert powerful effects on locomotion when simultaneously inactivated. This is compatible with the work of others in the rat that suggested that the rhythm-generating network is distributed throughout the caudal thoracic and lumbar region

of the spinal cord with a rostrocaudal excitability gradient (see Kiehn, 2006 for a review). In the isolated neonatal rat spinal cord preparation regular rhythmic activity induced by application of 5-HT / NMDA mixture persist in both rostral and caudal isolated lumbar parts of the spinal cord after transecting the cord at mid-L3 (Kremer et Lev-Tov, 1997), which suggests that the rhythmogenic elements are not restricted to L1-L2 in rats. In addition, in the same preparation, left/right alternation was preserved after a mid-sagittal lesion between T12 and L2 segments (Kjaerulff et Kiehn, 1996). More recently, it was shown that, when isolated, thoracic, lumbar and sacral regions could generate right and left alternating motor bursts induced by 5-HT / NMDA mixture (Falgairolle et Cazalets, 2007). Specialization of different parts of the spinal cord could result for the distribution of different neurotransmitter system used to induce rhythmic activity in rats. For example, in the rat, 5-HT alone produced locomotor-like activity when applied to caudal thoracic or rostral lumbar, but not in caudal lumbar region of the cord (Cowley et Schmidt, 1997) whereas a mixture of 5-HT / NMDA or acetylcholine / acetylcholine esterase inhibitor induced locomotor-like activity when applied in both rostral and caudal parts of the lumbar cord (Cowley et Schmidt, 1997; Kjaerulff et Kiehn, 1996; Gabbay et al., 2002).

The present work also illustrates the relative contribution of other segments (rostral or caudal to L3-L4) in the expression of locomotion in decerebrate cats. Indeed, simultaneously inactivating T13, L1 and L2 segments completely blocked locomotion. However, they are not as important as L3-L4 segments for the generation of the locomotor

pattern since targeting individually one of those segments (T13, L1 or L2) produced important locomotor deficits but did not abolish locomotion. The role of these segments rostral to L3-L4 could be to integrate descending supraspinal inputs from the brainstem before relaying this information to a more caudal locomotor network (Shik, 1983). Such an organization was described at the cervical level. A propriospinal system at segments C3-C4 of the cat spinal cord, projecting to motoneurons located at C6-T1 segments, mediates cortico-, rubro-, reticulo- and tectospinal inputs (for review see Alstermark et al., 2007). In addition, the isolated cervical region can generate the locomotor pattern of the forelimbs as shown in cats (Zangger, 1981) and in rats (Ballion et al., 2001). This spinal interneuronal organization could also exist for the hindlimbs. Experiments done by Shik on the initiation of locomotion in mesencephalic cat suggest a relation between reticulospinal and propriospinal systems at the thoracic level of the spinal cord (Shik, 1997). This lesion study indicates that some propriospinal cells at the thoracic level could be implicated as a relay between reticulospinal descending inputs and the locomotor network in the lumbar enlargement. More recently, using in vitro neonatal rat spinal cord preparations, it was shown that rhythmic lumbar root discharges (recorded at L2 and L5 level) evoked by electrical stimulation of the brainstem, was abolished following the suppression of synaptic activity in the cervicothoracic region (C1-T8) (Zaporozhets et al., 2006). Thus, injecting yohimbine at low-thoracic or high-rostral levels in decerebrate cats could have altered the modulatory role of such an integrating propriospinal network located rostral to the CPG.

In light of our results, we propose a model (Figure 10) of a segmental organization of the locomotor network for the hindlimbs of the cat as viewed from the point of view of one neurotransmitter system, namely noradrenaline. Although this model emphasizes the critical role played by noradrenergic mechanisms in these mid-lumbar spinal segments L3-L4, it also recognizes the importance of combined inputs from more rostral segments in rhythmogenesis. An essential feature of this model is that segments rostral to L3-L4 have multisegmental connections, so that inactivation of one segment does not prevent the action of more rostral segments on L3-L4 segments. A strictly serial activation scheme is not compatible with our results because with such an arrangement, inactivation say of L2 individually would have the same effect as inactivating T13, L1 and L2 simultaneously, which is not the case. Furthermore, as mentioned, descending supraspinal inputs that project directly, and hypothetically via T13, L1, L2, to segments L3-L4 must be required for the full expression of locomotion in the decerebrate cat. Afferent inputs projecting to midlumbar segments may also be of critical importance since midlumbar interneurons receiving peripheral inputs from group II afferents shown to discharge during MLR-evoked fictive locomotion (Shefchyk et al., 1990). Finally, the work of Barthélemy (Barthelemy et al., 2007) shows that ISMS is probably acting mainly through the activation of sensory inputs and also that inputs ascending from lower segments through ventral/ventrolateral pathways (Riddell et Hadian, 2000; Barthelemy et al., 2007).

Therefore, in the scheme proposed, the midlumbar L3-L4 segments would occupy a focal point for the generation of locomotion in the spinal cat and in the decerebrate cat with regard to noradrenergic mechanisms. Several inputs would converge at L3-L4 and the integrity of these segments is essential for the expression of the full hindlimb locomotor pattern. This of course does not mean that other segments do not play a role in the final expression of hindlimb locomotion, but their inactivation does not have the profound effect it has when midlumbar spinal segments are blocked by yohimbine. Although this scheme best represents our results on noradrenergic mechanisms, it is possible that the distribution of the relative segmental importance might differ for other neurotransmitter systems in line with the distribution of their various sub-receptors. For example, since i.t. administration antagonizing NMDA or non-NMDA receptors antagonist in lumbar segments blocked hindlimb treadmill and fictive locomotion induced by MLR stimulation (Douglas et al., 1993), it will be interesting to inject intraspinally various other neurotransmitter blockers in similar preparation as used in this study..

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to sincerely thank J. Provencher for technical assistance during surgery, experiments, analyses and preparation of the illustrations, P. Drapeau for programming, C. Gagner for electronics, C. Gauthier for some of illustrations, and A. Frigon and G. Barrière for comments on the manuscript.

GRANTS

This investigation and the stipend for H.D-M were supported by individual and group grants from the Canadian Institute of Health Research and from a Tier 1 Canada Chair on spinal cord research to S. Rossignol.

Reference list

1. **Alstermark B, Isa T, Pettersson LG and Sasaki S.** The C3-C4 propriospinal system in the cat and monkey: a spinal pre-motoneuronal centre for voluntary motor control. *Acta Physiol (Oxf)* 189: 123-140, 2007.
2. **Armstrong DM.** Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat. *Prog Neurobiol* 26: 273-361, 1986.
3. **Ballion B, Morin D and Viala D.** Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 14: 1727-1738, 2001.
4. **Barbeau H, Julien C and Rossignol S.** The effects of clonidine and yohimbine on locomotion and cutaneous reflexes in the adult chronic spinal cat. *Brain Res* 437: 83-96, 1987.
5. **Barbeau H and Rossignol S.** Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412: 84-95, 1987.
6. **Barbeau H and Rossignol S.** Enhancement of locomotor recovery following spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* 7: 517-524, 1994.

7. **Barthelemy D, Leblond H and Rossignol S.** Characteristics and mechanisms of locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation in spinal cats. *J Neurophysiol* 97: 1986-2000, 2007.
8. **Bedard PJ, Tremblay LE, Barbeau H, Filion M, Maheux R, Richards CL and Dipaolo T.** Action of 5-hydroxytryptamine, substance P, thyrotropin-releasing hormone and clonidine on motoneurone excitability. *Can J Neurol Sci* 14: 506-509, 1987.
9. **Bertrand S and Cazalets JR.** The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Neurosci* 16: 1741-1750, 2003.
10. **Cazalets JR, Borde M and Clarac F.** Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J Neurosci* 15: 4943-4951, 1995.
11. **Chau C, Barbeau H and Rossignol S.** Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *J Neurophysiol* 79: 392-409, 1998a.
12. **Chau C, Barbeau H and Rossignol S.** Effects of intrathecal α_1 - and α_2 -noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 79: 2941-2963, 1998b.
13. **Chau, C., Giroux, N., Reader, T. A., Marcoux, J., and Rossignol, S.** Segmental and laminar distribution of α_2 -adrenergic receptors in cat lumbo-sacral spinal cord following complete lesions. *Society for Neuroscience Abstracts* 26: 695, 2000.

14. **Cowley KC and Schmidt BJ.** Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 77: 247-259, 1997.
15. **Dahlstrom A and Fuxe K.** Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20: 398-399, 1964.
16. **Delcomyn F.** Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science* 210: 492-498, 1980.
17. **Deliagina TG, Orlovsky GN and Pavlova GA.** The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Exp Brain Res* 53: 81-90, 1983.
18. **Delivet-Mongrain, H., Leblond, H., and Rossignol, S.** Effects of intraspinal injections of yohimbine in thoracic and lumbar segments on the spontaneous locomotion of decerebrate cats. *Society for Neuroscience Abstracts Neuroscience Meeting Planner*. Atlanta, GA: 648.8, 2006.
19. **Douglas JR, Noga BR, Dai X and Jordan LM.** The effects of intrathecal administration of excitatory amino acid agonists and antagonists on the initiation of locomotion in the adult cat. *J Neurosci* 13: 990-1000, 1993.
20. **Edgley SA and Jankowska E.** An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 389: 647-674, 1987a.

21. **Edgley SA and Jankowska E.** Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 385: 393-413, 1987b.
22. **Edgley SA, Jankowska E and Shefchyk S.** Evidence that mid-lumbar neurones in reflex pathways from group II afferents are involved in locomotion in the cat. *J Physiol* 403: 57-71, 1988.
23. **Falgairolle M and Cazalets JR.** Metachronal coupling between spinal neuronal networks during locomotor activity in newborn rat. *J Physiol* 580: 87-102, 2007.
24. **Forsberg H and Grillner S.** The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Res* 50: 184-186, 1973.
25. **Gabbay H, Delvolve I and Lev-Tov A.** Pattern generation in caudal-lumbar and sacrococcygeal segments of the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 88: 732-739, 2002.
26. **Garcia-Alias G, Valero-Cabre A, Lopez-Vales R, Fores J, Verdu E and Navarro X.** Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Res* 1108: 195-204, 2006.
27. **Giroux N, Reader TA and Rossignol S.** Comparison of the effect of intrathecal administration of clonidine and yohimbine on the locomotion of intact and spinal cats. *J Neurophysiol* 85: 2516-2536, 2001.

28. **Giroux N, Rossignol S and Reader TA.** Autoradiographic study of α_1 -, α_2 -Noradrenergic and Serotonin $1A$ receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *J Comp Neurol* 406: 402-414, 1999.
29. **Grillner S.** Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. In: Handbook of physiology. The nervous system II., edited by Brookhart JM and Mountcastle VB. Bethesda, Maryland: Amer. Physiol. Soc., 1981, p. 1179-1236.
30. **Grillner S and Zangger P.** On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res* 34: 241-261, 1979.
31. **Hammar I, Bannatyne BA, Maxwell DJ, Edgley SA and Jankowska E.** The actions of monoamines and distribution of noradrenergic and serotonergic contacts on different subpopulations of commissural interneurons in the cat spinal cord. *Eur J Neurosci* 19: 1305-1316, 2004.
32. **Hammar I and Jankowska E.** Modulatory effects of alpha 1-, alpha 2-, and beta -receptor agonists on feline spinal interneurons with monosynaptic input from group I muscle afferents. *J Neurosci* 23: 332-338, 2003.
33. **Hammar I, Stecina K and Jankowska E.** Differential modulation by monoamine membrane receptor agonists of reticulospinal input to lamina VIII feline spinal commissural interneurons. *Eur J Neurosci* 26: 1205-1212, 2007.
34. **Kiehn O.** Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29: 279-306, 2006.

35. **Kjaerulff O and Kiehn O.** Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro: a lesion study.* *J Neurosci* 16: 5777-5794, 1996.
36. **Kremer E and Lev-Tov A.** Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *J Neurophysiol* 77: 1155-1170, 1997.
37. **Krutki P, Jankowska E and Edgley SA.** Are crossed actions of reticulospinal and vestibulospinal neurons on feline motoneurons mediated by the same or separate commissural neurons? *J Neurosci* 23: 8041-8050, 2003.
38. **Langlet C, Leblond H and Rossignol S.** The mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 93: 2474-2488, 2005.
39. **Leblond, H. and Rossignol, S.** Intraspinal injections of yohimbine in midlumbar segments block spontaneous decerebrate locomotion in cats. *Soc. Neurosci Abstr. Abstract Viewer/Itinerary Planner.* Washington, DC: , online: 276.1, 2003.
40. **Magnuson DS, Trinder TC, Zhang YP, Burke D, Morassutti DJ and Shields CB.** Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Exp Neurol* 156: 191-204, 1999.
41. **Magnuson DSK, Lovett R, Coffee C, Gray R, Han YC, Zhang YP and Burke DA.** Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat. *Journal of Neurotrauma* 22: 529-543, 2005.

42. **Majczynski H, Cabaj A, Slawinska U and Gorska T.** Intrathecal administration of yohimbine impairs locomotion in intact rats. *Behav Brain Res* 175: 315-322, 2006.
43. **Marcoux J and Rossignol S.** Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *J Neurosci* 20: 8577-8585, 2000.
44. **Orlovsky GN.** Spontaneous and induced locomotion of the thalamic cat. *Biophysics* 14: 1154-1162, 1969.
45. **Orlovsky GN, Deliagina TG and Grillner S.** *Neuronal control of locomotion: from mollusc to man.* New York: Oxford University Press, 1999.
46. **Riddell JS and Hadian M.** Interneurones in pathways from group II muscle afferents in the lower-lumbar segments of the feline spinal cord. *J Physiol* 522.1: 109-123, 2000.
47. **Rossignol S.** Neural control of stereotypic limb movements. In: *Handbook of Physiology, Section 12. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*, edited by Rowell LB and Sheperd JT. New York: Oxford University Press, 1996, p. 173-216.
48. **Rossignol S.** Locomotion and its recovery after spinal injury. *Curr Opin Neurobiol* 10: 708-716, 2000.

49. **Rossignol S.** Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/ or peripheral lesions in the adult mammals. *Phil Trans R Soc B* 361: 1647-1671, 2006.
50. **Rossignol S, Bouyer L, Langlet C, Barthélemy D, Chau C, Giroux N, Brustein E, Marcoux J, Leblond H and Reader TA.** Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat. *Prog Brain Res* 143: 163-172, 2004.
51. **Rossignol S, Chau C, Brustein E, Bélanger M, Barbeau H and Drew T.** Locomotor capacities after complete and partial lesions of the spinal cord. *Acta Neurobiol Exp* 56: 449-463, 1996.
52. **Rossignol S, Chau C, Giroux N, Brustein E, Bouyer L, Marcoux J, Langlet C, Barthélemy D, Provencher J, Leblond H, Barbeau H and Reader TA.** The cat model of spinal injury. *Prog Brain Res* 137: 151-168, 2002.
53. **Rossignol S and Dubuc R.** Spinal pattern generation. *Current Opinion in Neurobiology* 4: 894-902, 1994.
54. **Rossignol S, Dubuc R and Gossard JP.** Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86: 89-154, 2006.
55. **Rossignol S, Lund JP and Drew T.** The role of sensory inputs in regulating patterns of rhythmical movements in higher vertebrates. A comparison between locomotion, respiration and mastication. In: *Neural control of rhythmic movements in vertebrates*, edited by Cohen A, Rossignol S and Grillner S. New York: Wiley and sons Co, 1988, p. 201-283.

56. **Roudet C, Mouchet P, Feuerstein C and Savasta M.** Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci Res* 39: 319-329, 1994.
57. **Shefchyk S, McCrea DA, Kriellaars D, Fortier P and Jordan L.** Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Exp Brain Res* 80: 290-295, 1990.
58. **Shik ML.** Action of the brainstem locomotor region on spinal stepping generators via propriospinal pathways. In: *Spinal cord reconstruction*, edited by Kao CC, Bunge RP and Reier PJ. New York: Raven Press, 1983, p. 421-434.
59. **Shik ML.** Recognizing propriospinal and reticulospinal systems of initiation of stepping. In: *Motor control*, edited by Human kinetics publishers inc. 1997, p. 310-313.
60. **Shik ML and Orlovsky GN.** Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol Rev* 56: 465-500, 1976.
61. **Steeves JD, Schmidt BJ, Skovgaard BJ and Jordan LM.** Effect of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine depletion on locomotion in the cat. *Brain Res* 185: 349-362, 1980.
62. **Vanderhorst VGJM and Holstege G.** Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46-76, 1997.

63. **Zangger P.** The effect of 4-aminopyridine on the spinal locomotor rhythm induced by L-Dopa. *Brain Res* 215: 211-223, 1981.

64. **Zaporozhets E, Cowley KC and Schmidt BJ.** Propriospinal neurons contribute to bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord. *J Physiol* 572: 443-458, 2006.

FIGURES

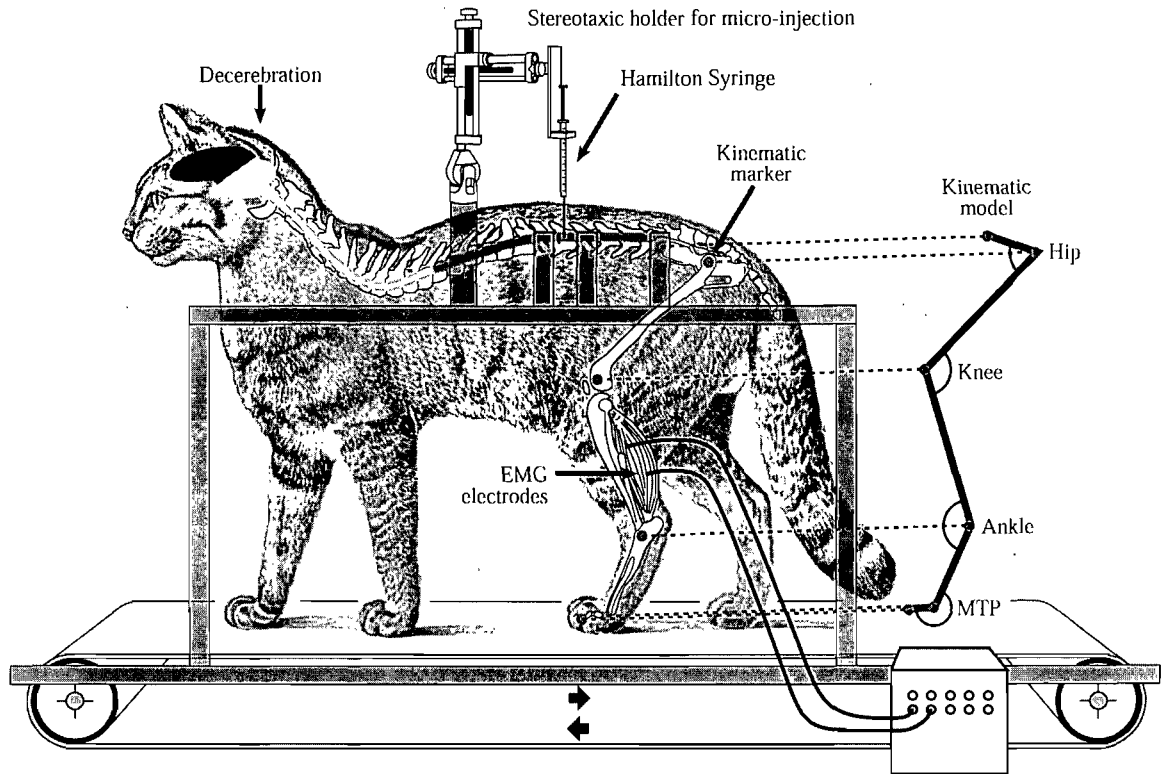


Figure 1. Experimental set-up. After a precollicular-premammary decerebration, the cat is fixed with a rigid frame over the treadmill with two pairs of lateral vertebral pins and one set of pins inserted in the iliac fossae. Reflective markers were placed on the skin over various joints of the left hindlimb to allow the reconstruction of movements according to the kinematic model indicated. The angular orientation was chosen so that the excursion of all joints would be represented by a decrease in angular values in the first part of swing. EMG wires were inserted percutaneously. The Hamilton microsyringe was fixed on a stereotaxic manipulator over the spinal cord to inject yohimbine in the targeted spinal segments indicated in blue.

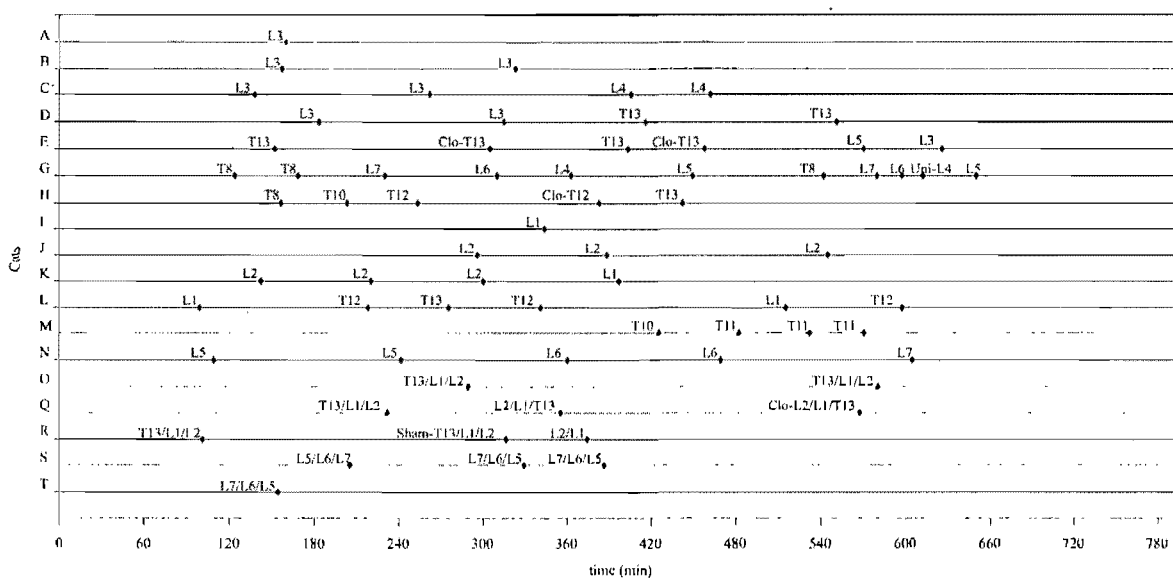


Figure 2. Sequential injections of yohimbine in the various cats. For each cat represented by a letter on the vertical axis, the sequence and the spinal level of injection of yohimbine is indicated relative to the time following decerebration on the horizontal axis. Clo, Clonidine injection ; Sham, physiological saline solution injection ; /, indicate segments injected simultaneously ; Uni, unilateral yohimbine injection.

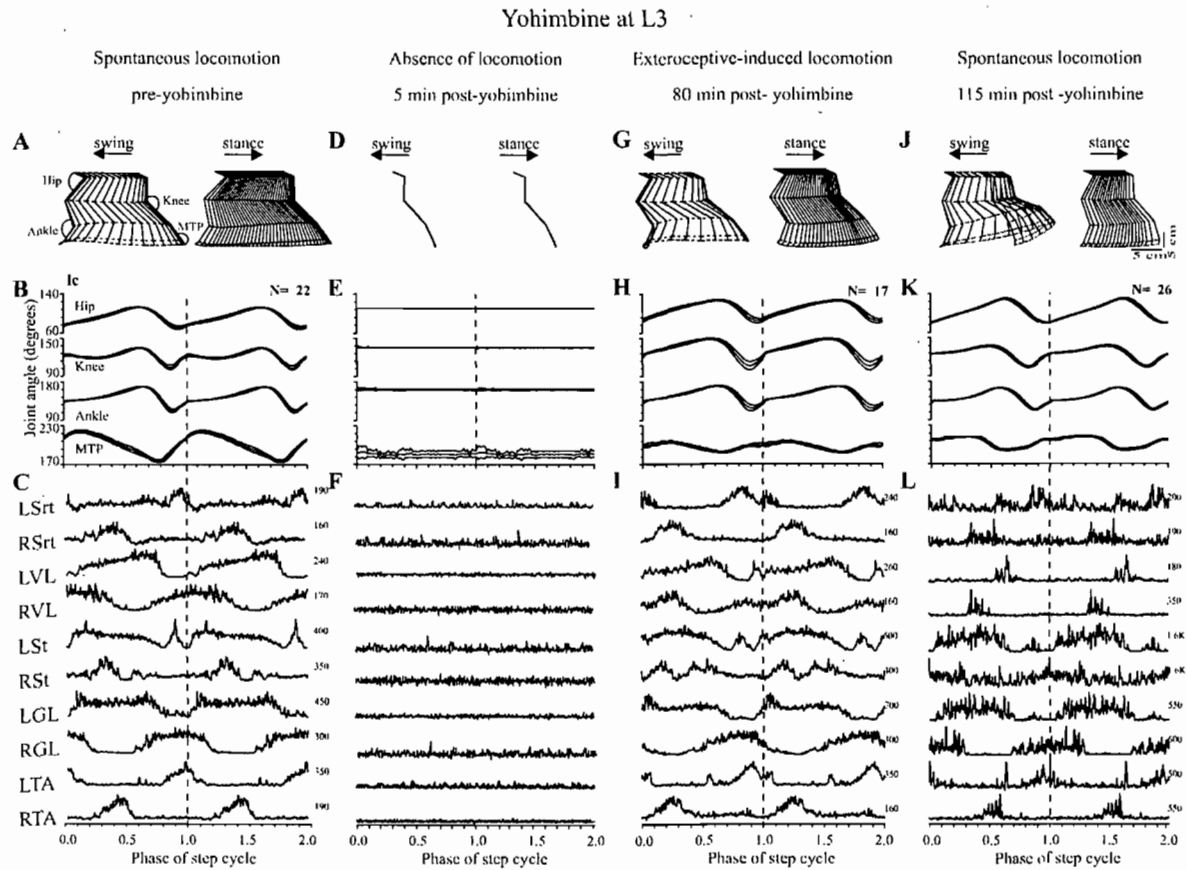


Figure 3. Effects of yohimbine ($4 \times 2.5 \mu\text{l}$ solution 8 mg/ml) at L3 in cat C at 5, 80 and 115 minutes. In the top row (A,D,G,J), the stick diagrams illustrate the swing and stance phases separately for one representative step cycle in each condition. In the middle row (B,E,H,K), the averaged joint angular displacement (mean \pm SD over N cycles) of the left hip, knee, ankle, and metatarso-phalangeal (MTP) joints synchronized to contact of the left foot and repeated twice for the sake of clarity. In the bottom row (C,F,I,L), are represented the rectified, normalized and averaged electromyograms (EMGs) of the hindlimb muscles also synchronized on contact of the left foot for the same number of cycles. A-C: Spontaneous locomotion (SL) at 0.3 m/s before drug injection (22 step cycles). D-F: Locomotion is abolished 5 min after yohimbine injection. G-I: Recovery of exteroceptive-induced

locomotion (EL) 80 minutes post-yohimbine (17 step cycles). J-L: Recovery of spontaneous locomotion 115 minutes post-yohimbine (26 step cycles). L, left; R, right; St, semitendinosus; Srt, sartorius; VL, vastus lateralis; GL, gastrocnemius lateralis; GM, gastrocnemius medialis.

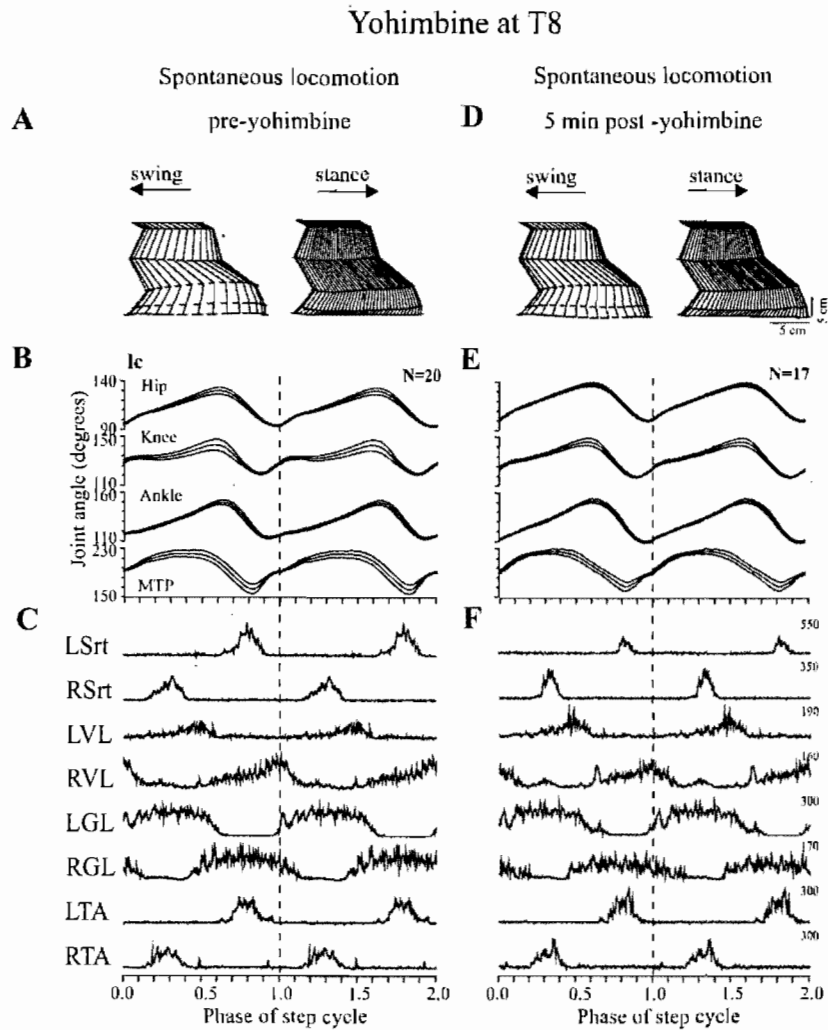


Figure 4. Effects of yohimbine injected intraspinally at T8 in cat H. Same display as Fig. 3. A-C: SL before any drug injection (20 step cycles). D-F: SL 5 min after yohimbine (17 step cycles).

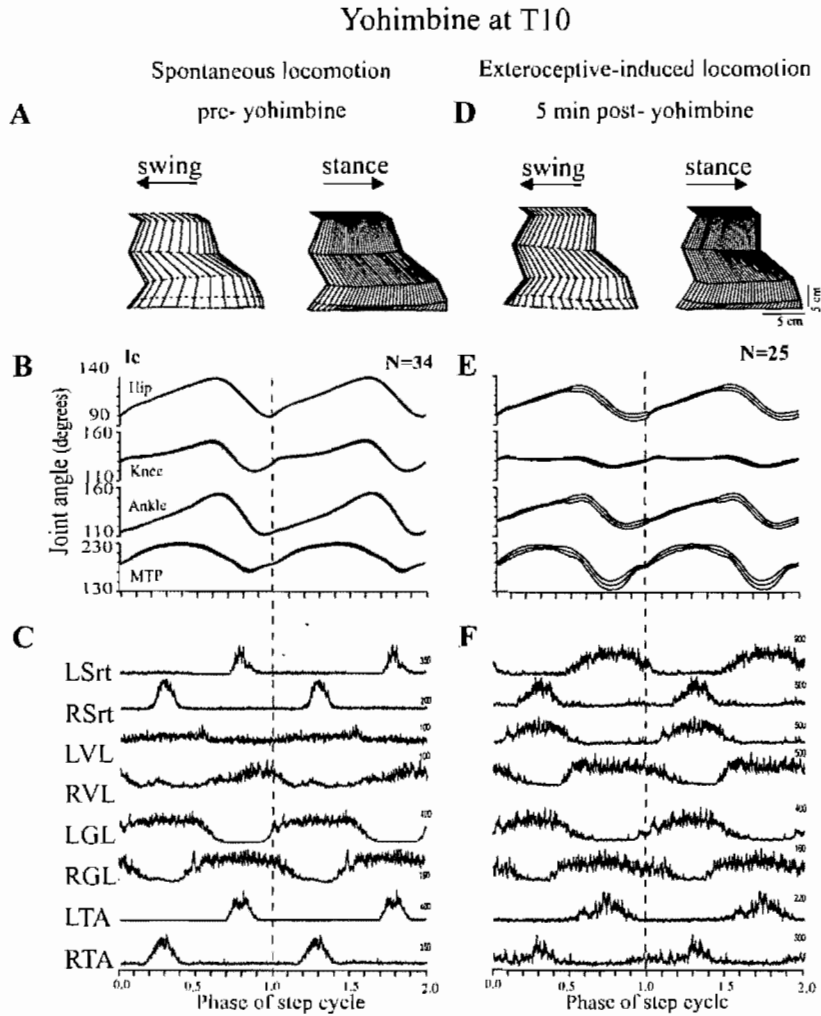


Figure 5. Effects of yohimbine injected intraspinally at T10 in cat H. Same display as Fig. 3. A-C: SL before any drug injection (34 step cycles). D-F: EL 5 min after yohimbine (25 step cycles).

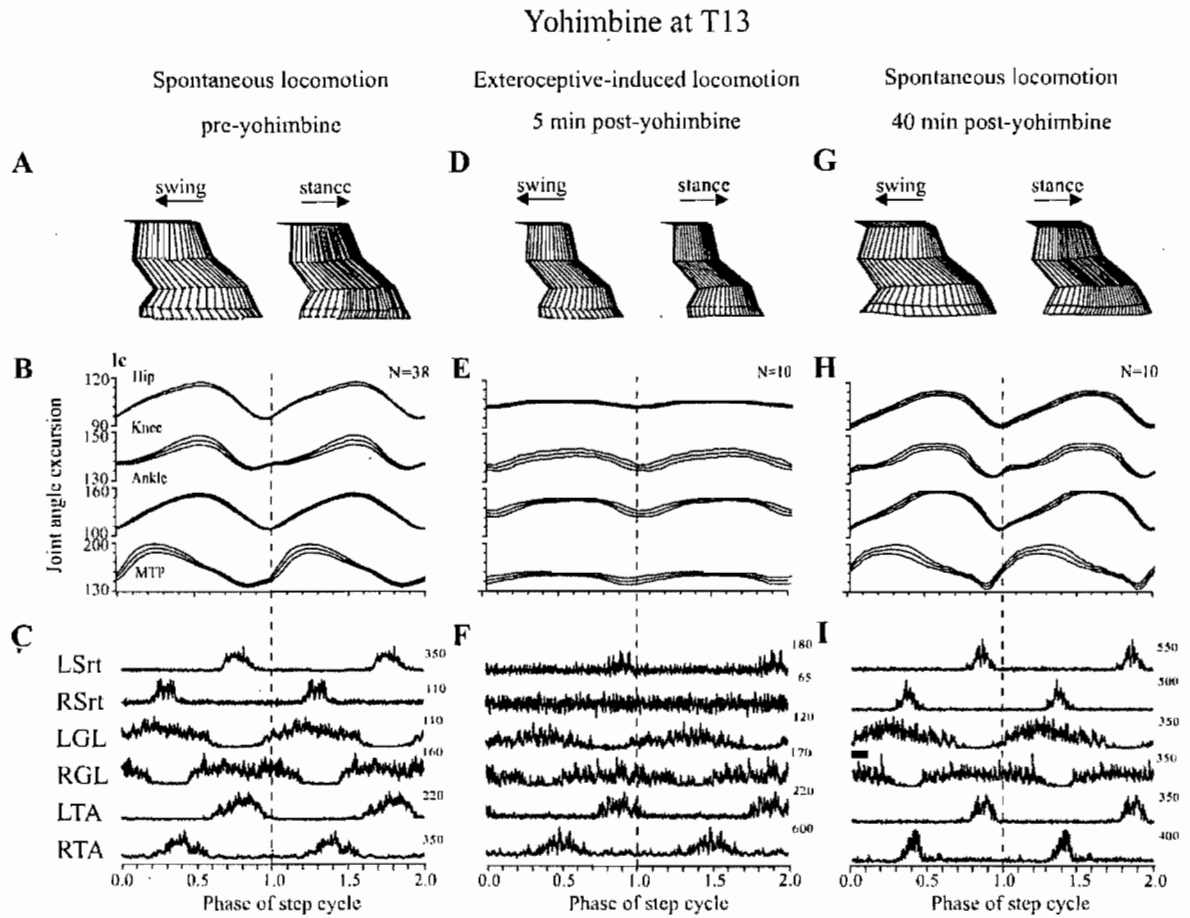


Figure 6. Effects of yohimbine injected intraspinally at T13 in cat H. Same display as Fig. 3. A-C: SL before any drug injection for a sequence of 38 step cycles. D-F: EL 5 min after yohimbine (10 step cycles). G-I: Recovery of SL 40 min after yohimbine (10 step cycles).

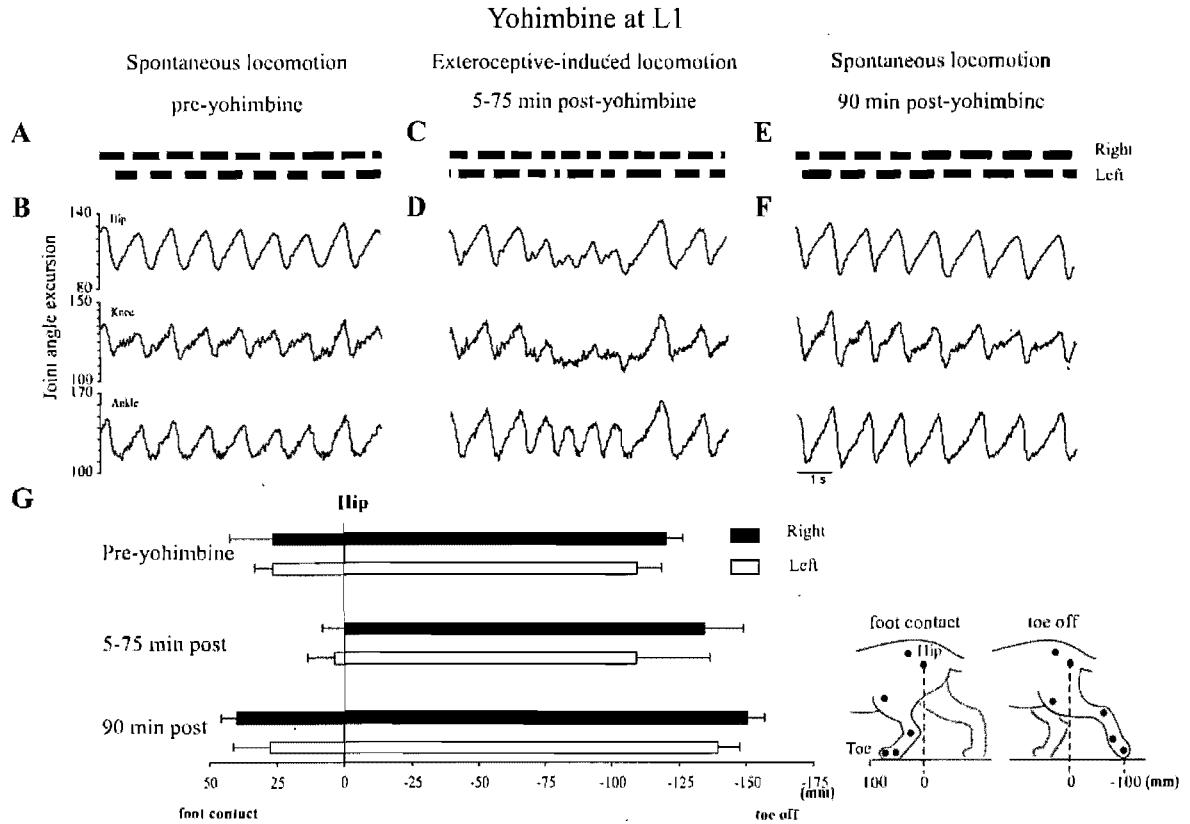


Figure 7. Examples of locomotor deficits observed following intraspinally injected yohimbine at L1 in cat L. A-B: SL before drug injection (9 step cycles). C-D: EL 5 min after yohimbine (8 step cycles) (same results were observed from 5 to 75 min). E-F: Recovery of SL 90 min after yohimbine (8 step cycles). A-C-E: Duty cycle at 0.3 m/s. Black bars represent the stance phase of each step cycle. B-D-F: Raw joint angular excursion of the hip, the knee and the ankle of the left hindlimb for the same step cycles as A-C-E. G: Bar diagram of the position of the toe relative to the hip (vertical line at 0, see insert) at the foot contact and at toe off, in the three situations.

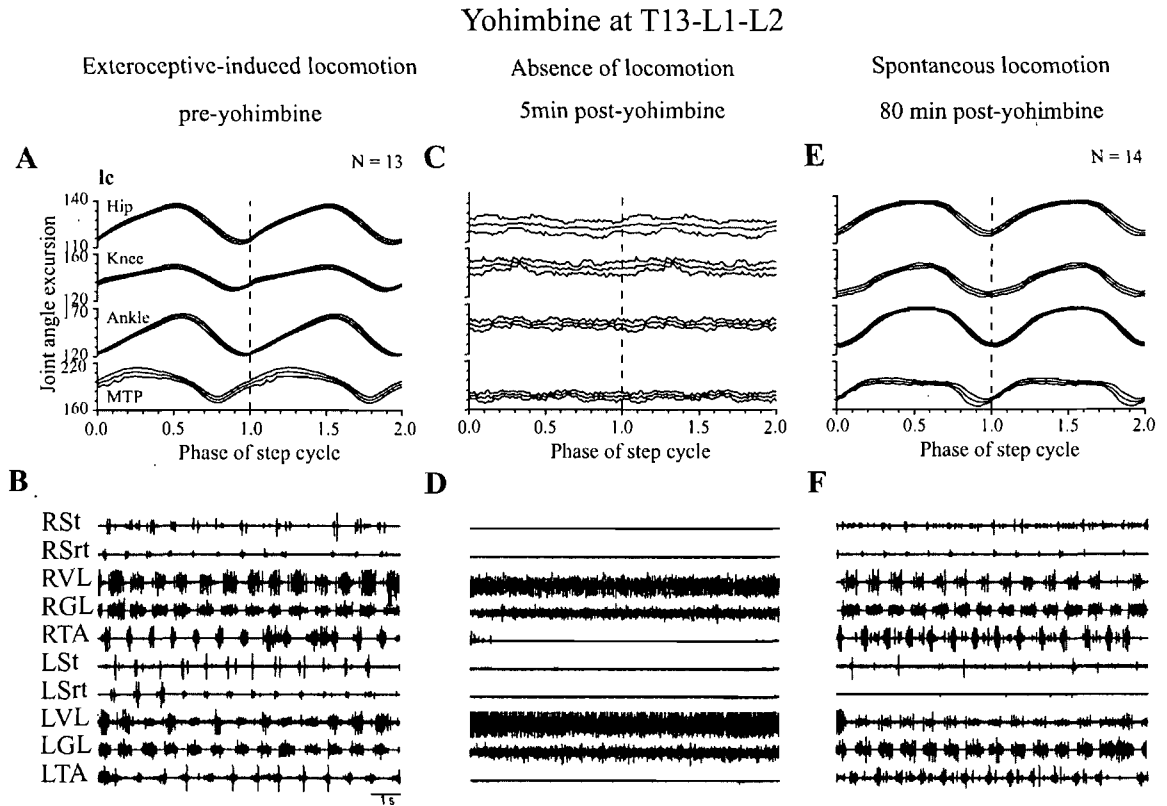


Figure 8. Effects of intraspinal injection of yohimbine in close succession at T13-L1-L2 in cat Q. A-C-E: Averaged joint angular excursion. B-D-F: Raw EMGs of hindlimb muscles of the same steps as A-C-E. A-B: EL before drug injection (13 step cycles). C-D: Absence of locomotion 5 min after yohimbine. E-F: Recovery of SL 80 min after yohimbine (14 step cycles).

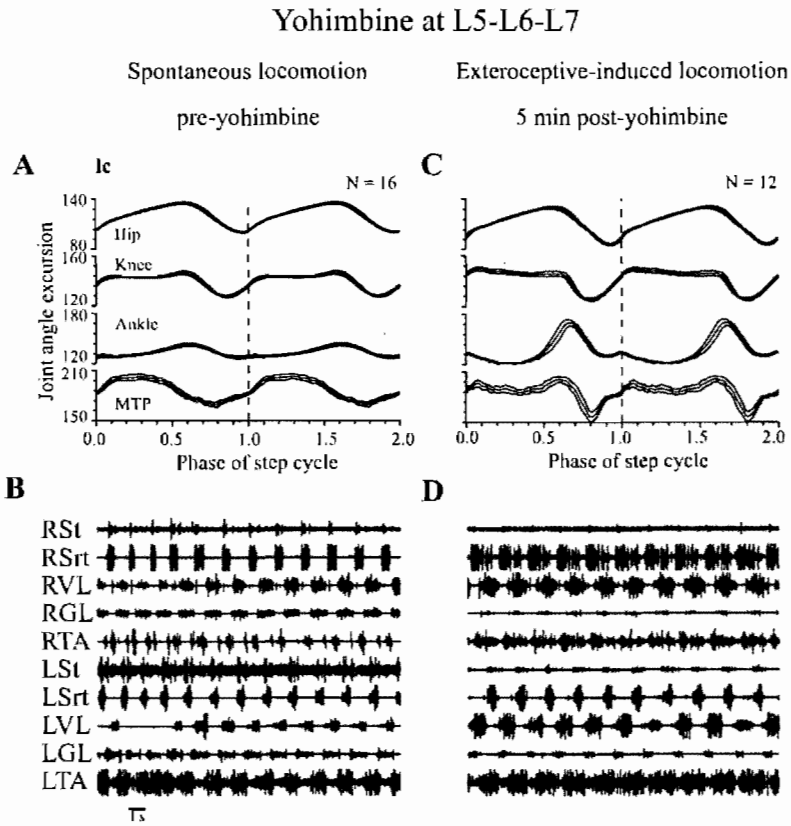


Figure 9. Effects of yohimbine intraspinally injected in close succession at L5-L6-L7 in cat S. Same display as Fig. 8. A-B: SL before drug injection (16 step cycles). C-D: EL 5 min after yohimbine (12 step cycles).

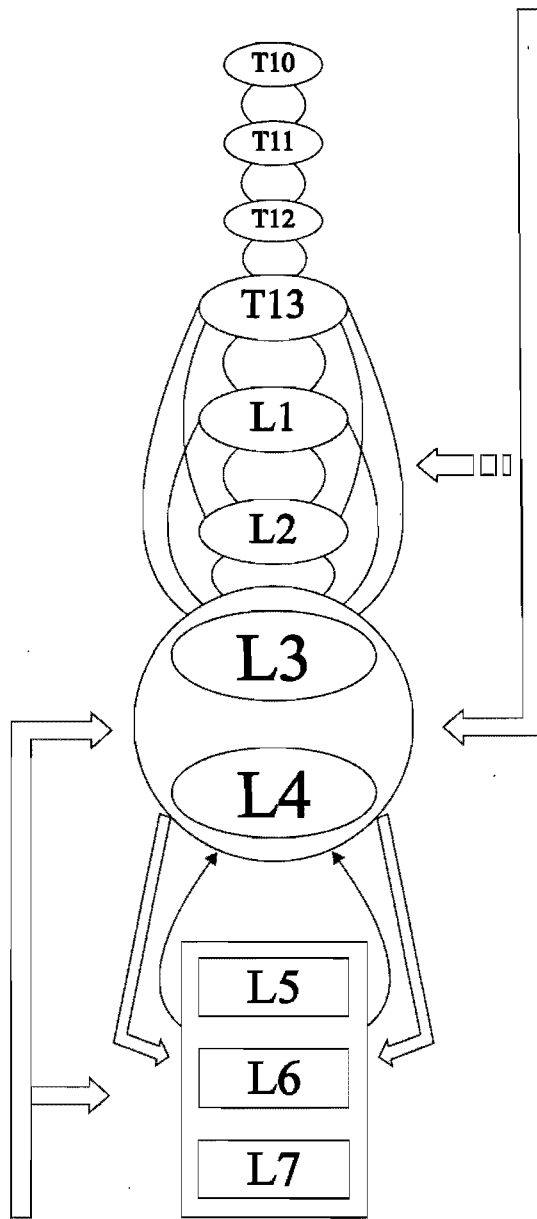


Figure 10. Block diagram of a hypothetical functional organization of the locomotor network and its inputs. Lines represent functional link between different segments. The size of the oval segments represents their relative importance in the rythmogenesis of locomotion in decerebrate cat. The large grey circle surrounding L3-L4 represents a spinal region whose

integrity is essential for locomotor rhythmogenesis in the hindlimbs. Rectangles represent segments containing motoneuronal pool of the hindlimb muscles. Grey arrows represent the locomotor drive of L3-L4 segment on these more caudal segments containing hindlimb motoneuronal pool. Arrows on the left represent sensory inputs while arrows on the right represent known (solid) and hypothetical (dashed) descending inputs required for the expression of locomotion in decerebrate cat. Thin black arrow represents ascending inputs from lumbosacral segments to the more rostral lumbar segments. Note that this diagram does not illustrate all the inputs to the various segments but rather the inputs needed for locomotor rhythmogenesis. Similarly, the size of the elements illustrates their importance in rhythmogenesis rather than their importance in the actual generation of the locomotor pattern.

Segments	Trials	cat	Pre		Post-yohimbine					
			SL/trials	No effect	Block only SL	Recovery	Block SL deficit EL	Recovery	Block SL and EL	Recovery
T8	4	GH	4/4	4/4						
T10	2	HM	1/2	1/2	1/1	1/1				
T11	3	M	0/3	3/3						
T12	4	HL	4/4		4/4	4/4				
T13	6	DEHL	3/6				3/6	3/3	3/6	3/3
L1	4	IKL	3/4				4/4	3/4		
L2	6	JK	3/6				6/6	5/6		
L3	8	ABCDE	3/8						8/8	6/8
L4	4	CG	2/4						4/4	2/4
L5	4	CN	4/4		2/4	2/2	2/4	0/2		
L6	4	CN	3/4	1/4	1/3	1/1	2/4	0/2		
L7	3	CN	3/3		2/3	2/2	1/3	0/1		
T13-L1-L2	6	PQR	3/6				1/6	1/1	5/6	3/5
L5-L6-L7	4	ST	3/4		3/4	3/3	1/4	1/1		

Table 1. Effects of yohimbine injections at different spinal cord segments tested for each cats.

For each segment tested (Segments) the number of injections performed (trials) on each cat (cat) and the number of trials in which spontaneous locomotion (SL) was observed before injection (SL/trials) are indicated. Spontaneous locomotion was not always observed before each trial. In those cases, the effect of yohimbine injections was evaluated on the exteroceptive-induced locomotion (EL). Four different effects were observed: No effect (No effect); Spontaneous locomotion was blocked but exteroceptive stimulation could reinstate a similar pattern (Block only SL); Spontaneous locomotion is blocked and exteroceptive-induced locomotion (EL) showed deficits (Block SL deficit EL); Locomotion is completely abolished (Block SL and EL). For each category of effects the number of trials where it was observed and the number of trials where recovery of this particular effect was observed is indicated (recovery).



The American Physiological Society

9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3991, USA

Publications Department Phone: (301) 634-7070

Fax: (301) 634-7243

July 23, 2008

Mr. Hugo Delivet-Mongrain
Department of Physiology,
Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central,
Faculty of Medicine,
Université de Montréal,
P.O Box 6128, Station Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Dear Mr. Delivet-Mongrain:

The American Physiological Society grants you permission to use the following *Journal of Neurophysiology* article in your masters thesis for the University of Montréal:

Hugo Delivet-Mongrain, Hugues Leblond, and Serge Rossignol
Effects of localized intraspinal injections of a noradrenergic blocker on locomotion of high decerebrate cats
J Neurophysiol (June 11, 2008). doi:10.1152/jn.90454.2008

The University of Montréal and the Library and Archives Canada may produce and sell copies of your thesis on demand, but may not provide free internet downloads.

The American Physiological Society publication must be credited as the source with the words "used with permission" added when referencing the *J Neurophysiol* article.

Sincerely,

[information retirée / information withdrawn]

Ms. Margaret Reich
Director of Publications
The American Physiological Society

MR/pr

Chapitre 3 : Discussion et conclusion

Le but de l'étude présentée ici était de déterminer l'importance relative des mécanismes noradrénergiques au niveau de différents segments de la moelle épinière thoracique et lombaire pour la génération et la modulation du patron locomoteur chez le chat décérébré marchant spontanément sur tapis roulant. Nous avons montré, sur une telle préparation, que l'intégrité des récepteurs noradrénergiques alpha-2 des segments L3-L4 était essentielle à l'expression du patron locomoteur alors que les afférences noradrénergiques projetant vers d'autres segments adjacents y contribuait dans une moindre mesure. Nous discuterons maintenant de l'implication des segments pré-motoneuronaux et de l'organisation du réseau locomoteur à l'égard de la spécialisation des différentes régions de la moelle, afin de mieux comprendre comment nos injections intraspinales de yohimbine ont pu bloquer ou altérer l'expression du patron locomoteur. L'intégration des afférences supraspinales et périphériques au niveau des segments L3-L4 sera traitée dans un premier temps. Puis, nous discuterons de l'implication des segments plus rostraux pour l'expression du patron locomoteur. Finalement, la spécialisation de la moelle épinière à l'égard des autres systèmes de neurotransmetteurs sera abordée.

Intégration des afférences supraspinales et périphériques au niveau des segments L3-L4

Comme nous avons discuté dans l'introduction, il est indéniable que les segments mi-lombaires jouent un rôle central dans la rythmogenèse de la locomotion. Nous discuterons ici des expériences montrant que, en plus de ce rôle, les segments L3-L4 sont un lieu de convergence des différentes voies supraspinales et périphériques. En effet, une grande partie de l'intégration de ces afférences se fait au niveau des segments mi-lombaires, bien que les circuits des segments plus caudaux jouent également ce rôle.

Tout d'abord, notons que la plupart des afférences supraspinales sont intégrées au niveau des segments pré-motoneuronaux avant d'être relayées via un système propriospinal vers les motoneurones des pattes postérieures afin d'intégrer leurs influences au cycle locomoteur (McCrea, 1996). En effet, la stimulation de voies descendantes engendre différents effets en fonction de la phase du cycle de marche durant laquelle la stimulation est produite. Par exemple, la stimulation électrique de la RLM produit une excitation des motoneurones extenseurs durant la phase d'appuie et une inhibition durant la phase de balancement (Shefchyk et Jordan, 1985). Aussi, la stimulation électrique de la formation réticulée produit une coactivation des fléchisseurs et des extenseurs quand l'animal est au repos, mais une excitation phase-dépendante des fléchisseurs durant la locomotion (Drew et Rossignol, 1984). De plus, la réinitialisation du cycle locomoteur est une autre façon d'illustrer l'interaction entre les voies supraspinales et le réseau locomoteur spinal. La stimulation de la formation réticulée (Drew et Rossignol, 1984; Perreault et al., 1994) ou des noyaux vestibulaires (Russell et Zajac, 1979) produit une réinitialisation du cycle de marche chez le chat décérébré.

Quelques exemples d'interneurones impliqués dans l'expression de la locomotion et l'intégration de différents inputs ont effectivement été identifiés dans les segments pré-motoneuronaux. Situé dans la partie latérale des laminae VII et VIII de L3-L4, des interneurones sont contactés par les voies cortico- et rubrospinale et leur axone emprunte le funicule latéral jusqu'au motoneurones (Kostyuk et al., 1971). D'autres interneurones recevant des inputs des voies réticulo- et vestibulospinale qui modulent l'activité des motoneurones de pattes postérieures via le funicule ventral ont été identifiés au niveau des régions ventromédianes des segments L3-L4 (Krutki et al., 2003; Vasilenko et Kostyukov, 1976). De plus, ces interneurones sont modulés par le système noradrénergique. L'activation de neurones commissuraux par la voie réticulospinale est déprimée par la clonidine (Hammar et al., 2007). La voie réticulospinale étant impliquée dans l'initiation de la locomotion, la modulation de cette population d'interneurones a pu être compromise lors des injections intraspinales de yohimbine à L3-L4. De façon plus générale, les

interneurones situés au niveau des segments mi-lombaires semblent donc formés un système propriospinal relayant l'information vers les motoneurones et l'intégrant au différentes phases du cycle de marche.

Au sujet de l'intégration des afférences périphériques, il a été montré que les segments mi-lombaires (L3-L5) contiennent également des interneurones ayant des connexions directes excitatrices et inhibitrices sur les motoneurones des pattes postérieures, qui sont activés par les afférences du groupe I et II (Edgley et Jankowska, 1987a; Edgley et Jankowska, 1987b). Par exemple, les afférences de type Ia et II de la hanche, input nécessaire à l'initiation de la phase de balancement (Sherrington, 1910b; Grillner et Rossignol, 1978), projettent vers le segment L4 (Jankowska, 1992). De plus, nous savons que ces interneurones sont probablement impliqués dans l'expression du patron locomoteur puisqu'ils sont actifs durant la locomotion du chat décérébré induite par stimulation électrique de la RLM (Edgley et al., 1988; Shefchyk et al., 1990). Ces interneurones spinaux situés dans les segments mi-lombaires (L3-L5) nous intéressent d'autant plus qu'ils sont modulés par des inputs noradrénergiques. Par exemple, l'administration de noradrénaline (NA) déprime l'activité des interneurones Ia et Ia/Ib (Hammar et Jankowska, 2003). Aussi, le système noradrénergique ferait contact, au niveau des segments mi-lombaires, avec des interneurones de la voie des afférences de type II (Maxwell et al., 2000). En effet, l'activation d'interneurones commissuraux par les afférences de type II est déprimée par la noradrénaline (Hammar et al., 2004). Finalement, notons que la stimulation du locus coeruleus/subcoeruleus, déprime la transmission des afférences de type II au niveau des segments mi-lombaires (Noga et al., 1992). L'intégration de certaines afférences sensorielles impliquées dans le contrôle de la locomotion des membres postérieurs semble donc se faire au niveau des segments pré-motoneuronaux. Et puisqu'elles peuvent être modulées par le système noradrénergique, ces connexions ont également pu être affectées par des injections intraspinales de yohimbine effectuées au niveau mi-lombaire.

Cette convergence des différentes voies supraspinales et périphériques vers un système propriospinal intégrateur impliqué dans le contrôle des mouvements moteurs a également été décrite chez le chat au niveau membres antérieurs. Effectivement, un système propriospinal situé aux niveau des segments C3-C4, projetant vers les motoneurones des pattes antérieures situés aux segments C6-T1, est impliqué dans l'intégration des afférences des voies cortico-, rubro-, reticulo- and tecto-spinal lors de mouvements volontaires (Alstermark et al., 2007). La technique de marquage rétrograde à l'aide du WGA-HRP (wheat germ agglutinin avec horseradish peroxidase) montrait en effet que la population d'interneurones faisant connexions avec les motoneurones caudaux était principalement situé à C3-C4, mais aussi à C2 et C5 (Alstermark et Kummel, 1990). Différentes sous-populations d'interneurones de ce système propriospinal jouent un rôle spécifique de médiateur des différentes afférences supraspinales. Il a été montré chez le chat que des lésions spécifiques interrompant les connexions entre les voies supraspinales et le réseau d'interneurones de C3-C4 ou celle entre ce réseau et les populations de motoneurones des pattes antérieurs empêchaient les mouvements d'atteintes ou du moins y engendraient d'importants déficits (Alstermark et al., 1981b). En plus de jouer un rôle de médiateur des commandes motrices, ce système propriospinal renvoie vers les centres supérieurs des projections les informant des afférences sensorielles périphériques. Par exemple, il a été montré que les informations ascendantes provenant des neurones de C3-C4 jouaient un rôle important dans le contrôle du cervelet sur les mouvements des membres antérieurs (Alstermark et al., 1981a). Des projections ascendantes de ce système rejoindraient également la formation réticulée, mais leurs rôles restent obscurs. De plus, ce système module également l'influence des afférences périphériques sur les motoneurones en régulant l'activité des interneurones inhibiteurs Ia, montrant la diversité des rôles jouer par les interneurones situés à C3-C4. Cette organisation ressemble précisément à ce que nous avons décrit pour les segments L3-L4 au sujet de la modulation de la locomotion des membres postérieurs par l'intégration des afférences supraspinales et périphériques.

Implication des segments lombaires rostraux à L3-L4 et des segments thoraciques dans l'expression du patron locomoteur

Bien qu'il a été montré que les segments rostral à L3 ne sont pas nécessaire à l'expression du patron locomoteur une fois que le chat spinal ait récupéré ses capacités locomotrices (Langlet et al., 2005), nos expériences montrent que ces segments y sont impliqués avant la réorganisation du réseau locomoteur.

Très peu d'informations sont connues sur le rôle de ces segments au sujet de l'expression de la locomotion. Pourtant, il y a plus de cent ans, des expériences sur différents réflexes des pattes postérieures d'animaux spinaux démontraient qu'il existe des interconnexions entre les segments thoraciques et les segments lombaires (Sherrington et Laslett, 1903). Plus récemment, Shik réalisa des expériences fort intéressantes sur l'initiation de la locomotion chez le chat. Ces résultats suggéraient l'existence d'une relation entre les systèmes propriospinal et réticulospinal au niveau thoracique de la moelle épinière (Shik, 1997). En stimulant la région motrice mésencéphalique (MLR) il évoquait la locomotion, mais réalisa qu'une transection du funicule ventrolatéral (VLF) arrêta cette locomotion, alors que la transection du funicule dorsolatéral (DLF) ne l'altérait en rien. Cependant, en stimulant directement DLF, il obtenait de la locomotion. Il exécuta par la suite une transection bilatérale de DLF et VLF au niveau cervical et il obtint une locomotion en stimulant DLF caudalement à cette lésion suggérant qu'il s'agit de voies uniquement descendantes. Afin de mieux comprendre cette organisation, il réalisa une transection de DLF au niveau lombaire rostral et stimula DLF dans un premier temps au niveau thoracique rostral et ensuite au niveau thoracique caudal. Dans les deux cas, ces stimulations engendraient une locomotion. Ainsi, ces expériences sur l'initiation de la locomotion chez les chats suggéraient l'existence de neurones supraspinaux dont les axones, qui descendent via les voies ventrales du funicule latéral, font contact, au niveau

thoracique, avec des interneurons qui projettent à leur tour via les voies dorsales du funicule latéral vers les motoneurons lombaires.

Ces résultats, au sujet du déclenchement de la locomotion, suggérant l'implication d'une interaction entre une voie supraspinale et un système propriospinal au niveau thoracique, pourraient expliquer la diminution de l'excitabilité et l'observation des déficits locomoteurs engendrés par nos injections intraspinales de yohimbine au niveau des segments thoraciques et rostraux à L3-L4. Puisque la yohimbine antagonise les récepteurs noradrénergiques alpha-2, nous avons bloqué, au niveau de ces segments, un input noradrénergique impliqué dans le déclenchement et l'expression de la locomotion. Sachant que le locus coeruleus est la principale source de noradrénaline libérée dans la moelle, il est raisonnable de croire que, la voie coeruleospinale pourrait également participer à l'initiation de la locomotion en contactant un réseau propriospinal situé rostralement à L3-L4. À la lumière des expériences décrites ci-haut, deux raisons principales justifient cette hypothèse. Premièrement, il a été proposé que, en plus d'activer des neurones réticulospinaux (Garcia-Rill et Skinner, 1987), le déclenchement de la locomotion par la stimulation de la RLM pourrait également impliquer l'activation de neurones noradrénergiques non-myélinisés de la voie coeruleospinale (Shik, 1983). Deuxièmement, tout comme la voie réticulospinale, le locus coeruleus projette vers la moelle épinière via le funicule ventrolatéral (Stevens et al., 1985). Ces observations nous laissent croire que, en plus de la voie réticulospinale, la voie coeruleospinale ait pu être également affectée par les différentes lésions réalisées par Shik.

L'existence d'un réseau propriospinal impliqué dans l'expression de la locomotion a également été mise en évidence chez le rat nouveau-né. Bien que les segments L1-L2 chez le rat soient essentiels à l'expression du patron locomoteur (voir introduction), il existe des interconnexions impliquées dans l'expression du patron locomoteur entre tous les segments thoraciques, lombaires et sacrés de la moelle, comme le montre la propagation métachronale de l'activation des motoneurons dans ces différents segments (Cazalets,

2005; Falgairolle et Cazalets, 2007). Une locomotion induite pharmacologiquement et enregistrée au niveau lombaire était abolie si la transmission synaptique était supprimée au niveau thoracique, suggérant l'importance du système propriospinal thoracique pour la transmission des voies descendantes impliquées dans l'activation du réseau locomoteur (Zaporozhets et al., 2006). De plus, suite à une première hémisection latérale entre C1 et T3 et une deuxième hémisection contralatérale entre T5 et mi-L1, la stimulation de la voie bulbospinale pouvait générer un rythme locomoteur, confirmant que ce réseau propriospinal était suffisant à la transmission la commande bulbospinale déclenchant la locomotion (Cowley et al., 2008). D'autres études utilisant des microstimulations intraspinales (MSIS) arrivaient aux mêmes conclusions. Chez le rat spinal (T8-T9), des MSIS à T10-T12 améliorait les capacités locomotrices de l'animal (Yakovenko et al., 2007). Les auteurs suggéraient que les MSIS stimulait, au niveau thoracique, un réseau propriospinal qui à son tour participait à l'activation du réseau locomoteur. Un réseau propriospinal d'interneurones au niveau thoracique capable de relayer les afférences supraspinales et participant à la récupération de la locomotion a également été mis en évidence chez la souris (Courtine et al., 2008).

Bien qu'il soit connu que des terminaisons noradrénergiques aboutissent au niveau thoracique de la moelle épinière du chat (Mizukawa, 1980) et du rat (Fritschy et al., 1987), nous ne savons pas si ces connexions sont impliquées dans l'expression du patron locomoteur. Les résultats obtenus dans l'étude présentée ici montrent qu'il serait possible que des cellules situées au niveau caudal de la moelle thoracique et répondant aux stimulations noradrénergiques puissent participer à l'expression du patron locomoteur. Des neurones appartenant à d'autres systèmes de neurotransmetteurs ont pour leur part été identifiés, notamment au niveau thoracique (voir prochaine section).

Spécialisation des différentes régions médullaires à l'égard des systèmes sérotoninergique et cholinergique

Plusieurs cellules propriospinales répondant aux stimulations sérotoninergique ou cholinergique et participant à l'expression du patron locomoteur ont été identifiées dans différentes régions de la moelle épinière du rat nouveau-né, notamment au niveau thoracique (voir paragraphes suivants). Ainsi, la spécialisation des différentes régions de la moelle épinière peut également être mise en évidence par l'administration d'agents pharmacologiques. La distribution des différents récepteurs pourrait expliquer en partie cette spécialisation.

Tout d'abord, notons que différents systèmes de neurotransmetteurs appliqués localement à différentes régions de la moelle épinière n'ont pas tous le même pouvoir d'induction de la locomotion. Par exemple, chez le rat nouveau-né, l'administration de 5-HT seule peut induire des rythmes locomoteurs lorsque appliquée au niveau caudal de la moelle thoracique ou rostral de la moelle lombaire, mais pas au niveau caudal de la moelle lombaire (Cowley et Schmidt, 1997), alors qu'un cocktail 5-HT / NMDA ou un mélange d'acétylcholine avec un inhibiteur de l'acétylcholine estérase peut induire des rythmes locomoteurs lorsque appliqué au niveau rostral ou caudal de la moelle épinière lombaire (Cowley et Schmidt, 1997; Kjaerulff et Kiehn, 1996; Gabbay et al., 2002).

En effet, la sérotonine, par exemple, n'est pas libérée de façon homogène dans les différentes régions de la moelle épinière. Bien que des neurones actifs durant une locomotion induite par la 5-HT ont été identifiés de T11 à L6 chez le rat nouveau-né (Cina et Hochman, 2000), la libération de la sérotonine n'est pas uniforme. Lors d'une locomotion induite par stimulation électrique du tronc cérébral, les principaux sites où la sérotonine est relâchée se situent principalement au niveau caudal de la moelle thoracique (T12-T13) et aussi au niveau des segments lombaire (L3-L4) (Jordan et Schmidt, 2002). La

distribution des sous-types de récepteurs sérotoninergiques pouvant déclencher la locomotion lorsqu'ils sont activés, varie également dans l'axe rostro-caudal. Le sous-type 5-HT7 est principalement distribué entre les segments thoraciques et les segments rostraux de la moelle lombaire, alors que le sous-type 5-HT2A est principalement retrouvé au niveau des segments L3-L4, chez le rat nouveau-né (Jordan et Schmidt, 2002).

La spécialisation des différentes régions de la moelle peut également être mise en évidence par les différentes cellules propriospinales répondant aux stimulations cholinergiques qui sont aussi impliquées dans l'expression du patron locomoteur chez le rat. Par exemple, le sous-type muscarinique des récepteurs cholinergiques semble particulièrement important pour l'induction de la locomotion puisque bloquer spécifiquement ces récepteurs par l'administration d'atropine suffit à abolir le rythme locomoteur induit par l'ACh (Smith et al., 1988). Ce sous-type de récepteurs serait spécialement important pour transmettre les inputs cholinergiques nécessaires à la coordination entre les membres postérieurs et les membres antérieurs. En effet, l'administration d'ACh produit des rythmes locomoteurs synchronisés entre les membres (Cowley et Schmidt, 1994). Des cellules pourvues de récepteurs muscariniques responsables de cette coordination seraient situées au niveau thoracique, puisque l'administration localisée d'atropine aux segments mi-thoraciques abolit la coordination entre rythmes enregistrés au niveau cervical et ceux des segments lombaires (Jordan et Schmidt, 2002).

Ces études renforcent l'idée de la spécialisation des différentes régions de la moelle épinière et de la distribution hétérogène des différents récepteurs d'un segment à l'autre de la moelle. Il serait donc intéressant de connaître la distribution des récepteurs noradrénergiques α -2 dans les différents segments thoraciques et lombaires de la moelle épinière du chat, ce qui nous permettrait de raffiner l'interprétation de nos résultats. De plus, les résultats que nous avons obtenus dans l'étude présentée ici auraient peut-être été différents si d'autres types de récepteurs avaient été visés. Il serait donc intéressant de

reproduire nos expériences avec des antagonistes sérotoninergique et cholinergique, afin de déterminer l'importance de ces différents inputs pour l'expression de la locomotion du chat. Il serait également intéressant d'utiliser des agents GABAergiques et glutamatergiques bloquant l'activité des réseaux spinaux à différents segments afin de déterminer, à l'égard de l'expression du patron locomoteur, le rôle spécifique des circuits neuronaux situés dans différentes régions de la moelle épinière.

En conclusion, rappelons que l'étude présentée ici montre que l'intégrité des récepteurs noradrénergiques alpha-2 situé au niveau des segments mi-lombaire est essentielle à l'expression du patron locomoteur chez le chat décérébré. Nos résultats montrent aussi que les afférences noradrénergiques projetant vers les segments adjacents à L3-L4 participent également à la pleine expression de la locomotion. Ces observations nous permettent de mieux comprendre l'organisation et la localisation du réseau locomoteur.

Bibliographie

1. Alstermark, B., Isa, T., Pettersson, L. G., et Sasaki, S. (2007). The C3-C4 propriospinal system in the cat and monkey: a spinal pre-motoneuronal centre for voluntary motor control. *Acta Physiol (Oxf)*, 189, 123-140.
2. Alstermark, B. et Kummel, H. (1990). Transneuronal transport of wheat germ agglutinin conjugated horseradish peroxidase into last order spinal interneurons projecting to acromio- and spinodeltoideus motoneurons in the cat 2. Differential labelling of interneurons depending on movement type. *Experimental Brain Research*, 80, 96-103.
3. Alstermark, B., Lindstrom, S., Lundberg, A., et Sybirska, E. (1981a). Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 8. Ascending projection to the lateral reticular nucleus from C3-C4 propriospinal neurones also projecting to forelimb motoneurons. *Experimental Brain Research*, 42, 282-298.
4. Alstermark, B., Lundberg, A., Norrsell, U., et Sybirska, E. (1981b). Integration in descending motor pathways controlling the forelimb in the cat. 9. Differential behavioural defects after spinal cord lesions interrupting defined pathways from higher centres to motoneurons. *Experimental Brain Research*, 42, 299-318.
5. Armstrong, D. M. (1986). Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat. *Prog. Neurobiol.*, 26, 273-361.

6. Babu, R. S. et Namasivayam, A. (2008). Recovery of bipedal locomotion in bonnet macaques after spinal cord injury: footprint analysis. *Synapse*, 62, 432-447.
7. Ballion, B., Morin, D., et Viala, D. (2001). Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat. *Eur.J Neurosci.*, 14, 1727-1738.
8. Barbeau, H., Julien, C., et Rossignol, S. (1987). The effects of clonidine and yohimbine on locomotion and cutaneous reflexes in the adult chronic spinal cat. *Brain Research*, 437, 83-96.
9. Barbeau, H. et Rossignol, S. (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Research*, 412, 84-95.
10. Barbeau, H. et Rossignol, S. (1991). Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Research*, 546, 250-260.
11. Barbeau, H. et Rossignol, S. (1994). Enhancement of locomotor recovery following spinal cord injury. *Curr.Opin.Neurol.*, 7, 517-524.
12. Barrière, G., Mellen, N., et Cazalets, J. R. (2004). Neuromodulation of the locomotor network by dopamine in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur.J Neurosci.*, 19, 1325-1335.

13. Barthelemy, D., Leblond, H., et Rossignol, S. (2007). Characteristics and mechanisms of locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation in spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 97, 1986-2000.
14. Bedard, P. J., Tremblay, L. E., Barbeau, H., Filion, M., Maheux, R., Richards, C. L., et Dipaolo, T. (1987). Action of 5-hydroxytryptamine, substance P, thyrotropin-releasing hormone and clonidine on motoneurone excitability. *Canadian journal of neurological sciences*, 14, 506-509.
15. Bertrand, S. et Cazalets, J. R. (2002). The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur.J.Neurosci.*, 16, 1741-1750.
16. Bertrand, S. et Cazalets, J. R. (2003). The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the isolated spinal cord of newborn rat. *Eur.J.Neurosci.*, 16, 1741-1750.
17. Brown, T. G. (1911). The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proc.Roy.Soc.London B.*, 84, 308-319.
18. Brustein, E. et Rossignol, S. (1998). Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. I. Deficits and adaptive mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, 80, 1245-1267.

19. Bussel, B., Roby-Brami, A., Azouvi, P., Biraben, A., Yakovleff, A., et Held, J. P. (1988a). Myoclonus in a patient with a spinal cord section. Possible involvement of the spinal stepping generator. *XXXth.Int Cong.Physiol.Sci.Vancouver.*
20. Bussel, B. C., Roby-Brami, A., Yakovleff, A., et Bennis, N. (1988b). Evidences for the presence of a spinal stepping generator in patients with a spinal cord section. Dans B.Amblard, A. Berthoz, et F. Clarac (Eds.), *Posture and gait: development, adaptation and modulation* (pp. 273-278). North Holland: Elsevier.
21. Calancie, B., Needham-Shropshire, B., Jacobs, P., Willer, K., Zych, G., et Green, B. A. (1994). Involuntary stepping after chronic spinal cord injury.Evidence for a central rhythm generator for locomotion in man. *Brain, 117*, 1143-1159.
22. Cazalets, J. R. (2000). Organization of the spinal locomotor network in neonatal rat. Dans R.G.Kalb et S. M. Strittmater (Eds.), *Neurobiology of spinal cord injury* (pp. 89-111). Totowa N.J.: Humana Press.
23. Cazalets, J. R. (2005). Metachronal propagation of motoneurone burst activation in isolated spinal cord of newborn rat. *J.Physiol, 568*, 583-597.
24. Cazalets, J. R., Borde, M., et Clarac, F. (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *Journal of Neuroscience, 15*, 4943-4951.

25. Cazalets, J. R., Grillner, P., Menard, I., Cremieux, J., et Clarac, F. (1990). Two types of motor rhythm induced by NMDA and amines in an in vitro spinal cord preparation of neonatal rat. *Neurosci.Lett.*, *111*, 116-121.
26. Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., et Clarac, F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *Journal of Physiology*, *455*, 187-204.
27. Chau, C., Barbeau, H., et Rossignol, S. (1998a). Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, *79*, 392-409.
28. Chau, C., Barbeau, H., et Rossignol, S. (1998b). Effects of intrathecal α_1 - and α_2 -noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, *79*, 2941-2963.
29. Chau, C., Giroux, N., Reader, T. A., Marcoux, J., and Rossignol, S. (2000). Segmental and laminar distribution of α_2 -adrenergic receptors in cat lumbo-sacral spinal cord following complete lesions. *Society for Neuroscience Abstracts*, *26*, 695.
30. Chau, C., Provencher, J., Lebel, F., Jordan, L., Barbeau, H., and Rossignol, S. (1994). Effects of intrathecal injection of NMDA receptor agonist and antagonist on locomotion of adult chronic spinal cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, *20*, 573, no 214.14.
31. Cina, C. et Hochman, S. (2000). Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin- evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, *423*, 590-602.

32. Commissiong, J. W., Hellstrom, S. O., et Neff, N. H. (1978). A new projection from locus coeruleus to the spinal ventral columns: histochemical and biochemical evidence. *Brain Research*, 148, 207-213.
33. Courtine, G., Song, B., Roy, R. R., Zhong, H., Herrmann, J. E., Ao, Y., Qi, J., Edgerton, V. R., et Sofroniew, M. V. (2008). Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat.Med.*, 14, 69-74.
34. Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (1994). A comparison of motor patterns induced by N-methyl-D-aspartate, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Neurosci.Lett.*, 171, 147-150.
35. Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (1997). Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 77, 247-259.
36. Cowley, K. C., Zaporozhets, E., et Schmidt, B. J. (2008). Propriospinal neurons are sufficient for bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord. *J.Physiol*, 586, 1623-1635.
37. Dahlstrom, A. et Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20, 398-399.
38. Delcomyn, F. (1980). Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science*, 210, 492-498.

39. Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N., et Pavlova, G. A. (1983). The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Experimental Brain Research*, 53, 81-90.
40. Delivet-Mongrain, H., Leblond, H., and Rossignol, S. (2006). Effects of intraspinal injections of yohimbine in thoracic and lumbar segments on the spontaneous locomotion of decerebrate cats. *Society for Neuroscience Abstracts, Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA*, 648.8.
41. Delivet-Mongrain, H., Leblond, H., et Rossignol, S. (2008). Effects of localized intraspinal injections of a noradrenergic blocker on locomotion of high decerebrate cats. *Journal of Neurophysiology*.
42. Dimitrijevic, M. R., Gerasimenko, Y., et Pinter, M. M. (1998). Evidence for a spinal central pattern generator in humans. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 860, 360-376.
43. Douglas, J. R., Noga, B. R., Dai, X., et Jordan, L. M. (1993). The effects of intrathecal administration of excitatory amino acid agonists and antagonists on the initiation of locomotion in the adult cat. *Journal of Neuroscience*, 13, 990-1000.
44. Drew, T., Jiang, W., Kably, B., et Lavoie, S. (1996). Role of the motor cortex in the control of visually triggered gait modifications. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 74, 426-442.
45. Drew, T., Prentice, S., et Schepens, B. (2004). Cortical and brainstem control of locomotion. *Prog.Brain Res.*, 143, 251-261.

46. Drew, T. et Rossignol, S. (1984). Phase-dependent responses evoked in limb muscles by stimulation of medullary reticular formation during locomotion in thalamic cats. *Journal of Neurophysiology*, 52, 653-675.
47. Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987a). An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *Journal of Physiology*, 389, 647-674.
48. Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987b). Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord. *Journal of Physiology*, 385, 393-413.
49. Edgley, S. A., Jankowska, E., et Shefchyk, S. (1988). Evidence that mid-lumbar neurones in reflex pathways from group II afferents are involved in locomotion in the cat. *Journal of Physiology*, 403, 57-71.
50. Engberg, I. et Lundberg, A. (1969). An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiol Scand.*, 75, 614-630.
51. English, A. W. et Weeks, O. I. (1987). An anatomical and functional analysis of cat biceps femoris and semitendinosus muscles. *J.Morphol.*, 191, 161-175.
52. Falgairolle, M. et Cazalets, J. R. (2007). Metachronal coupling between spinal neuronal networks during locomotor activity in newborn rat. *J.Physiol*, 580, 87-102.

53. Fedirchuk, B., Nielsen, J., Petersen, N., et Hultborn, H. (1998). Pharmacologically evoked fictive motor patterns in the acutely spinalized marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Exp Brain Res.*, 122, 351-361.
54. Forssberg, H. et Grillner, S. (1973). The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Research*, 50, 184-186.
55. Forssberg, H., Grillner, S., et Halbertsma, J. (1980a). The locomotion of the low spinal cat. I. Coordination within a hindlimb. *Acta Physiol Scand.*, 108, 269-281.
56. Forssberg, H., Grillner, S., Halbertsma, J., et Rossignol, S. (1980b). The locomotion of the low spinal cat: II. Interlimb coordination. *Acta Physiol Scand.*, 108, 283-295.
57. Forssberg, H., Grillner, S., et Rossignol, S. (1977). Phasic gain control of reflexes from the dorsum of the paw during spinal locomotion. *Brain Research*, 132, 121-139.
58. Fritschy, J. M., Lyons, W. E., Mullen, C. A., Kosofsky, B. E., Molliver, M. E., et Grzanna, R. (1987). Distribution of locus coeruleus axons in the rat spinal cord: a combined anterograde transport and immunohistochemical study. *Brain Research*, 437, 176-180.
59. Fung, S. I., Chan, J. Y., Manzoni, D., White, S. R., Lai, Y. Y., Strahlendorf, H. K., Zhuo, H., Liu, R. H., Reddy, V. K., et Barnes, C. D. (1994). Cotransmitter-mediated locus coeruleus action on motoneurons. *Brain Res. Bull.*, 35, 423-432.

60. Gabbay, H., Delvolve, I., et Lev-Tov, A. (2002). Pattern generation in caudal-lumbar and sacrococcygeal segments of the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 88, 732-739.
61. Garcia-Alias, G., Valero-Cabre, A., Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E., et Navarro, X. (2006b). Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Res.*, 1108, 195-204.
62. Garcia-Alias, G., Valero-Cabre, A., Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E., et Navarro, X. (2006a). Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Res.*, 1108, 195-204.
63. Garcia-Rill, E. et Skinner, R. D. (1987). The mesencephalic locomotor region ii. Projections to reticulospinal neurons. *Brain Research*, 411, 13-20.
64. Garcia-Rill, E., Skinner, R. D., Gilmore, S. A., et Owings, R. (1983). Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). II. Afferents and efferents. *Brain Res. Bull.*, 10, 63-71.
65. Gimenez y Ribotta, M., Provencher, J., Feraboli-Lohnherr, D., Rossignol, S., Privat, A., et Orsal, D. (2000). Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *Journal of Neuroscience*, 20, 5144-5152.

66. Giroux, N., Chau, C., Barbeau, H., Reader, T. A., et Rossignol, S. (2003). Effects of intrathecal glutamatergic drugs on locomotion. II. NMDA and AP-5 in intact and late spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, *90*, 1027-1045.
67. Giroux, N., Reader, T. A., et Rossignol, S. (2001). Comparison of the effect of intrathecal administration of clonidine and yohimbine on the locomotion of intact and spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, *85*, 2516-2536.
68. Giroux, N., Rossignol, S., et Reader, T. A. (1999). Autoradiographic study of α_1 -, α_2 -Noradrenergic and Serotonin $1A$ receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *Journal of Comparative Neurology*, *406*, 402-414.
69. Goldberg, M. R. et Robertson, D. (1983). Yohimbine: A pharmacological probe for study of the α_2 -adrenoreceptor. *Pharmacol. Rev.*, *35*, 143-180.
70. Grillner, S. (1975). Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol. Rev.*, *55*, 247-304.
71. Grillner, S. (1981). Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. Dans J.M. Brookhart et V. B. Mountcastle (Eds.), *Handbook of physiology. The nervous system II*. (pp. 1179-1236). Bethesda, Maryland: Amer. Physiol. Soc.
72. Grillner, S. et Rossignol, S. (1978). On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats. *Brain Research*, *146*, 269-277.

73. Grillner, S. et Zangger, P. (1975). How detailed is the central pattern generation for locomotion? *Brain Research*, 88, 367-371.
74. Grillner, S. et Zangger, P. (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Experimental Brain Research*, 34, 241-261.
75. Halbertsma, J. M. (1983). The stride cycle of the cat: the modelling of locomotion by computerized analysis of automatic recordings. *Acta Physiol Scand., Suppl.* 521, 1-75.
76. Hammar, I., Bannatyne, B. A., Maxwell, D. J., Edgley, S. A., et Jankowska, E. (2004). The actions of monoamines and distribution of noradrenergic and serotonergic contacts on different subpopulations of commissural interneurons in the cat spinal cord. *Eur.J.Neurosci.*, 19, 1305-1316.
77. Hammar, I. et Jankowska, E. (2003). Modulatory effects of alpha 1-, alpha 2-, and beta -receptor agonists on feline spinal interneurons with monosynaptic input from group I muscle afferents. *Journal of Neuroscience*, 23, 332-338.
78. Hammar, I., Stecina, K., et Jankowska, E. (2007). Differential modulation by monoamine membrane receptor agonists of reticulospinal input to lamina VIII feline spinal commissural interneurons. *Eur.J.Neurosci.*, 26, 1205-1212.
79. Hinsey, J. C., Ranson, S. W., et McNattin, R. F. (1930). The role of the hypothalamus and mesencephalon in locomotion. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 23, 1-43.

80. Jankowska, E. (1992). Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog. Neurobiol.*, 38, 335-378.
81. Jankowska, E. (2008). Spinal interneuronal networks in the cat: elementary components. *Brain Res. Rev.*, 57, 46-55.
82. Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S., et Lundberg, A. (1967a). The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol Scand.*, 70, 369-388.
83. Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S., et Lundberg, A. (1967b). The effects of DOPA on the spinal cord. 6. Half centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiol Scand.*, 70, 389-402.
84. Jankowska, E. et Skoog, B. (1986). Labelling of midlumbar neurones projecting to cat hindlimb motoneurons by transneuronal transport of a horseradish peroxidase conjugate. *Neurosci. Lett.*, 71, 163-168.
85. Jiang, W. et Drew, T. (1996). Effects of bilateral lesions of the dorsolateral funiculi and dorsal columns at the level of the low thoracic spinal cord on the control of locomotion in the adult cat: I. Treadmill walking. *Journal of Neurophysiology*, 76, 849-866.
86. Jordan, L. M., Liu, J., Hedlund, P. B., Akay, T., et Pearson, K. G. (2008). Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res. Rev.*, 57, 183-191.

87. Jordan, L. M., Pratt, C. A., et Menzies, J. E. (1979). Locomotion evoked by brain stem stimulation: occurrence without phasic segmental afferent input. *Brain Research*, 177, 204-207.
88. Jordan, L. M. et Schmidt, B. J. (2002). Propriospinal neurons involved in the control of locomotion: potential targets for repair strategies. *Prog. Brain Res.*, 125-139.
89. Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 279-306.
90. Kiehn, O. et Butt, S. J. (2003). Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog. Neurobiol.*, 70, 347-361.
91. Kiehn, O. et Kjaerulff, O. (1996). Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat. *Journal of Neurophysiology*, 75, 1472-1482.
92. Kiehn, O., Sillar, K. T., Kjaerulff, O., et McDearmid, J. R. (1999). Effects of noradrenaline on locomotor rhythm-generating networks in the isolated neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 82, 741-746.
93. Kjaerulff, O. et Kiehn, O. (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro*: a lesion study. *Journal of Neuroscience*, 16, 5777-5794.

94. Kostyuk, P. G., Vasilenko, D. A., et Lang, E. (1971). Propriospinal pathways in the dorsolateral funiculus and their effects on lumbosacral motoneuronal pools. *Brain Research*, 28, 233-249.
95. Kremer, E. et Lev-Tov, A. (1997). Localization of the spinal network associated with generation of hindlimb locomotion in the neonatal rat and organization of its transverse coupling system. *J Neurophysiol*, 77, 1155-1170.
96. Krutki, P., Jankowska, E., et Edgley, S. A. (2003). Are crossed actions of reticulospinal and vestibulospinal neurons on feline motoneurons mediated by the same or separate commissural neurons? *Journal of Neuroscience*, 23, 8041-8050.
97. Kudo, N. et Yamada, T. (1987). N-Methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord -hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro. *Neurosci.Lett.*, 75, 43-48.
98. Kuypers, H. G. J. M. (1981). Anatomy of the descending pathways. Dans J.M.Brookhart et V. B. Mountcastle (Eds.), *Handbook of physiology-The system nervous III* (pp. 597-665). Maryland: Amer.Physiol.Soc.
99. Lafreniere-Roula, M. et McCrea, D. A. (2005). Deletions of rhythmic motoneuron activity during fictive locomotion and scratch provide clues to the organization of the mammalian central pattern generator. *J Neurophysiol*, 94, 1120-1132.

100. Lambert, G. A., Lang, W. J., Friedman, E., Meller, E., et Gershon, S. (1978). Pharmacological and biochemical properties of isomeric yohimbine alkaloids. *Eur.J Pharmacol.*, 49, 39-48.
101. Langlet, C., Leblond, H., et Rossignol, S. (2005). The mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 93, 2474-2488.
102. Leblond, H., L'Espérance, M., Orsal, D., et Rossignol, S. (2003). Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse. *Journal of Neuroscience*, 23, 11411-11419.
103. Leblond, H., Marcoux, J., and Rossignol, S. (2001a). The relative importance of midlumbar segments in real and fictive locomotion of spinal cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 27.
104. Leblond, H., Ménard, A., et Gossard, J.-P. (2000). Bulbospinal control of spinal cord pathways generating locomotor extensor activities in the cat. *Journal of Physiology*.
105. Leblond, H., Menard, A., et Gossard, J.-P. (2001b). Corticospinal control of locomotor pathways generating extensor activities in the cat. *Experimental Brain Research*, 138, 173-184.
106. Leblond, H. and Rossignol, S. (2003). Intraspinal injections of yohimbine in midlumbar segments block spontaneous decerebrate locomotion in cats. *Soc.Neurosci Abstr.*, *Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: , online, 276.1.

107. Lennard, P. R. et Hermanson, J. W. (1985). Central reflex modulation during locomotion. *TINS*, 8, 483-486.
108. Lundberg, A. (1981). Half-centres revisited. Dans J.Szentagothai, M. Palkovits, et J. Hamori (Eds.), *Regulatory functions of the CNS.Principles of motion and organization.Adv. Physiol. Sci. vol.1* (pp. 155-167). Budapest: Pergamon Press.
109. Magnuson, D. S., Trinder, T. C., Zhang, Y. P., Burke, D., Morassutti, D. J., et Shields, C. B. (1999). Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Exp.Neurol.*, 156, 191-204.
110. Magnuson, D. S. K., Lovett, R., Coffee, C., Gray, R., Han, Y. C., Zhang, Y. P., et Burke, D. A. (2005a). Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat. *Journal of Neurotrauma*, 22, 529-543.
111. Magnuson, D. S. K., Lovett, R., Coffee, C., Gray, R., Han, Y. C., Zhang, Y. P., et Burke, D. A. (2005b). Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat. *Journal of Neurotrauma*, 22, 529-543.
112. Majczynski, H., Cabaj, A., Slawinska, U., et Gorska, T. (2006). Intrathecal administration of yohimbine impairs locomotion in intact rats. *Behavioral Brain Research*, 175, 315-322.
113. Marcoux, J. et Rossignol, S. (2000). Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *Journal of Neuroscience*, 20, 8577-8585.

114. Matsuyama, K. et Drew, T. (2000a). Vestibulospinal and Reticulospinal Neuronal Activity During Locomotion in the Intact Cat. I. Walking on a Level Surface. *Journal of Neurophysiology*, 84, 2237-2256.
115. Matsuyama, K. et Drew, T. (2000b). Vestibulospinal and Reticulospinal Neuronal Activity During Locomotion in the Intact Cat. II. Walking on an Inclined Plane. *Journal of Neurophysiology*, 84, 2257-2276.
116. Maxwell, D. J., Riddell, J. S., et Jankowska, E. (2000). Serotonergic and noradrenergic axonal contacts associated with premotor interneurons in spinal pathways from group II muscle afferents. *Eur.J.Neurosci.*, 12, 1271-1280.
117. McCrea, D. A. (1996). Supraspinal and segmental interactions. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 74, 513-517.
118. McCrea, D. A. (2001). Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *J.Physiol*, 533, 41-50.
119. McCrea, D. A. et Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res.Rev.*, 57, 134-146.
120. Mizukawa, K. (1980). The segmental detailed topographical distribution of monoaminergic terminals and their pathways in the spinal cord of the cat. *Anat.Anz.*, 147, 125-144.

121. Mori, S., Matsuyama, K., Kohyama, J., Kobayashi, Y., et Takakusaki, K. (1992). Neuronal constituents of postural and locomotor control systems and their interactions in cats. *Brain Dev.*, *14*, S109-S120.
122. Noga, B. R., Bras, H., et Jankowska, E. (1992). Transmission from group II muscle afferents is depressed by stimulation of locus coeruleus/subcoeruleus, Kolliker-Fuse and raphe nuclei in the cat. *Experimental Brain Research*, *88*, 502-516.
123. Orlovsky, G. N. (1969). Spontaneous and induced locomotion of the thalamic cat. *Biophysics*, *14*, 1154-1162.
124. Orlovsky, G. N. (1972). The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion. *Brain Research*, *40*, 359-371.
125. Orlovsky, G. N., Deliagina, T. G., & Grillner, S. (1999). *Neuronal control of locomotion: from mollusc to man*. New York: Oxford University Press.
126. Orlovsky, G. N. et Shik, M. L. (1976). Control of locomotion: a neurophysiological analysis of the cat locomotor system. Dans R. Portez (Ed.), *International review of physiology. Neurophysiology II*. (pp. 281-309). Baltimore: University Park Press.
127. Pearson, K. G. et Rossignol, S. (1991). Fictive motor patterns in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, *66*, 1874-1887.
128. Perreault, M.-C., Rossignol, S., et Drew, T. (1994). Microstimulation of the medullary reticular formation during fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology*, *71*, 229-245.

129. Perret, C. et Cabelguen, J.-M. (1976). Central and reflex participation in the timing of locomotor activations of a bifunctional muscle, the semi-tendinosus, in the cat. *Brain Research*, 106, 390-395.
130. Philippon, M. (1905). L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux. *Trav.Lab.Physiol.Inst.Solvay (Bruxelles.)*, 7, 1-208.
131. Pratt, C. A. et Loeb, G. E. (1991). Functionally complex muscles of the cat hindlimb. I. Patterns of activation across sartorius. *Experimental Brain Research*, 85, 243-256.
132. Riddell, J. S. et Hadian, M. (2000). Interneurones in pathways from group II muscle afferents in the lower-lumbar segments of the feline spinal cord. *Journal of Physiology*, 522.1, 109-123.
133. Rossignol, S. (1996). Neural control of stereotypic limb movements. Dans L.B.Rowell et J. T. Sheperd (Eds.), *Handbook of Physiology, Section 12. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems* (pp. 173-216). New York: Oxford University Press.
134. Rossignol, S. (2000). Locomotion and its recovery after spinal injury. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 10, 708-716.
135. Rossignol, S. (2006). Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/ or peripheral lesions in the adult mammals. *Phil Trans.R.Soc.B*, 361, 1647-1671.

136. Rossignol, S., Bélanger, M., Chau, C., Giroux, N., Brustein, E., Bouyer, L., Grenier, C.-A., Drew, T., Barbeau, H., et Reader, T. (2000). The spinal cat. Dans R.G.Kalb et S. M. Strittmatter (Eds.), *Neurobiology of spinal cord injury* (pp. 57-87). Totowa: Humana Press.
137. Rossignol, S., Bouyer, L., Barthélemy, D., Langlet, C., et Leblond, H. (2002a). Recovery of locomotion in the cat following spinal cord lesions. *Brain Res.Rev.*, 40, 257-266.
138. Rossignol, S., Bouyer, L., Langlet, C., Barthélemy, D., Chau, C., Giroux, N., Brustein, E., Marcoux, J., Leblond, H., et Reader, T. A. (2004a). Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat. *Prog.Brain Res.*, 143, 163-172.
139. Rossignol, S., Brustein, E., Bouyer, L., Marcoux, J., Barthélemy, D., Langlet, C., et Leblond, H. (2004b). Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82, 617-627.
140. Rossignol, S., Chau, C., Brustein, E., Bélanger, M., Barbeau, H., et Drew, T. (1996). Locomotor capacities after complete and partial lesions of the spinal cord. *Acta Neurobiol.Exp.*, 56, 449-463.
141. Rossignol, S., Chau, C., Giroux, N., Brustein, E., Bouyer, L., Marcoux, J., Langlet, C., Barthélemy, D., Provencher, J., Leblond, H., Barbeau, H., et Reader, T. A. (2002b). The cat model of spinal injury. *Prog.Brain Res.*, 137, 151-168.

142. Rossignol, S., Drew, T., Brustein, E., et Jiang, W. (1999). Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat. *Prog. Brain Res.*, 123, 349-365.
143. Rossignol, S. et Dubuc, R. (1994). Spinal pattern generation. *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 894-902.
144. Rossignol, S., Dubuc, R., et Gossard, J. P. (2006). Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev.*, 86, 89-154.
145. Rossignol, S., Giroux, N., Chau, C., Marcoux, J., Brustein, E., et Reader, T. A. (2001). Pharmacological aids to locomotor training after spinal injury in the cat. *J. Physiol*, 533, 65-74.
146. Rossignol, S., Lund, J. P., et Drew, T. (1988). The role of sensory inputs in regulating patterns of rhythmical movements in higher vertebrates. A comparison between locomotion, respiration and mastication. Dans A. Cohen, S. Rossignol, et S. Grillner (Eds.), *Neural control of rhythmic movements in vertebrates* (pp. 201-283). New York: Wiley and sons Co.
147. Roudet, C., Mouchet, P., Feuerstein, C., et Savasta, M. (1994a). Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. *J. Neurosci. Res.*, 39, 319-329.

148. Roudet, C., Mouchet, P., Feuerstein, C., et Savasta, M. (1994b). Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: a quantitative autoradiographic study. *J.Neurosci.Res.*, 39, 319-329.
149. Russell, D. F. et Zajac, F. E. (1979). Effects of stimulating Deiter's nucleus and medial longitudinal fasciculus on the timing of the fictive locomotor rhythm induced in cats by DOPA. *Brain Research*, 17, 588-592.
150. Rybak, I. A., Shevtsova, N. A., Lafreniere-Roula, M., et McCrea, D. A. (2006). Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *J Physiol*, 577, 617-639.
151. Shefchyk, S., McCrea, D. A., Kriellaars, D., Fortier, P., et Jordan, L. (1990). Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Experimental Brain Research*, 80, 290-295.
152. Shefchyk, S. J., Jell, R. M., et Jordan, L. M. (1984). Reversible cooling of the brainstem reveals areas required for mesencephalic locomotor region evoked treadmill locomotion. *Experimental Brain Research*, 56, 257-262.
153. Shefchyk, S. J. et Jordan, L. M. (1985). Excitatory and inhibitory post-synaptic potentials in alpha-motoneurons produced during fictive locomotion by stimulation of the mesencephalic locomotor region. *Journal of Neurophysiology*, 53, 1345-1355.

154. Sherrington, C. S. (1910a). Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *Journal of Physiology*, 40, 28-121.
155. Sherrington, C. S. (1910b). Remarks on the reflex mechanism of the step. *Brain*, 33, 1-25.
156. Sherrington, C. S. et Laslett, E. E. (1903). Observations on some spinal reflexes and the interconnection of spinal segments. *Journal of Physiology*, 29, 58-96.
157. Shik, M. L. (1983). Action of the brainstem locomotor region on spinal stepping generators via propriospinal pathways. Dans C.C.Kao, R. P. Bunge, et P. J. Reier (Eds.), *Spinal cord reconstruction* (pp. 421-434). New York: Raven Press.
158. Shik, M. L. (1997). Recognizing propriospinal and reticulospinal systems of initiation of stepping. Dans Human kinetics publishers inc (Ed.), *Motor control* (pp. 310-313).
159. Shik, M. L. et Orlovsky, G. N. (1976). Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol.Rev.*, 56, 465-500.
160. Shik, M. L., Severin, F. V., et Orlovsky, G. N. (1966). Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics*, 11, 756-765.
161. Sirota, M. G. et Shik, M. L. (1973). Locomotion of the cat on stimulation of the mesencephalon. *Fiziol.Zh.SSSR Im I.M.Sechenova*, 59, 1314-1321.

162. Smith, J. C., Feldman, J. L., et Schmidt, B. J. (1988). Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. *Federation Proc*, 2, 2283-2288.
163. Sqalli-Houssaini, Y. et Cazalets, J. R. (2000). Noradrenergic control of locomotor networks in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. *Brain Research*, 852, 100-109.
164. Sqalli-Houssaini, Y., Cazalets, J. R., et Clarac, F. (1993). Oscillatory properties of the central pattern generator for locomotion in neonatal rats. *Journal of Neurophysiology*, 70, 803-813.
165. Steeves, J. D. et Jordan, L. M. (1980). Localization of a descending pathway in the spinal cord which is necessary for controlled treadmill locomotion. *Neurosci.Lett.*, 20, 283-288.
166. Steeves, J. D. et Jordan, L. M. (1984). Autoradiographic demonstration of the projections from the mesencephalic locomotor region. *Brain Research*, 307, 263-276.
167. Steeves, J. D., Jordan, L. M., et Lake, N. (1975). The close proximity of catecholamine-containing cells to the 'mesencephalic locomotor region' (MLR). *Brain Research*, 100, 663-670.
168. Steeves, J. D., Schmidt, B. J., Skovgaard, B. J., et Jordan, L. M. (1980). Effect of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine depletion on locomotion in the cat. *Brain Research*, 185, 349-362.

169. Stevens, R. T., Apkarian, A. V., et Hodge, C. J., Jr. (1985). Funicular course of catecholamine fibers innervating the lumbar spinal cord of the cat. *Brain Research*, 336, 243-251.
170. Vanderhorst, V. G. J. M. et Holstege, G. (1997). Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 382, 46-76.
171. Vasilenko, D. A. et Kostyukov, A. I. (1976). Brain stem and primary afferent projections to the ventromedial group of propriospinal neurones in the cat. *Brain Research*, 117, 141-146.
172. Vidal, C., Viala, D., et Buser, P. (1979). Central locomotor programming in the rabbit. *Brain Research*, 168, 57-73.
173. Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., et Coulter, J. D. (1982). Descending noradrenergic projections and their spinal terminations. *Prog. Brain Res.*, 57, 219-238.
174. Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., et Coulter, J. D. (1983). Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Research*, 263, 15-31.
175. Whelan, P. J. (1996). Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog. Neurobiol.*, 49, 481-515.

176. Whelan, P. J., Hiebert, G. W., et Pearson, K. G. (1995). Stimulation of the group I extensor afferents prolongs the stance phase in walking cats. *Experimental Brain Research*, 103, 20-30.
177. Yakovenko, S., Kowalczewski, J., et Prochazka, A. (2007). Intraspinal stimulation caudal to spinal cord transections in rats. Testing the propriospinal hypothesis. *Journal of Neurophysiology*, 97, 2570-2574.
178. Yakovenko, S., Mushahwar, V., VanderHorst, V., Holstege, G., et Prochazka, A. (2002). Spatiotemporal activation of lumbosacral motoneurons in the locomotor step cycle. *Journal of Neurophysiology*, 87, 1542-1553.
179. Yu, J. et Eidelberg, E. (1981). Effects of vestibulospinal lesions upon locomotor function in cats. *Brain Research*, 220, 179-183.
180. Zangger, P. (1981). The effect of 4-aminopyridine on the spinal locomotor rhythm induced by L-Dopa. *Brain Research*, 215, 211-223.
181. Zaporozhets, E., Cowley, K. C., et Schmidt, B. J. (2006). Propriospinal neurons contribute to bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord. *J.Physiol*, 572, 443-458.